



## DH10Bac Chemically Competent Cell

**产品货号：** KLC1601

**产品规格：** 100 $\mu$ l/支

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

### 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 *lacZ $\alpha$*  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。 $\phi$ 80lacZ $\Delta$ 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，转化效率  $>10^8$ cfu/ $\mu$ g 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 900 $\mu$ l 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<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup> )，每个稀释用吸取 100 $\mu$ l 铺一个 LB 平板 ( 共涂 3 个平板 )，平板包含 50 $\mu$ g/ml Kan，7 $\mu$ g/ml Gentamicin，7 $\mu$ g/ml tetracycline，40 $\mu$ g/ml X-gal，40 $\mu$ g/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 $\mu$ g/ml Kan，7 $\mu$ g/ml Gentamicin，7 $\mu$ g/ml tetracycline，40 $\mu$ g/ml X-gal，40 $\mu$ g/ml IPTG )。37 度过夜培养。
2. 挑选白色的克隆，转接到含有 50 $\mu$ g/ml Kan，7 $\mu$ g/ml Gentamicin，7 $\mu$ g/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 )。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 700 $\mu$ l 不含抗生素的无菌培养液 LB，37°C，200 rpm 复苏 60 分钟。
4. 取 100 $\mu$ l 转化液涂布到含 50-100 $\mu$ g/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。

### 保存条件：

-80°C 保存 6 个月。