qBac®杆状病毒表达载体系统

用户手册

陕西杆粒生物科技有限公司

2026 年 10 月

版本号：V0002.0000

目录

第一部分：概述 1

1.1 BEVS 发展简史 1

1.2 昆虫细胞系 3

1.3 qBac®杆状病毒表达载体系统 4

1.4 使用许可说明 5

第二部分：简要实验程序 6

2.1 本产品 6

2.2 使用者需要准备 6

2.3 实验程序 7

第三部分：完全实验程序 9

3.1 实验准备 9

3.2 制备重组杆状病毒 12

3.3 表达蛋白 15

第四部分：问题与解决方案 16

第一部分：概述

杆状病毒表达载体系统（Baculovirus Expression Vector System, BEVS）是一个基于昆虫细胞的真核表达体系。它通过专一性感染昆虫细胞的杆状病毒基因组，将外源基因导入到昆虫细胞中表达。由于具有类似于哺乳动物细胞的蛋白质翻译后加工系统，昆虫细胞中表达的外源蛋白有非常好的可溶性和生物学活性。另外，杆状病毒没有对哺乳动物的潜在致病性，多角体基因缺失的重组杆状病毒也丧失了在昆虫个体间的传播能力，因而 BEVS 具有良好的生物安全性。这些优点使得该表达系统广泛应用于生物制品，尤其是疫苗工业领域。

1.1 BEVS 发展简史

杆状病毒是一类具有囊膜包裹的双链环状 DNA 病毒，其基因组大小为 80～180 kb，在自然界中以节肢动物作为专一性宿主进行感染和传播。苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒（Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus, AcMNPV）是杆状病毒的模式种。

1981 年 Miller 根据 AcMNPV 分子生物学性质及现代分子生物学技术，从理论上阐述了杆状病毒作为载体表达外源基因的可行性。1983 年 Smith 等成功地利用 AcMNPV 作为载体在草地贪夜蛾（*Spodoptera frugiperda*）细胞中表达了人β-干扰素基因，完成了从理论到实践的飞跃。由于构建重组病毒使用了野生型病毒基因组 DNA，导致重组病毒混杂在大量野生型病毒中，必须通过空斑筛选才能获得纯的重组病毒。1990 年 Kitts 等把一个 *Bsu*36I 限制性酶切位点引入到多角体基因附近。用 *Bsu*36I 酶切线性化 AcMNPV 后，重组病毒空斑筛选的阳性率从原来的 0.01%提高到 25～30%（图 1-1A）。1993 年 Kitts 和 Possee 把多个 *Bsu*36I 位点一起引入到杆状病毒基因组种，

使重组效率提高到 90%以上。虽然如此，空斑筛选依然是一个不可或缺的步骤——这个步骤既耗时又难以操作。

为了避开空斑筛选，1993 年 Luckow 等用 Kan/mini-attTn7/mini-F（卡那霉素抗性基因/Tn7 转座子位点/F 质粒复制子）替换了多角体基因。由于引进了大肠杆菌的复制子，重组杆状病毒基因组 DNA 可以象质粒一样在大肠杆菌中复制。一起引进的 Tn7 转座子位点可以通过转座的方式在大肠杆菌中实现外源基因的插入（图 1-1B）。筛选获得的阳性克隆经质粒提取，再转染昆虫细胞，即可获得重组病毒。这个载体商业化后成为目前广泛使用的 Bac-to-Bac®杆状病毒表达载体系统。

Luckow 等构建的这个能在昆虫细胞和大肠杆菌之间穿梭的杆状病毒 DNA 被命名为 Bacmid。该名称取自 Baculovirus 和 plasmid，中文译名为“杆粒”。

