

## GV3101 农杆菌菌株

**产品保存:** -80℃冰箱冻结法保存

**产品信息:**

溶剂: 15-20%甘油

体积: 0.2mL

培养基: LB 培养基, TY 培养基

**基因型:** C58 (rif<sup>R</sup>) Ti pMP90 (pTiC58DT-DNA) ( gent<sup>R</sup>) Nopaline

**产品说明:**

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。

**菌株活化操作** (仅供参考):

划平板接种: 取出甘油菌置于冰上, 并置于超净台内, 后续操作都在超净台内操作。将接种环在酒精灯上略略烧一下, 使接种环处于无菌状态。微冷后, 蘸取少量甘油菌, 在含 50μg/mL 利福平的 TY 平板 (LB 平板) 上连续作 S 形或 Z 形划动, 如图 1 所示。28-30℃, 倒置培养 2-3 天。

图 1 平板划线



**注意事项:**

1. 收到菌株后, 尽快活化, 再次分装保存。
2. 如果菌株活性差, 离心后, 取沉淀划线, 并再次保存。
3. 本产品仅供科研使用。请勿用于医药、临床诊断或治疗, 食品及化妆品等用途。
4. 为了您的安全和健康, 请穿好实验服并佩戴一次性手套和口罩操作。
5. 如有疑问请致电 400-878-6800 咨询。

## 农杆菌感受态细胞制备 试剂盒

### 产品组成:

组分	规格 (20T)	货号
LB 液体培养基	100mL	PM0010L
农杆菌洗涤液	50mL	AT0001
农杆菌保存液	5mL	AT0002
抗生素 Rif	100 $\mu$ L	SL3881
说明书	1 份	

### 产品简介:

农杆菌感受态制备试剂盒(Agrobacterium Competent Cells Preparation Kit)是一种专门用于农杆菌感受态快速制备的试剂盒。农杆菌经过本试剂盒处理后,细胞膜的通透性发生了暂时性的改变,成为能允许外源 DNA 分子进入的感受态细胞。

农杆菌常生活在植物根表面,依靠由根组织渗透出来的营养物质生存,是一类广泛存在于土壤中的革兰氏阴性细菌,常用于基因过表达、敲除、敲减和编辑等转基因植物的构建。根瘤农杆菌 Ti 质粒上的 T-DNA 上有 8 个左右的基因在植物细胞内表达,指导合成一种特殊化合物冠瘿碱,引起转化细胞癌变;而发根农杆菌的 Ri 质粒同样含有 T-DNA,可诱导产生发状根,其特征是大量增生高度分支的根系。

本试剂盒适用于绝大多数常见的农杆菌,如 GV3101、EHA101、LBA4404 和 EHA105 等根瘤农杆菌(Agrobacterium tumefaciens)或 C58C1 和 Ar.1193 等发根农杆菌(Agrobacterium rhizogenes)感受态细胞的制备。使用本试剂盒可以使感受态转化效率达到  $10^3$ - $10^4$ cfu/ $\mu$ g 质粒。但是不同种类农杆菌菌种制备出来的感受态细胞,转化效率可能有较大差异。此外,对于较小的质粒转化效率会略高,而对于较大的质粒则转化效率会略低一些。

**自备材料:** 目标菌种、接种环、三角瓶、移液器和 LB 平板(含抗生素)等。

### 使用说明:

GV3101 农杆菌使用抗生素 Rif (25  $\mu$ g/mL)。

#### 1. 平板划线:

为取得最佳的感受态效率,必须先把农杆菌甘油菌或其它形式保存的菌种划线到含有相应抗

生素的 LB 或 YEB 平板，28-30°C 培养 2-3 天。

#### 2. 接种培养：

使用接种环挑取 LB 或 YEB 平板上的单菌落，接种于 5 毫升 LB 或 YEB 液体培养基的试管内（含有相应抗生素）。

#### 3. 培养：

在摇床上 28-30°C 约 200rpm 培养过夜，通常培养时间控制在 16-18h 之间。

#### 4. 再接种培养：

根据需要制备的农杆菌感受态细菌的量，按照 1:50 的比例用新鲜培养的过夜菌接种培养。

例如取 1mL 的新鲜过夜菌液到 50mL 本试剂盒提供的农杆菌感受态细菌培养液中（建议 OD 值为 0.1-0.2），置于摇床上 28-30°C，200rpm 培养约 5-6h 后，OD<sub>600</sub> 达到 0.5-0.8。

**注：**培养液中须含有 25μg/mL 的利福平，同时可根据不同类型农杆菌 Ti 或 Ri 质粒抗性再添加一种抗生素。对于不具有利福平抗性的发根农杆菌，则需根据各菌株对应的抗性，使用相应抗生素进行培养。

#### 5. 制备农杆菌感受态细胞（以 50mL 的菌液为例，请在冰上操作）：

a. 将培养好的菌液倒入 50mL 离心管中，冰浴放置 15 min。注意：后续所有操作均在 4°C 或冰浴中进行。

b. 4°C，3000×g 离心 5min 收集菌体，弃去上清。

**注：**离心机必须提前冷却至 4°C。如果离心前的菌量为 50mL，直接按后续操作进行，如果是其它体积则按比例换算后进行后续操作。

c. 加入 25mL 冰上预冷的农杆菌洗涤液，轻轻重悬离心后的菌体，冰浴放置 30 min。

d. 4°C，3000×g 离心 5min，再次收集菌体。

e. 使用预冷的 1mL 的农杆菌保存液，轻轻重悬离心后的菌体，冰浴放置 20min。

f. 在冰浴条件下将重悬后的感受态快速分装在 1.5mL 离心管中，液氮速冻至少 3min，可以根据需要适当分装成 50-200μL/管。

g. 保存在 -80°C，通常 6 个月内感受态效率不会有明显变化。

#### 6. 感受态细胞的转化：

a. 取 -80°C 保存的农杆菌感受态放置于室温片刻，待其部分融化，处于冰水混合状态时插入冰浴中。

b.每 100 $\mu$ L 感受态加入 0.1-1 $\mu$ g 质粒 DNA(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。

c.冰上静置 15-20min。

d.放于液氮中速冻 1-3min, 立即放入 37 $^{\circ}$ C 中水浴 5min。

e.加入 500-700 $\mu$ L 无抗生素的 LB 或 YEB 液体培养基, 28-30 $^{\circ}$ C 振荡培养 2-4h。

f.4000 $\times$ g 离心 1min 收菌, 留取 100 $\mu$ L 左右上清轻轻吹打重悬农杆菌沉淀, 涂布于含相应抗生素(载体抗性)的 LB 或 YEB 平板上, 倒置放于 28 $^{\circ}$ C 培养箱培养 2-3d。

g.后续可以挑取菌落进行 PCR 鉴定等。

**注意事项:**

1. 本试剂盒中提供的利福平溶液如果出现沉淀, 属于正常现象, 可以在充分溶解后使用。
2. 感受态制备的过程中须注意无菌操作, 避免其它微生物的污染。
3. 本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品, 不得存放于普通住宅内。
4. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。