

## EHA101 农杆菌电转感受态细胞

### EHA101 Electroporation-Competent Cell 说明书

产品货号: ML-G27018

保存条件: -80℃

产品规格: 10×50μl 50×50μl

产品介绍

基 因 型

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

简 要 说 明

MLBioEHA101 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：kan，赋予 EHA101 菌株卡那霉素抗性，适用于玉米、水稻、烟草等植物的转基因操作。MLBioEHA101 电转感受态特别适用于大质粒的转化：经 pK7WGF2 质粒 (壮观霉素抗性，size:11876 bp)检测转化效率>105 cfu/μg DNA；经 pK7WGF2-ZH 质粒 (size:40 kd) 检测转化效率可达  $5 \times 10^3$  cfu/μg DNA。

## 操作说明

- 1.0.2cm 电击杯和杯盖从储存液中拿出倒置于干净的吸水纸上 5 分钟，待其沥干水分，正置 5 分钟，使乙醇充分挥发，待乙醇挥发干净立即插入冰中，压实冰面，电极杯顶离冰面 0.5cm 以方便盖上杯盖，冰中静置 5 分钟充分降温。
- 2.取-80℃保存的 MLBio 农杆菌感受态插入冰中 5 分钟，待其融化，加入 1-5ug 质粒 DNA (质粒体积不大于 6ul，最好用试剂盒抽提，双蒸水溶解)，用手拨打管底混匀，立即插入冰中，用 200ul 枪头将感受态-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，设置参数：C=25uF，PC=200ohm，V=2400V (此参数 MLBio 推荐，使用者也可按所用电转仪推荐的 protocol 操作)，将电击杯快速放入电转槽中，电击完成快速插入冰中，加入 700ul 无抗生素的 LB 并转移到感受态空管中，28℃振荡培养 2~3 小时。
- 4.6000rpm 离心一分钟收菌，留取 100 μl 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℃培养箱培养 2-3 天 (当平板只

含有 50ug/ml kan 时，28℃培养 48h 即可；平板中同时加入 50ug/ml kan，20ug/ml rif 时，需 28℃培养 60h；如果使用的平板含有 50ug/ml rif 则需要 28℃培养 72-90h）。

### 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。
- 3.转化高浓度的质粒可相应减少最终用于涂板的菌量。
- 4.利福平浓度不应高于 25ug/ul，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 50ug/ml kan，若所用平板含有 20ug/ml rif 则转化效率降低到 1/2。
- 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，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。

### 备 注

- 1、农杆菌相关抗生素配方：

抗生素	配方	原液浓度	工作浓度
羧苄青霉素 (carb)	双蒸水溶解, 0.22 μm 滤膜过滤除菌	50 mg/m	50 μg/ml
硫酸卡那霉素 (kan)	双蒸水溶解, 0.22 μm 滤膜过滤除菌	50 mg/ml	50 μg/ml
链霉素 (strep)	双蒸水溶解, 0.22 μm 滤膜过滤除菌	10 mg/ml	50 μg/ml
利福平 (rif)	DMSO 溶解, 0.22 μm 滤膜过滤除菌	10 mg/ml	20 μg/ml
庆大霉素 (gent)	双蒸水溶解, 0.22 μm 滤膜过滤除菌	20 mg/ml	40 μg/ml

2、常用农杆菌抗性: (R: 抗; S: 敏感。)

农杆菌菌株	羧苄青霉素 (carb)	链霉素 (strep)	利福平(rif)	庆大霉素 (gent)	硫酸卡那霉素 (kan)
AGL-1	R	R	R	S	S
EHA101	S	R	R	S	R
EHA105	S	R	R	S	S
LBA4404	S	R	R	S	S
GV3101S	S	R	R	R	S

3、LB 及 YEB 配方:

component	LB(液体)/L	LB(固体)/L	component	YEB(液体)/L	YEB(固体)/L
Yeast extract	5 g	5 g	Yeast extract	1 g	1 g
NaCl	10 g	10 g	牛肉浸膏	5 g	5 g

NaOH	调 PH 到 7.0	调 PH 到 7.0	蔗糖	5 g	5 g
Agar	—	15 g	MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0.49 g	0.49 g
			NaOH	调 PH 到 7.0	调 PH 到 7.0
			Agar	—	15 g