



GV3101 农杆菌感受态细胞

产品信息:

组成	BC304-01
GV3101 Chemically Competent cells	20×100μl
pCAMBIA2301 (1μg/μl)	1 支

储存条件: -70 °C 保存, 避免反复冻融。

基因型:

C58 (rif^R) Ti pMP90 (pTiC58DT-DNA) (gent^R/strep^R) Nopaline

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, 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)。pMP90 (pTiC58DT-DNA)型Ti 质粒含有筛选标签: Strep和Gent, 赋予GV3101菌株链霉素和庆大霉素抗性, 适用于拟南芥、烟草、玉米、土豆等植物的转基因操作, 经植物双元pCAMBIA2301质粒检测, 转化效率可达10³ cfu/μg, -70°C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°C保存的 GV3101 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 (第一次使用前最好做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: 也可以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°C 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 或 LB 液体培养基, 于 28°C 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°C 培养箱中倒置培养 48-72 小时。

(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, 20 μg/ml Rif 时, 需 28°C 培养 60 h; 如果使用的平板含有 50 μg/ml Rif 则需要 28°C 培养 72-90 h)。

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。
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)。

BM190428