

杆状病毒穿梭载体 bacmid 小提试剂盒

HX3043

产品简介

杆状病毒穿梭载体 bacmid 小提试剂盒是一种从大肠杆菌 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。提取简单快速，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, 136 kb) 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。抽提获得的高质量 bacmid DNA 可以直接用于转染昆虫细胞。

产品应用

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 DNA，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。

储存条件

室温保存，一年有效。

产品信息

组分编号	组分名称	规格 50 T
HX3043-1	Buffer S1 (悬浮液)	15 ml
HX3043-2	Buffer P1 (裂解液)	15 ml
HX3043-3	Buffer P2 (中和纯化液)	15 ml
HX3043-4	RNase A (100 mg/ml)	15 μ l
HX3043-5	TE	1 ml

注意事项

- 首次使用前把试剂盒提供的 RNase A 全部加入到 Buffer S1 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，Buffer P1 和 Buffer P2 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。Buffer P1 请勿过分剧烈混匀，否则会产生大量气泡。Buffer P1 使用完后，请注意盖紧瓶盖，以避免被空气中二氧化碳酸化。Buffer P1 有强碱性，Buffer P1 和 Buffer P2 对人体都有刺激性，操作时请小心，并注意适当防护。
- 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。
- 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

- 取少量 pFastBac 重组质粒加入 DH10Bac 感受态，稍混匀后冰上静置 30 min，42°C 热激 90 sec，加入 500 μ l SOC 培养液培养 4 h。随后涂板于已提前涂好 X-gal (90 mm 琼脂板涂 40 μ l 2% X-gal) 的含 7 μ g/ml 庆大霉素 (gentamicin)、100 μ g/ml 卡那霉素 (kanamycin)、10 μ g/ml 四环素 (tetracycline) 和 40 μ g/ml IPTG 的 LB 平板，37°C 倒置培养过夜。
- 培养 48 h 后挑取白斑至 3 ml SOC 培养液 (含 7 μ g/ml 庆大霉素、100 μ g/ml 卡那霉素和 10 μ g/ml 四环素) 中 37°C 200 rpm 培养过夜。
- 取过夜菌 1.5 ml，10000g 离心 1 min 收集细菌，弃上清。再加入 1.5 ml 过夜菌，同前再次离心收集一次，每管共收集 3 ml 过夜菌。

4. 加入 300 μ l Buffer S1 (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 300 μ l Buffer P1, 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 min, 但总裂解时间不要超过 5 min。切勿 vortex!
6. 加入 300 μ l Buffer P2, 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 min, 吸取上清至一洁净的 2 ml 离心管中。如果上清中仍有少量不溶物, 可以>12000 g 离心 5-10 min, 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 800 μ l 异丙醇中, 颠倒混匀, 冰上放置 10 min, >12000 g 离心 10 min 后, 弃上清。
8. 沉淀用 500 μ l 已预冷的 70%乙醇重悬, >15000 g 离心 5 min, 弃上清。
9. 沉淀再次用 200 μ l 已预冷的 70%乙醇重悬, >12000 g 离心 5 min 后, 弃上清。
10. 沉淀室温干燥, 待乙醇挥发后, 用 20 μ l 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直接转染昆虫细胞。