



EHA105(pSoup)农杆菌感受态细胞

产品信息:

组成	BC313-01
EHA105(pSoup) Chemically Competent Cell	20×100μl
pGs2 (100ng/μl)	1 支

储存条件: -70℃保存，避免反复冻融。不适合在液氮中保存。

基因型: C58 (*rif^R*) *TipEHA105* (*pTiBo542DT-DNA*) (*strep^R*) *SuccinamopinepSoup* (*tet^R*)

产品介绍:

农杆菌EHA105(pSoup)菌株由EHA105菌株改造而来，为C58型背景，核基因中含有利福平抗性筛选基因*rif*。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)。一些缺失农杆菌复制相关元件 (如*pVS1*的复制起点REP区或*pVS1*质粒的STA区) 的表达质粒如pGreen、pGreenII-62SK和pGs2等不能在EHA105菌株中繁殖。pSoup辅助质粒可以帮助这些不完整双元表达质粒在农杆菌中的复制。EHA105(pSoup)菌株具有四环素 (Tet) 抗性。EHA105(pSoup)适用于水稻、烟草等植物的转基因操作。经植物表达质粒pGs2检测，转化效率可达10³ 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(pSoup)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，最好做一下预实验，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: 可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、SOB、SOC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) 平板或 Kan(50 μg/ml)+Tet(10 μg/ml)，28℃培养 48 h 即可;

对于Amp抗性质粒，使用Carb(50 μg/ml) 平板或 Carb(50 μg/ml)+Tet(10 μg/ml)，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)。
3. 相关抗生素配制及工作浓度
利福平 (Rif) 用DMSO配制成为20 mg/ml的储存液，工作浓度为20 μg/ml。盐酸四环素 (Tet) 用甲醇溶解成10mg/ml的储存液，工作浓度为10 μg/ml。硫酸卡那霉素 (Kan)、硫酸链霉素 (Strep)、硫酸庆大霉素 (Gent) 和羧苄青霉素钠盐 (Carb) 分别用双蒸水配制成浓度为50 mg/ml、50 mg/ml、40 mg/ml和50 mg/ml的储存液，并用0.22μg过滤器过滤除菌。工作浓度分别为 Kan:50 μg/ml，Strep:50 μg/ml，Gent:40 μg/ml和Carb:50 μg/ml。