



极致稳定 · 硬核高表达

NovaBac™

杆状病毒表达系统

适用细胞：Sf9 / Sf21 / High Five | 应用：重组蛋白高水平表达 · 病毒样颗粒（VLP）生产 · 药物筛选靶点表达 | 仅限科研用途，不用于诊断程序

文件编号	版本号	生效日期	页码
WD-IFU-NovaBac-BEVS	V1.0	2026 年 08 月 10 日	见页脚

目 录

第一章 系统概述	1
1.1 系统简介	1
1.2 与传统系统的核心区别	1
1.3 系统主要组成	1
1.4 产品信息	3
1.5 工作流程图	4
第二章 昆虫细胞培养要点	6
2.1 培养条件关键参数	6
2.2 转染前细胞要求	6
第三章 pNovaBac 重组转移质粒构建	6
3.1 克隆策略选择	6
3.2 克隆与转化（常规感受态）	7
第四章 重组 Bacmid 的制备	7
4.1 实验原理与培养基	7
4.2 DH10Bac 转化操作	7
4.3 重组 Bacmid DNA 提取	8
4.4 PCR 验证转座	9
第五章 转染昆虫细胞制备 P0 重组病毒	9
5.1 转染参数（6 孔板，单孔基础）	9
5.2 通用注意事项	10
5.3 操作流程：无血清培养基培养的细胞	10
第六章 P0 病毒的收获	10
6.1 病毒感染细胞的形态变化	10
6.2 P0 病毒收获操作	10
6.3 病毒原液的保存	11
第七章 杆状病毒的扩增	11
7.1 关键参数与原则	11
7.2 病毒接种量计算公式	11
7.3 病毒参考预期	11
7.4 P0 扩增至 P1 标准操作（20 mL）	12
7.5 进一步扩增至 P2 / P3	12
第八章 重组蛋白表达	12
8.1 通用表达指南	12
8.2 病毒接种量计算	13
8.3 表达条件三因子优化	13
8.4 小规模收获操作（24 孔板）	13
第九章 故障排除	14



9.1	pNovaBac 克隆环节	14
9.2	重组 Bacmid 制备环节	14
9.3	Bacmid DNA 提取环节	14
9.4	转染环节	15
9.5	蛋白表达环节	15
第十章	附录	15
10.1	pNovaBac 详细质粒信息	15
10.2	抗生素母液配方	17
10.3	LB 培养基与平板	18
10.4	SOC 复苏培养基（每 1 L）	18
10.5	Bacmid 中量提取（NovaBac™ 大质粒/Bacmid 中量提取试剂盒(10 次)）	18

第一章 系统概述

1.1 系统简介

昆虫细胞—杆状病毒表达系统 (BEVS) 是真核蛋白表达的主力平台之一：既保留完整的翻译后修饰能力，又能在数天内把表达量推到毫克级。但传统 BEVS 有一个让人头疼的环节——重组病毒必须在昆虫细胞内靠同源重组产生，阳性率只有 0.1%–1%，随后还要做多轮蚀斑纯化，一套流程走下来通常要 3–6 周。

NovaBac™ 杆状病毒表达系统把这一步搬到了大肠杆菌里完成。它利用细菌转座子 Tn7 的位点特异性转座作用，在 DH10Bac 中直接将目的基因整合进 Bacmid（杆状病毒穿梭质粒），转座成功与否由蓝白斑一眼可辨：白色菌落即为阳性，阳性率 >99%。省去蚀斑纯化后，从质粒到高滴度纯净重组病毒的时间由数周缩短至数日。

对使用者而言，这意味着三件事：不必再判读蚀斑、不必再反复纯化、P0 病毒即可达 10^6 – 10^7 pfu/mL 起步。系统同时兼容 Sf9、Sf21 与 High Five，可用于重组蛋白高水平表达、病毒样颗粒 (VLP) 生产及药物筛选靶点表达。

1.2 与传统系统的核心区别

对比项	传统同源重组系统	NovaBac 系统
重组发生场所	昆虫细胞内（共转染线性化病毒 + 转移载体）	大肠杆菌内（位点特异性 Tn7 转座）
重组效率	低（约 0.1%–1%）	高（白色菌落即为阳性，>99%）
筛选方式	蚀斑纯化（多轮）	蓝白斑筛选 + 抗生素三抗
首次获得纯化病毒所需时间	通常 3–6 周	通常 7–10 天
首次得到的病毒滴度	较低（需多轮放大）	P0 即可达 10^6 – 10^7 pfu/mL
对插入大基因的耐受	较差	好（bacmid 可承载 >100 kb 外源序列）

1.3 系统主要组成

1.3.1 pNovaBac 转移质粒

所有 pNovaBac™ 系列质粒均基于经典的 Tn7 转座系统开发。质粒骨架包含 Tn7 左右臂（Tn7L、Tn7R）、庆大霉素抗性筛选基因、强效启动子（AcMNPV 多角体 PH 启动子或 p10 启动子），以及 SV40 polyA 终止信号，共同构成了一个高效的 **mini-Tn7 转座单元**。

操作极简：只需将您的目的基因克隆至多克隆位点 (MCS)，即可在转座酶的辅助下，将表达单元精准、100% 稳定地整合到宿主 Bacmid 基因组中。



【选型指南：全面覆盖您的表达场景】

NovaBac™ 为您提供 4 款经过底层优化的核心载体，无论您是进行常规基础表达，还是需要挽救极难折叠的复杂蛋白，都能在这里找到最合适的“武器”：

载体	特征	适用场合	一句话选型建议
pNovaBac-gfp	内置 EGFP 增强型绿色荧光蛋白	体系质控 / 阳性对照	“排雷先锋”：用于监控转染效率、直观评估病毒滴度及锁定最佳收获期。
pNovaBac-mel	融合 Melittin (蜜蜂蜂毒肽) 强效分泌信号肽	分泌型 / 糖基化蛋白	“无损分泌”：靶蛋白直接分泌至培养基，免去细胞破碎，极简纯化。
pNovaBac-Dual	搭载 PH 与 p10 双强效启动子 及 双 MCS	蛋白复合物共表达；VLP 生产	“黄金搭档”：需在单一细胞内按 1:1 严谨比例共表达两种蛋白或亚基时的首选。
pNovaBac-chaperone 1	搭载 分子伴侣蛋白解聚系统模块	辅助折叠 / 挽救不溶沉淀	“死端拯救”：作为共转染辅助质粒，专治目标蛋白包涵体沉淀，大幅提升可溶性与得率。

