



碧云天生物技术/Beyotime Biotechnology
 订货热线: 400-1683301或800-8283301
 订货e-mail: order@beyotime.com
 技术咨询: info@beyotime.com
 网址: http://www.beyotime.com

杆状病毒穿梭载体bacmid小量抽提试剂盒

产品编号	产品名称	包装
D0031	杆状病毒穿梭载体bacmid小量抽提试剂盒	50次

产品简介:

- 碧云天生产的杆状病毒穿梭载体bacmid小量抽提试剂盒(Baculovirus Shuttle Vector Bacmid Mini Preparation Kit, 简称 Bacmid Miniprep Kit)是一种从大肠杆菌DH10Bac中简单快速抽提高质量可完美应用于昆虫细胞转染的bacmid的试剂盒。
- **主要特点:**简单快速, 不使用剧毒试剂, 无须酚氯仿抽提, 无须过柱纯化, 有效解决bacmid分子量大、抽提难度高等系列问题, 确保抽提获得的bacmid可完美用于昆虫细胞转染。
- 当目的基因被插入到pFastBac系列载体中构建成目的重组质粒后, 该重组质粒可用于转化大肠杆菌DH10Bac从而发生位点特异的转座(site-specific transposition), 蓝白斑筛选和PCR鉴定筛选含有重组bacmid的重组子, 再使用本试剂盒进行bacmid的小量抽提即可获得可转染昆虫细胞的bacmid DNA。
- 本试剂盒在抽提bacmid的同时, 也会抽提辅助质粒(helper plasmid)和未重组的pFastBac质粒。抽提获得的bacmid等质粒混合物可以直接用于转染昆虫细胞以包装杆状病毒, 最终用于目的蛋白在昆虫细胞中的大量表达。
- Bac-to-Bac杆状病毒表达系统是由Luckow等人于1993年发展的一种快速而有效产生重组杆状病毒的方法。该系统主要包括以下两个组分: (1)用于插入目的基因的pFastBac载体, 目的基因插入后受杆状病毒特异性启动子(baculovirus-specific promoter)调控表达; (2)含杆状病毒穿梭载体bacmid (bMON14272, 136kb)和辅助质粒(helper plasmid, 用于表达转座必须的转座蛋白)的大肠杆菌DH10Bac宿主菌株。将pfastBac重组质粒转化该菌株可发生pfastBac重组质粒中mini-Tn7元件和bacmid上的mini-attTN7发生转座, 从而形成重组的bacmid。
- 利用 Bac-to-Bac 杆状病毒感染昆虫细胞产生重组蛋白主要包括以下实验步骤:(1)把目的基因克隆到 pFastBac 载体产生重组质粒; (2)转化 pFastBac 重组质粒到 DH10Bac 大肠杆菌感受态细胞产生重组 bacmid; (3)利用杆状病毒穿梭载体 bacmid 小量抽提试剂盒提取重组 bacmid DNA; (4)将重组 bacmid DNA 转染进入昆虫细胞(推荐使用碧云天的 C0551 LipoInsect™转染试剂)以产生重组杆状病毒; (5)扩增重组的杆状病毒并用其感染昆虫细胞以大规模表达重组目的蛋白。
- 本试剂盒抽提获得的高质量bacmid DNA可以直接用于转染昆虫细胞, 碧云天生产的LipoInsect™转染试剂(C0551)适用于将pFastBac等杆状病毒表达载体制备的bacmid转染到Sf9、Sf21和High Five™等昆虫细胞以用于Bac-to-Bac®、BaculoDirect™和InsectSelect™表达系统的蛋白表达。LipoInsect™转染试剂的转染效率非常高, 对昆虫细胞Sf9的实测阳性率可达98%以上。
- 关于昆虫细胞系统的蛋白表达与纯化的详细介绍, 请见如下网页: <http://www.beyotime.com/support/insect cell.htm>。
- 一个包装的本产品可以进行50次bacmid的小量抽提。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
D0031-1	溶液I (悬浮液)	15ml
D0031-2	溶液II (裂解液)	15ml
D0031-3	溶液III (中和纯化液)	15ml
D0031-4	RNase A (100mg/ml)	15μl
D0031-5	TE	1ml
—	说明书	1份

保存条件:

室温保存, 一年有效。

注意事项:

- 第一次使用前把试剂盒提供的RNase A全部加入到溶液I (悬浮液)中, 混匀, 并在瓶上做好标记。加入RNase A后须4°C存放。
- 温度较低时, 溶液II和溶液III可能会有沉淀产生。使用前必须检查一遍。如有沉淀, 37°C水浴加热溶解, 混匀后使用。
- 溶液II请勿过分剧烈混匀, 否则会产生大量气泡。
- 溶液II使用完后, 请注意盖紧瓶盖, 以避免被空气中二氧化碳酸化。
- 本试剂盒所有操作均在室温进行, 操作时无需冰浴。所有离心也均在室温进行, 但在4°C进行离心也是可以的。
- 溶液II有强碱性, 溶液II和溶液III对人体都有刺激性, 操作时请小心, 并注意适当防护。
- 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。

使用说明:

