

产品说明书

产品名称: **XK GV3101 Chemically Competent Cell**

产品货号: **XK003**

产品组分

组分	XK003-01	XK003-02
XK GV3101 Chemically Competent Cell	10×100 μL	100×100 μL
*pCAMBIA2301(Control Vector)	10 μL(10 pg/μL)	10 μL(10 pg/μL)

*阳性对照质粒，抗性为 Kana，用于验证感受态转化效率。

基因型

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

储存条件

-80°C保存 6 个月，避免反复冻融。

产品简介

根癌农杆菌 GV3101 染色体背景为 C58，核基因上含有筛选标签——利福平抗性基因 Rif；该菌株携带的 pMP90 (pTiC58DT-DNA) 是一种无自身转运功能的胭脂型 Ti 质粒，质粒上含有的 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；同时 pMP90 (pTiC58DT-DNA) 型 Ti 质粒含有筛选标签 Gent，赋予 GV3101 菌株庆大霉素抗；常用于拟南芥、烟草、土豆、玉米等植物的转基因操作。本公司生产的 GV3101 化学转化感受态细胞经特殊工艺制作，使用 pCAMBIA2301 质粒 DNA 检测，转化效率可达 1×10^4 cfu/μg。

适用范围

常用于拟南芥、烟草、土豆、玉米等植物的转基因操作。

注意事项

1. 进行转化操作时，应根据相应温度及无菌条件的要求进行，实验过程中轻柔操作。
2. 感受态细胞解冻后应立即使用，禁止反复冻融；
3. 质粒不纯或存在乙醇等有机溶剂的污染会影响其转化效率。
4. 加入的待转化 DNA 的总体积不应超过感受态细胞体积的 1/10；
5. 利福平推荐的工作浓度控制在 20~25 μg/mL 之间，过高的抗生素浓度会影响其生长速率和转化效率。本公司计算感受态转化效率所用的是 20 μg/mL Rif 和 50 μg/mL Kana 的 YEB 平板。
6. 由于 Ti 质粒丢失的概率极低（可以忽略），所以一般培养农杆菌时不考虑添加相应抗生素。

操作步骤

1. 将感受态细胞从 -80°C 中取出，在手心或室温片刻使其部分融化，处于冰水混合状态时插入冰中；
2. 每 $100\ \mu\text{L}$ 感受态加入 $0.01\text{--}1\ \mu\text{g}$ 待转化的质粒 DNA（加入质粒 DNA 体积不超过 $10\ \mu\text{L}$ ），用手轻轻拨打管底混匀，依次于冰上静置 $10\ \text{min}$ 、液氮 $5\ \text{min}$ （或 -70°C 干冰乙醇浴 $5\ \text{min}$ ）、 37°C 水浴 $5\ \text{min}$ 、冰浴 $5\ \text{min}$ ；
3. 加入 $900\ \mu\text{L}$ 无抗生素的无菌 YEB 或 LB 液体培养基，混匀后于 28°C 振荡培养 $2\text{--}3$ 小时。
4. $6000\ \text{rpm}$ ， $1\ \text{min}$ 离心收菌，留底部 $100\ \mu\text{L}$ 左右菌液轻轻吹打重悬菌块，涂布于含相应抗生素的 YEB 或 LB 平板上，倒置放于 28°C 培养箱培养 $2\text{--}3$ 天（当平板只含有 $50\ \mu\text{g}/\text{mL}$ Kan 时， 28°C 培养 $48\ \text{h}$ 即可；平板中同时加入 $50\ \mu\text{g}/\text{mL}$ Kan, $20\ \mu\text{g}/\text{mL}$ Rif 时，需 28°C 培养 $60\ \text{h}$ ；如果使用的平板含有 $50\ \mu\text{g}/\text{mL}$ Rif 时，则需要 28°C 培养 $72\text{--}90\ \text{h}$ ）。

备注

1. GV3101 农杆菌抗生素配方：

抗生素	配方	储存浓度	工作浓度
利福平 (Rif)	DMSO 溶解， $0.22\ \mu\text{m}$ 滤膜过滤除菌	$20\ \text{mg}/\text{mL}$	$20\ \mu\text{g}/\text{mL}$
庆大霉素 (Gent)	双蒸水溶解， $0.22\ \mu\text{m}$ 滤膜过滤除菌	$20\ \text{mg}/\text{mL}$	$40\ \mu\text{g}/\text{mL}$
硫酸卡那霉素 (Kana)	双蒸水溶解， $0.22\ \mu\text{m}$ 滤膜过滤除菌	$50\ \text{mg}/\text{mL}$	$50\ \mu\text{g}/\text{mL}$

2. LB 及 YEB 培养基的配制：

1) LB 液体培养基 (1 L)：

胰蛋白胍 (Tryptone)	$10\ \text{g}$
酵母提取物 (Yeast extract)	$5\ \text{g}$
NaCl	$10\ \text{g}$

2) YEB 液体培养基 (1 L)：

胰蛋白胍 (Tryptone)	$5\ \text{g}$
酵母提取物 (Yeast extract)	$1\ \text{g}$
牛肉 (浸) 膏	$5\ \text{g}$
蔗糖 (Sucrose)	$5\ \text{g}$
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$0.49\ \text{g}$

根据以上配方，称取相应质量的试剂至合适的仪器中，加入去离子水至 $1\ \text{L}$ ，摇晃混匀，使用 NaOH 溶液调节 pH 至 7.0 。如配制固体培养基，则另加入 $15\ \text{g}$ 琼脂粉 (Agar)。配制完成后， 115°C 高温高压灭菌 $30\ \text{min}$ 。

