

DH10Bac(甘油菌)

产品编号: MB15005-1 规格: 200μL

产品内容:

产品组成	MB15005-1
DH10Bac(甘油菌)	200μL
说明书	1 份

产品简介:

DH10Bac 甘油菌, 是收集生长在对数期的 DH10Bac 菌, 加入含有甘油的细菌冻存液制备而成。可以直接划平板或小量、大量培养。

DH10Bac 是昆虫杆状病毒 Bac-to-Bac 系统中常用的同源重组大肠杆菌菌株。该菌株含有杆状病毒穿梭载体(baculovirus shuttle vector) bMON14272(俗称 bacmid, 其含有一个转座反应必须的 mini-attTn7 重组位点)和一个辅助质粒 pMON7124(用于表达转座所需的转座蛋白)。DH10Bac 主要用作 pFastBac 等类似载体转化的宿主菌株。当 pFastBac 重组质粒转化进入 DH10Bac 细胞后, pFastBac 载体上的 mini-Tn7 位点和 DH10Bac 宿主菌中 bacmid 上的 mini-attTn7 位点之间发生转座(transposition), 产生重组的 bacmid。重组的 bacmid 在转染昆虫细胞后可产生含有重组子的杆状病毒, 后者进一步感染昆虫细胞后即可启动外源重组蛋白的表达。

DH10Bac 宿主包含的 bacmid bMON14272 含小型 F 复制子, 卡那霉素抗性基因, mini-attTn7 位点和 lacZα 互补因子(可通过蓝白斑筛选); 辅助质粒 pMON7124 包含四环素抗性和 tnsABCD 区域, 该区域表达转座反应所需的转座蛋白。携带 T7 转座原件(Tn7 element)的供体质粒 pFastBac (donor pFastBac plasmid)带有庆大霉素抗性基因, 杆状病毒多角体启动子, 多克隆位点区域和 SV40 的多腺苷酸化信号。

使用 DH10Bac 制备 DH10Bac 感受态细胞, 转化在多克隆位点插入目的基因的 pFastBac 重组质粒产生重组的 bacmid, 提取重组 bacmid DNA, 将重组 bacmid DNA 转染进入昆虫细胞产生重组杆状病毒, 扩增重组的杆状病毒并用其感染昆虫细胞, 就可以大规模表达重组目的蛋白。

DH10Bac 菌株具有卡那霉素抗性和四环素抗性, pFastBac 质粒具有庆大霉素(Gentimycin)抗性和氨苄青霉素抗性。

DH10Bac 菌株基因型: F- *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ80/*lacZ*Δ*M15* Δ*lacX74* *recA1* *endA1* *araD139* Δ(*ara, leu*)7697 *galU* *galK* λ-*rpsL* *nupG* / pMON14272 / pMON7124。

重组后的克隆用蓝白斑进行筛选, 重组成功的克隆在含有卡那霉素和四环素抗性的 IPTG/X-Gal LB 平板上呈现为白色菌落。

本菌株可以使用常规的 LB 培养基或 SOC 培养基进行培养。

操作方法:

(一) 实验前准备:

1. 将 DH10Bac 甘油菌保种管置于冰盒中, 全程需在超净工作台内实施无菌操作。
2. 准备含卡那霉素(100μg/ml)和四环素(10μg/ml)的 LB 固体培养基平板或 LB 液体培养基, 使用前室温平衡 30 分钟。

(二) 菌种培养:

a. 划平板接种:

1. 接种环灭菌: 将接种环置于酒精灯外焰灼烧灭菌, 使接种环处于无菌状态, 冷却至室温后使用。
2. 初代划线: 接种环蘸取少量已解冻的菌液, 使接种环与 LB 固体培养基呈 30-40° 夹角, 在含卡那霉素(100μg/ml)和四环素(10μg/ml)的 LB 平板上连续作 S 形或 Z 形轻轻划动, 进行不重叠来回划线, 首区覆盖面积约占整个平板的 1/5-1/6。
3. 继代划线: 每完成一个划线区后重新灼烧灭菌接种环, 冷却至室温, 与前次轨迹呈 90° 或 120° 夹角,



依次进行第二至第四象区的交替划线。

4. 培养条件：倒置平板于 37°C 恒温培养箱，培养 12-16 小时。

b. 直接培养：

1. 使用 70%乙醇浸润镊子尖端，经酒精灯外焰灼烧灭菌，待冷却后夹取无菌塑料枪头或牙签，蘸取少量已解冻菌液，将带菌接种物转移至含 3mL LB 液体培养基(含卡那霉素(100μg/ml)和四环素(10μg/ml))试管内或者 100mL 及以上体积的 LB 液体培养基(含卡那霉素(100μg/ml)和四环素(10μg/ml))细菌培养瓶中。

2. 置于恒温振荡培养箱中 37°C，200rpm 振荡培养 12-16 小时。

(三) 感受态细菌的制备

可以使用美仑生物的超级感受态细菌制备试剂盒(货号：MA0661)或其他方法进行感受态细胞的制备。

保存条件：-20°C 保存，3 个月有效。-80°C 可以长期保存。

运输条件：湿冰运输。

注意事项：

- 使用本甘油菌时可以不必要完全融解，在甘油菌表面蘸取少量涂板或进行液体培养即可。也可以完全融解后使用，但随着冻融次数的增加细菌的活力会逐渐下降。
- 为保证菌种纯正，避免其它细菌污染，尽量先划平板然后再挑单克隆菌落进行后续操作。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

S250401

