

## GV3101 电转化感受态使用说明

### ◇ 产品简介

本品为根癌农杆菌 GV3101(基因型: C58 (rif<sup>R</sup>) Ti pMP90 (pTiC58DT-DNA) ( gent<sup>R</sup>) Nopaline) 制作的电击感受态细胞。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。GV3101 电转感受态特别适用于大质粒的转化, 经 pCAMBIA2301 质粒 (12739bp, Kan<sup>R</sup>) 检测转化效率 >10<sup>5</sup> cfu/μg DNA; 经 pCAMBIA2301-ZH 质粒 (40kb, Kan<sup>R</sup>) 检测转化效率 >5 × 10<sup>3</sup> cfu/μg DNA。

### ◇ 产品规格

品名	货号	规格
GV3101 电转化感受态	EL023H-S	10×50 μL
	EL023H-M	50×50 μL

-80℃ (12 个月)

### ◇ 转化方法

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 0.01-1 μg 质粒 DNA (体积不大于 6ul), 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, 根据仪器要求设置参数, 将电击杯快速放入电转槽中, 电击完成快速插入冰中, 加入 900 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. 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  $\mu\text{g/ml}$ ，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。
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。