



EHA105 农杆菌感受态细胞

产品信息:

组成	BC303-01
EHA105 Chemically Competent Cell	20×100μl
pCAMBIA2301 (100ng/μl)	1 支

储存条件: -70℃保存，避免反复冻融。

基因型:

C58 (rif^r) TipEHA105 (pTiBo542DT-DNA) (strep^R) 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)。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植物双元 pCAMBIA2301 质粒检测，转化效率可达 10^3 cfu/μg，-70℃保存 12 个月转化效率不发生改变。

转化方法 (采用冻融方法)

1. 取-70℃保存的 EHA105 农杆菌感受态细胞于冰水浴中融化；
2. 无菌条件下，向感受态细胞中加入 100ng-1μg 质粒 DNA (第一次使用前最好做预实验确定所加质粒的最佳量)，轻轻混匀，冰水浴中静置 5 分钟；
3. 将离心管置于液氮中速冻 5 分钟；(注：也可以用干冰和无水乙醇混合物代替液氮)
4. 然后快速将离心管置于 37℃水浴中保持 5 分钟，不要晃动水面；
5. 将离心管放回冰水浴中，冰浴 5 分钟；
6. 无菌条件下加入 800μl 无抗生素的 2xYT 或 LB 液体培养基，于 28℃振荡培养 2-3 小时，菌体复苏；
7. 6000rpm 离心 1 分钟收菌，留 100μl 左右上清，轻轻吹打重悬菌体，取适量菌液，涂布于相应抗生素的 LB 平板上，于 28℃培养箱中倒置培养 48-72 小时。

建议：(1) 利福平不利于农杆菌生长，会降低其生长速度和转化效率，仅使用质粒抗性即可。

例如对于Kan抗性质粒，使用Kan(50 μg/ml) 平板，28℃培养 48 h 即可；

对于Amp抗性质粒，使用Carb(50 μg/ml) 平板，28℃培养 48 h 即可。

(2) 摇菌时可加入Rif，工作浓度建议不超过25 μg/ml。

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. 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)。