操作提示：关于各款质粒的图谱和使用说明，请详阅本说明书附录的【pNovaBac 详细质粒信息】。质粒序列请至唯地官网下载。

1.3.2 DH10Bac 感受态大肠杆菌

DH10Bac 是含有以下两种元件的 *E. coli* 工程菌株：

- 杆状病毒穿梭载体 (Bacmid, bMON14272, 约 136 kb)：含低拷贝 mini-F 复制子、卡那霉素抗性基因、以及插有 mini-attTn7 靶位点的 lacZα 基因片段。
- 辅助质粒 pMON7124 (13.2 kb)：编码 Tn7 转座酶，赋予四环素抗性，在反式上提供转座所需酶。

转化效率： 1×10^8 cfu/μg DNA。完整菌株基因型为：F⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 araD139 Δ(ara,leu)7697 galU galK λ⁻ rpsL nupG / bMON14272 / pMON7124。具体操作请参见唯地生物说明书。

1.3.3 NovaFect™ 昆虫细胞转染试剂盒

NovaFect™ 昆虫细胞转染试剂盒（货号：INT1001M）采用高电荷阳离子聚合物技术，专为 NovaRapid™ 快速瞬时表达系统及 NovaBac™ 杆状病毒表达系统量身打造，可在 Sf9, Sf21 和 High Five 等主流昆虫细胞中实现卓越的转染。

为简化您的实验流程，本试剂盒经过特殊配方优化，实现了相较于传统试剂（如 Cellfectin™ II）的重大性能提升：

- （1）全程免换液：具有极低细胞毒性，转染复合物加入后直接培养，无需执行繁琐的换液步骤。

(2) 多模式兼容：无论您采用贴壁培养还是悬浮培养，均可直接使用本产品，便于后续的生产工艺放大。

(3) 超低毒性（护细胞）：极其温和的聚合物配方，显著降低细胞毒性，让转染后的细胞保持最佳增殖状态，为后续蛋白高表达提供坚实基础。

1.3.4 昆虫细胞系

在重组蛋白表达与病毒包装的实验中，选择最匹配的细胞系是项目成功的关键。唯地生物为您提供经过严格验证的三大王牌昆虫细胞系——Sf9、Sf21 与 High Five，全面满足您从高滴度病毒扩增到复杂、高难度蛋白表达的多样化需求。

Sf9 / Sf21：病毒扩增与复杂蛋白表达的“稳健基石”

源自秋粘虫（*Spodoptera frugiperda*）的经典细胞系，为您日常实验与攻坚克难提供最可靠的底层支撑：

- Sf9 —— 病毒包装与常规表达首选：细胞大小高度均一，贴壁生长的单层和蚀斑极为规整，操作极简。在 Bacmid 转染、病毒纯化及高效扩增实验中表现出众，是您获取高质量病毒及常规胞内蛋白表达的完美搭档。
- Sf21 —— 攻克膜蛋白与毒性蛋白的“破局者”：展现出更强悍的细胞耐受性和卓越的翻译后修饰能力。当您面对极具挑战性的毒性蛋白，或需要精细折叠的复杂膜蛋白时，Sf21 能显著提升表达成功率与蛋白天然活性，是您攻克难表达靶点的专属王牌。

High Five：分泌表达与瞬时转染的“产能王者”

源自粉纹夜蛾（*Trichoplusia ni*）的顶级细胞系（BTI-TN-5B1-4），专为追求极致产量与效率的您量身打造：

突破性的分泌产量：针对分泌型重组蛋白，其表达量最高可达 Sf9 的 5 至 10 倍！助您用更少的成本与资源，获得更充沛的目的蛋白。

极致的转染效率：搭配独家 NovaRapid™ 快速表达系统，瞬时转染效率一骑绝尘，大幅缩短实验周期，助您抢占研发先机。

 唯地生物为您保驾护航

我们不仅提供卓越的细胞系，更提供完善的技术支持。关于具体的培养及转染操作，请随时查阅我们为您精心准备的《Sf9-Sf21 细胞系说明书》与《High five 细胞系说明书》，轻松开启高产之旅！

1.4 产品信息

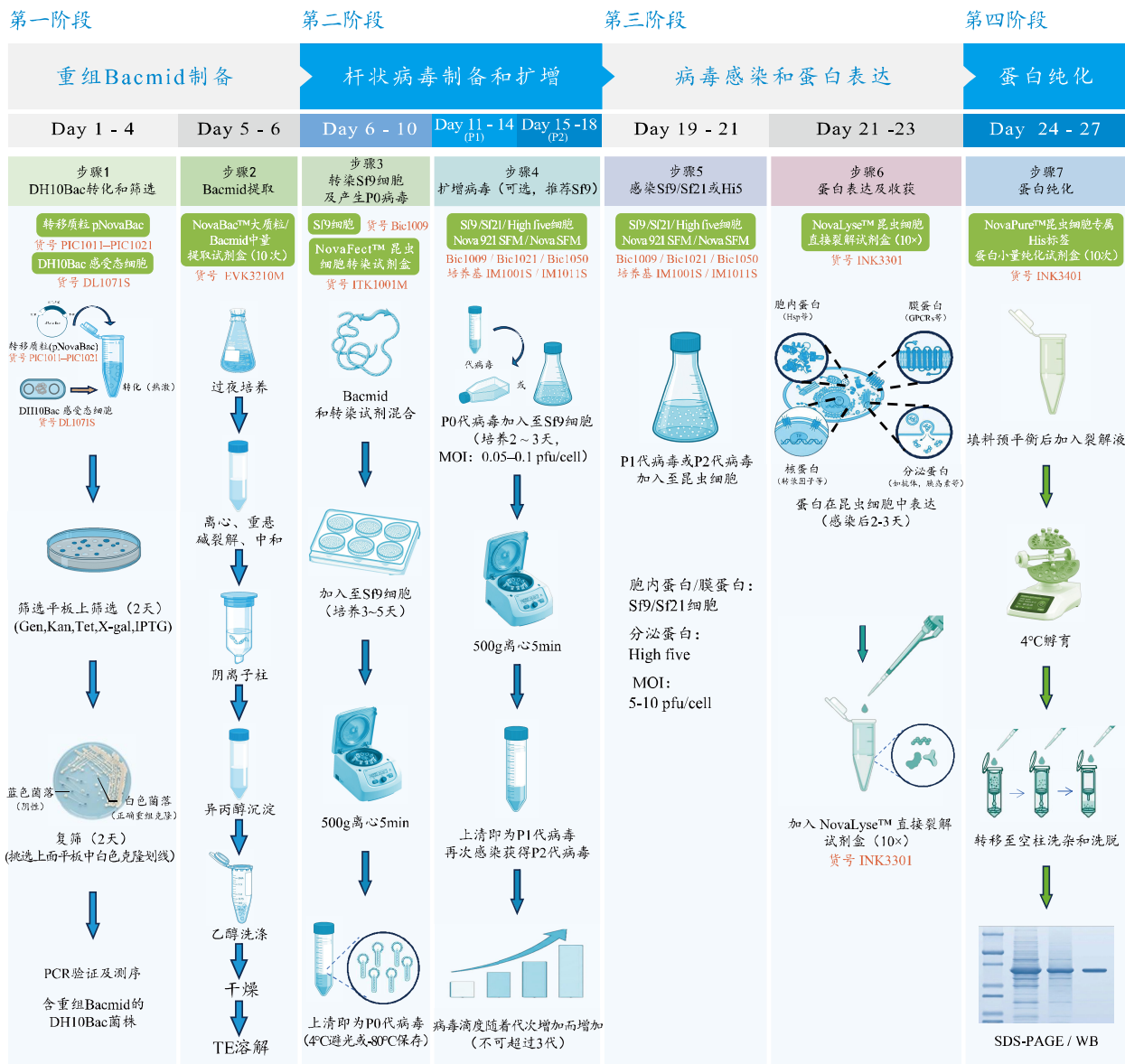
产品名称	规格	货号
NovaBac™ 杆状病毒表达系统 Kit	整套 Kit（6 箱组件）	INK1001

