

河南普诺易生物制品研究院有限公司
Henan Proteineasy Biological Products Research Institute CO., LTD
DH10Bac 感受态细胞

货号: CC1004

规格: 100 μ L \times 10

产品简介:

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), 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。 ϕ 80lacZ Δ 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/ μ g DNA。

基因型: F-mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 endA1 araD139 Δ (ara, leu)7697 galU galK λ -rpsLnupG/pMON14272/pMON7124

保存条件:

-80 $^{\circ}$ C 保存, 一年有效。

使用说明: (以下操作均按无菌条件的标准进行)

供体质粒 (pFastBac 等) 转化重组方法:

1. DH10Bac 感受态细胞从 -80 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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 900 μ l 不含抗生素的 SOC 液体培养基, 37 $^{\circ}$ 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 100 μ l 铺一个 LB 平板 (共涂 3 个平板), 平板包含 50 μ g/mL Kan、7 μ g/mL Gentamicin、7 μ g/mL tetracycline、40 μ g/mL X-gal、40 μ g/mL IPTG。
5. 将平板倒置放于 37 $^{\circ}$ C 培养箱 48 小时 (抗生素含量较高, 需在 37 度长时间培养才能

河南普诺易生物制品研究院有限公司
Henan Proteineasy Biological Products Research Institute CO., LTD
DH10Bac 感受态细胞

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 度过夜培养。

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 (或异丙醇-醋酸钠法抽提重组质粒 DNA (>100 kb))。使用 PCR 法分析重组质粒是否正确重组。

注意事项:

1. 感受态细胞应保存在 -80°C , 不可反复冻融, 否则其转化效率将会降低。

2. 实验过程中应严格无菌操作, 防止其它 DNA 或杂菌的污染, 避免为以后的筛选、鉴定带来影响。

3. 转化时, 转化效率与外源 DNA 的浓度在一定范围内成正比, 但当加入的外源 DNA 量过多或体积过大反而会降低转化效率。转化时 DNA 体积要小于感受态细胞体积的十分之一。