

GV3101(pSoup-p19) Chemically Competent Cell 使用说明书

产品编号: CC407

储存条件: -80 °C (12 个月)

产品规格: 100 μL/支

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

产品说明:

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。

使用方法:

1. 取-80°C保存的农杆菌感受态于室温或手心片刻待其部分融化, 处于冰水混合状态时插入冰中。
2. 每 100 μL 感受态加入 0.01-1 μg 质粒 DNA (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, 依次于冰上静置 5 min、液氮 5 min、37°C水浴 5 min、冰浴 5 min。
3. 加入 700 μL 无抗生素的 LB 或 YEB 液体培养基, 于 28°C振荡培养 2~3 h。
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 LB 或 YEB 平板上, 倒置放于 28°C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 $\mu\text{g/mL}$ ，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，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)。
6. 不适用于氨苄青霉素抗性质粒。