

Grace 昆虫培养基，未补充

产品编号: PWL203

规格: 100ml / 500ml

产品内容

产品组成	PWL203-1	PWL203-2
Grace 昆虫培养基，未补充	100ml	500ml
说明书	1 份	1 份

产品简介

Grace昆虫培养基是由Grace改良的Wyatt培养基，最初设计用于澳大利亚白星橙天蚕蛾（*Antheraea eucalypti*）细胞的生长。适当补充添加剂后，Grace昆虫培养基目前广泛用于草地贪夜蛾细胞Sf9和Sf21的生长。Sf9和Sf21细胞通常用于借助杆状病毒表达载体系统（BEVS）来表达重组蛋白。Grace昆虫培养基含有多种细胞培养所需的氨基酸、维生素、无机盐等成分，不含蛋白、脂类或生长因子，因此本产品需要补充剂，通常需搭配10%胎牛血清（FBS）或无血清添加物使用。Grace昆虫培养基需要环境CO₂以维持生理pH值。

本产品含有：L-谷氨酰胺、碳酸氢钠；不含：酚红、乳清蛋白水解物、酵母粉、蛋氨酸。

使用方法

（一）培养条件

完全培养基：Grace为基础培养基，作为生长培养基使用时需添加10%的FBS，配制成Grace昆虫细胞完全培养基。作为转染培养基使用时不需添加FBS。

悬浮培养摇床设置：27-28℃，100%湿润空气，120-140rpm（振幅25mm）或90-110rpm（振幅50mm）。

贴壁培养培养箱设置：27-28℃，100%湿润空气。

（二）细胞复苏

1. 在37℃水浴中，迅速（<2分钟）解冻一管冻存细胞。当最后一丝冰融化时，迅速从水浴中移出细胞冻存管。

2. 轻轻混匀并吸出管中细胞悬液。悬浮培养：转移细胞悬液至含有20-30ml的Grace昆虫细胞完全培养基的125ml摇瓶中，使细胞接种密度为 $3-5 \times 10^5$ 个/ml；贴壁培养：转移细胞悬液至含有5ml的Grace昆虫细胞完全培养基的T25培养瓶中，使细胞接种密度为 $2-5 \times 10^4$ 个/cm²。

3. 悬浮培养：将摇瓶放到摇床中进行细胞培养；贴壁培养：将培养瓶放到培养箱中进行细胞培养。

4. 细胞复苏3-5天后，挑选对数生长期的细胞进行传代。建议细胞传代至少3次，待其完全复苏，倍增时间稳定后，再进行细胞应用。

【注】由于复苏的昆虫细胞非常脆弱，一般无需离心去除DMSO。

（三）悬浮细胞传代

【注】昆虫细胞对机械剪切力非常敏感，请注意操作轻柔，避免过多的机械损伤。

1. 从摇床中取出含细胞悬液的摇瓶，无菌取样并计数，当细胞满足以下条件时进行传代：①对数生长期；②细胞存活率>90%；③活细胞密度>2×10⁶个/ml。

【注】如果观察到细胞碎片，请将细胞悬液在100×g下离心5-10分钟，然后将细胞沉淀重悬在新鲜的Grace昆虫细胞完全培养基中，以减少细胞碎片和代谢废物副产物的积累。建议每1-2周使用离心的方式彻底更换一次培养基；如果距复苏或者上次传代已满5天，活细胞密度仍然不达要求，请离心彻底更换培养基或者复苏新的冻存细胞。

2. 按接种密度为0.5-1.0×10⁶个/ml和最终传代体积，计算所需细胞悬液的量。

3. 在新的无菌摇瓶中加入合适体积的预热的Grace昆虫细胞完全培养基；然后按照计算的所需量将细胞接种入此摇瓶中。

4. 将摇瓶继续放到摇床中进行细胞培养。当活细胞密度达到2×10⁶个/ml（2-4天）时，可以再次进行传代。

【注】在细胞传代30次或者持续3个月以上时，需要复苏新的冻存细胞进行传代。

（四）贴壁细胞传代

1. 当细胞融合度达到80-90%时，可以进行传代。吸出培养瓶中的旧培养基和脱落的细胞，然后用4ml（T25瓶用量）预热的Grace昆虫细胞完全培养基重悬细胞。反复轻轻敲打单层贴壁细胞进行重悬。

