



EHA101 电转感受态细胞

EHA101 Electroporation Chemically Competent Cell

Cat.NO. ZC1405D

目录编号	产品名称	包装单位
■ ZC1405D	EHA101 电转感受态细胞	10×50μl

备注: 以上包装均含有 pK7WGF2 (10ng/μl)5μl (质量控制用, 请转化提取后使用)。

储存: -70°C 保存六个月。

产品介绍:

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: kan, 赋予 EHA101 菌株和卡那霉素抗性, 适用于玉米、水稻、烟草等植物的转基因操作。EHA101 电转感受态特别适用于大质粒的转化, 经 pK7WGF2 质粒检测转化效率大于 10^5 cfu/μg DNA。

基因型为: C58 (rif^R) Ti pEHA101 (pTiBo542 D T-DNA) (kan^R) Nopaline

操作方法:

1. 0.1cm 电击杯和杯盖从储存液中拿出倒置于干净的吸水纸上 5min, 待其沥干水分, 正置 5min, 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 5min 充分降温。

2. 取 -70°C 保存的农杆菌感受态插入冰中 5min, 待其融化, 加入 10ng 质粒 DNA (体积不大于 6μl, 感受态转化效率较高, 第一次使用前最好做预实验确定所加质粒的量), 用手拨打管底混匀, 立即插入冰中, 用 200μl 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=25μF, PC=200Ω, V=2.4kV (BioRad 电转仪推荐参数); 也可按所用电转仪推荐的参数操作。将电击杯快速放入电转槽中, 电击完成快速插入冰中, 电击完成快速插入冰中, 加入 700μl 无抗生素的 LB 并转移到感受态空管中, 28°C 振荡培养 2~3h。

4. 6000rpm 离心 1min 收菌, 留取 100μl 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 2-3d。

(当平板只含有 50μg/ml kan 时, 28°C 培养 48h 即可; 平板中同时加入 50μg/ml kan, 20μg/ml rif 时, 需 28°C 培养 60h; 如果使用的平板含有 50μg/ml rif 则需要 28°C 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。转化高浓度的质粒可相应减少最终用于涂板的菌量。
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 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, 若所用平板含有 20 μ g/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 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)。

ZOMANBIO