



EHA105 Chemically Competent Cell

产品货号： NGC201

产品规格： 100μl/支

基因型： C58 (rif^r) Ti pEHA105 (pTiBo542DT-DNA) Succinamopine

产品介绍：

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)。EHA105 菌株适用于水稻、烟草等植物的转基因操作。本公司生产的 EHA105 化学转化感受态细胞经特殊工艺制作，转化效率 $>10^4$ cfu/μg DNA。

操作方法：

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 μl 感受态加入 0.01-1 μg 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 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. 6000 rpm 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 50 μg/ml kan 时，28℃ 培养 48 h 即可；平板中同时加入 50 μg/ml kan，20 μg/ml rif 时，需 28℃ 培养 60 h；如果使用的平板含有 50 μg/ml rif 则需要 28℃ 培养 72-90 h)。

农杆菌相关抗生素配方：

抗生素	配方	原液	工作液
羧苄青霉素 (carb)	双蒸水溶解，0.22 μm 滤膜过滤除菌	50 mg/ml	50 μg/ml
硫酸卡那霉素 (kan)	双蒸水溶解，0.22 μm 滤膜过滤除菌	50 mg/ml	50 μg/ml
链霉素 (strep)	双蒸水溶解，0.22 μm 滤膜过滤除菌	10 mg/ml	50 μg/ml
利福平 (rif)	DMSO 溶解，0.22 μm 滤膜过滤除菌	10 mg/ml	20 μg/ml
庆大霉素 (gent)	双蒸水溶解，0.22 μm 滤膜过滤除菌	20 mg/ml	40 μg/ml

常用农杆菌抗性：(R：抗；S：敏感)

农杆菌菌株	羧苄青霉 (carb)	链霉素 (strep)	利福平 (rif)	庆大霉素 (gent)	硫酸卡那霉素 (kan)
AGL-1	R	S	R	S	S
EHA101	S	S	R	S	R
EHA105	S	S	R	S	S
LBA4404	S	R	R	S	S
GV3101	S	S	R	R	S

**LB 及 YEB 配方：**

component	LB(液体)/L	LB(固体)/L	component	YEB(液体)/L	YEB(固体)/L
Tryptone	10 g	10 g	Tryptone	5 g	5 g
Yeast extract	5 g	5 g	Yeast extract	1 g	1 g
NaCl	10 g	10 g	牛肉浸膏	5 g	5 g
NaOH	调 PH 到 7.0	调 PH 到 7.0	蔗糖	5 g	5 g
Agar	-	15 g	MgSO ₄ *7H ₂ O	0.49 g	0.49 g
			NaOH	调 PH 到 7.0	调 PH 到 7.0
			Agar	-	15 g

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。转化高浓度的质粒可相应减少最终用于涂板的菌量。
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 µg/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。本公司感受态计算转化效率时所用平板只含有 50 µg/ml kan，若所用平板含有 20 µg/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 Ti 质粒筛选抗生素可防止 Ti 质粒丢失，但 Ti 质粒筛选抗生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这些抗生素，Ti 质粒丢失的概率极低(可以忽略)。

保存条件：

-80℃保存 6 个月。