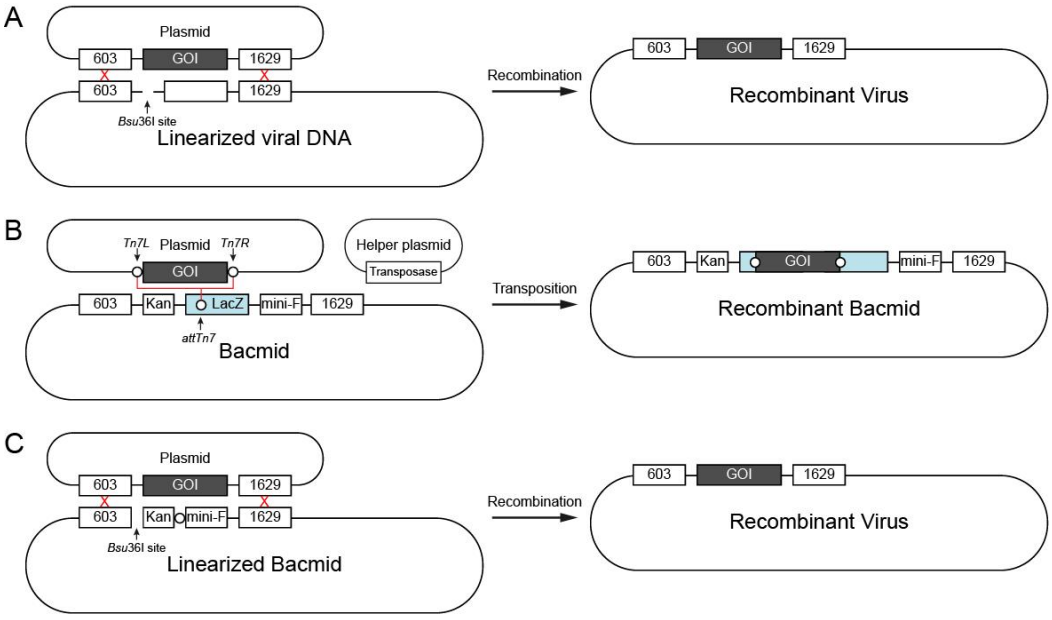


图 1-1 获得重组杆状病毒的不同方式

A. 直接通过杆状病毒基因组 DNA 与外源基因侧翼同源序列重组获得重组病毒

B. 通过转座将外源基因插入到 Bacmid 中，获得重组 Bacmid

C. 通过 Bacmid 与外源基因侧翼同源序列同源重组获得重组病毒

由于 Bacmid 可以在大肠杆菌中增殖，即便采用同源重组策略，人们也

开始使用 Bacmid 替代从病毒中提取病毒基因组 DNA（图 1-1C）。为了能像 Bac-to-Bac®一样免空斑筛选, 2003 年 Zhao 等将重组位点下游的必需基因 Orf1629 部分敲除。这样一来，只有同源重组后修复了 Orf1629 的 DNA 才能产出重组病毒。此后，由于操作的便利性，重组方式已经开始替代业界广泛使用的基于转座的 Bac-to-Bac®系统。

参考文献:

Miller LK. A virus vector for genetic engineering in invertebrates, p. 203-224. In N. J. Panopoulos (ed.), Genetic engineering in the plant sciences. Praeger, New York. 1981.

Smith GE, Summers MD, Fraser MJ. Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. Mol Cell Biol. 1983. 3(12):2156-65.

Kitts PA, Ayres MD, Possee RD. Linearization of baculovirus DNA enhances the recovery of recombinant virus expression vectors. Nucleic Acids Res. 1990. 18(19):5667-72.

Kitts PA, Possee RD. A method for producing recombinant baculovirus expression vectors at high frequency. Biotechniques. 1993. 14(5):810-7.

Luckow VA, Lee SC, Barry GF, Olins PO. Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in Escherichia coli. J Virol. 1993. 67(8):4566-79.

Zhao Y, Chapman DA, Jones IM. Improving baculovirus recombination. Nucleic Acid Res. 2003. 31:e6.

1.2 昆虫细胞系

目前 AcMNPV 杆状病毒表达领域比较常用的昆虫细胞系有 *Sf*9/*Sf*21 和 High Five。

Sf 细胞系

*Sf*9/*Sf*21 细胞源于草地贪夜蛾（*Spodoptera frugiperda*）蛹的卵巢组织，*Sf*9/*Sf*21 细胞系适用于杆状病毒的感染、纯化、高滴度病毒的生产和表达重组蛋白。*Sf*9/*Sf*21 细胞具有良好的贴壁性，可用于静止培养系统。由于 *Sf*9/*Sf*21 细胞并无贴壁依赖性，所以也可以进行摇瓶或生物反应器悬浮培养。