组份与储存

箱号	成分	货号	数量	保存条件
Box 1	Sf9	Bic1009	1 mL ×1 支	-80℃ (2 年) 或液氮长期
	pNovaBac-gfp	PIC1011	20 μL ×1 支	-20 °C
	pNovaBac-mel	PIC1012	20 μL ×1 支	-20 °C
	pNovaBac-Dual	PIC1013	20 μL ×1 支	-20 °C
	pNovaBac-chaperone 1	PIC1021	20 μL ×1 支	-20 °C
	DH10Bac 感受态细胞	DL1071S	100 μL ×10 支	-80 °C
	X-gal	YC8002S	5 mL×1 支	-20℃, 避光
	IPTG	YC8024S	5 mL×1 支	-20℃
	NovaBac™ 抗生素 A (四环素, 1000×)	YC9050L-11	1.5 mL×1 支	-20℃
	NovaBac™ 抗生素 B (Kan、Gen, 1000×)	YC9020L-11	1.5 mL×1 支	-20℃
Box 2	NovaFect™ 昆虫细胞转染试剂	INT1001M	1.5 mL×1 支	4 °C (勿冻)
	NovaFect™ 昆虫细胞转染稀释液	/	25 ml ×1 瓶	4 °C (勿冻)
	Nova 921 SFM™ 昆虫细胞无血清培养基	IM1001S	500 ml ×1 瓶	4 °C (勿冻)

1.5 工作流程图





整个 NovaBac 工作流程见上图, 大概分为 4 个阶段和 7 个步骤:

1. 目的基因克隆至 pNovaBac 转移质粒, 并转化 DH10Bac, 发生 Tn7 转座, 三抗 + 蓝白斑筛选, 挑取白色克隆, PCR 验证转座。
2. 验证正确的 Bacmid 扩大培养, 并使用阴离子柱纯化 (推荐使用 NovaBac™ 大质粒/Bacmid 中量提取试剂盒(10次) (货号: EVK3210M) 纯化 Bacmid)。
3. NovaFect™ 昆虫细胞转染试剂 (货号: ITK1001M) 介导的 Bacmid 转染 Sf9 / Sf21 细胞, 3-5 天后收获 P0 病毒 ($>10^6$ pfu/mL)。
4. 扩增至 P1 ($>10^7$ pfu/mL) / P2 ($>10^8$ pfu/mL); 蚀斑实验滴定 (可选)。
5. 高滴度病毒感染 Sf9/Sf21/High Five。
6. 蛋白表达并收获, 蛋白裂解 (推荐使用 NovaLyse™ 昆虫细胞直接裂解试剂盒) 或收获上清
7. 镍柱纯化 (推荐使用 NovaPure™ 昆虫细胞专属 His 标签蛋白小量纯化试剂盒, 货号: INK3401)。蛋白纯度要求高请使用离子交换和分子筛进行进一步的纯化。

重要: 代次控制: 杆状病毒每次扩增都会积累缺陷型颗粒 (DI particles), 使用代次过高会导致表达量

下降。通常 P3 即为可用代次的上限；表达实验应优先使用 P2 或 P1。

第二章 昆虫细胞培养要点

NovaBac™ 系统推荐使用 Sf9 作为重组病毒制备的宿主。本章只涵盖与 NovaBac™ 工作流程直接相关的关键参数；完整培养、复苏、冻存、传代规程请参阅《Sf9/Sf21 昆虫细胞培养操作说明书》和《High five 昆虫细胞培养操作说明书》。

2.1 培养条件关键参数

参数	推荐范围	说明
培养温度	27–28 °C	非湿化、无 CO ₂
pH	6.1–6.4	Nova 921 SFM™ 和 Nova SFM™ 在常压敞盖条件下可自维持
渗透压	345–390 mOsm/kg	鳞翅目细胞最适渗透压
溶氧	10%–50% 空气饱和度	悬浮培养需被动扩散通气
剪切力保护	Pluronic™ F-68 0.1%	Nova 921 SFM™ 和 Nova SFM™ 已含表面活性剂

2.2 转染前细胞要求

- 细胞处于对数生长中期，活力 >95%。
- 贴壁转染：1 × 10⁶ cells / 孔（6 孔板）。
- 悬浮转染：密度 1.5–2.5 × 10⁶ cells/mL；起始转染时密度调至 2.0 × 10⁶ cells/mL。
- 代次：建议 5–20 代之间，避免过高代次。
- 无血清培养基首选 Nova 921 SFM™ 昆虫细胞无血清培养基。
- 转染时切勿在培养基中加入抗生素——抗生素会与转染试剂相互作用，导致细胞死亡或转染效率下降。

