



## GV3101 Electroporation-Competent Cell

**产品货号：** NGE101

**产品规格：** 50μl/支

**基因型：** C58 (*rif<sup>R</sup>*) *Ti pMP90 (pTiC58DT-DNA) (gent<sup>R</sup>) 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：*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。我公司生产的 GV3101 电转感受态特别适用于大质粒的转化：对于 40kd 左右的 DNA 转化效率可达  $5 \times 10^3$  cfu/μg DNA；对于 11.6kb 的 DNA 转化效率  $> 10^5$  cfu/μg DNA。

### 操作方法：

- 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。
- 取 -80℃ 保存的农杆菌感受态插入冰中 5 分钟，待其融化，加入 0.01-1 μg 质粒 DNA (体积不大于 6ul，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 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。
- 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。
- 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)。

### 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



### 常用农杆菌抗性：(R：抗；S：敏感)

农杆菌菌株	羧苄青霉 (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

### 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	MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0.49 g	0.49 g
			NaOH	调 PH 到 7.0	调 PH 到 7.0
			Agar	-	15 g

### 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 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)。

### 保存条件：

-80℃保存 6 个月。