

M5 HiPer DB10Bac Competent Cell (DB10Bac 感受态细胞) 使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 HiPer DB10Bac Competent Cell	100 μ l \times 10 支	MF833-10
M5 HiPer DB10Bac Competent Cell	100 μ l \times 20 支	MF833-20

【储存条件】

-70°C 恒温保存，避免反复冻融，有效期六个月；干冰运输。

【产品简介】

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 107 cfu/ μ g，-70°C 保存几个月转化效率不发生改变。

基 因 型 : *F-mcrAΔ(mrr-hsdRMS-mcrBC)φ80lacZΔM15ΔlacX74recA1endA1araD139Δ(ara,leu)7697galUgalKλ-rpsL.nupG/pMON14272/pMON7124*

【产品特点】

DH10Bac 细胞包含亲本 Bacmid pMON14272 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、attTn7 位点和 lac Z α -互补因子。辅助质粒包含 tnsABCD 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 ϕ 80lacZ Δ M15 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。

【使用方法】

提示

- 感受态细胞应保存在-70°C，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：50 μ g/ml kanamycin、7 μ g/ml gentamicin、10 μ g/ml tetracycline、100 μ g/ml X-gal、40 μ g/ml IPTG

按照无菌操作规程进行下列操作步骤：

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 50-100 μ l，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 100 μ l 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°C 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 900 μ l 无菌的 SOC (不含抗生素)，混匀后置于 37°C, 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 100 μ l 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°C 培养 24-48 小时。
7. 保留剩余的菌液于 4°C 冰箱中，视平板上菌落生长情况决定去留。

【注意事项】

1. 融化后的感受态细胞应及时进行转化，以免降低转化效率；融化后不宜再次冻结保存。
2. 整个操作过程要轻柔，避免移液枪吹吸。
3. 请使用传热性能好的薄壁试管或离心管，换用不同的试管或离心管时，应摸索热激时间，以获得最佳转化效率。
4. 请保留剩余的连接反应液，以便在转化实验不成功时重新进行转化。
5. 经验表明，使用 SOC 培养基复苏比使用 LB 培养基复苏的转化效率高约一倍以上。

【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 MgCl₂ 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。

【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。