High Five 细胞系

High Five 细胞来源于粉纹夜蛾（*Trichopulsia ni*）卵巢细胞，表达量高

于 *Sf* 细胞系。High Five 的糖基化和磷酸化修饰比 *Sf* 细胞系更复杂，因此更适合表达一些分泌性重组蛋白。High Five 细胞具有贴壁和悬浮生长的双重特性，因此可以通过摇瓶和生物反应器实现规模化培养。

1.3 qBac®杆状病毒表达载体系统

qBac®杆状病毒表达载体源于 BAC10:KO_{1629}（Zhao et al. 2003），因而不需要空斑筛选，只需简单的共转染即可获得 100%阳性病毒（图 1-2）。

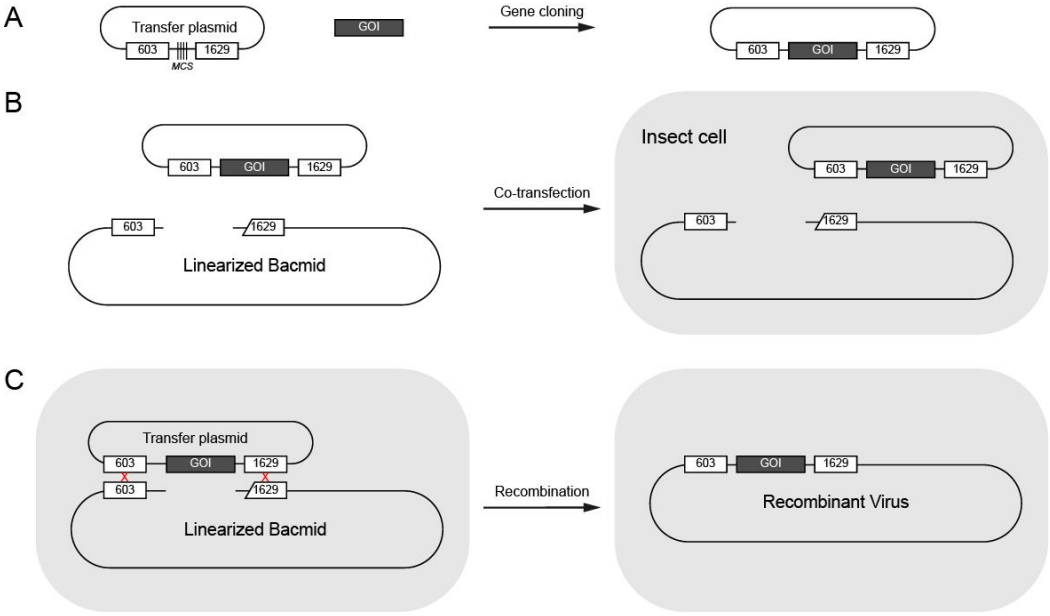


图 1-2 qBac 载体获得重组杆状病毒的步骤

A. 将外源基因序列（GOI）通过分子克隆手段插入到转移载体的多克隆位点

B. 带有外源基因的转移载体与 Bacmid 共转染昆虫细胞

C. 转移载体和 Bacmid 在昆虫细胞中发生同源重组，得到重组杆状病毒

在 BAC10:KO_{1629} 基础上，我们敲除多个非必需基因，这不仅使 Bacmid 有更大的外源片段容量，还能释放更多的细胞资源用于表达外源蛋白。另外，由于病毒感染可以诱导昆虫细胞的凋亡，外源蛋白的表达时间只有 3～4 天。我们通过 siRNA 干扰，直接抑制昆虫细胞凋亡通路末端蛋白 Caspase-1 的表达，使病毒感染的昆虫细胞具有抗凋亡的特性。这样，昆虫细胞中外源蛋白的表达时限可以达到至少 5 天。经过上述改造，qBac®杆状病毒表达载体外

