

EHA105(pSoup)感受态细胞

产品规格

EHA105(pSoup)感受态细胞 100 μ l*10

储存条件

-80 $^{\circ}$ C(12 个月)

基因型

C58 (rif^R) Ti pEHA105 (pTiBo542DT-DNA) Succinamopine(pSoup-tet^R)

产品简介

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)。在 EHA105 菌株中转入 help 质粒 pSoup 即为 EHA105(pSoup)菌株，可帮助 pGreen，62SK，pGs2 系列质粒在农杆菌中复制，同时赋予该菌株四环素 (tet) 抗性，适用于水稻、烟草等植物的转基因操作。EHA105(pSoup)化学转化感受态细胞经特殊工艺制作，pCambia2301(卡那霉素抗性)质粒检测转化效率>104 cfu/ μ g DNA。

使用说明

- 1).取-80 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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). 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). 转化高浓度的质粒可相应减少最终用于涂板的菌量，本公司生产的 EHA105(pSoup)感受态细胞具有四环素抗性，但在转入目标质粒涂板筛选阳性克隆时，只需加入目标质粒抗性的抗生素，不加四环素。

- 3). 平板上阳性克隆密度过大时，由于营养不足，阳性克隆生长变慢，菌落变小，为了获得大的菌落，应减少质粒用量。
- 4). 利福平浓度不应高于 25 µg/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。
- 5). 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，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。

***本试剂仅供实验室研究使用**