



GV3101(pSoup-p19) 电转感受态细胞

GV3101(pSoup-p19) Electroporation Chemically Competent Cell

Cat.NO. ZC1407D

目录编号	产品名称	包装单位
■ ZC1407D	GV3101(pSoup-p19) 电转感受态细胞	10×50μl

备注: 以上包装均含有 Compcell Control Plasmid pGs2 (10ng/μl)5μl (质量控制用)。

储存: -70℃ 保存六个月。

产品介绍:

P19 蛋白来源于番茄丛矮病毒,可抑制宿主对外源基因的 RNA 沉默效应,提高异源基因转录本的稳定性,进而促进异源蛋白的表达,广泛应用于转基因植物及烟草叶片,拟南芥叶片,番茄叶片或原生质体的瞬时表达系统中。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: gent,赋予 GV3101 菌株庆大霉素抗性;在 GV3101 菌株中转入 help 质粒: pSoup-p19 即为 GV3101(pSoup-p19) 菌株,可帮助 pGreen, 62SK, pGs2 等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。GV3101 (pSoup-p19)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 5×10³ cfu/μg DNA。

基因型为: C58 (rif^R) Ti pMP90 (pTiC58DT-DNA) (gent^R) Nopaline(pSoup-p19-tet^R)

操作方法:

1. 0.1cm 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 0.5cm 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 1-5μg 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 200μl 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=25μF, PC=200Ω, V=2400V (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 700μl 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. 6000rpm 离心 1 分钟收菌,留取 100μl 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 50μg/ml kan 时,28℃ 培养 48 h 即可;平板中同时加入 50μg/ml kan, 20μg/ml rif 时,需 28℃ 培养 60h;如果使用的平板含有 50μg/ml rif 则需要 28℃ 培养 72-90h)。



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 $\mu\text{g/ml}$, 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。
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 (可以忽略)。

ZOMANBIO