

Bacmid 大量提取手册

一、细菌培养

- 1、从冻存管中挑取含有相应 Bacmid 的大肠杆菌，在 LB 固体培养基平板（含 15 $\mu\text{g/mL}$ 卡那霉素）上划线，37°C 培养过夜。
- 2、第二天早晨挑取单菌落接种于 5 mL LB 培养基试管中（事先预热，接种前加 2.5 μL 卡那霉素贮液），37°C 200 rpm 震荡培养 10-12 小时。
- 3、将 1 mL 上述菌液接种于装有 100 mL LB 培养基的 500 mL 摇瓶中（事先预热，接种前加 50 μL 卡那霉素贮液），37°C 200 rpm 震荡培养过夜（视菌体浓度调整培养时间）。
- 4、把 100 mL 菌液用 50 mL 离心管分两次 4°C 5500 rpm 离心（Eppendorf 5804R 冷冻离心机），每次 10 min，倒掉上清后倒置离心管，使残余的上清流净。

二、Bacmid 提取

- 1、加入 5 mL 冰预冷的溶液 I，重悬菌体，保证细胞完全分散。
- 2、加入 5 mL 溶液 II，轻轻反转离心管混匀，使菌体彻底裂解，立刻冰浴 10 min。
●此步骤后所有操作宜轻柔，避免 Bacmid 被剪切力破坏
- 3、加入 3.75 mL 冰预冷的溶液 III，轻轻反转离心管混匀，冰浴 10 min。
- 4、4°C 7000 rpm 离心 20 min（不要开刹车模式），将上清小心倒至新的 50 mL 离心管中，避免将沉淀倒入新离心管中。
- 5、加入 0.6 倍异丙醇（约 8 mL），轻轻反转混匀，室温沉淀至少 10 min，室温 7000 rpm 离心 20 min。
- 6、小心倒出上清，加入 1 mL 70%乙醇，清洗沉淀，7000 rpm 离心 2 min，小心吸出乙醇，自然晾干（不要干得太透）。
- 7、用 450 μL dd H₂O 溶解 DNA 沉淀，用剪头的枪头将 DNA 溶液转入 1.5 mL 离心管，加入 5 μL 20 mg/mL RNase A，37°C 水浴酶切 2 小时。
- 8、加入等体积（450 μL ）苯酚氯仿异戊醇（25:24:1），反转数次，使有机相和水相充分接触，12000 rpm 离心 10 min（此后均为台式离心机），用剪头的枪头将上层水相转入干净的 1.5 mL 离心管中。小心不要吸到蛋白层和有机相。
- 9、加入 50 μL 3M NaAc 和 1 mL 无水乙醇，-20°C 沉淀 30 min，12000 rpm 离心 15 min。

10、弃上清，加 500 μL 70%乙醇洗涤沉淀，12000 rpm 离心 5 min，弃上清后晾干（不要干得太透，不可加热干燥）。

三、Bacmid 线性化

- 1、用 405 μL dd H₂O 溶解 DNA（不要用枪头吹打）。
- 2、加入 45 μL 10 \times CutSmart[®] Buffer、1 μL NEB *Bsu*36I，37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴酶切 9 小时（或过夜）。
- 3、加入等体积（450 μL ）苯酚氯仿异戊醇（25:24:1），反转数次，使有机相和水相充分接触，12000 rpm 离心 10min，用剪头的枪头将上层水相转入干净的 1.5 mL 离心管中。小心不要吸到蛋白层和有机相。
- 4、加入 50 μL 3M NaAc 和 1 mL 无水乙醇，-20 $^{\circ}\text{C}$ 沉淀 30 min，12000 rpm 离心 15 min。
- 5、弃上清，加 500 μL 70%乙醇洗涤沉淀，12000 rpm 离心 5 min，弃上清后晾干（不要干得太透，不可加热干燥）。
- 6、用 500 μL 灭菌 dd H₂O 溶解 DNA。取 2 μL 电泳检测 DNA 浓度和质量。用灭菌 dd H₂O 调整至合适浓度（5ng 线性化 Bacmid 即可做一次转染），分装后-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

附录：试剂配制

LB 培养基：按下表配好后用 NaOH 调节 pH 至 7.0，灭菌

胰蛋白胨	10 g
酵母粉	5 g
NaCl	10 g
H ₂ O	1 L

LB 固体培养基：每 100 mL LB 培养基加 1.5 g 琼脂粉，灭菌

卡那霉素贮液（30 mg/mL）：0.3 g 卡那霉素溶于 10 mL ddH₂O 中，过滤灭菌，分装后-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。卡那霉素工作浓度为 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，即每 mL 培养基加 0.5 μL 贮液。

3M NaAc: 24.6g NaAc 溶于 40 mL ddH₂O 中，加冰乙酸调 pH 至 5.2，定容至 100 mL。

溶液 I：按下表配好后用 NaOH 调节 pH 至 8.0，115 $^{\circ}\text{C}$ 灭菌，4 $^{\circ}\text{C}$ 保存

葡萄糖	0.99 g
Tris-HCl	0.303 g
EDTA	0.29 g
H ₂ O	100 mL

溶液 II：现配现用

10 M NaOH	0.2 mL
2% SDS	5 mL
H ₂ O	4.8 mL

溶液 III：

5 M KAc	60 mL (29.4g/100 mL)
冰乙酸	11.5 mL
H ₂ O	28.5 mL

2018 年 07 月 02 日

