



GV3101(pSoup-p19) 化学感受态细胞

产品信息:

组成	BC315-01
GV3101(pSoup-p19)化学感受态细胞	10×100μl
pGS2 (100ng/μl)	1 支

储存条件: -70°C保存, 避免反复冻融。

基因型: C58(rif^R)TipMP90 (pTiC58DT-DNA) (gent^R) Nopaline(pSoup-p19-tet^R)

产品介绍:

GV3101(pSoup-p19)是一种基于 GV3101 的遗传背景构建而成的广泛应用于植物转化研究的新型农杆菌菌株。其染色体携带利福平抗性, 含脂碱型 Ti 质粒 pMP90 (具有庆大霉素抗性), 可提供 T-DNA 转移所必需的毒性 (vir) 功能。在此基础上, 菌株中引入了 pSoup-p19 辅助质粒 (具有四环素抗性)。该质粒赋予菌株双重功能, 表达的 p19 蛋白可有效抑制植物细胞对外源基因的 RNA 沉默 (RNA silencing), 从而提高异源转录本的稳定性, 显著增强目标蛋白在转基因植物或瞬时表达系统中的表达水平, 同时帮助某些复制元件不完整的双元表达载体 (例如 pGreen、pGreenII-62SK、pGs2 等) 在农杆菌中稳定复制。这些载体通常缺失农杆菌复制所必需的元件 (如 pVS1 来源的复制起点 Rep 区或稳定性 STA 区)。该菌株适用于拟南芥、烟草、马铃薯等多种双子叶植物, 以及玉米等单子叶植物的遗传转化及瞬时表达实验。GV3101(pSoup-p19)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 10³cfu/μg, -70°C保存 12 个月转化效率不发生改变。

转化方法 (冻融法)

- 1.取-70°C保存的 GV3101(pSoup-p19)农杆菌感受态细胞, 置于冰水浴中融化。
- 2.在无菌条件下, 向感受态细胞中加入 100 ng-1μg 质粒 DNA (初次使用时建议通过预实验确定最佳质粒用量), 轻轻混匀, 冰水浴中静置 5 分钟。
- 3.将离心管放入液氮中速冻 5 分钟 (也可使用干冰与无水乙醇混合物替代液氮)。
- 4.迅速将离心管转移至 37°C水浴中, 静置 5 分钟, 期间避免晃动水面。
- 5.将离心管放回冰水浴中, 继续冰浴 5 分钟。
- 6.无菌条件下加入 800 μl 不含抗生素的 2×YT 或 LB 液体培养基, 于 28°C振荡培养 2-3 小时, 使菌体复苏。
- 7.6000 rpm 离心 1 分钟收集菌体, 弃去大部分上清, 保留约 100 μl, 轻轻吹打重悬菌体。取适量菌液涂布于含相应抗生素的 LB 平板 (四环素终浓度为 10 μg/ml, 并根据质粒抗性添加对应抗生素, 例如若转化质粒 pGreenII-62SK 为卡那霉素抗性, 则添加终浓度为 50 μg/ml 的硫酸卡那霉素)。
- 8.待涂布的液体吸干后, 倒置平板, 置于 28°C培养箱中培养 48-72 小时。

注意事项

- 1.加入质粒时需轻柔操作, 其体积不应超过感受态细胞体积的 1/10。若质粒不纯或含有乙醇等有机物残留, 将导致转化效率显著下降。
- 2.培养基中添加利福平是为抑制杂菌生长, 但其浓度不宜超过 25μg/ml, 过高会抑制农杆菌生长, 降低其生长速度与转化效率。
- 3.尽管根据菌株抗性添加庆大霉素可减少 Ti 质粒丢失, 但抗生素一般不利于农杆菌的转基因操作。常规培养时可不添加庆大霉素, Ti 质粒丢失概率极低, 通常可忽略。
- 4.本感受态细胞不适用于携带氨基青霉素抗性基因的质粒。
- 5.相关抗生素配制及工作浓度, 利福平 (Rif) 用 DMSO 配制成为 20 mg/ml 的储存液, 工作浓度为 20 μg/ml。盐酸四环素 (Tet) 用甲醇溶解成 10mg/ml 的储存液, 工作浓度为 10 μg/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为 50 mg/ml、50 mg/ml、40 mg/ml 和 50 mg/ml 的储存液, 并用 0.22μm 滤器过滤除菌。工作浓度分别为 Kan:50 μg/ml, Strep:50 μg/ml, Gent:40 μg/ml 和 Carb:50 μg/ml。