

## 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*，基因型为：C58 (*rif*<sup>R</sup>) Ti pMP90 (pTiC58DT-DNA) (*gent*<sup>R</sup>) Nopaline，巨匠生物开发的 GV3101 电转感受态特别适用于大质粒的转化：经 pCAMBIA2301 质粒检测转化效率 $>10^5$  cfu/ $\mu$ g DNA；经 pCAMBIA2301-ZH 质粒 (40 kb)检测转化效率可达  $5\times 10^3$  cfu/ $\mu$ g DNA。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，pMP90 型 Ti 质粒含有筛选标签：*gent*，赋予 GV3101 菌株庆大霉素抗性，适用于拟南芥、烟草、玉米、土豆等植物的转基因操作，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 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)。

## 产品组成

组 分	CC701
GV3101 Electroporation- Competent Cell	100 $\mu$ l

## 贮藏条件

本产品应置于-80℃储存，12个月。

## 使用方法

- 1、0.2 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 2-5 分钟，待其融化，加入 0.05-2  $\mu$ g 质粒 DNA（体积不大于 6 $\mu$ l，感受态转化效率较高，第一次使用前最好做预实验确定所加质粒的量），用手拨打管底混匀，立即插入冰中，用 200  $\mu$ l 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  $\mu$ F，PC=200 ohm，V=2200 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  $\mu$ l 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  $\mu$ l 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。

## 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。本公司 GV3101 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 (可以忽略)。

## 附录

### 1、农杆菌相关抗生素浓度

抗生素	工作浓度
羧苄青霉素 (carb)	50 µg/ml
硫酸卡那霉素 (kan)	50 µg/ml
链霉素 (strep)	50µg/ml
利福平 (rif)	20µg/ml
庆大霉素 (gent)	40 µg/ml

### 2、LB 及 YEB 配方：

Component	LB(液体)/L	LB(固体)/L	component	YEB(液体)/L	YEB(固体)/L
Tryptone	10g	10g	Tryptone	5g	5g
Yeast extract	5g	5g	Yeast extract	1g	1g
NaCl	10g	10g	牛肉浸膏	5g	5g
NaOH	调 PH 到 7.0	调 PH 到 7.0	蔗糖	5g	5g
Agar	—	15g	MgSO4*7H2O	0.49g	0.49g
			NaOH	调 PH 到 7.0	调 PH 到 7.0
			Agar	—	15g