1. 取少量pFastBac重组质粒加入DH10Bac感受态, 稍混匀后冰上静置30分钟, 42°C热激90秒, 加入500µl SOC培养液培养4h。随后涂板于已提前涂好X-gal (90mm琼脂板涂40µl 2% X-gal)的含7µg/ml庆大霉素(gentamicin)、100µg/ml卡那霉素(kanamycin)、10µg/ml四环素(tetracycline)和40µg/ml IPTG的LB平板, 37°C倒置培养过夜。
2. 培养48小时后挑取白斑至3ml SOC培养液(含7µg/ml庆大霉素、100µg/ml卡那霉素和10µg/ml四环素)中37°C 200rpm培养过夜。
3. 取过夜菌1.5ml, 10000g离心1分钟收集细菌, 弃上清。再加入1.5ml过夜菌, 同前再次离心收集一次, 每管共收集3ml过夜菌。
4. 加入300µl溶液I (已添加RNase A), 重悬细菌沉淀。确保沉淀完全散开, 无可见细菌团块。
5. 加入300µl溶液II, 轻轻颠倒离心管4-6次, 使细菌完全裂解, 溶液透明。如果发现还没有完全透明, 可增加颠倒次数3-5次, 再室温放置2-3分钟, 但总裂解时间不要超过5分钟。**切勿vortex!**
6. 加入300µl溶液III, 随即颠倒离心管4-6次混匀, 可见白色絮状物产生。>12000g离心10分钟, 吸取上清至一洁净的2ml离心管中。如果上清中仍有少量不溶物, 可以>12000g离心5-10分钟, 取出上清, 确保上清澄清透明, 无不溶物。
7. 于上清中缓慢加入已预冷的800µl异丙醇中, 颠倒混匀, 冰上放置10min, >12000g离心10分钟后, 弃上清。
8. 沉淀用500µl已预冷的70%乙醇重悬, >15000g离心5分钟, 弃上清。
9. 沉淀再次用200µl已预冷的70%乙醇重悬, >12000g离心5分钟后, 弃上清。
10. 沉淀室温干燥, 待乙醇挥发后, 用20µl本试剂盒提供的TE溶解, -20°C保存。
11. 后续如有必要可以对抽提获得的Bacmid进行PCR鉴定, 以确定是否含有插入的目的片段。经测试按照上述步骤抽提获得的Bacmid可以完美用于昆虫细胞转染试剂(如碧云天的C0551 LipoInsect™转染试剂)直接转染昆虫细胞。

常见问题:

1. 转化DH10Bac感受态后平板上没有蓝斑, 所有克隆均为白斑:
 - a. 蓝白斑显色时间不够。需 37°C 培养至少 48 小时后才能鉴别。
 - b. 转化后培养时间不够。涂板前转化菌需在 SOC 培养基中 37°C 培养至少 4 小时。
 - c. 平板配置时, 忘记加入 IPTG 和 X-gal 了。平板须已提前涂好 X-gal (90mm 平板涂 40µl 2% X-gal)并含 7µg/ml 庆大霉素、100µg/ml 卡那霉素、10µg/ml 四环素和 40µg/ml IPTG。
 - d. 平板上克隆太多, 太密。稀释后涂板。
 - e. 平板配制时间过久或者存放于有光处。含有多种抗生素的平板超过 4 个星期通常就不能使用, 且需避光保存。
2. 所有克隆都是蓝色:
 - a. pFastBac1 重组质粒质量不好或已降解。使用经过电泳检查的高纯度 pFastBac1 重组质粒。
 - b. 可能没加庆大霉素。需严格按照相应方法来配制蓝白斑筛选平板。
3. 克隆数量很少:
 - a. 转化菌在 SOC 培养基中培养时间不够。涂板前转化菌需在 SOC 培养基中至少培养 4 小时。
 - b. 转化 DH10Bac 感受态后使用的是 LB 培养基而不是 SOC 培养基。需使用 SOC 培养基至少 37°C 培养 4 小时或 30°C 培养 6 小时。
4. 蓝白斑难以区分:
 - a. LB 平板培养基配制的 pH 不对。可使用碧云天生产的 BeyoPure™ LB Broth with Agar (premixed powder) (ST158)配制平板, 并确保调节 pH 至 7.0。
 - b. 37°C 培养时间太短。涂板 48 小时后再进行观察。
 - c. IPTG 浓度不对。需要优化 IPTG 浓度, 通常 IPTG 最佳浓度范围为 20-60µg/ml。
5. bacmid DNA发生了降解:
 - a. bacmid 储存不当。bacmid 应在-20°C 保存, 并尽量避免反复冻融。
 - b. 提取大分子量的 bacmid 时, 操作手法过于剧烈。抽提 bacmid 时, 不要使用 vortex, 不能剧烈混合, 操作须尽量温和。

相关产品:

产品编号	产品名称	包装
D0031	杆状病毒穿梭载体bacmid小量抽提试剂盒	50次
D0346	DH10Bac甘油菌(重组Bacmid制备用菌株)	200µl
D2802	pFastBac1-EGFP (杆状病毒包装阳性对照质粒)	1µg
C0551-0.5ml	LipoInsect™转染试剂	0.5ml
C0551-1.5ml	LipoInsect™转染试剂	1.5ml
C0551-7.5ml	LipoInsect™转染试剂	5×1.5ml

使用本产品的文献:

1. Lin Zhou, Yunfei Li, Heyuan Wang, Yicheng Zhou, Zhihui Zhu. Establishment and characterization of a new embryonic cell line from *Helicoverpa armigera* (Hübner). IN VITRO CELL DEV-AN. 2020 Aug;56(7):559-566.
2. Xuefeng Yang, Qian Du, Xiaofen Wang, Jun Shi, Tongtong Wang, Peixuan Li, Jianhui Zhong, Dewen Tong, Yong Huang. Porcine circovirus type 2 infection inhibits macrophage M1 polarization induced by other pathogens via viral capsid protein and host gC1qR protein. Vet Microbiol. 2023 Oct;285:109871.

Version 2024.03.12