



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

pFastBac1-N-EGFP (昆虫杆状病毒表达质粒)

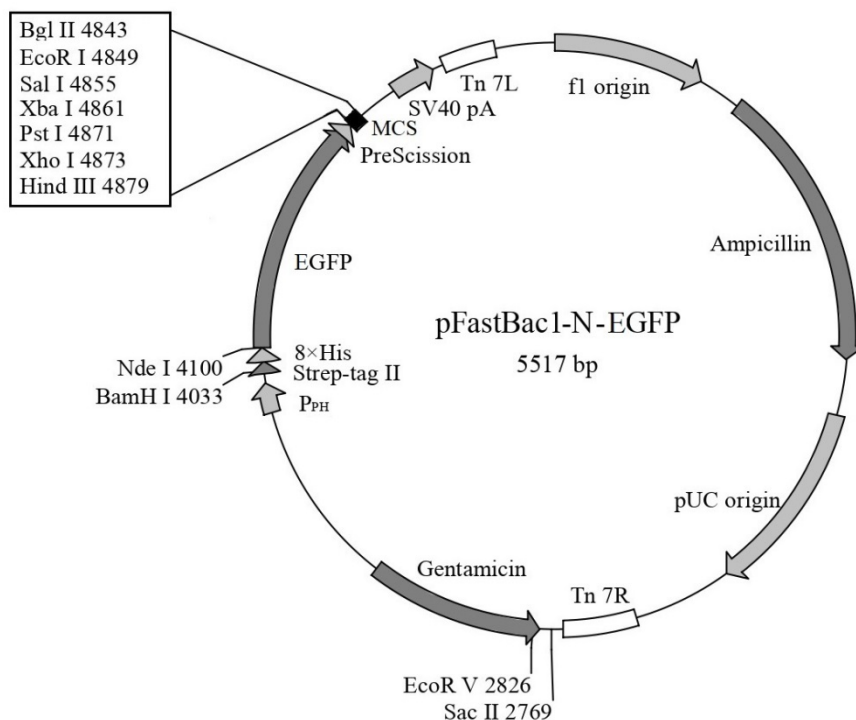
产品编号	产品名称	包装
D2805-1μg	pFastBac1-N-EGFP (昆虫杆状病毒表达质粒)	1μg
D2805-100μg	pFastBac1-N-EGFP (昆虫杆状病毒表达质粒)	100μg

产品简介:

- pFastBac1-N-EGFP, 全称为pFastBac1-Strep-tag-His-tag-N-EGFP-PreScission, 是碧云天自行研发的以pFastBac1为基础构建的用于昆虫细胞表达目的蛋白N端融合有EGFP蛋白的质粒。本质粒含有polyhedrin (PH)启动子, 可以高效启动目的蛋白和EGFP融合蛋白在昆虫细胞(如Sf9和Sf21等)中的表达, 其表达的EGFP有很强的绿色荧光, 在显微镜下可以非常方便地观察目的蛋白的表达情况。同时EGFP的N端含有编码8×His标签的序列和编码短肽亲和标签Strep-tag II的序列, 因此可以非常便捷地使用镍柱或Strep-Tactin系统进行分离纯化。同时在目的蛋白和EGFP之间含有PreScission酶切位点, 便于后续酶切去除标签。
- **和EGFP融合表达, 便于观察表达水平。** 采用Bac-to-Bac杆状病毒表达系统表达目的蛋白时, 通常仅仅是根据细胞被杆状病毒感染的外部形态来判断目的蛋白的表达情况, 因此很容易出现收集病毒时间过早或过晚而导致的目的蛋白表达水平偏低或活性下降的问题。将目的蛋白构建成EGFP的融合表达蛋白, 因为后者有很强的绿色荧光, 在荧光显微镜下可以非常方便地观察目的蛋白的表达效果从而可以有效避免上述问题的发生。
- **His和Strep-tag II双标签系统, 便于分离纯化。** pFastBac1-N-EGFP表达的目的蛋白EGFP融合蛋白的N端含有编码8×His标签的序列, 因此可以非常便捷地使用镍柱进行分离纯化, 也可以使用His标签抗体来识别目的蛋白融合蛋白的表达。同时, 本质粒表达的目的蛋白EGFP融合蛋白的N端还含有短肽亲和标签Strep-tag II的序列。Strep-tag II是由8个氨基酸(WSHPQFEK)构成的短肽序列, 在生理条件下可通过Strep-Tactin纯化介质高选择性地对Strep-tag II融合蛋白进行亲和纯化, 该标签的纯化条件比较温和, 能很好地保持目的蛋白的生物活性, 并仅通过一步亲和层析后就有可能获得超过99%纯度的目的蛋白。
- **带有PreScission位点, 便于去除标签。** 本质粒表达的融合蛋白, 在目的蛋白和EGFP蛋白之间有PreScission蛋白酶识别的八肽序列LEVLFGQP, 因此在目的蛋白纯化后或纯化的同时可以利用PreScission蛋白酶切除目的蛋白N端的EGFP蛋白、8×His标签以及Strep-tag II标签。PreScission蛋白酶酶切发生在八肽序列的Q和G之间, 如果目的蛋白基因是通过无缝克隆的方法以最理想的方式克隆在PreScission酶切位点之后, 那么目的蛋白的N端可以只留下两个额外的氨基酸残基GP。
- pFastBac1-C-EGFP是基于Bac-to-Bac杆状病毒表达系统(Bac-to-Bac Baculovirus Expression System)而设计的表达载体。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, 目的基因如EGFP等插入后受杆状病毒特异性启动子(baculovirus-specific promoter) polyhedrin启动子调控表达; (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(D0346)。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。位点特异的转座会破坏宿主的lacZα基因, 从而可通过蓝白斑筛选重组克隆。PCR等方法鉴定重组克隆后, 提取重组的bacmid转染昆虫细胞, 可以产生重组杆状病毒, 并表达目的蛋白和融合蛋白。扩增重组的杆状病毒并感染昆虫细胞, 就可以大量表达纯化目的蛋白了。
- 本质粒为氨苄青霉素抗性。
- pFastBac1-N-EGFP质粒的主要信息如下:

