

## DH10Bac 电击转化感受态使用说明

### 产品规格

| 品名              | 货号        | 规格       |
|-----------------|-----------|----------|
| DH10Bac 电击转化感受态 | EL028-H-S | 5×50 μL  |
|                 | EL028-H-M | 10×50 μL |

保存条件: -80℃ (12 个月)

### 产品简介

DH10Bac 电击感受态细胞只能用于电击转化, 不能用于热激转化。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: 父本杆粒 bMON14272 包含 mini-F 复制子, 卡那抗性基因, attTn7 位点和 lacZ $\alpha$ 互补因子; 辅助质粒 pMON7124 含有 tnsABCD 区 (tnsABCD region supplies the transposition proteins required for insertion of the mini-Tn7 from the donor plasmid into its target site on the parent bacmid), 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。mcrA、mcrBC 及 mrr 突变使 DH10Bac 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)。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。 $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15 的存在使 DH10Bac 可用于蓝白斑筛选。DH10Bac 电击感受态细胞经 pUC19 质粒 (2686bp, Amp<sup>R</sup>) 检测转化效率  $>2.5 \times 10^9$  cfu/ $\mu$ g DNA。

### 基因型

F- mcrA  $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC) $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ lacX74 recA1 endA1 araD139  $\Delta$ (ara, leu)7697 galU galK  $\lambda$ - rpsL nupG / pMON14272 / pMON7124

### 转化方法

1. 取适量睿必特复苏液置 37 度预热 1-2 小时 (每管感受态准备 10ml 复苏液)。
2. 杀菌处理后的 0.1 cm 电击杯和杯盖插入冰中, 压实冰面, 电击杯顶离冰面 0.5 cm 以方便盖上杯盖, 冰中静置 5 分钟充分降温。

3. 取-80℃保存的电击感受态细胞插入冰中 5 分钟, 待其融化, 加入目的 DNA (质粒或连接产物) 并用手拨打 EP 管底轻轻混匀, 避免产生气泡, 立即插入冰中。

(A) 对于连接产物, 部分公司的 T4 连接酶体系或重组体系可与电击感受态混合后电击转化, 无需进行 DNA 纯化, 但 DNA 浓度不能过高, DNA 浓度不超过 100 ng/μl, 体积不超过 1/10 感受态。

(B) 对离子浓度较高的 DNA 溶液或反应体系请用膜纯化或乙醇沉淀法纯化 DNA, ddH<sub>2</sub>O 溶解后电击转化。

4. 用 200 μl 枪头(用刀切除 0.5cm 枪尖)将感受态-DNA 混合物快速移到电击杯中(避免产生气泡), 轻轻晃动使液面保持水平状态, 盖上杯盖, 插入冰中。
5. 启动电转仪, 设置参数: C=25 μF, PC=200 Ω, V=1.8 kV, 将电击杯从冰中拿出, 用吸水纸擦拭表面, 吸干表面水渍, 放入电转槽中, 电击完成后拿出电转杯放室温, 打开杯盖, 15 秒内加入 0.9ml 预热的睿必特复苏液(此步骤可在电转仪旁操作, 无需在超净台操作), 用 1ml 枪吹吸电击杯底部 2-3 次, 混匀后转移到 50 ml 离心管, 向离心管中补加培养基至 10 ml。37℃, 250 rpm 复苏 60 分钟。
6. 5000 rpm 离心一分钟收菌, 重悬后取 100-200 μl 涂布到含相应抗生素的平板上(因菌量较大, 若全部涂板请选用培养皿 2-5 个)。将平板倒置放于 37℃培养箱过夜培养 13-17 小时。

## 注意事项

1. 加入 DNA 时体积不应大于感受态体积的 1/10。
2. 电击感受态细胞加入电击杯应避免产生气泡, 气泡会增加弧光放电风险。
3. 当 DNA 不纯或存在盐, 乙醇, 蛋白及缓冲液等污染时, 转化效率急剧下降。
4. 电击杯里的离子可增加溶液的电导, 增大在含有细胞和 DNA 的溶液中产生电流和弧光放电的风险。
5. 若转化大质粒或想获得较高转化效率, 推荐使用高纯质粒提取试剂盒提取质粒。
6. 对于连接产物, 最好用膜纯化或乙醇沉淀法纯化 DNA 后用适量 ddH<sub>2</sub>O 或 TE 缓冲液重悬产物, 保证 DNA 浓度不超过 100 ng/μl。过高浓度连接产物或过大体积连接产物会降低转化效率, 增加弧光放电的风险。
7. 混入质粒时应轻柔操作, 吸取感受态细胞时避免用力过猛, 以免剪切力过大损伤细胞膜, 降低转化效率。转化高浓度的质粒或连接产物可相应减少最终用于涂板的菌量。
8. 电击感受态细胞最好保存在-80℃以下, 高于-80℃超期储存会导致转化效率会下降。