



EHA105 农杆菌电转感受态细胞

产品组成:

组成	BC307-01
EHA105 Electrocompetent cells	20×50μl
pCAMBIA2301 (10ng/μl)	1 支

储存条件: -70℃保存，避免反复冻融。

基因型: C58 (Rif^r) Ti pEHA105 (pTiBo542DT-DNA) (Str^r), Succinamopine type

产品说明:

EHA105由EHA101菌株改造而来(Hood et al., 1993)，为农杆菌C58型背景，核基因中含有利福平抗性基因(Rif)。此菌株还携带一种自身转运功能丧失的质粒(disarmed Ti plasmid)。EHA105菌株含有胭脂碱型Ti质粒pEHA105 (pTiBo542DT-DNA),该质粒含有vir基因(vir基因是TDNA插入植物基因组所必需的元件，pEHA105 (pTiBo542DT-DNA)质粒自身的T-DNA转移功能被破坏，但可辅助植物双元表达载体的T-DNA的转移)。pEHA105 (pTiBo542DT-DNA)质粒还含有Str抗性基因，赋予EHA105菌株链霉素抗性。EHA105农杆菌适用于水稻、烟草等植物的转基因操作。EHA105电转感受态特别适用于大质粒的转化，经pCAMBIA2301质粒检测转化效率大于10⁵ cfu/μg DNA。

操作方法:

1. 电极间距为0.1cm的电转杯 (Gene Pulser®/MicroPulser™ electroporation cuvettes) 插入碎冰中，压实冰面，冰中静置5分钟，使电转杯充分降温。(电转杯重复使用方法：每次用完后，用大量的自来水冲洗干净去掉菌液和DNA，用蒸馏水洗3遍，将其泡在75%乙醇中30分钟，取出杯子，沥干液体，放在超净台中，使乙醇充分挥发，盖上盖子放干燥地方备用。)
2. 取-70℃保存的农杆菌感受态插入冰中5分钟，待其融化，加入10ng-1μg质粒DNA (洗脱或溶解质粒的溶液中离子不能太高，可用双蒸水稀释。**第一次使用前最好做预实验确定所加质粒的最佳量**)，用手拨搅管底混匀，立即插入冰中，在超净台中用无菌吸头将感受态-质粒混合物快速移到电击杯中，盖上杯盖，空管保留待用。
3. 启动电转仪，设置电击参数：C=25μF，PC=200ohm，V=2.4KV (此参数为BioRad公司推荐，依据不同电转仪设置针对农杆菌合适的电击参数)。用纸巾擦掉电转杯外部的水分，将电转杯快速放入电转槽中进行电击步骤。电击完成后，将电转杯快速插入冰中，加入700μl无抗生素的LB并转移到原来保留的感受态空管中，28℃，150-200 rpm，振荡培养2-3小时。
4. 6000rpm离心一分钟收菌，留取200μl左右上清轻轻吹打重悬菌块，取100μl的菌液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50μg/ml Kan时，28℃培养48小时即

可；平板中同时加入50 μ g/ml Kan, 20 μ g/ml Rif时，需28 $^{\circ}$ C培养60小时；如果使用的平板含有50 μ g/ml Rif则需要28 $^{\circ}$ C培养72-90小时）。

注意事项：

1. 混入质粒时应轻柔操作，加入质粒的体积不大于感受态体积的1/10，质粒不纯或超大质粒会导致转化效率急剧下降。
2. 平板上菌落过多时，菌落很小。为了获得大的菌落，应减少质粒用量或减少涂布量，或将菌落转移到新平板上生长。
3. 利福平使用的工作浓度浓度不应高于25 μ g/ml，过高的利福平浓度会降低生长速度和转化效率。
4. 利福平具有防止杂菌生长筛选农杆菌的作用；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可不考虑添加链霉素或庆大霉素，Ti质粒丢失的概率极低（可忽略）。

Hood EE, Gelvin SB, Melchers S, Hoekema A (1993) New Agrobacterium helper plasmids for gene transfer to plants (EHA105). Trans Res 2:208-218

BM230130