



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，但可辅助植物二元表达载体的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，可用双蒸水溶解或稀释)，用手拨打管底混匀，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=2KV/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℃，150-200rpm，振荡培养2-3小时。
4. 6000 rpm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。



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°C培养48 h 即可;

对于 Amp 抗性质粒, 使用 Carb(50 µg/ml) 平板, 28°C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. 混入质粒时应轻柔操作, 加入质粒的体积不应大于感受态体积的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. 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)。

20241011