

EHA105 (pSoup) 感受态细胞

EHA105(pSoup) Chemically Competent Cell

产品规格:

货号、数量、规格:	保存条件: -80℃
KW-96314 (10支100u1)	

基 因 型

C58 (rifR) Ti pEHA105 (pTiBo542DT-DNA) Succinamopine (pSoup-tetR)

简 要 说 明

EHA105菌株由EHA101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)。在EHA105菌株中转入help质粒：pSoup即为EHA105 (pSoup)菌株，可帮助pGreen, 62SK, pGs2系列质粒在农杆菌中复制，同时赋予该菌株四环素 (tet) 抗性，适用于水稻、烟草等植物的转基因操作。EHA105 (pSoup)化学转化感受态细胞经特殊工艺制作，pCAMBIA2301 (卡那霉素抗性)质粒检测转化效率 >10⁴ cfu/μg DNA。

操作说明

1. 取-80℃保存的农杆菌感受态于室温或手心片刻待其部分融化，处于冰水混合状态时插入冰中。
2. 每100 μ l感受态加入0.01-1 μ g质粒DNA（转化效率较高，第一次使用前最好做预实验确定所加质粒的量），用手拨打管底混匀，依次于冰上静置5分钟、液氮5分钟、37℃水浴5分钟、冰浴5分钟。
3. 加入700 μ l无抗生素的LB或YEB液体培养基，于28℃振荡培养2~3小时。
4. 6000 rpm离心一分钟收菌，留取100 μ l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50 μ g/ml kan 时，28℃培养48 h即可；平板中同时加入50 μ g/ml kan, 20 μ g/ml rif 时，需28℃培养60 h；如果使用的平板含有50 μ g/ml rif 则需要28℃培养72-90 h）。

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. 转化高浓度的质粒可相应减少最终用于涂板的菌量，本公司生产的GV3101(pJIC SA_Rep)感受态细胞具有四环素抗性，但在转入目标质粒涂板筛选阳性克隆时，只需加入目标质粒抗性的抗生素，不加四环素。
3. 平板上阳性克隆密度过大时，由于营养不足，阳性克隆生长变慢，菌落变小，为了获得大的菌落，应减少质粒用量。

4. 利福平浓度不应高于25 $\mu\text{g/ml}$ ，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。
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，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