第三章 pNovaBac 重组转移质粒构建

3.1 克隆策略选择

3.1.1 载体选择

- 需亲和纯化：选 pNovaBac-gfp，注意阅读框选择。
- 蛋白复合物 / VLP：选 pNovaBac-Dual，将两个亚基分别置于 PH 与 p10 启动子下。
- 分泌蛋白 / 糖基化蛋白：选 pNovaBac-mel（蜂蜜素信号肽）。
- 需要分子伴侣辅助折叠的蛋白：选 pNovaBac-chaperone 1。

3.1.2 表达盒设计要点

- ATG 起始密码子前应有合适的 Kozak 类共有序列：A/G ⁻³ NN ATG G。



- 5'-UTR 长度建议 ≤ 50 bp，避免二级结构。
- 3' 端紧邻终止密码子；如使用 pNovaBac-gfp，注意 10×His-TEV 与 ORF 同框。
- 插入片段大小建议 ≤ 10 kb（更大的片段可行但效率下降）。

3.2 克隆与转化（常规感受态）

切勿将连接产物直接转化进 DH10Bac：应先转化常规 $recA^-$ $endA^-$ 菌株（如 TOP10、DH10B、DH5 α ）扩增并验证后，再用于 DH10Bac 转化。

1. 酶切 pNovaBac 载体并去磷酸化；纯化插入片段。
2. 用重组试剂盒（唯地生物货号：A2011S）进行同源重组，转化 TOP10 或 DH5 α ，铺含 50 $\mu\text{g/mL}$ 羧苄青霉素（Car）的 LB 板。

3.2.1 PCR 验证

1. 使用 pUC/M13 通用引物或一对载体-插入跨界引物。使用 Taq 酶进行菌落 PCR 验证。
2. 挑取 1~3 个 PCR 正确的单菌落，接 LB+Amp（100 $\mu\text{g/mL}$ ）小摇过夜。
3. 用小提试剂盒提取质粒。
4. 测序验证：阅读框、定向、连接处序列。

第四章 重组 Bacmid 的制备

4.1 实验原理与培养基

经过验证的重组 pNovaBac 质粒转化 DH10Bac 后，mini-Tn7 元件由质粒上的 Tn7 转座到 Bacmid 的 mini-attTn7 靶位点，破坏 lacZ α 阅读框，从而使重组菌落呈白色（蓝白斑筛选）。

4.1.1 三抗 + 蓝白斑选择性 LB 平板

每次转化需新鲜配制 3 个含以下五种添加剂的 LB 琼脂平板：

添加剂	工作浓度	作用
卡那霉素（Kan）	50 $\mu\text{g/mL}$	选择 bacmid（卡那抗性）
庆大霉素（Gm）	7 $\mu\text{g/mL}$	选择转座成功的 mini-Tn7（庆大抗性）
四环素（Tet）	10 $\mu\text{g/mL}$	选择辅助质粒 pMON7124
X-gal	100 $\mu\text{g/mL}$	蓝白斑筛选
IPTG	40 $\mu\text{g/mL}$	诱导 lac 操纵子

4.2 DH10Bac 转化操作

4.2.1 准备工作

- 水浴预热至 42 $^{\circ}\text{C}$ 。
- 选择性平板预热至 37 $^{\circ}\text{C}$ ，30 分钟。
- SOC 培养基平衡至室温。



4.2.2 转化步骤

1. 冰上解冻每管 100 μ L DH10Bac 感受态。
2. 加入 pNovaBac 重组质粒。
3. 切勿吹打混匀，仅轻摇。冰浴 30 分钟。
4. 42 °C 热击 45 秒，不要振荡。
5. 立即转回冰上 2 分钟。
6. 加入 900 μ L 室温 SOC 培养基。
7. 37 °C 摇床 225 rpm，4 小时（必须！转座过程需要时间）。
8. 对 pNovaBac 转化体系做 10^{-1} – 10^{-3} 系列稀释，每稀释度取 100 μ L 涂布于三抗 + X-gal/IPTG 选择平板。
9. 37 °C 培养 24–48 小时（务必至少 36 小时以充分显色，避免假白斑）。

白斑挑取诀窍：真阳性白斑通常较大、孤立、分散；中央偏灰或外圈偏蓝的菌落可能含有 bacmid + 重组 bacmid 的混合群体，应避免挑选。每株可挑 1–2 个最白、最大、最孤立的菌落。

4.2.3 表型再验证

1. 挑取 ≤ 10 个白斑，分别划线于新的三抗 + X-gal/IPTG 板。
2. 37 °C 过夜。
3. 确认第二轮平板上的菌落仍为白色后，挑取单白斑接种含 Kan + Gm + Tet 的液体 LB（无需 X-gal/IPTG），37 °C 摇床 250 rpm 过夜。

4.3 重组 Bacmid DNA 提取

Bacmid 大小 >135 kb，属于低拷贝大质粒。推荐使用 NovaBac™ 大质粒/Bacmid 中量提取试剂盒（10 次）（货号：EVK3210M）。

禁忌与注意：① 不要使用硅胶膜试剂盒——Filter 膜会截留大分子量 bacmid。② 提取后产物必须不含酚和高浓度盐：酚残留对昆虫细胞有毒，盐会干扰转染试剂复合，降低转染效率。

4.3.1 操作流程（基于 NovaBac™ 大质粒/Bacmid 中量提取试剂盒）

提前确认：NovaBac™ P1 已加 RNase A；P2 无沉淀。

1. $9000 \times g$ 离心 15 分钟收集 1.5 mL 过夜菌液，弃尽上清。
2. 加 8 mL P1（含 RNase A）重悬至无颗粒。
3. 加 8 mL P2，温和颠倒 5 次混匀；切勿涡旋。室温静置 3 分钟。
4. 加 8 mL P3（中和液），立即温和颠倒混匀至均一。
5. 冰浴静置 15 min。
6. 4 °C， $12,000 \times g$ 离心 20 分钟。
7. 如沉淀未紧贴管底，室温静置 5 分钟使其分层；上清再 $>15,000 \times g$ 离心 10 分钟。
8. 加入 1.5 倍体积的 NovaBac™ Dilution Buffer，温和颠倒混匀。
8. 用 25–40 mL 的 NovaBac™ Equilibration/Wash Buffer 进行柱平衡。



9. 将上述稀释好的上样液沿管壁缓慢加入。
10. 再加入 25-40 ml 的 NovaBac™ Equilibration/Wash Buffer 洗柱。
11. 用 15 mL 预热 50°C 的 NovaBac™ Elution Buffer 洗脱。
12. 向洗脱液中加入 0.7 倍体积的异丙醇，温和颠倒混匀 10 次。
13. 室温静置 10 min 后立即离心。
14. 4°C、≥12000×g 离心 30 min。
15. 加入 8 mL 室温 70%乙醇，轻轻旋转洗涤（勿重悬沉淀），4°C、≥12000 ×g 离心 10 min。
16. 弃乙醇，室温风干 5-10 min。
17. 加入 250~300 μL 的 TE 缓冲液或无核酸酶水。4°C 静置过夜复溶，期间可温和弹管数次。

