

产品介绍

GV3101 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,基因型为:C58 (rifR) TipMP90 (pTiC58DT-DNA) (gentR) Nopaline, 巨匠生物开发的 GV3101 电转感受态特别适用于大质粒的转化: 经 pCAMBIA2301 质粒检测转化效率 $>10^5$ cfu/ μ g DNA; 经 pCAMBIA2301-ZH 质粒 (40 kb) 检测转化效率可达 5×10^3 cfu/ μ g DNA。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 pMP90, pMP90 型 Ti 质粒含有筛选标签: gent, 赋予 GV3101 菌株庆大霉素抗性, 适用于拟南芥、烟草、玉米、土豆等植物的转基因操作, 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, pMP90 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-DN 顺利转移)。

产品组成

组分	CC701 (10 支)	CC701 (20 支)
GV3101 Electroporation-Competent Cell	10 \times 100 μ l	20 \times 100 μ l

贮藏条件

本产品应置于-80°C储存, 勿置于-20°C或液氮中保存

使用方法

- 0.2 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 min, 待其沥干水分, 正置 5 min, 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 min 充分降温;
- 取-80°C保存的农杆菌感受态插入冰中 2-5 min, 待其融化, 加入 0.05-2 μ g 质粒 DNA (体积不大于 6 μ l, 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 μ l 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 μ F, PC=200 ohm, V=2200 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 μ l 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 1 min 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。

注意事项

- ❖ 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。
- ❖ 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。
- ❖ 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。
- ❖ 利福平浓度不应高于 25 $\mu\text{g/ml}$ ，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 GV3101 感受态计算转化效率时所用平板只含有 50 $\mu\text{g/ml}$ Kan，若所用平板含有 20 $\mu\text{g/ml}$ Rif 则转化效率降低到 1/2。
- ❖ 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）。

附录

常用抗生素浓度

抗生素类型	工作浓度
羧苄青霉素 (carb)	50 $\mu\text{g/ml}$
硫酸卡那霉素 (kan)	50 $\mu\text{g/ml}$
链霉素 (strep)	50 $\mu\text{g/ml}$
利福平 (rif)	20 $\mu\text{g/ml}$
庆大霉素 (gent)	40 $\mu\text{g/ml}$