GV3101(pSoup)电击　感受态细胞

GV3101(pSoup) Electroporation-Competent Cell

保存条件：　-80℃

产品规格:

GV3101(pSoup)电击	5×50μl
pGs2（control vector）	10pg/μl　10μl

基　因　型

C58 (rif^R) Ti pMP90 (pTiC58DT-DNA) (gent^R) Nopaline(pSoup-tet^R)

简 要 说 明

GV3101(pSoup)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：gent，赋予 GV3101 菌株庆大霉素抗性；在 GV3101 菌株中转入 help 质粒：pSoup 即为 GV3101(pSoup)菌株，可帮助 pGreen，62SK，pGs2 系列质粒在农杆菌中复制，同时赋予该菌株四环素（tet）抗性。适用于拟南芥、烟草、玉米、土豆等植物的转基因操作。开发的 GV3101(pSoup)电转感受态特别适用于大质粒的转化：经 pGs2(卡那霉素抗性)质粒检测转化效率>105 cfu/μg DNA；经 pGs2-ZH(卡那霉素抗性)质粒(size:40 kd)检测转化效率可达 5×10^3 cfu/μg DNA。

操　作　说　明

1. 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。

2. 取-80℃保存的农杆菌感受态插入冰中 5 分钟，待其融化，加入 1-5 μg 质粒 DNA（质粒体积不大于 6ul，最好用试剂盒抽提，双蒸水溶解），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。

3. 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℃振荡培养 2~3 小时。

4. 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℃培养箱培养 2-3 天

（当平板只含有 50 μg/ml kan 时，28℃培养 48 h 即可；平板中同时加入 50 μg/ml kan，20 μg/ml rif 时，需 28℃培养 60 h；如果使用的平板含有 50 μg/ml rif 则需要 28℃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. 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

备　　注

1、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）	双蒸水溶解，0.22 μm 滤膜过滤除菌	50 mg/ml	50 μg/ml
硫酸卡那霉素（kan）	双蒸水溶解，0.22 μm 滤膜过滤除菌	50 mg/ml	50 μg/ml
链霉素（strep）	双蒸水溶解，0.22 μm 滤膜过滤除菌	10 mg/ml	50 μg/ml
利福平（rif）	DMSO 溶解，0.22 μm 滤膜过滤除菌	10 mg/ml	20 μg/ml
庆大霉素（gent）	双蒸水溶解，0.22 μm 滤膜过滤除菌	20 mg/ml	40 μg/ml

2、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

3、LB 及 YEB 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	MgSO4*7H2O	0.49 g	0.49 g
			NaOH	调 PH 到 7.0	调 PH 到 7.0
			Agar	—	15 g