

DH10Bac Chemically Competent Cell 产品说明书

● 产品规格 (CAT#: DL1071)

DH10Bac Competent Cell	100μl /支
pUC19 (control vector, 10pg/μl)	10μl
保存条件 (保质期) :	-80°C (6个月)

● 基因型

F- *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) φ80*lacZ*ΔM15 Δ*lacX74 recA1 endA1 araD139* Δ(*ara, leu*)7697 *galJ galK λ- rpsL nupG* /pMON14272 / pMON7124

● 产品说明

DH10Bac 菌株主要用于生产重组杆状病毒分子(Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统)。该菌株中含有父本杆粒 bMON14272、辅助质粒 pMON7124：父本杆粒 bMON14272 包含 mini-F 复制子，卡那抗性基因，*attTn7* 位点和 *lacZ* α 互补因子；辅助质粒 pMON7124 含有 *tnsABCD* 区 (*tnsABCD* region supplies the transposition proteins required for insertion of the mini-Tn7 from the donor plasmid into its target site on the parent bacmid)，编码转移酶和四环素抗性基因，这个辅助质粒促进 Tn7 转移。可提高供体质粒 pFastBac (具有庆大霉素抗性) 转化后的基因转座效率。*mcrA*、*mcrBC* 及 *mrr* 突变使 DH10Bac 菌株适合于克隆富含甲基胞嘧啶或甲基腺嘌呤的 DNA (Therefore, genomic DNA, both prokaryotic and eukaryotic, can be cloned efficiently in DH10Bac)。 *recA1* 和 *endA1* 的突变有利于插入 DNA 的稳定和高纯度质粒 DNA 的提取。φ80*lacZ*ΔM15 的存在使 DH10Bac 可用于蓝白斑筛选，DH10Bac 感受态细胞经特殊工艺制作，pUC19 质粒 (2686bp, Amp^R) 检测转化效率>10⁸cfu/μg DNA。

● 操作方法

供体质粒 (pFastBac 等) 转化重组方法:

1. DH10Bac 感受态细胞从-80°C拿出，迅速插入冰中，5 分钟后待菌块融化，加入供体质粒 (pFastBac 等) 1ng，并用手拨打 EP 管底混匀，冰中静置 25 分钟。
2. 42°C水浴热激 45 秒，迅速放回冰中并静置 2 分钟，晃动会降低转化效率。
3. 向离心管中加入 900μl 不含抗生素的 SOC 液体培养基，37°C，225 rpm 复苏 4 小时。
4. 复苏完成后，用 SOC 稀释转化液到 (10⁻¹, 10⁻²)，每个稀释用吸取 100ul 铺一个 LB 平板 (共涂 3 个平板)，平板包含 50ug/ml Kan，7ug/ml Gentamicin，7ug/ml tetracycline，40ug/ml X-gal，40ug/ml IPTG。
5. 将平板倒置放于 37°C培养箱 48h (抗生素含量较高，需在 37 度长时间培养才能挑到成功重组的合适克隆)。

阳性验证:

1. 挑 10 个白色的克隆, 重新划线在 LB 平板 (50ug/ml Kan, 7ug/ml Gentamicin, 7ug/ml tetracycline, 40ug/ml X-gal, 40ug/ml IPTG)。37 度过夜培养。
2. 挑选白色的克隆, 转接到含有 50ug/ml Kan, 7ug/ml Gentamicin, 7ug/ml tetracycline 的 LB 培养液中, 过夜培养。
3. 使用试剂盒 (QIAGEN cat. 12162) 或异丙醇-醋酸钠法抽提重组质粒 DNA (>100kb)。
4. 使用 PCR 法分析重组质粒是否正确重组。

pUC19 检测转化效率方法:

1. DH10Bac 感受细胞态从 -80°C 拿出, 迅速插入冰中, 5 分钟后待菌块融化, 加入目的 DNA (质粒或连接产物) 并用手拨打 EP 管底混匀, 冰中静置 25 分钟。
2. 42°C 水浴热激 45 秒, 迅速放回冰中并静置 2 分钟, 晃动会降低转化效率。
3. 向离心管中加入 700μl 不含抗生素的无菌培养液 LB, 37°C, 200 rpm 复苏 60 分钟。
4. 取 100μl 转化液涂布到含 50-100ug/ml 氨苄的 LB 平板上。
5. 将平板倒置放于 37°C 培养箱 12-16h, 统计计算转化效率。

● 注意事项

1. 感受态细胞最好在冰中缓慢融化, 插入冰中 8 分钟内加入目标 DNA, 不可在冰中放置时间过长, 长时间存放会降低转化效率。
2. 转化高浓度的质粒可相应减少最终用于涂板的菌量。
3. 涂板时务必涂干, 平板表面不留任何水份。
4. 若要获得大量, 高纯度质粒, 建议在 TB 培养基 (唯地 CAT#: CM1018L) 中摇菌培养 (以标准质粒 PUC19 为例: 在 TB 营养液中过夜培养的菌体浓度和质粒产量为 LB 的 3-4 倍, SOC 的 2 倍)