4.4 PCR 验证转座

由于 Bacmid >135 kb，限制酶分析十分困难，应改用 PCR 验证。使用跨越 mini-attTn7 位点的 pUC/M13 通用引物：

引物	序列 (5' → 3')
pUC/M13 Forward	CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG
pUC/M13 Reverse	AGCGGATAACAATTTTCACACAGG

预期产物大小

转座源	PCR 产物预期大小
未转座 bacmid	~300 bp
pNovaBac (含目的基因)	~2300 bp + 插入片段大小

若插入片段 >4 kb，应用高保真酶，并适当延长延伸时间至 1 min/kb。

第五章 转染昆虫细胞制备 P0 重组病毒

5.1 转染参数（6 孔板，如果需要扩大请参照《NovaFect™ 昆虫细胞转染试剂盒》）

参数	推荐值
培养板	6 孔板（35 mm/孔），每孔接一份 Bacmid
细胞数	1 × 10 ⁶ Sf9 或 Sf21 细胞 / 孔
培养基体积	2 mL
NovaFect™ 昆虫细胞转染稀释液	200 μL
Bacmid DNA	16 μg
NovaFect™ 昆虫细胞转染试剂	8 μL
复合物形成时间	15 分钟（不超过 30 分钟）

参数	推荐值
孵育温度 / 时间	27 °C / 72–96 小时

5.2 通用注意事项

- NovaFect™ 昆虫细胞转染试剂不需要更换培养基或洗涤细胞。
- 转染时切勿加入抗生素——会导致细胞死亡或转染受抑。
- 复合物孵育不要超过 30 分钟，否则转染效率显著下降。
- 混匀仅用上下颠倒 5–10 次，禁止涡旋或剧烈吹打。

5.3 操作流程：无血清培养基培养的细胞（6 孔板）

1. 确认 Sf9 细胞处于对数期 ($2-4 \times 10^6$ cells/mL)，活力 >95%。
2. 按 1×10^6 cells / 孔接种于 2 mL 培养基（Nova 921 SFM™ 昆虫细胞无血清培养基）中。室温（或回培养箱）静置 15 分钟以上使其贴壁。
3. 稀释 Bacmid：取 200 μ L NovaFect™ 昆虫细胞转染稀释液，加入 16 μ g Bacmid 轻弹混匀。
4. 加入 8 μ L NovaFect™ 昆虫细胞转染试剂，轻弹混匀，室温 15 min 形成复合物。
5. 将整个混合物逐滴均匀加至细胞中。
6. 27 °C 孵育 3–5 天。

第六章 P0 病毒的收获

出芽病毒（budded virus）通常在转染后 72–96 小时释放至培养基中。若转染效率较低，可能延迟至第 5 天才出现明显感染迹象。

6.1 病毒感染细胞的形态变化

阶段	时间窗	形态特征
早期 (Early)	0–24 h	细胞直径增大 25%–50%；细胞核显著增大，似乎『撑满』细胞
晚期 (Late)	24–72 h	停止生长（与未感染对照相比）；颗粒状、囊泡样；从培养面脱落
极晚期 (Very Late)	>72 h	细胞裂解，单层中出现透亮区（『清晰化』）

6.2 P0 病毒收获操作

1. 转染后 72–96 小时，当细胞出现晚期至极晚期感染特征时，将每孔含病毒的培养基（约 2 mL）转入无菌 12 mL 离心管。
2. $500 \times g$ 离心 5 分钟，去除细胞和大碎片。
3. 上清转入新的 12 mL 离心管，即为 P0 病毒原液。
4. （可选）若需提高滴度浓度，可通过 0.2 μ m 低蛋白吸附滤膜进一步过滤澄清。



5. 标记标签：构建名称、代次（P0）、收获日期、估计滴度（如已测）、操作人。

6.3 病毒原液的保存

- P0 原液：4 °C 避光，常规使用首选。
- -80 °C 长期分装：用作主种子库，切勿日常取用。
- 切勿存于 4 °C 与 -80 °C 以外温度（如 -20 °C）。
- 反复冻融可使滴度下降 10–100 倍。

P0 病毒原液的应用：（1）扩增制备 P1 高滴度原液；（2）蚀斑实验滴定；（3）蚀斑纯化（必要时）；（4）小规模初步表达（注：MOI 未知，结果不可重复）。推荐先扩增至 P1 后再用于表达实验。

第七章 杆状病毒的扩增

P0 原液滴度通常为 $1 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ pfu/mL，需扩增以获得 $1 \times 10^7 - 1 \times 10^8$ pfu/mL 的 P1 高滴度原液。

7.1 关键参数与原则

参数	推荐范围	说明
细胞代次	5–20 代	状态最佳，活率 >95%
细胞密度	2×10^6 cells/mL（接种时）	对数期
MOI	0.05–0.1 pfu/cell	高 MOI 反而降低病毒质量（DI 颗粒积累）
收获时机	60–80% 细胞死亡时	或 72–96 小时；需经验确定
最高代次	P3	继续扩增会引入有害突变
培养体积	10–200 mL（推荐 200 mL 摇瓶）	—

7.2 病毒接种量计算公式

所需病毒原液体积 = $\text{MOI (pfu/cell)} \times \text{总细胞数} \div \text{病毒滴度 (pfu/mL)}$

例：使用 $\text{MOI} = 0.1$ 感染 $10 \text{ mL} \times 2 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ 培养，已知 P0 滴度 $5 \times 10^6 \text{ pfu/mL}$ ：

$$\text{所需 P0 量} = (0.1 \text{ pfu/cell} \times 2 \times 10^7 \text{ cells}) \div (5 \times 10^6 \text{ pfu/mL}) = 0.4 \text{ mL}$$

若 P0 滴度未知，可保守按 $1 \times 10^6 \text{ pfu/mL}$ 估算。

7.3 病毒参考预期



代次	预期滴度范围
P0	$1 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ pfu/mL
P1	$1 \times 10^7 - 1 \times 10^8$ pfu/mL
P2 (如果继续扩增)	1×10^8 pfu/mL

