

DH10Bac (BmNPV) Chemically Competent Cell 产品说明书

● 产品规格 (CAT#: DL1071B)

DH10Bac (BmNPV) Competent Cell	100μl /支
pUC19 (control vector, 10pg/μl)	10μl
保存条件 (保质期) :	-80℃ (6 个月)

● 基因型

F- *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) φ80/*lacZ*ΔM15 Δ*lacX*74 *recA1 endA1 araD*139 Δ(*ara, leu*)7697 *galU galK* λ- *rpsL nupG* / bMON14272-Bm / pMON7124

● 产品说明

DH10Bac (BmNPV) 菌株与 DH10Bac 菌株的主要区别是细胞内的父本杆粒不同，两个菌株的核基因及辅助质粒完全一样。DH10Bac，即是 DH10Bac (AcMNPV)，内含父本杆粒：bMON14272 (来源于苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒 AcMNPV)，配套的昆虫细胞为 Sf9、Sf21、High 5 等草地夜蛾 / 粉纹夜蛾细胞；DH10Bac (BmNPV)，内含父本杆粒：bMON14272-Bm (来源于家蚕核型多角体病毒 BmNPV)，配套的昆虫细胞为 BmN、Bm5 等家蚕细胞，AcMNPV 病毒不能感染家蚕细胞，BmNPV 病毒也不能感染夜蛾细胞。两种父本杆粒在不同的昆虫细胞中表达目标蛋白，不同的昆虫细胞具有不同的蛋白表达谱和表达偏好，所以两种昆虫系统功能具有互补性，不能相互代替。

DH10Bac (BmNPV) 主要用于生产 Bm 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-Bm、辅助质粒 pMON7124：父本杆粒 bMON14272-Bm 包含 mini-F 复制子，卡那抗性基因，完整野生型 BmMNPV 病毒基因组 (昆虫细胞复制、包装病毒衣壳骨架等必需基因)，晚期 / 极晚期强启动子蛋白表达框 (外源蛋白表达框)，*attTn7* 位点和 *lacZ* α 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，主要作用是促进 Tn7 转移，提高供体 pFastBac 系列质粒 (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 (BmNPV) 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 (BmNPV))。*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。φ80/*lacZ*ΔM15 的存在使 DH10Bac (BmNPV) 可用于蓝白斑筛选，DH10Bac (BmNPV) 感受态细胞经特殊工艺制作，pUC19 质粒 (2686bp, Amp^R) 检测转化效率 >10⁸cfu/μg DNA。

附言：配套 DH10Bac (AcMNPV) 系统的 pFastBac、pFastBac-HTA/B/C、pFastBac-Dual 等质粒同样适配 DH10Bac (BmNPV) 系统。操作方法与 DH10Bac (AcMNPV) 系统完全一致。

● 操作方法

供体质粒 (pFastBac 等) 转化重组方法：

1. DH10Bac (BmNPV) 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)

1ng, 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 900μl 不含抗生素的 SOC 液体培养基, 37℃, 225 rpm 复苏 4 小时。

4. 复苏完成后, 用 SOC 稀释转化液到 (10-1, 10-2), 吸取每个稀释梯度复苏液 100ul 铺一个 LB 平板 (共涂 3 个平板), 平板包含 50ug/ml Kan, 7ug/ml Gentamicin, 7ug/ml tetracycline, 40ug/ml X-gal, 40ug/ml IPTG。

5. 将平板倒置放于 37℃培养箱 48h (抗生素含量较高, 需在 37 度长时间培养才能挑到成功重组的菌落)。

阳性验证:

1. 挑 10 个白色的克隆, 重新划线在 LB 平板 (50ug/ml Kan, 7ug/ml Gentamicin, 7ug/ml tetracycline, 40ug/ml X-gal, 40ug/ml IPTG)。37 度过夜培养。

2. 挑选白色的克隆, 转接到含有 50ug/ml Kan, 7ug/ml Gentamicin, 7ug/ml tetracycline 的 LB 培养液中, 过夜培养。

3. 使用质粒中提或大提试剂盒或异丙醇-醋酸钠法抽提重组质粒 DNA (病毒杆粒 > 100kb, 质粒小提试剂盒提取质粒浓度过低, 杂质含量高, 不适合后续的昆虫细胞转染试验)。

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 (BmNPV) 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 700μl 不含抗生素的无菌培养液 LB, 37℃, 200 rpm 复苏 60 分钟。

4. 取 100μl 转化液涂布到含 50-100ug/ml 氨苄的 LB 平板上。

5. 将平板倒置放于 37℃培养箱 12-16h, 统计计算转化效率。

● 配套试剂货号

产品名称	货号	产品名称	货号	产品名称	货号
pFastBac-HTC 质粒	CAT#: PA1006	pFastBac1	CAT#: PA1007	pFastBac-HTA	CAT#: PA1008
pFastBac-Dual	CAT#: PA1009	LB 固体培养基	CAT#: CM1010S	硫酸卡那霉素	CAT#: YC9020L
氨苄青霉素钠	CAT#: YC9020L	庆大霉素	CAT#: YC9090L	四环素	CAT#: YC9050L
X-Gal 溶液 (20 mg/ml, 过滤除菌)	CAT#: YC8012	IPTG 溶液 (100 mg/ml)	CAT#: YC8024	Sf9/Sf21 细胞专用无血清培养基	CAT#: ISC2001

● 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 (唯地 CAT#: CM1018L) 中摇菌培养 (以标准质粒 PUC19 为例: 在 TB 营养液中过夜培养的菌体浓度和质粒产量为 LB 的 3-4 倍, SOC 的 2 倍)