



DH10Bac 感受态细胞

产品信息:

组成	BC112-01
DH10Bac Competent cells	20×100μl
pUC19 (0.1ng/μl)	5μl

储存条件: -70℃保存, 避免反复冻融。

产品介绍:

大肠杆菌DH10Bac感受态细胞, 适用于昆虫杆状病毒Bac-to-Bac系统中同源重组的菌株, 用于产生重组Bacmid。是经特殊工艺制备, 使用pUC19质粒检测, 转化效率可达 10^7 cfu/μg, -70℃保存几个月转化效率不发生改变。

基因型:

F-mcrAA(mrr-hsdRMS-mcrBC)φ80lacZΔM15ΔlacX74recA1endA1araD139Δ(ara,leu)7697galUgalKλ-rpsLnupG/pMON14272/pMON7124

产品特点:

DH10Bac 细胞包含亲本 Bacmid bMON14272 和辅助质粒 pMON7124 亲本 Bacmid 包含一个 mini-F 复制子、卡那霉素抗性基因、att Tn7 位点和 lac Zα-互补因子。辅助质粒包含 tns ABCD 区域, 该区域提供了 mini-Tn7 从供体质粒插入亲本 Bacmid 靶位点所需要的转座蛋白。供体如 pFastBac 系列质粒 (pFastBac1, pFastBacDual 等) 含有 Tn7R 和 Tn7L 同源重组臂, Tn7R 和 Tn7L 之间包含庆大霉素抗性基因、昆虫病毒多角体基因启动子、多克隆位点和 SV40 病毒的 PolyA 加尾信号。当含有靶基因 pFastBac 的重组质粒转化到 DH10Bac 细胞后, 发生重组后就可产生重组 Bacmid, 提取纯化重组 Bacmid 转染昆虫细胞 Sf9 或 Sf21 就可以包装产生昆虫病毒。此外, DH10Bac 细胞中的 The φ80dlacZΔM15 基因的产物可以实现β-半乳糖苷酶的α-互补现象, 用于重组 Bacmid 的蓝白斑筛选。

操作步骤 (以下操作均按无菌条件的标准进行):

提示

- ◆ 感受态细胞应保存在-70℃, 不可多次冻融和放置时间过长, 以避免降低感受态细胞的转化效率。
- ◆ 制备含下面抗生素的 LB 固体平板:

50μg/ml kanamycin、7μg/ml gentamicin、10μg/ml tetracycline、100μg/ml X-gal、40μg/ml IPTG。

1. 取感受态细胞置于冰浴中, 如需分装可将刚融化细胞悬液分装到无菌预冷的离心管中, 置于冰浴中。(一次转化感受态细胞的建议用量为 50-100μl, 可以根据实际情况分装使用。应注意所用 DNA 体积不要超过感受态细胞悬液体积的十分之一。)以下实验以 100μl 感受态细胞为例。

2. 向感受态细胞悬液中加入 1-10ng 重组质粒，轻轻旋转离心管以混匀内容物，在冰浴中静置 30 分钟。
3. 将离心管置于 42℃ 水浴中放置 90 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。
4. 向每个离心管中加入 900μl 无菌的 SOC（不含抗生素），混匀后置于 37℃ ,200rpm，摇床振荡培养 4 小时。
5. 用 SOC 培养基进行 10 倍梯度稀释，如分成 3 个稀释梯度 10^{-1} ， 10^{-2} ， 10^{-3} 。
6. 取 100ul 的各个梯度的培养物用于涂布。等平板中的液体完全吸收后，倒置平板，37℃ 培养 24-48 小时。
7. 保留剩余的菌液于 4℃ 冰箱中，视平板上菌落生长情况决定去留。

相关试剂及培养基的制备方法：

1. LB 液体培养基：称取 10g Tryptone，5g Yeast Extract 和 10g NaCl 置于 1L 烧杯中。加入约 800ml 的去离子水，完全溶解后用 2mol/L 的 NaOH 溶液调节 pH 值至 7.0。加去离子水定容至 1L。分装后，121℃ 高压灭菌 20 分钟。
2. SOB和SOC 培养基：称取 20g Tryptone，5g Yeast Extract，0.5g NaCl 置于 1L 烧杯中加入约 800ml 的去离子水，完全溶解后再补加 10ml 250mM KCl 溶液，滴加 5M NaOH（约 0.2ml）调 pH 至 7.0。加入去离子水将培养基定容至 1L。121℃ 灭菌 20 分钟。使用时加入 5ml 灭菌的 2M $MgCl_2$ 溶液（此种培养基称为 SOB）。再补加经 0.22μm 过滤除菌的 1M 葡萄糖溶液 2ml（此种培养基为 SOC）。
3. 转化复苏细菌用的液体 LB 培养基或 SOC 培养基：可以一次高压 50ml 液体培养基，无菌状态按 1ml 每管分装于高压灭菌的 1.5ml 离心管中，装于自封袋中，冻存于 -20℃ 中，每次用一支。可以极大地避免培养基污染和减少劳动量。
4. LB 固体选择培养基：100ml LB 液体培养基中加入 1.5g 琼脂粉，摇匀后，121℃ 高压灭菌 20 分钟。冷却至 50℃ 左右时加入相应浓度的抗生素（如 AMP 浓度通常为 100μg/ml），混匀后倒在细菌用的无菌培养皿中，等琼脂凝固后即可使用。
5. IPTG：称量 1.9g IPTG（MW=238.31）充分溶解于 40ml 灭菌水，浓度为 200mmol/L。用无菌 0.22μm 过滤膜过滤除菌。小份分装后，-20℃ 保存。
6. X-gal：用 DMF（二甲基甲酰胺）配制成 20mg/ml，小份分装（1ml/份）后，-20℃ 避光保存。

BM190318