



DH10Bac Chemically Competent Cell 产品说明书

产品规格 (CAT#: YC124)

DH10Bac :	100μl/支
pUC19 (control vector , 0.1ng/μl):	5μl
保存条件(保质期) :	-80°C (6 个月)

产品介绍

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 *lacZα* 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), 具有四环素抗性, 在细胞扩增过程中丢失, 但可提高供体质粒 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。 $\phi 80/lac\Delta M15$ 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 质粒检测转化效率 $> 10^8$ cfu/μg DNA。

基因型 : F- *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) $\phi 80/lac\Delta M15$ $\Delta lacX74$ *recA1 endA1 araD139 Δ (*ara, leu*)7697 *galU galK* λ -*rpsL nupG* /pMON14272 / pMON7124*

操作方法一 : (pUC19 检测转化效率方法)

1. 取感受态细胞置于冰浴中 (解冻 1-2 分钟) , 加入目的 DNA (质粒或连接产物) , 轻轻混匀, 在冰浴中放置 25 分钟。

注意 : 所使用 DNA 体积不要超过感受态细胞体积的 1/10。

2. 将离心管置于 42°C 水浴中放置 60 秒, 然后快速将管转移到冰浴中, 使细胞冷却 2 分钟, 该过程不要摇动离心管。

3. 向每个离心管中加入 700μl 无菌的 SOC 或 LB 培养基 (不含抗生素) , 混匀后置于 37°C 180rpm 摇床振荡培养 45-60 分钟, 目的是使质粒上相关的抗性标记基因表达, 使菌体复苏。

4. 根据实验要求, 吸取适量体积已转化的感受态细胞加到含相应抗生素的 SOC 或 LB 固体琼脂培养基上, 将细胞均匀涂开。将平板置于室温直至液体被吸收, 倒置平板, 37°C 培养 12-16 小时。

操作方法二（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) 10-100ng, 并用手拨打 EP 管底混匀, 冰中静置 25 分钟。
2. 42°C 水浴热激 60 秒, 迅速放回冰中并静置 2 分钟, 该过程不要摇动离心管。
3. 向离心管中加入 900 μl 不含抗生素的 SOC 液体培养基, 37°C , 180 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 100 μl 铺一个 LB 平板 (共涂 3 个平板), 平板包含 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Kan, 7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Gentamicin, 7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ tetracycline, 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ X-gal, 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 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°C 长时间培养才能挑到合适克隆)。

阳性验证

1. 挑 10 个白色的克隆, 重新划线在 LB 平板 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Kan, 7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Gentamicin, 7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ tetracycline, 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ X-gal, 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ IPTG)。 37°C 过夜培养。
2. 挑选白色的克隆, 转接到含有 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Kan, 7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Gentamicin, 7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 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 ($>100\text{kb}$)。使用 PCR 法分析重组质粒是否正确重组。

注意事项

1. 感受态细胞需要在冰中缓慢融化, 插入冰中 10 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. 混入质粒或连接产物时应轻柔操作, 避免用移液枪吹吸。
3. 转化高浓度的质粒或高效率的连接产物可相应减少最终用于涂板的菌量。
4. 感受态细胞应保存在 -80°C , 请避免反复冻融, 以免降低感受态细胞的转化效率。
5. 为防止转化实验不成功, 可以保留部分连接反应液, 以重新转化, 将损失降低到最低。