源蛋白产量有了大幅度提升（图 1-3），并且具有良好的可溶性。

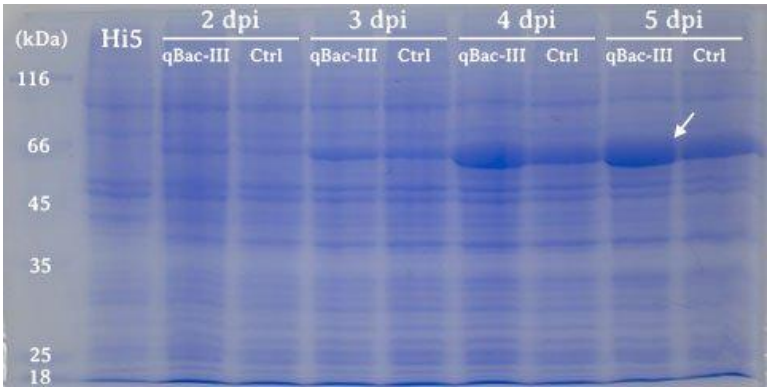


图 1-3 用 qBac-III载体（货号：10301）表达的荧光素酶 Fluc

1.4 使用许可说明

本产品（qBac®杆状病毒表达载体）在用于科研用途时，不需要额外的使用许可。

用于工业和商业用途时，必须要获得我们的使用许可。在未经授权的情况下将本产品于工业和商业，将会面临严厉的法律诉讼和经济赔偿。

如需进一步了解本产品商业授权相关信息，请见公司网站“知识产权及授权”（https://bacmid.com/index.php?id=ip）。

需要洽谈使用许可，请致函 info@bacmid.com。

第二部分：简要实验程序

提示：此部分内容仅针对具有重组杆状病毒操作经验的用户，其他用户请从第三部分开始阅读。

2.1 本产品

qBac® Bacmid（Bacmid DNA，qBac-I，货号：10101；qBac-III，货号：10301；qBac-IIIG，货号：10302）浓度 8 ng/μL，每次转染使用 5 μL。

pQB® 系列转移载体质粒（Transfer vectors，货号信息见 http://bacmid.com/index.php?id=plasmid），待表达的基因首先需要克隆到该转移质粒（Transfer vector）上，新制备的重组质粒浓度 100 ng/μL，每次转染使用 3 μL [300 ng]。

Control plasmid（阳性对照转移质粒 DNA）浓度 100 ng/μL，每次转染使用 3 μL [300 ng]。

2.2 使用者需要准备

1） 转染试剂（推荐 Promega FuGENE HD Transfection Reagent）。

2） 昆虫细胞培养基（加 100 UI/mL 氨苄青霉素和 100 UI/mL 链霉素）。

3） 六孔细胞培养板或 35 mm 细胞培养皿，每孔（皿）铺 1 x 10^6 个 *Sf*9 细胞（2 mL）。

4） 带有目的基因片段的转移质粒，浓度 100 ng/μL（每次转染需要 300 ng）。

5） 无菌 1.5 ml 离心管，无菌移液器枪头，无菌 ddH_2O。

2.3 实验程序

2.3.1 准备转染 DNA 混合物

2.3.1.1 向 1 号无菌 1.5 mL 离心管中加入 95 µL ddH_2O（或无血清昆虫细胞培养基），再向离心管中加入 5 µL Promega FuGENE HD Transfection Reagent 转染试剂，充分混匀。

2.3.1.2 向 2 号无菌 1.5 mL 离心管中加入 92 µL ddH_2O（或无血清昆虫细胞培养基），再向离心管中加入 5 µL qBac Bacmid，再向离心管中加入 3 µL 转移质粒 DNA，轻弹混匀。

2.3.1.3 将 1 号离心管中全部溶液用移液器转移到 2 号离心管中，轻弹混匀，获得转染 DNA 混合物，室温静置孵育 20～30 分钟。

2.3.2 转染

2.3.2.1 将 2 号离心管中 DNA 混合物溶液逐滴均匀加入已经铺好细胞的六孔细胞培养板或培养皿中。

2.3.2.2 放置 28℃培养箱中静置培养 4～6 天。

2.3.3 收获 P0 代病毒

2.3.3.1 用移液器小心吸取细胞板或培养皿中的培养基（上清），转移到无菌的离心管中。

2.3.3.2 用台式离心机 300 x *g* 离心 5 min 移除细胞碎片，4℃避光保存。此即为 P0 代病毒。

2.3.4 表达蛋白

2.3.4.1 用 1～20 µL（或 0.1～0.5 MOI，Multiplicity of Infection，即感染复数，指病毒感染细胞的比例） P0 代病毒加到铺好细胞的六孔细胞培养板的一个孔或 35 mm 细胞培养皿中，28℃静置培养 4～6 天，收集培养皿中的

