



GV3101(pSoup)农杆菌感受态细胞

产品信息:

组成	BC314-01
GV3101(pSoup) Chemically Competent Cell	20×100μl
pGs2 (100ng/μl)	1 支

储存条件: -70℃保存，避免反复冻融。不适合在液氮中保存。

基因型: C58 (*rif^R*) *Ti pMP90 (pTiC58DT-DNA) (gent^R/strep^R)Nopaline pSoup (tet^R)*

产品介绍:

农杆菌GV3101菌株为C58型背景，核基因中含有利福平抗性筛选基因*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pMP90 (pTiC58DT-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，pMP90 (pTiC58DT-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)，质粒为庆大霉素抗性。一些缺失农杆菌复制相关元件(如pVS1的复制起点REP区或pVS1质粒的STA区)的表达质粒如pGreen、pGreenII-62SK和pGs2等不能在GV3101菌株中繁殖。辅助质粒pSoup可以帮助这些不完整双元表达质粒在农杆菌中的复制并使GV3101(pSoup)菌株具有四环素(Tet)抗性。该菌株适用于拟南芥、烟草、玉米和土豆等植物的转基因操作。GV3101(pSoup)农杆菌感受态细胞经特殊工艺制备，经pGs2质粒检测，转化效率可达 10^3 cfu/μg，-70℃保存12个月转化效率不发生改变。

转化方法: (采用冻融方法)

1. 取-70℃保存的GV3101(pSoup)农杆菌感受态细胞于冰水浴中融化;
2. 无菌条件下，向感受态细胞中加入100ng-1μg质粒DNA(第一次使用，最好做一下预实验，确定所加质粒的最佳量)，轻轻混匀，冰水浴中静置5分钟;
3. 将离心管置于液氮中速冻5分钟;(注:可用干冰和无水乙醇混合物代替液氮)
4. 然后快速将离心管置于37℃水浴中保持5分钟，不要晃动水面;
5. 将离心管放回冰水浴中，冰浴5分钟;
6. 无菌条件下加入800μl无抗生素的2xYT、SOB、SOC或LB液体培养基，于28℃振荡培养2-3小时，菌体复苏;
7. 6000rpm离心1分钟收菌，留100μl左右上清，轻轻吹打重悬菌体，取适量菌液，涂布于相应抗生素的LB平板上，于28℃培养箱中倒置培养48-72小时。(实验表明:当平板只含有50μg/ml的Kan时，28℃培养48h即可看到菌落;平板中含有50μg/ml Kan和20μg/ml Rif时，需28℃培养60h可看到菌落;如果平板中含有50μg/ml Kan和50μg/ml Rif时则需要28℃培养72-90h可看到菌落。)

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25μg/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和筛选农杆菌;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)。
6. 相关抗生素配制及工作浓度
利福平(Rif)用DMSO配制成20mg/ml的储存液，工作浓度为20μg/ml。盐酸四环素(Tet)用甲醇溶解成10mg/ml的储存液，工作浓度为10μg/ml。硫酸卡那霉素(Kan)、硫酸链霉素(Strep)、硫酸庆大霉素(Gent)和羧苄青霉素钠盐(Carb)分别用双蒸水配制成浓度为50mg/ml、50mg/ml、40mg/ml和50mg/ml的储存液，并用0.22μm过滤器过滤除菌。工作浓度分别为Kan:50μg/ml，Strep:50μg/ml，Gent:40μg/ml和Carb:50μg/ml。

BM190911