7.4 P0 扩增至 P1 标准操作 (20 mL)

若 P1 滴度 $<10^6$ 或 P2 滴度 $<10^7$ pfu/mL：应重新制备病毒原液。

1. 感染当天将 Sf9/Sf21 细胞稀释为 2×10^6 cells/mL，置 125 ml 摇瓶含 20~25 mL 培养。
2. 按公式加入相应量的 P0 病毒原液。
3. 27 °C 摇床培养 72–96 小时，转速依摇床的振幅而定：

振荡轨道直径 (振幅)	推荐转速
19 mm	125 ± 5 rpm
25 mm	125 ± 5 rpm
50 mm	95 ± 5 rpm

4. 每天监测细胞活力与形态；当 60–80% 细胞死亡时收获。
5. 转移培养液至合适体积的离心管， $500 \times g$ 离心 5 分钟。
6. 上清即为 P1 病毒原液，4 °C 避光储存，加入终浓度 2% 的血清，防止病毒被蛋白酶降解；分装 1 mL 至 -80 °C 作主种子库。

7.5 进一步扩增至 P2 / P3

P1 → P2 / P2 → P3 流程相同，按比例放大细胞数与病毒接种体积。P3 是常规可用的最高代次；高于 P3 的扩增不再推荐。

从冷冻主种子库再扩增：-80 °C 长期保存的病毒滴度会逐渐下降。如需从主种子库制备新一批高滴度病毒，解冻后立即按上述方法扩增一代，避免直接用于关键表达实验。

第八章 重组蛋白表达

高滴度 ($>1 \times 10^8$ pfu/mL) P1 或 P2 病毒原液可用于感染昆虫细胞表达目的蛋白。

8.1 通用表达指南

参数	推荐 / 说明
细胞系	Sf9 (通用) / Sf21 (膜蛋白和有毒蛋白)；High Five (分泌蛋白)

参数	推荐 / 说明
	产量更高 5–10×)
培养基	Nova 921 SFM™ 昆虫细胞无血清培养基, Nova SFM™ 昆虫细胞无血清培养基
细胞密度	$1 \times 10^6 - 2 \times 10^6$ cells/mL (对数中期)
MOI	起始 5–10 pfu/cell; 后期通过滴度优化
温度	27 °C, 无 CO ₂
FBS / BSA 补充	感染后可加 0.1–0.5% 用于保护蛋白免受蛋白酶降解
分泌型蛋白最高表达	感染后 30–72 小时
胞内蛋白最高表达	感染后 48–96 小时

8.2 病毒接种量计算

病毒体积 = 期望 MOI × 总细胞数 ÷ 病毒滴度

示例: 50 mL × 2×10^6 cells/mL (共 1×10^8 个细胞)、MOI = 5、病毒滴度 1×10^8 pfu/mL:

$$\text{病毒体积} = (5 \times 1 \times 10^8) \div (1 \times 10^8) = 5 \text{ mL}$$

8.3 表达条件三因子优化

8.3.1 细胞系筛选

1. 用相同 MOI 同时感染 Sf9、Sf21、High Five 细胞。
2. 在 24、48、72、96 h 后取样检测重组蛋白。
3. 选择产量最高、降解最少的细胞系。

8.3.2 MOI 优化

1. 用 MOI = 1, 2, 5, 10, 20 分别感染同一细胞群。
2. 在统一时间点检测产量。
3. 选择最佳 MOI。

8.3.3 时间曲线

1. 固定 MOI 感染。
2. 于 24、48、72、96 h 取样。
3. 选择产量峰值时间点收获。

8.4 小规模收获操作 (24 孔板)

1. 每孔接种 6×10^5 Sf9/Sf21, 至少静置 30 分钟贴壁。
2. 用新鲜培养基洗一次, 加 300 μL 新鲜培养基。
3. 按目标 MOI 加入 P2 病毒原液; 设置阴性对照 (mock)、阳性对照 (pNovaBac-gfp)。

4. 27 °C 培养。
5. 在选定时间点收获细胞或上清（分泌蛋白）。
6. 若收细胞：吸去培养基，用无血清培养基洗一次，加 400 μ L 1 $\times$ SDS-PAGE 缓冲液（62.5 mM Tris-HCl pH 6.8、2% SDS）裂解。
7. 样品 -20 °C 保存或煮沸 $\geq$ 3 分钟后上 SDS-PAGE。

第九章 故障排除

9.1 pNovaBac 克隆环节

问题	可能原因	建议措施
转化无菌落	感受态失活；连接产物过少；Amp 浓度过高	新鲜感受态、增加 DNA 用量、Amp 浓度调至 100 μ g/mL
菌落多但插入率低	载体未充分酶切；自连背景高	改用双酶切定向克隆；CIP/SAP 去磷酸
插入方向不对	MCS 单酶切	选择两种不同酶切位点定向克隆
测序读出突变	菌株重组活性	改用 Stbl3、NEB Stable 等低重组菌株

9.2 重组 Bacmid 制备环节

问题	可能原因	建议措施
所有菌落均为蓝色	未发生转座；复苏时间不足	确保 4 小时充分复苏；检查 pNovaBac 完整性；新鲜配制 X-gal/IPTG 板
所有菌落均为白色（含阴性对照）	X-gal/IPTG 失效；DH10Bac 已丢失辅助质粒	重新配制板；新购感受态
白斑很少	DH10Bac 转化效率低；DNA 量过多导致毒性	确认感受态效率 $\geq 10^8$ cfu/ μ g；DNA 用量限于 1 ng
假白斑（实为蓝灰）	培养时间不足；选择性平板比例不当	至少 36–48 小时；新配三抗 + X-gal/IPTG
PCR 验证 ~300 bp（未转座）	挑取了未转座的回复菌落	重新做表型再验证后再挑

9.3 Bacmid DNA 提取环节

问题	可能原因	建议措施
产量极低	Bacmid 为低拷贝；用了普通试剂盒	改用 Bacmid 专用提取试剂盒
A260/A280 < 1.7	蛋白或酚污染	增加洗涤；过有机相后再用乙醇沉淀
DNA 断裂	重悬时剧烈吹打	冰浴溶解 ≥10 min；只吹打 1–2 次
转染效率低	盐残留；酚残留	70% 乙醇充分洗涤；空气干燥后用 TE 溶解

