DH10Bac (BmNPV) Chemically Competent Cell 产品说明书

● 产品规格（CAT#：DL1071B）

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

● 基因型

F- *mcr*A Δ(*mrr-hsd*RMS-*mcr*BC) ϕ80*lac*ZΔM15 Δ*lac*X74 *rec*A1 *end*A1 *ara*D139 Δ(*ara*, *leu*)7697 *gal*U *gal*K λ- *rps*L *nup*G / bMON14272-Bm / pMON7124

● 产品说明

DH10Bac (BmNPV) 菌株与 DH10Bac 菌株的主要区别是细胞内的父本杆粒不同，两个菌株的核基因及辅助质粒完全一样。DH10Bac，即是 DH10Bac (AcMNPV)，内含父本杆粒：bMON14272（来源于苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒 AcMNPV），配套的昆虫细胞为 Sf9、Sf21、High 5 等草地夜蛾 / 粉纹夜蛾细胞；DH10Bac (BmNPV)，内含父本杆粒：bMON14272-Bm（来源于家蚕核型多角体病毒 BmNPV），配套的昆虫细胞为 BmN、Bm5 等家蚕细胞，AcMNPV 病毒不能感染家蚕细胞，BmNPV 病毒也不能感染夜蛾细胞。两种父本杆粒在不同的昆虫细胞中表达目标蛋白，不同的昆虫细胞具有不同的蛋白表达谱和表达偏好，所以两种昆虫系统功能具有互补性，不能相互代替。

DH10Bac (BmNPV)主要用于生产 Bm 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-Bm 、辅助质粒 pMON7124 ：父本杆粒 bMON14272-Bm 包含 mini-F 复制子，卡那抗性基因，完整野生型 BmMNPV 病毒基因组（昆虫细胞复制、包装病毒衣壳骨架等必需基因），晚期 / 极晚期强启动子蛋白表达框（外源蛋白表达框），*att*Tn7 位点和 *lac*Z α 互补因子；辅助质粒 pMON7124 含有 tnsABCD 区，编码转移酶和四环素抗性基因，主要作用是促进 Tn7 转移，提高供体 pFastBac 系列质粒（具有庆大霉素抗性）转化后的基因转座效率。*mcr*A、*mcr*BC 及 *mrr* 突变使 DH10Bac (BmNPV) 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 (BmNPV) ）。*rec*A1 和 *end*A1 的突变有利于插入 DNA 的稳定和高纯度质粒 DNA 的提取。ϕ80*lac*ZΔM15 的存在使 DH10Bac (BmNPV) 可用于蓝白斑筛选，DH10Bac (BmNPV) 感受态细胞经特殊工艺制作，pUC19 质粒（2686bp，Amp^R）检测转化效率>10^8cfu/μg DNA。

附言：配套 DH10Bac (AcMNPV)系统的 pFastBac、pFastBac-HTA/B/C、pFastBac-Dual 等质粒同样适配 DH10Bac (BmNPV) 系统。操作方法与 DH10Bac (AcMNPV)系统完全一致。

● 操作方法

供体质粒（pFastBac 等）转化重组方法：

1. DH10Bac (BmNPV) 感受态细胞从-80℃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℃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℃，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），吸取每个稀释梯度复苏液 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℃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菌落）。

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. 使用质粒中提或大提试剂盒或异丙醇-醋酸钠法抽提重组质粒 DNA（病毒杆粒＞100kb，质粒小提试剂盒提取质粒浓度过低，杂质含量高，不适合后续的昆虫细胞转染试验）。

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 (BmNPV) 感受细胞态从-80℃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℃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℃，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℃培养箱 12-16h，统计计算转化效率。

● 配套试剂货号

产品名称	货号	产品名称	货号	产品名称	货号
pFastBac-HTC 质粒	CAT#: PA1006	pFastBac1	CAT#: PA1007	pFastBac-HTA	CAT#: PA1008
pFastBac-Dual	CAT#: PA1009	LB 固体培养基	CAT#:CM1010S	硫酸卡那霉素	CAT#：YC9020L
氨苄青霉素钠	CAT#:YC9020L	庆大霉素	CAT#:YC9090L	四环素	CAT#:YC9050L
X-Gal 溶液（20 mg/ml，过滤除菌）	CAT#:YC8012	IPTG 溶液（100 mg/ml）	CAT#:YC8024	Nova SFM昆虫细胞无血清培养基	CAT#: IM1011

● 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）