Feature Nucleotide	Position
f1 origin	2-457
Ampicillin resistance gene	589-1449
pUC origin	1620-2208
Tn 7R	2511-2735
Gentamicin resistance gene	2802-3335
Polyhedrin promoter (P _{PH})	3904-3995
Strep-tag II	4041-4064
8×His Tag	4077-4100
EGFP sequence	4101-4817
PreScission	4818-4841
Multiple cloning site	4842-4883
SV40 polyadenylation signal	5007-5141
Tn 7L	5170-5335

➤ pFastBac1-N-EGFP质粒(5517bp)的图谱如下:



➤ pFastBac1-N-EGFP质粒的详细图谱如下:

					Strep-tag II
		BamHI			
4011	TACCGTCCCA	CCATCGGGCG	CGGATCCATG	TGGAGCCACC	CGCAGTTCGA
	ATGGCAGGGT	GGTAGCCCGC	GCCTAGGTAC	ACCTCGGTGG	GCGTCAAGCT
					8xHis Tag
4061	AAAAGGTTCA	GGTTCACATC	ATCACCATCA	CCATCACCAT	ATGGTGAGCA
	TTTTCCAAGT	CCAAGTGTAG	TAGTGGTAGT	GGTAGTGGTA	TACCACTCGT
					EGFP sequence
4111	AGGGCGAGGA	GCTGTTCACC	GGGGTGGTGC	CCATCCTGGT	CGAGCTGGAC
	TCCCCTCCT	CGACAAGTGG	CCCCACCACG	GGTAGGACCA	GCTCGACCTG
4161	GGCGACGTAA	ACGCCACAA	G TTCAGCGTG	TCCGGCGAGG	GCGAGGGCGA
	CCGCTGCATT	TGCCGGTGTT	CAAGTCGCAC	AGGCCGCTCC	CGCTCCCGCT
4211	TGCCACCTAC	GGCAAGCTGA	CCCTGAAGTT	CATCTGCACC	ACCGCAAGC
	ACGGTGGATG	CCGTTCGACT	GGGACTTCAA	G TAGACGTGG	TGGCCGTTCC
4261	TGCCCGTGCC	CTGGCCCACC	CTCGTGACCA	CCCTGACCTA	CGGCGTGCAG
	ACGGGCACGG	GACCGGGTGG	GAGCACTGGT	GGGACTGGAT	GCCGCACGTC
4311	TGCTTCAGCC	GCTACCCCGA	CCACATGAAG	CAGCACGACT	TCTTCAAGTC
	ACGAAGTCGG	CGATGGGGCT	GGTGTACTTC	GTCGTGCTGA	AGAAGTTCAG
4361	CGCCATGCC	GAAGGCTACG	TCCAGGAGCG	CACCATCTTC	TTCAAGGACG