培养基（上清），用台式离心机 300 x *g* 离心 5 min 移除细胞碎片，获得 P1 代病毒，测定滴度（方法自选）。4℃避光保存。

2.3.4.2 用 P1 代病毒以 3～5 MOI 感染 *Sf*9 或 High Five 细胞，至感染后 5 天收集蛋白。

第三部分：完全实验程序

3.1 实验准备

3.1.1 本产品

qBac® Bacmid（Bacmid DNA，qBac-I，货号：10101；qBac-III，货号：10301；qBac-IIIG，货号：10302）浓度 8 ng/μL，每次转染使用 5 μL。

pQB® 系列转移载体质粒（Transfer vectors，货号信息见 http://bacmid.com/index.php?id=plasmid），待表达的基因首先需要克隆到该转移质粒（Transfer vector）上，新制备的重组质粒浓度 100 ng/μL，每次转染使用 3 μL [300 ng]。

Control plasmid（阳性对照转移质粒 DNA）浓度 100 ng/μL，每次转染使用 3 μL [300 ng]。

3.1.2 需要提前购买和准备的实验材料

1） 转染试剂（推荐 Promega FuGENE HD Transfection Reagent）。

2） 昆虫细胞培养基（推荐 HyClone SFX-Insect Serum-free Insect Cell Culture Medium）。

3） 六孔细胞培养板或 35 mm 细胞培养皿。

4） 无菌 1.5 ml 离心管，无菌移液器枪头，无菌 ddH_2O。

5） 氨苄青霉素-链霉素贮液：称取 0.6 g（100 万单位）氨苄青霉素和 1 g（100 万单位）硫酸链霉素，溶于 20 ml ddH_2O，用 0.22 μm 细菌滤器过滤除菌后每 2 mL 分装一管，-20℃冰箱保存。使用时，每升昆虫细胞培养基加入 2 mL 氨苄青霉素-链霉素贮液，得到含有 100 UI/mL 氨苄青霉素和 100 UI/mL 链霉素的昆虫细胞培养基。

6） 28℃恒温培养箱。

3.1.3 构建转移质粒

根据表达蛋白的要求选择相应的转移质粒，选择时需要考虑如下因素：

1）启动子：在意表达量可选用极晚期强启动子 p10 或 polh；在意蛋白质折叠可选用晚期启动子 p6.9 或 gp64、早期启动子 ie1，甚至于选择真核 CMV 启动子。

2）标签：可选择在目标蛋白的氨基末端或羧基末端融合检测标签、亲和层析标签或增溶标签。

3）信号肽：对于分泌蛋白或跨膜蛋白，需要在目标蛋白氨基末端融合表达信号肽。

qBac 表达载体系统具有良好的兼容性，您可以选择我司提供的 pQB 系列转移质粒（http://bacmid.com/index.php?id=plasmid），或选择如下兼容转移质粒：

OET Ltd.：pOET 系列质粒；

Novagen：pIEx、pBiEx、pTriEx、pBac 系列质粒；

Takara（Clontech）：pBacPAK 系列质粒。

在使用这些质粒时，请确认在多克隆位点上下游存在杆状病毒的同源序列（图 3-1 中的 603 和 1629）。

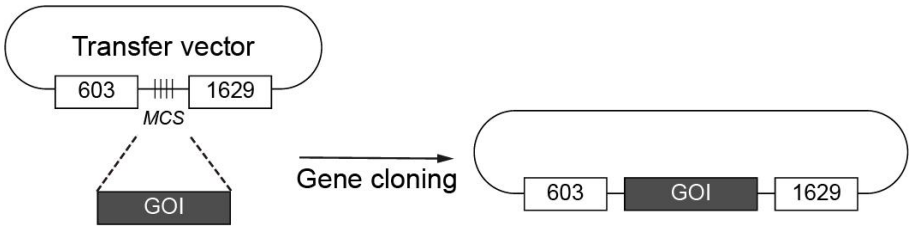


图 3-1 构建转移质粒示意图

待表达的基因首先需要克隆到转移质粒（Transfer vector）上（图 3-1）。

将阳性克隆接种于 5 mL LB 液体培养基，待细菌生长至对数生长后期，用质粒小提试剂盒提取质粒。取 2 μL 质粒电泳检查纯度和 DNA 含量，根据目测估计的结果，用 ddH_2O 稀释质粒至 100 ng/μL。调节浓度后的质粒可以立即用于后续步骤，或保存于-20℃冰箱中。

