

EHA105 Electroporation-Competent Cell 产品说明书

● 产品规格 (CAT#: AE1010)

EHA105 Electroporation- Competent Cell	50μl /支
pCAMBIA2301 (control vector, 10ng/μl)	10μl
保存条件 (保质期):	-80°C (12个月)

● 基因型

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

● 产品说明

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)。EHA105 菌株适用于水稻、烟草等植物的转基因操作, 唯地生物开发的 EHA105 电感受态特别适用于大质粒的转化: 经 pCAMBIA2301 质粒 (12739bp, Kan^R) 检测转化效率>10⁵ cfu/μg DNA; 经 pCAMBIA2301-ZH 质粒 (40kb, Kan^R) 检测转化效率>5×10³ cfu/μg DNA。

● 操作方法

- 0.1 cm 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 0.5 cm 以方便盖上杯盖, 冰中静置 5 分钟充分降温。
- 取-80°C 保存的农杆菌感受态插入冰中 5 分钟, 待其融化, 加入 0.01-1 μg 质粒 DNA (体积不大于 6ul, 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 200 μl 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。
- 启动电转仪, 设置参数: C=25 μF, PC=200 ohm, V=2400 V (此参数为 Biorad 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 700 μl 无抗生素的 LB 并转移到感受态空管中, 28°C 振荡培养 2~3 小时。
- 6000 rpm 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°C 培养箱培养 2-3 天
(当平板只含有 50 μg/ml kan 时, 28°C 培养 48 h 即可; 平板中同时加入 50 μg/ml kan, 10 μg/ml rif 时, 需 28°C 培养 48-60 h; 平板中同时加入 50 μg/ml kan, 20 μg/ml rif 时, 需 28°C 培养 60-72 h; EHA105 平板或液体培养时均不建议使用大于 20 μg/ml 的利福平浓度。)
- 液体摇菌: 农杆菌是好氧菌, 固体平板上菌落的生长和液体摇菌均需要大量氧气, 液体摇菌成功的关键是保证营养液中溶解足够的氧气: 1, 要用透气试管或三角瓶; 2, 保证营养液有大的横截面和小的厚度; 3, 抗生素尽量少加或不加, 必须添加的抗生素尽量使用低浓度, 不使用高浓度。(唯地生物推荐的小摇方法: 12-15ml 的圆底透气试管中加入 1ml 含有抗生素的 LB, 新鲜的农杆菌平板中取 1-2 个单菌落接种, 30 度、200rpm 摇菌 24-48h; 大摇方法: 100ml 透气三角瓶中加入不超过 20ml 含有抗生素的 LB, 取小摇菌液按 2% 比例接菌, 30 度、200rpm 摇菌 24-48h。

● 关于农杆菌的利福平抗性：

农杆菌的利福平抗性来源于农杆菌的一个核基因突变，不在 Ti 质粒上，所以利福平与 Ti 质粒是否丢失没有关系，利福平并不是农杆菌培养过程中必须要添加的抗生素；相反，在农杆菌培养基中加入利福平特别是加入利福平浓度过高会导致农杆菌生长变慢，侵染活力降低，不建议在农杆菌的培养基中加入利福平，在没有超净台的实验室加入利福平可以抑制杂菌生长，在超净台中进行农杆菌实验可不添加利福平（1-4）。

不同农杆菌来源不同，有不同的核基因和 Ti 质粒，表现出不同的生长势，特别是在含有抗生素的培养基中生长时，表现出对不同的抗生素不同的敏感度。EHA105 对利福平更加敏感，生长更容易被利福平抑制，对利福平浓度的高敏感性也是 EHA105 菌株的一个鉴定标准。图 1 显示含有 pCambia2301 质粒的 EHA105、LBA4404 在 LK50，LK50+Rif20，LK50+Rif50 三种培养基中的生长曲线——利福平对 EHA105 菌株影响较大，在液体培养基 LK50 中添加利福平不仅影响 EHA105 的生长速度，同时也影响 EHA105 的终浓度（在 LK50 中添加 20ug/ml 的利福平可以将 EHA105 的生长时间延迟 7h，终浓度从 OD600=6.42 降到 5.22，在 LK50 中添加 50ug/ml 的利福平可以将 EHA105 的生长时间延迟 11h，终浓度从 OD600=6.42 降到 4.13；而对照菌株 LBA4404 对液体培养基中利福平的浓度变化并不敏感，只是终浓度略有下降）。