9.4 转染环节

问题	可能原因	建议措施
细胞死亡严重	Bacmid 含污染；转染剂过量；含抗生素	重新提取干净 Bacmid；试剂用量按说明优化；转染时弃抗生素
72–96 h 无感染迹象	Bacmid 转座失败；细胞状态差；MOI 不足	PCR 重新验证 bacmid；用低代次（5–20 代）、活力 >95% 的对数期细胞
P0 滴度过低 (<10 ⁶)	转染效率低；收获过早或过晚	优化 DNA 与试剂比例；每天监测晚期感染特征再收获
复合物沉淀	孵育时间过长 (>20 min)	5 min 内使用；颠倒不涡旋

9.5 蛋白表达环节

问题	可能原因	建议措施
蛋白产量极低	病毒滴度未测；MOI 不当；代次过高	蚀斑实验测滴度；做 MOI 1/5/10/20 阶梯；用 P1 或 P2
蛋白被降解	感染后期蛋白酶释放	提前收获（30–48 h）；加入蛋白酶抑制剂；High Five 改 Sf9
蛋白不可溶 / 包涵体	过表达 / 错误折叠	降低 MOI；缩短表达时间；27 °C 改 21–24 °C；考虑共表达分子伴侣
糖基化模式不符	昆虫细胞糖基化与哺乳类不同	考虑 HEK293 哺乳类系统
分泌蛋白产量低	信号肽不识别	改用蜂蜜素信号肽（HBM）；改用 High Five

第十章 附录

10.1 pNovaBac 详细质粒信息

(准确序列与精细图谱，请至唯地生物官网一键下载)



(1) pNovaBac-gfp —— 您的“体系监控雷达”

定位：系统质控与可视化标准品

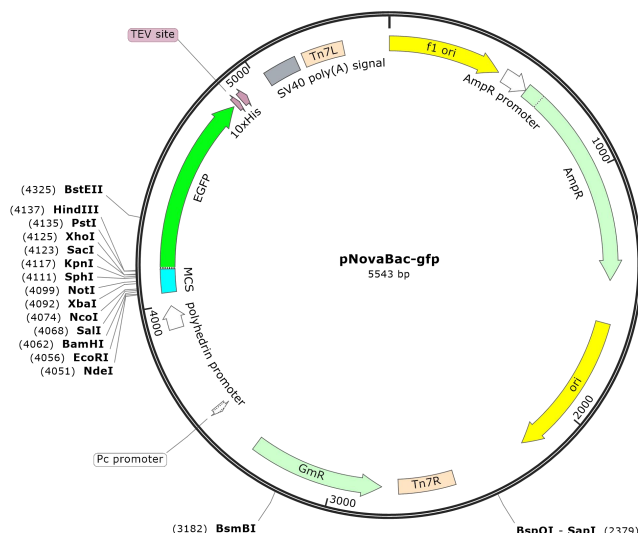
核心功能：内置超强启动子驱动的绿色荧光蛋白（GFP）表达框。

适用场景：

- ✧ **新手排雷**：初次使用本系统时作为阳性对照，验证转染试剂与细胞状态。也可将目的基因插入 MCS 区域，与 gfp 共表达。
- ✧ **病毒滴度监控**：在重组病毒包装与扩增阶段，通过荧光细胞的比例，肉眼即可直观判断出毒效率和估算病毒滴度（MOI）。

- ✧ **最佳收获期摸索**：通过追踪荧光强度的峰值，精确锁定目标蛋白表达的黄金收获窗口期。

使用提示 (Tips)：强烈建议每次进行新项目转染或病毒包装时，单开一个孔平行转染本载体。当您看到满视野明亮的绿色荧光时，意味着整个培养体系运行完美！



(2) pNovaBac-mel —— 专攻“无损分泌表达”

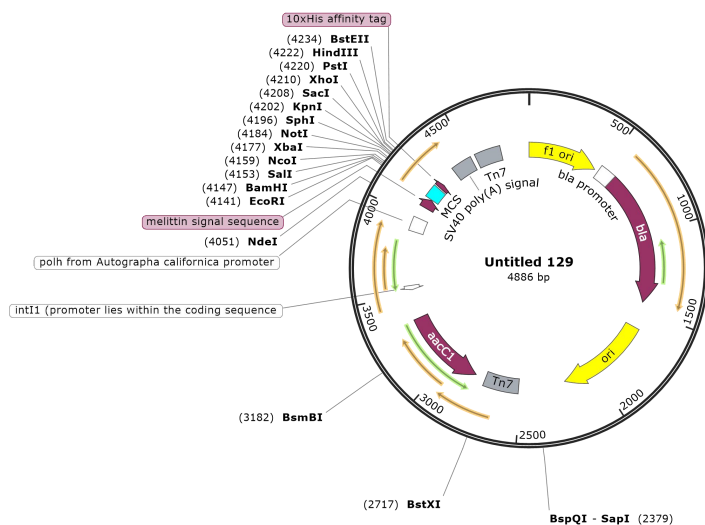
定位：高效胞外分泌型载体

核心功能：载体 N 端融合了经过深度优化的蜜蜂蜂毒肽（Honeybee Melittin, HBM）信号肽。该信号肽在昆虫细胞中拥有极强的分泌引导能力，并在分泌过程中会被宿主细胞的信号肽酶精准切除。

适用场景：

- ✧ 表达具有细胞毒性的靶蛋白（防止蛋白在胞内大量堆积毒死宿主细胞）。
- ✧ 需要二硫键正确折叠的天然分泌蛋白或抗体片段。
- ✧ **极简纯化需求**：目标蛋白直接分泌至培养基中，收集上清即可配合 NovaPure™ 进行纯化，彻底免去细胞破碎步骤。

使用提示 (Tips)：构建质粒时，务必仔细核对阅读框（ORF）相位。确保您的目标基因与前端的 Melittin 信号肽序列严密无缝连接，中途不能有移码或提前终止密码子。



(3) pNovaBac-Dual —— 蛋白复合物的“黄金搭档”

定位：双基因同源共表达载体

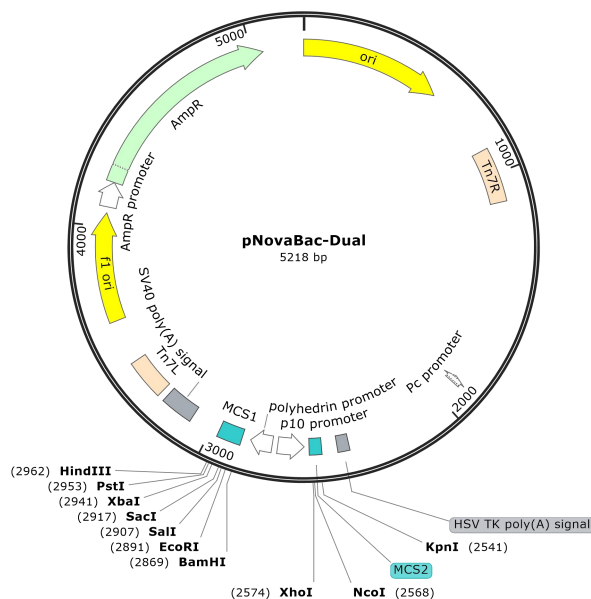
核心功能：单质粒内置双重独立表达框（通常为多角体 Polh 与 p10 强启动子），可在一个质粒中同时、高效驱动两种不同靶蛋白的表达。