虽然提取质粒时不严格强调无菌操作，但为了减少后续步骤的污染风险，建议从质粒洗脱开始，尽可能避免细菌对质粒溶液的污染。

3.1.4 昆虫细胞

取对数生长期的 *Sf*9（或 *Sf*21）细胞，用血球计数板或细胞计数仪计数，根据计数结果，用昆虫细胞培养基（含 100 UI/mL 氨苄青霉素和 100 UI/mL 链霉素）调节细胞浓度至 0.5 x 10^6 cells/mL。

> **注意：**对数生长期的细胞对转染成功至关重要，因为病毒只能在对数生长期的细胞中复制。

六孔细胞培养板每孔加 2 mL 细胞，或 35 mm 细胞培养皿加 2 mL 细胞。平放静置至少一小时等待细胞沉降后贴壁，此间一定不要晃动，避免细胞沉降不均匀。用倒置显微镜观察细胞贴壁情况，以贴壁细胞面积占培养皿底面面积计算细胞汇合度，转染时细胞汇合度以 50～70%为宜（图 3-2），传毒时细胞汇合度建议为 70～80%，蛋白表达时细胞汇合度达到 90%左右为宜。细胞间的空隙是必要的，这些空隙能在转染后的 24 小时内为每个细胞提供分裂所需的空间。

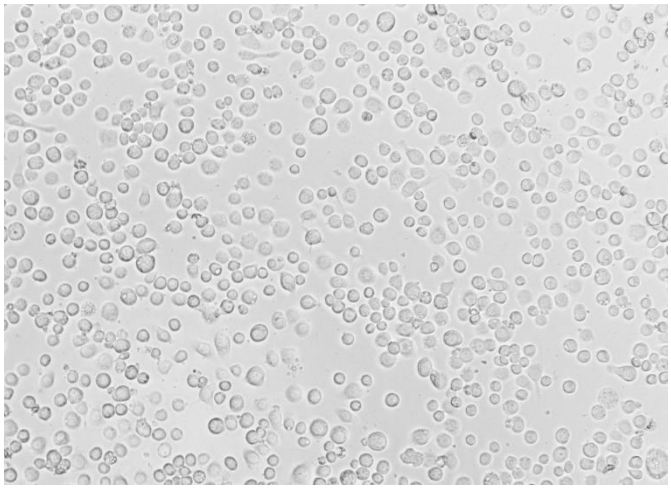


图 3-2 贴壁后的 *Sf*9 细胞

注意：不要使用 *T.ni* High Five 细胞制备重组病毒或扩增病毒，因为该细胞系容易引入突变。

3.2 制备重组杆状病毒

3.2.1 准备转染 DNA 混合物

铺完细胞后静置的一小时时间，可以用来准备转染 DNA 混合物。

3.2.1.1 准备两个无菌 1.5 mL 离心管，分别编号“1”和“2”。向 1 号离心管中加入 95 μL ddH_2O（或无血清昆虫细胞培养基），再向离心管中加入 5 μL Promega FuGENE HD Transfection Reagent 转染试剂。盖好离心管盖，用手指轻弹离心管底部，使液体充分混匀。如果液体溅到离心管壁上，可瞬时离心把液体甩到离心管底部。

3.2.1.2 向 2 号离心管中加入 92 μL ddH_2O（或无血清昆虫细胞培养基），再向离心管中加入 5 μL qBac Bacmid，再向离心管中加入 3 μL 转移质粒 DNA。盖好离心管盖，用手指轻弹离心管底部，使液体充分混匀。如果液体溅到离心管壁上，可手臂轻甩把液体甩到离心管底部。此步骤中吸取、混

匀 Bacmid 一定要轻柔，避免线性长链 DNA 发生断裂。

3.2.1.3 将 1 号离心管中全部溶液用移液器转移到 2 号离心管中，盖好离心管盖，用手指轻弹离心管底部，使液体充分混匀。获得的转染 DNA 混合物需要在室温静置孵育 20～30 分钟。

