

EHA101 感受态细胞

- 产品规格

EHA101 感受态细胞 100 μ l*10

- 储存条件

-80°C(12 个月)

- 基因型

C58 (rif R) Ti pEHA101 (pTiBo542 D T-DNA)(kanR,strepR)Nopaline

- 产品简介

EHA101 菌株为 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胭脂碱型 Ti 质粒 pEHA101 (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，pEHA101 (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)。pEHA101(pTiBo542DT-DNA) 型 Ti 质粒含有筛选标签：strep、kan，赋予 EHA101 菌株链霉素抗性和卡那霉素抗性，适用于玉米、水稻、烟草等植物的转基因操作，经 pK7WGF2 质粒检测转化效率可达 104 cfu/ μ g DNA。

- 使用说明

- 1).取 -80°C 保存的农杆菌感受态于冰上待其部分融化，处于冰水混合状态时插入冰中。
- 2).每 100 μ l 感受态加 1 μ g (体积不大于 10 μ l) 质粒 DNA，用手拨打管底混匀，依次于冰上静置 5 分钟、液氮 5 分钟、37°C 水浴 5 分钟、冰浴 5 分钟。
- 3).加入 700 μ l 无抗生素的 LB 或 YEB 液体培养基，于 28°C，200rpm 振荡培养 2~3 小时。
- 4).6000 rpm 离心一分钟收菌，留取 100 μ l 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°C 培养箱培养 2-3 天。(当平板只含有转化所用双元载体抗生素时，28°C 培养 48 小时即可；平板中同时加入双元载体抗生素，20 μ g/ml rif 时，需 28°C 培养 60 小时；如果使用的平板含有 50 μ g/ml rif 则需要 28°C 培养 72-90 小时)。

- 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).利福平浓度不应高于 25 μ g/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 μ g/ml kan，若所用平板同时含有 20 μ g/ml rif 则转化效率降低到 1/2。

4).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不考虑链霉素或庆大霉素，Ti 质粒丢失的概率极低(可以忽略)。

***本试剂仅供实验室研究使用**