CGGGTACGGG CTTCCGATGC AGGTCCTCGC GTGGTAGAAG AAGTTCCTGC

4411 ACGGCAACTA CAAGACCCGC GCCGAGGTGA AGTTCGAGGG CGACACCCTG
TGCCGTTGAT GTTCTGGGCG CGGCTCCACT TCAAGCTCCC GCTGTGGGAC

4461 GTGAACCGCA TCGAGCTGAA GGGCATCGAC TTCAAGGAGG ACGGCAACAT
CACTTGGCGT AGCTCGACTT CCCGTAGCTG AAGTTCCTCC TGCCGTTGTA

4511 CCTGGGGCAC AAGCTGGAGT ACAACTACAA CAGCCACAAC GTCTATATCA
GGACCCCGTG TTCGACCTCA TGTTGATGTT GTCGGTGTG CAGATATAGT

4561 TGGCCGACAA GCAGAAGAAC GGCATCAAGG TGAACCTCAA GATCCGCCAC
ACCGGCTGTT CGTCTTCTTG CCGTAGTTCC ACTTGAAGTT CTAGCGGGTG

4611 AACATCGAGG ACGGCAGCGT GCAGCTCGCC GACCACTACC AGCAGAACAC
TTGTAGCTCC TGCCGTCGCA CGTCGAGCGG CTGGTGATGG TCGTCTTGTG

4661 CCCCATCGGC GACGGCCCCG TGCTGCTGCC CGACAACCAC TACCTGAGCA
GGGGTAGCCG CTGCCGGGGC ACGACGACGG GCTGTTGGTG ATGGACTCGT

4711 CCCAGTCCGC CCTGAGCAAA GACCCCAACG AGAAGCGCGA TCACATGGTC
GGGTACGGCG GGACTCGTTT CTGGGGTTGC TCTTCGCGCT AGTGTACCAG

4761 CTGCTGGAGT TCGTGACCGC CGCCGGGATC ACTCTCGGCA TGGACGAGCT
GACGACCTCA AGCACTGGCG GCGGCCCTAG TGAGAGCCGT ACCTGCTCGA

PreScission

4811 GTACAAGCTG GAAGTCTGT TCCAGGGTCC TAGATCTGAA TTCGTCGACT
CATGTTTCGAC CTTCAAGACA AGGTCCCAGG ATCTAGACTT AAGCAGCTGA

PstI XhoI HindIII

4861 CTAGACTGCA GCTCGAGAAG CTTGTGCGAGA AGTACTAGAG GATCATAATC
GATCTGACGT CGAGCTCTTC GAACAGCTCT TCATGATCTC CTAGTATTAG

➤ pFastBac1-N-EGFP中没有的酶切位点(Restriction enzymes that do not cut pFastBac1-C-EGFP)包括:

AatII	AbsI	Acc65I	AfeI	AflII	AgeI	ApaI
AscI	AsiSI	BarI	BbvCI	BfuAI	BlpI	BmgBI
BmtI	BplI	BsiWI	BspDI	BspMI	BssHII	BstAPI
BstEII	Bsu36I	ClaI	CspCI	Eco53kI	EcoNI	FseI
FspAI	KasI	KflI	KpnI	MauBI	MluI	MreI
MteI	NarI	NcoI	NheI	NotI	NruI	NsiI
PacI	PaqCI	PasI	PflMI	PluTI	PmeI	PmlI
PshAI	PspOMI	PspXI	PsrI	PvuII	RsrII	SacI
SbfI	SexAI	SfiI	SfoI	SgrAI	SgrDI	SmaI
SpeI	SphI	SrfI	StuI	SwaI	TspMI	XcmI
XmaI	ZraI					

➤ pFastBac1-N-EGFP中的单酶切位点(Restriction enzymes that cut pFastBac1-C-EGFP)包括:

AjuI	, (N) ₅ `(N) ₇ GAA(N) ₇ TTGG(N) ₆ , (N) ₅ `	3063	HindIII	A`AGCT, T	4878
AlwNI	CAG, NNN`CTG	1855	HpaI	GTT AAC	5006
AvrII	C`CTAG, G	5157	MfeI	C`AATT, G	4993
BaeI	, (N) ₅ `(N) ₁₀ ACNNNNGTAYC(N) ₇ , (N) ₅ `	2803	MscI	TGG CCA	2709
BamHI	G`GATC, C	4032	NaeI	GCC GGC	129
BanII	G, RGCY`C	161	NdeI	CA`TA, TG	4099
BbsI	GAAGACNN`NNNN,	3757	NgoMIV	G`CCGG, C	127
BclI	T`GATC, A	5142	PaeR7I	C`TCGA, G	4872