提示：如果需要的话，可以用本产品中提供的 Control plasmid 平行准备一份转染 DNA 混合物。本产品中提供的 Control plasmid 含有极晚期强启动子控制的绿色荧光蛋白基因，在倒置荧光显微镜下可以非常容易地观察重组病毒的产生情况。

3.2.2 转染

3.2.2.1 将 2 号离心管中转染 DNA 混合物用移液器轻轻吸取出来，然后缓慢逐滴均匀加入已经铺好细胞的六孔细胞培养板或培养皿中（图 3-3）。轻轻晃动细胞培养板或培养皿，使 DNA 混合物与培养基充分混匀。

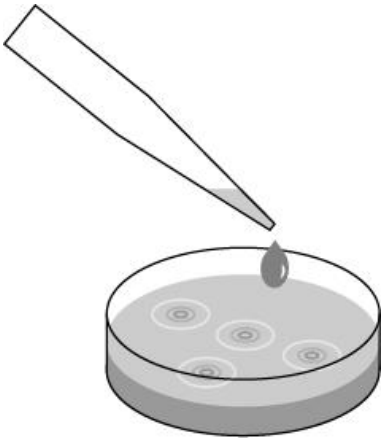


图 3-3 滴加转染 DNA 混合物示意图

3.2.2.2 放置 28℃培养箱中静置培养，每天用倒置显微镜观察细胞病变情况（图 3-4）。视细胞病变程度在培养 4～6 天（通常为 5 天）后收集 P0 代重组杆状病毒。

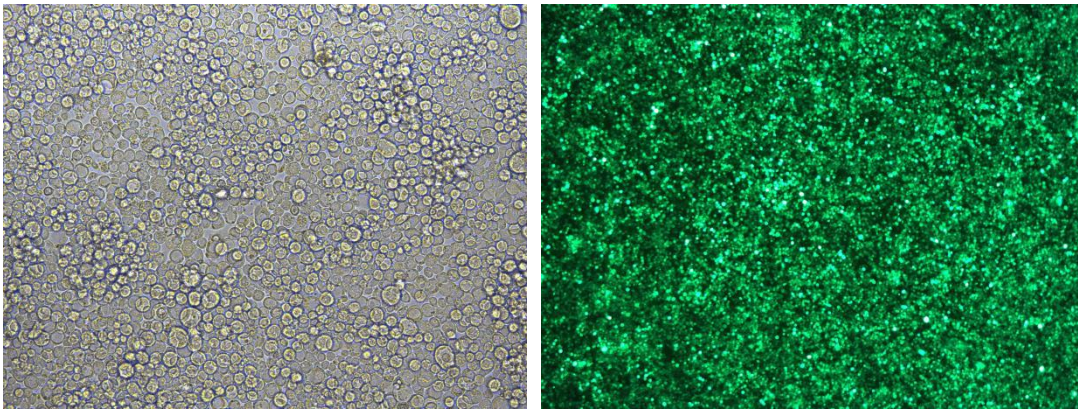


图 3-4 病变后细胞的形态

病变的昆虫细胞表现为：细胞分裂停滞（细胞密度不再增加），细胞变大、变圆，细胞内部出现折光强的颗粒，细胞从贴壁状态转变为悬浮状态（如左图）。如使用的是 qBac-IIIG 产品（货号：10302）或者 Control plasmid 对照质粒，可在荧光显微镜下观察到如右图的荧光照片，可根据荧光数量及强度判断转染进度。

3.2.3 收获 P0 代病毒

3.2.3.1 用移液器小心吸取细胞板或培养皿中的培养基（上清），转移到无菌的离心管中。

3.2.3.2 用台式离心机 300 x *g* 离心 5 min，将移除细胞碎片后的上清转移至新的无菌离心管中，4℃避光保存。此即为 P0 代病毒贮液。

3.2.4 扩增病毒

3.2.4.1 根据转染时病变程度或荧光强度，酌情用 1～20 μL（或 0.1～0.5 MOI，Multiplicity of Infection，即感染复数，指病毒感染细胞的比例） P0 代病毒加到铺好细胞的六孔细胞培养板的一个孔或 35 mm 细胞培养皿中，轻轻晃动细胞培养板或培养皿，使病毒与培养基充分混匀。28℃静置培养

4～6 天。收集培养基（上清），用台式离心机 300 x *g* 离心 5 min，将移除细胞碎片后的上清转移至新的无菌离心管中，4℃避光保存。此即为扩增后的 P1 代病毒。

