天净沙系列

CAT#:26-018

干冰运输、-80℃保存

天净沙

大肠杆菌 DH10Bac 感受态细胞

E. coli DH10Bac Chemically Competent Cells

使用手册 V0.8

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

产品及特点

本产品是大肠杆菌 DH10Bac 化学感受态细胞，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。其中父本杆粒 bMON14272 包含 mini-F 复制子,卡那抗性基因,*att*Tn7 位点和 *lac*Zα 互补因子；辅助质粒 pMON7124 含有 tnsABCD 区，编码转移酶和四环素抗性基因，这个辅助质粒促进 Tn7 转移。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。

该菌株的基因型为：F- mcrA Δ(*mrr-hsd*RMS-*mcr*BC) φ80*lacZ*ΔM15 Δ*lac*X74 *rec*A1 *end*A1 *ara*D139 Δ(*ara, leu*)7697 *gal*U *gal*K λ- *rps*L *nup*G /pMON14272 /pMON7124

本产品具有以下特点：

1. 该菌株具有卡那抗性，四环素抗性，由特殊工艺制作。
2. 存在 φ80*lacZ*ΔM15，故 DH10Bac 可用于蓝白斑筛选。
3. *rec*A1 和 *end*A1 突变，有利于插入 DNA 的稳定和高纯度质粒 DNA 的提取。
4. *mcr*A、*mcr*BC 及 *mrr* 突变，使 DH10Bac 适合于克隆富含甲基胞嘧啶或甲基腺嘌呤的 DNA。
5. pUC19 质粒（2686 bp，Amp^R）检测转化效率>1E8 cfu/μg DNA
6. 本产品足够 10 次 100 μL 的转化实验。
7. 本产品只可用于科研。

规格及成分

本产品采用 logo 热封袋包装

成分	编号	规格	包装
大肠杆菌 DH10Bac 化学感受态细胞	26-018a	100 μL×10	1.5 mL 本色管
pUC19（10 pg/μL）	26-018b	10 μL	1.5 mL 本色管
使用手册	26-018sc	1 份	无

运输及保存

干冰运输，-80℃保存，有效期为 6 个月

自备物品

质粒，EP 管，0.9% NaCl。

使用方法

1. DH10Bac 感受态细胞从-80℃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）1 ng，并用手拨打 EP 管底轻轻混匀（避免用枪吸打），冰中静置 25 分钟。
2. 42℃水浴热激 45 秒，迅速放回冰上并静置 2 分钟，晃动会降低转化效率。
3. 向离心管中加入 900 μL 不含抗生素的 SOC 液体培养基，37℃，225×g 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 μg/mL Kan，7 μg/mL Gentamicin，7 μg/mL tetracycline，40 μg/mL X-gal，40 μg/mL IPTG。 5. 将平板倒置放于 37℃培养箱 48 h（抗生素含量较高，需在 37℃长时间培养才能挑到成功重组的合适克隆）。 **阳性验证：** 1. 挑 10 个白色的克隆，重新划线在 LB 平板（50 μg/mL Kan，7 μg/mL Gentamicin，7 μg/mL tetracycline，40 μg/mL X-gal，40 μg/mL IPTG）。37℃过夜培养。 2. 挑选白色的克隆，转接到含有 50 μg/mL Kan，7 μg/mL Gentamicin，7 μg/mL tetracycline 的 LB 培养液中，过夜培养。 3. 使用试剂盒或微量核酸沉淀剂 IPA 型(230506)抽提重组质粒 DNA(＞100 kb)。 4. 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 感受细胞态从-80℃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℃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 μL 不含抗生素的无菌培养液 LB，37℃，200×g 复苏 60 分钟。 4. 取 100 μL 转化液涂布到含 50-100 μg/mL 氨苄的 LB 平板上。 5. 将平板倒置放于 37℃培养箱 12-16 h，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。 4. 若要获得大量，高纯度质粒，建议在 TB 培养基中摇菌培养。
关联产品	大肠杆菌 DH10Bac 菌种