适用场景：

- ✧ **抗体表达:** 同时表达重链 (Heavy chain) 与轻链 (Light chain)。
- ✧ **多亚基复合物:** 表达受体-配体复合物、激酶-调节亚基复合物等需要组装才能稳定的蛋白对。

使用提示 (Tips) :

策略分配：建议将分子量较大、或者较难表达的亚基克隆在表达强度最高的 **Polh 启动子**下游；将较易表达的小分子亚基放在另一启动子下游，以获得最佳的化学计量比。



(4) pNovaBac-chaperone 1 ——“死端沉淀”的终极拯救者

定位：强效双伴侣分子解聚辅助模块

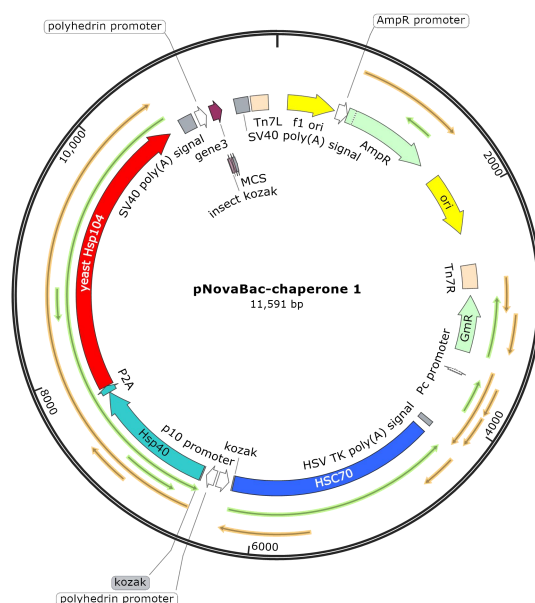
核心功能：共表达 HSC70、HSP40 与 Yeast HSP104 组合构成的“解聚微机器”。

HSC70/HSP40 负责在前端护航新生肽链，防止折叠错误；Yeast HSP104 负责在后端作为“分子马达”，强行瓦解已经形成的无活性蛋白沉淀。

适用场景：

- ✧ 跑 SDS-PAGE 时发现靶蛋白大量存在于裂解后的沉淀（包涵体）中，上清中无条带。
- ✧ 表达超大分子量、多结构域或极易聚沉的膜蛋白。
- ✧ 需要提升慢病毒或杆状病毒的组装滴度和感染活力。

使用提示 (Tips) :



pNovaBac-chaperone 1 创新性地引入了基于 **Yeast HSP104** 的双伴侣分子解聚系统。这不仅是一个普通的伴侣质粒，更是一台装载在宿主细胞内的“蛋白重塑马达”。**前端拦截 + 后端解聚：**HSP40/HSC70 负责护航新生肽链折叠，防止聚集；而独家引入的酵母源 HSP104 则能主动瓦解已形成的死端沉淀。无论是作为慢病毒包装的强力辅助，还是作为极难表达蛋白的拯救方案，该质粒模块都能助您突破宿主细胞的折叠极限，锁定极其珍贵的高纯度、高活性可溶产物。

10.2 抗生素母液配方

抗生素	母液浓度	溶剂	工作浓度	保存
卡那霉素 (Kan)	50 mg/mL	水 (除菌过滤)	50 µg/mL	-20 °C
庆大霉素 (Gm)	7 mg/mL	水 (除菌过滤)	7 µg/mL	-20 °C
四环素 (Tet)	10 mg/mL	70% 乙醇 (避光)	10 µg/mL	-20 °C 避光
氨苄西林 (Amp)	100 mg/mL	水 (除菌过滤)	100 µg/mL	-20 °C
IPTG	200 mg/mL	水 (除菌过滤)	40 µg/mL	-20 °C
X-gal	20 mg/mL	DMF	100 µg/mL	-20 °C 避光

10.3 LB 培养基与平板

10.3.1 LB 液体 (每 1 L)

- 胰蛋白胨 (Tryptone) : 10 g
- 酵母提取物 (Yeast Extract) : 5 g
- 氯化钠: 10 g
- 去离子水定容至 1 L, pH 调至 7.0, 121 °C 灭菌 20 min

培养基选择: 推荐使用 Luria Broth Base 而非 Lennox L LB——后者会降低显色强度和菌落数。

10.3.2 LB 三抗筛选板

- 在 LB 液体中加入 15 g/L 琼脂, 121 °C 灭菌后冷却至 ~50 °C。
- 加入抗生素终浓度: Kan 50 + Gm 7 + Tet 10 (µg/mL)。
- 加入 X-gal 100 µg/mL (DMF 溶液) + IPTG 40 µg/mL。
- 倒板, 4 °C 避光保存, 建议 2 周内使用。

10.4 SOC 复苏培养基 (每 1 L)

- 胰蛋白胨: 20 g
- 酵母提取物: 5 g
- NaCl: 0.5 g (10 mM)
- KCl: 0.186 g (2.5 mM)
- 121 °C 灭菌 20 min
- 灭菌后无菌加入: 1 M MgCl₂ 10 mL、1 M MgSO₄ 10 mL、20% 葡萄糖 20 mL

10.5 Bacmid 中量提取 (NovaBac™ 大质粒/Bacmid 中量提取试剂盒(10 次))

流程参照唯地生物 NovaBac™ 大质粒/Bacmid 中量提取试剂盒(10 次), 要点:

- 起始培养：单白菌落接 150 mL LB（含 Kan 50 + Gm 7 + Tet 10 $\mu\text{g/mL}$ ），37 °C 250 rpm 过夜。
- 按照操作手册，加入溶液，离心后过柱洗脱。
- 洗脱后异丙醇沉淀，70% 乙醇洗一次，TE 溶解。
- 建议测 OD_{260/280} ≥ 2.0 、A_{260/A230} ≥ 2.0 ，4 °C 保存。