3.2.4.2 获得 P1 代病毒后，可选择测定滴度，或将病毒扩增至一定体积后测定滴度。测定低度的方法自选。

> **提示：**本节仅为初步鉴定蛋白表达之目的，少量扩增病毒。如果您需要大量病毒贮液，可按比例提高扩增病毒的量。理论上从 P0 代病毒可以扩增 200 mL～4 L P1 代病毒。病毒在 4℃避光可以保存数个月，长期贮存可放于 -80℃冰箱中。长期贮存需要添加 5%血清。尽量避免过多的传代，过多的传代次数容易积累突变，使缺陷型病毒比例增大，进而影响蛋白的表达。

3.3 表达蛋白

3.3.1 按 3.1.4 中的方法在六孔细胞培养板或 35 mm 细胞培养皿中铺好 *Sf*9 昆虫细胞，用 P1 代病毒以 3～5 MOI 感染 *Sf*9 细胞。如果没有测滴度，可以根据扩增病毒时细胞病变或荧光强度的情况估计病毒的滴度，病变比较明显的可以按至少 5 x 10^7 pfu/mL 计算，即每孔（皿）加 60 µL 病毒。对于大部分重组病毒，滴度都可以达到 1～2 x 10^8 pfu/mL，即每孔（皿）加 15～30 µL 病毒悬液。

3.3.2 感染后的细胞在培养箱中 28℃静置培养 5 天后，收集蛋白表达样品。如果表达的蛋白是分泌蛋白，需要收集细胞培养液上清；如果表达的蛋白是胞内蛋白，需要收集细胞。

3.3.3 收集到的蛋白样品可以直接用 SDS-PAGE 检测目的蛋白的表达。收集到的细胞培养液上清建议用 Western blot 检测分泌蛋白的表达。

3.3.4 大量表达蛋白可以用悬浮培养的昆虫细胞。悬浮细胞的密度为 1～2 x 10^6 cells/mL，按 3～5 MOI 接种病毒。在 28℃恒温摇床上以 120 rpm 转速培养 3～5 天后，收集蛋白表达样品。

第四部分：问题与解决方案

1. 为什么共转染后没有得到重组病毒?

没有得到重组病毒的原因很多。

首先需要检查昆虫细胞的状态。昆虫细胞传代的最佳时期是对数生长后期，在即将达到平台期之前。到了平台期再传代会导致细胞生长状态变差，所以要经常检查细胞的生长状态。生长状态不好的细胞不能用于制备重组病毒和扩增病毒。只有当细胞处于旺盛的生长状态，即处于对数生长期，病毒才能很好地在细胞内感染和复制。

其次要检查实验过程的每一步。尤其需要注意的是用移液器吸取和释放 Bacmid，此步骤一定要轻柔。过于激烈的动作会导致线性 DNA 发生断裂，严重降低重组效率。

2. 为什么扩增之后病毒的滴度不高?

确认扩增病毒所用的细胞是处于对数生长期的健康细胞。

扩增病毒时，需要用低 MOI（0.1～0.5 pfu/细胞）感染细胞。高 MOI 将导致最终获得的病毒滴度非常低。更低的 MOI 用于扩增病毒也是可以的，但需要更长的感染时间获得高滴度病毒。

3. 为什么检测不到目的蛋白的表达?

确认外源基因的阅读框架是否正确，编码区是否存在突变。如果存在问题，则需要重新构建转移质粒。

您所使用的检测方式能否检测到低峰度的蛋白表达？虽然使用 qBac 表达载体，大多时候使用 SDS-PAGE 考马斯亮蓝染色就可以检测外源蛋白的表达，但是对于低峰度蛋白，建议使用 Western blot 检测。在一些罕见的实例中，即便用 Western blot 也检测不到蛋白表达，非常可能的原因是这个蛋

白具有很高的细胞毒性。

4. 其他问题及解决

首先, 可查阅公司官网“常见问题”（https://bacmid.com/index.php?id=faq）进行问题排查。

其次，可查阅公司拍摄的实验操作视频“杆状病毒昆虫细胞蛋白表达系统实验操作指导”（https://bacmid.com/index.php?id=experiment_guidance）。

如有其他问题，请发送邮件至 info@bacmid.com。