

EHA105 感受态细胞

EHA105 Chemically Competent Cell

产品规格:

货号、数量、规格:	保存条件: -80°C
KW-96301 (10支100ul)	

基因型

C58 (rif^R) Ti pEHA105 (pTiBo542DT-DNA) (strep^R)
Succinamopine

简要说明

我公司EHA105菌株由EHA105菌株改造而来，为C58型背景，核基因中含有筛选标签——利福平抗性基因rif，为了便于转化操作，此菌株携带一无自身转运功能的琥珀碱型Ti质粒pEHA105 (pTiBo542DT-DNA)，此质粒含有vir基因 (vir基因是T-DNA插入植物基因组必需的元件，pEHA105 (pTiBo542DT-DNA)质粒自身的T-DNA转移功能被破坏，但可以帮助转入的双元载体T-DNA顺利转移)。pEHA105 (pTiBo542DT-DNA)型Ti质粒含有筛选标签: strep，赋予EHA105菌株链霉素抗性，适用于水稻、烟草等植物的转基因操作，经pCAMBIA2301质粒检测转化效率可达 10^4 cfu/ μ g。

操作说明

1. 取-80℃保存的农杆菌感受态于冰上待其部分融化，处于冰水混合状态时插入冰中。
2. 每100 μl感受态加1ug（体积不大于10ul）质粒DNA，用手拨打管底混匀，依次于冰上静置5分钟、液氮5分钟、28℃水浴5分钟、冰浴5分钟。
3. 加入700 μl无抗生素的LB或YEB液体培养基，于28℃振荡培养2~3小时。
4. 6000rpm离心一分钟收菌，留取100 μl左右上清轻轻吹打重悬菌块涂布于含相应抗生素的LB或YEB平板上，倒置放于28℃培养箱培养2-3天（当平板只含有50ug/ml kan时，28℃培养48h即可；平板中同时加入50ug/ml kan，20ug/ml rif时，需28℃培养60h；如果使用的平板含有50ug/ml rif则需要28℃培养72-90h）。

注意事项

1. 加入质粒时体积不应大于感受态体积的1/10；质粒不纯或存在乙醇等有机物污染，转化效率急剧下降；质粒增大一倍，转化效率下降一个数量级。
2. 混入质粒时应轻柔操作。
3. 转化高浓度的质粒可相应减少最终用于涂板的菌量
4. 利福平浓度不应高于25ug/ul，过高的利福平浓度不利于农杆菌生长，会降低其生长速度和转化效率。本公司感受态计算转化效率时所用平板只含有50ug/ml kan，若所用平板含有20ug/ml rif则转化效率降低到1/2。
5. 培养基中加入利福平的目的是防止杂菌生长、筛选农杆菌；根据所用菌株抗性加入链霉素或庆大霉素可防止Ti质粒丢失，但链霉素不利于农杆菌的转基因操作，所以一般培养农杆菌时不考虑链霉素或庆大霉素，Ti质粒丢失的概率极低（可以忽略）。