DH10Bac (BmNPV) 二代甘油菌种说明书

● 产品规格（CAT#：Bec-1071B）

DH10Bac (BmNPV) 二代甘油菌	400μl /1 支	保存：-80℃/大于 10 年
LB 平板	9cm / 2 块	4 度保存/30 天
一次性接种环	4 支	——

● 基因型

F- *mcr*A 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 / 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，所以两种昆虫细胞蛋白表达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），*att*Tn7 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。*mcr*A、*mcr*BC 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) ）。*rec*A1 和 *end*A1 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。

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

1，客户收到菌株后，不可直接吸取菌液接种扩繁。应先对菌种进行复壮，待长出单菌落后挑单菌落接菌扩繁；复壮方法如下：在超净台打开盖子，用接种环沾取少量甘油菌液采用交叉划线法（图 1）在 LB 平板表面轻轻划线(注意：不要刺破培养基)，将平板封口后放 37 度培养 15-20h，即可长出单菌落。

2，交叉划线法：划线的目的是经过几次不连续划线达到梯度稀释菌液的效果，保证能长出单菌落。具体步骤如下：

A，-80 度取出的甘油菌应在超净台打开盖子，立即在表面挑取菌液/菌块划线，不用等融化后划线，固体状态时即可用接种环挑取划线，操作要点是“快速操作，立即划线”，目的是最大限度减少温度波动对菌种造成的“冷休克”和冰晶物理损伤；如果收到的是液体甘油菌，可直接划线，在超净台打开盖子用接种环沾取少量甘油菌液划线。

B，取出无菌接种环，注意不要污染，图 1 所示为标准的五段交叉划线法，分五个区，每个区划三条直线，第 1、2 区可共用一个接种环，划好 1，2 区后换一个新接种环划第 3 区，再换一个新接种环划第 4 区，再换一个新接种环划第 5 区，每一次换接种环划线要经过前面划线区的划线痕迹，这样就相当于对菌种进行稀释。简易划线也可只划 3 个区或 4 个区。

C，客户也可用金属接种环灼烧后划线；本公司提供的接种环为 ABS 材质，不可灼烧。

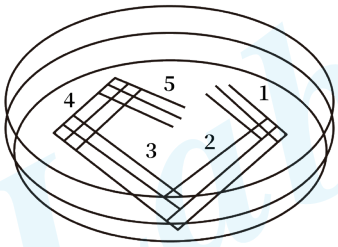


图 1. 五段交叉划线法示意图

● 注意事项

1，客户收到二代甘油菌株后，应立即放-80 度保存，不可放-20 度保存。

2，应减少甘油菌冻融的次数，冻融的次数越多，菌种的活力越低；

3，若扩繁菌种，注意一次扩繁不要超过四个世代，以保证菌种基因组的稳定；扩增后重新保存的菌种必须对菌种做表型、功能验证，所有表型、功能保持完好的菌株才能作为菌种使用。

2nd Lab® For a Better Lab