BsaHI	GR`CG, YC	836	PflFI	GACN`N, NGTC	3228
BseYI	C`CCAG, C	1960	PfoI	T`CCNGG, A	4381
BsmBI	CGTCTCN`NNNN,	3182	PpuMI	RG`GWC, CY	4092
BspQI	GCTCTTCN`NNN,	2381	PstI	C, TGCA`G	4870
BstBI	TT`CG, AA	4867	PvuI	CG, AT`CG	1007
BstXI	CCAN, NNNN`NTGG	2717	SacII	CC, GC`GG	2768
BstZ17I	GTA TAC	3884	SalI	G`TCGA, C	4854
EcoO109I	RG`GNC, CY	4836	SapI	GCTCTTCN`NNN,	2381
EcoRI	G`AATT, C	4848	SnaBI	TAC GTA	3881
EcoRV	GAT ATC	2825	TfiI	G`AWT, C	2290
Esp3I	CGTCTCN`NNNN,	3182	Tth111I	GACN`N, NGTC	3228
FalI	, (N) ₅ `(N) ₈ AAG(N) ₅ CTT(N) ₈ , (N) ₅ `	4578	XbaI	T`CTAG, A	4860
FspI	TGC GCA	1153	XhoI	C`TCGA, G	4872

➤ pFastBac1-N-EGFP质粒可使用的测序引物序列如下:

pFastbac-F primer (3995-4014): 5'-TAT TCC GGA TTA TTC ATA CC-3'

pFastBac-R primer (4909-4927): 5'-ACA AAT GTG GTA TGG CTG A-3'

➤ pFastBac1-N-EGFP的全序列信息请参考碧云天的网站上该质粒的信息。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
D2805-1μg	pFastBac1-N-EGFP	1μg
D2805-100μg	pFastBac1-N-EGFP	100μg
—	说明书	1份

保存条件:

-20°C保存。

注意事项:

- 本质粒未经碧云天书面许可不得用于任何商业用途, 也不得移交给订货人所在实验室外的任何个人或单位。
- 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. 首次使用1μg包装的本产品时, 请先取少量本质粒转化大肠杆菌, 进行质粒小量、中量或大量抽提后再用于后续用途。抽提获得的质粒可以通过酶切电泳进行鉴定, 或通过测序进行鉴定。
2. 100μg包装的本产品质粒浓度为0.1μg/μl, 共1ml。可以直接用于酶切或者转染细胞。

相关产品:

产品编号	产品名称	包装
D2802	pFastBac1-EGFP (杆状病毒包装阳性对照质粒)	1μg
D2804	pFastBac1-C-EGFP (昆虫杆状病毒表达质粒)	1μg/100μg
D2805	pFastBac1-N-EGFP (昆虫杆状病毒表达质粒)	1μg/100μg
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
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	7.5ml
P2151-1ml	BeyoMag™ Streptavidin Magnetic Beads (链霉亲和素磁珠)	1ml
P2151-5ml	BeyoMag™ Streptavidin Magnetic Beads (链霉亲和素磁珠)	5ml
P2151-200μl	BeyoMag™ Streptavidin Magnetic Beads (链霉亲和素磁珠)	200μl
P2302	PreScission Protease	100U
P2303	PreScission Protease	500U
P2229S	His标签蛋白纯化试剂盒(耐变性剂型)	10ml
P2226	His标签蛋白纯化试剂盒(耐还原螯合型)	10ml

P2233-10ml	BeyoGold™ His-tag Purification Resin (耐变性剂型)	10ml
P2233-100ml	BeyoGold™ His-tag Purification Resin (耐变性剂型)	100ml
P2233-1000ml	BeyoGold™ His-tag Purification Resin (耐变性剂型)	1000ml
P2210	BeyoGold™ His-tag Purification Resin (耐还原螯合型)	10ml
P2218	BeyoGold™ His-tag Purification Resin (耐还原螯合型)	100ml 100
P2220	BeyoGold™ His-tag Purification Resin (耐还原螯合型)	1000ml
A0303	辣根过氧化物酶标记Streptavidin	0.2ml
AF0159	GFP Mouse Monoclonal Antibody	50μl
AF5066	GFP Tag Rabbit Polyclonal Antibody	50μl
AG279	GFP抗体(兔多抗)	>40次
AG281	GFP抗体(小鼠单抗)	>40次
AF5060	His Tag Mouse Monoclonal Antibody	50μl
AH367	His-tag抗体(小鼠单抗)	>20次

Version 2021.10.01