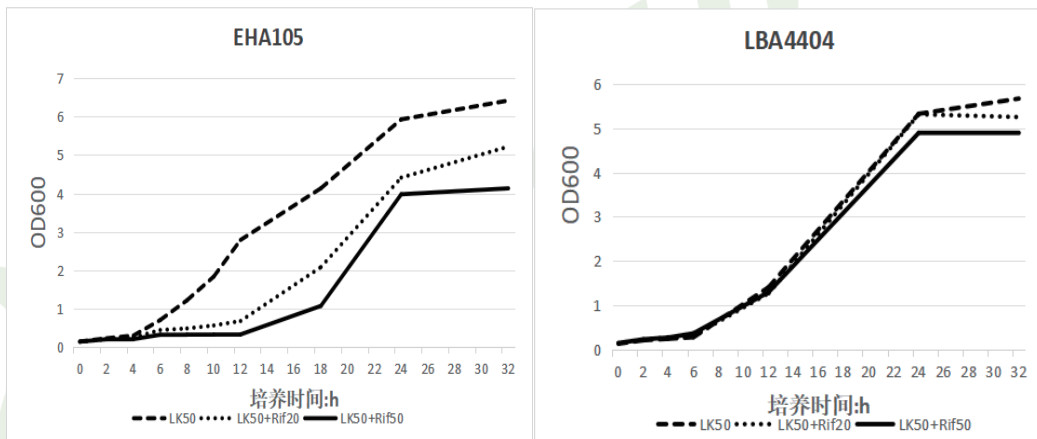


图 1：含有 pCambia2301 质粒的 EHA105、LBA4404 在 LK50，LK50+Rif20，LK50+Rif50 三种培养基中的生长曲线

生长曲线制作方法：将 pCambia2301 质粒分别转化 EHA105、LBA4404 菌株，涂板到 LK50 平板，48h 长出的菌落接种到 1ml LK50 液体培养基中（试验中均使用 12.5ml 圆底透气试管摇菌），30℃，200rpm 摇菌 24h，按 2%的比例分别接种到 1ml LK50，LK50+Rif20，LK50+Rif50 三种培养基中，测 OD600 值。LK50: LB+Kan 50ug/ml；LK50+Rif20: LB+Kan 50ug/ml+Rif 20ug/ml；LK50+Rif50: LB+Kan 50ug/ml+Rif 20ug/ml。

● 农杆菌相关抗生素配方：

抗生素	配方	原液	工作液
羧苄青霉素(carb)(唯地 CAT#: YC9040)	双蒸水溶解，0.22 μm 滤膜过滤除菌	100 mg/ml	50 μg/ml
硫酸卡那霉素(kan)(唯地 CAT#YC9020)	双蒸水溶解，0.22 μm 滤膜过滤除菌	100 mg/ml	50 μg/ml
壮观霉素(spec)(唯地 CAT#: YC9070)	双蒸水溶解，0.22 μm 滤膜过滤除菌	100 mg/ml	75 μg/ml
链霉素(strep)(唯地 CAT#: YC9060)	双蒸水溶解，0.22 μm 滤膜过滤除菌	100 mg/ml	50 μg/ml
利福平(rif)(唯地 CAT#: YC9080)	DMSO 溶解，0.22 μm 滤膜过滤除菌	60 mg/ml	20 μg/ml
庆大霉素(gent)(唯地 CAT#: YC9090)	双蒸水溶解，0.22 μm 滤膜过滤除菌	100 mg/ml	40 μg/ml
氯霉素 (cam) (唯地 CAT#: YC9030)	无水乙醇溶解，0.22 μm 滤膜过滤除菌	100 mg/ml	68 ug/ml

● 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	S	R	S	S
EHA101	S	S	R	S	R
EHA105	S	S	R	S	S
LBA4404	S	R	R	S	S
GV3101	S	S	R	R	S

● LB (唯地 CAT#: CM1010) 及 YEB (唯地 CAT#: CM2010) 配方：

Component	LB(液体)/L	LB(固体)/L	component	YEB(液体)/L	YEB(固体)/L
Tryptone	10 g	10 g	Tryptone	5 g	5 g
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 ₄ *7H ₂ O	0.49 g	0.49 g
			NaOH	调 PH 到 7.0	调 PH 到 7.0
			Agar	—	15 g

● 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 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。本公司 EHA105 感受态计算转化效率时所用平板只含有 50 µg/ml kan，若所用平板含有 20 µg/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)。

● References

1. Suma, B., Keshavachandran, R., & Nybe, E.V. (2008). Journal of Tropical Agriculture, 46,38–44.
2. Hood, E.E., Gelvin, S.B., Melchers, L.S and Hoekema, A.1993. Transgenic Res., 2: 208–218.
3. Lazo GR, Stein PA, Ludwig RA (1991) . Biotechnology (N Y) 9: 963–967.
4. Garfinkel DJ, Simpson RB, Ream LW, White FF, Gordon MP, Nester EW (1981). Cell 27: 143–153.