【注】观察细胞脱落情况，如果需要，可轻轻敲打瓶壁，帮助细胞解离。

2. 将细胞悬液转移至无菌的15ml离心管中，细胞将会在1-2分钟快速沉降至管底。轻轻吹打分散细胞。

3. 进行细胞计数，确定细胞存活率，计算活细胞密度。

4. 在含有预热完全培养基的培养瓶（5ml/T25瓶）中加入2-5×10⁴个/cm²的活细胞，轻轻混匀。

5. 将培养瓶继续放到培养箱中进行细胞培养。当细胞融合度达到80-90%（3-5天）时，可以再次进行传代。

（五）Bacmid转染（仅供参考，具体步骤请按照转染试剂要求进行）

1. 以六孔板为例：细胞按照8×10⁴个/孔，用Grace昆虫细胞完全培养基重悬并接种到六孔板内，每孔2ml，使细胞密度能达到约70-90%。放置于培养箱中培养。

【注】具体的接种细胞数量请根据细胞类型、大小和细胞生长速度等而定。

2. 至少1小时后，将完全培养基更换为不含血清的Grace培养基，每孔2ml。



3. 按照转染试剂要求，用不含血清的Grace培养基制备转染试剂-bacmid混合物，并均匀滴加到六孔板的细胞中，随后轻轻混匀。

4. 放置于培养箱中培养，3-5小时后将培养基更换为完全培养基。

5. 继续在培养箱培养约96小时后，收集每孔的培养液，500×g离心5分钟，获得的上清即为P1代杆状病毒。P1代病毒应2-8℃避光保存，如果包装病毒时的完全培养基为其他无血清培养基，则宜添加FBS至终浓度为2%以保护病毒不被蛋白酶降解。

【注】P1代病毒近期不使用的情况，可以适当分装后-80℃长期保存。尽量避免反复冻融病毒，反复冻融可能导致病毒滴度下降10-100倍。

6. 为获得更高滴度的杆状病毒，可以使用P1代病毒感染昆虫细胞等来获得P2代杆状病毒。具体操作请参照Bac-to-Bac Baculovirus expression system的相关操作规程。

【注】由于杆状病毒在每一代的扩增过程中均易出现缺少突变，因此推荐最多扩增至P3代病毒。

（六）细胞冻存

1. 选取培养至对数生长期、细胞存活率>90%、状态良好的细胞进行冻存。

2. 细胞计数并按照冻存密度为 $1-3 \times 10^7$ 个/ml/支计算所需细胞量。准备程序性冻存液：45%新鲜完全培养基+45%培养上清液+10%DMSO；或者直接使用无蛋白非程序性冻存液（美仑货号：PWL099）。

3. 将细胞以100×g离心5-10分钟，弃去上清，使用混匀的冻存液重悬，1ml/管分装至冻存管。

4. 如使用程序性冻存液则需要程序性降温至-80℃过夜，如使用无蛋白非程序性冻存液则可直接放入-80℃过夜，次日转移至液氮保存。

储存与运输

储存条件：2-8℃，避光。

运输条件：常温或湿冰运输（按季节）。

有效期：自生产之日起12个月。

注意事项

1. 为保持本产品的最佳使用效果，请勿进行冻融处理。

2. 本产品为无菌包装，请注意无菌取用。

3. 本培养基中碳酸氢钠含量为350mg/L，为了能与空气中的二氧化碳达到平衡从而起到缓冲作用，可以直接于无二氧化碳培养箱中培养昆虫细胞，而不能放于5%二氧化碳环境中。

4. 为了您的安全和健康，操作时请穿着实验服并佩戴一次性手套。



Components	Molecular Weight	Concentration (mg/L)	mM
Amino Acids			
Glycine	75.0	650.0	8.666667
L-Alanine	89.0	225.0	2.52809
L-Arginine hydrochloride	211.0	700.0	3.3175356
L-Asparagine	132.0	350.0	2.6515152
L-Aspartic acid	133.0	350.0	2.631579
L-Cystine	240.0	22.0	0.09166667
L-Glutamic Acid	147.0	600.0	4.0816326
L-Glutamine	146.0	600.0	4.109589
L-Histidine	155.0	2500.0	16.129032
L-Isoleucine	131.0	50.0	0.3816794
L-Leucine	131.0	75.0	0.57251906
L-Lysine hydrochloride	183.0	625.0	3.4153006
L-Phenylalanine	165.0	150.0	0.90909094
L-Proline	115.0	350.0	3.0434783
L-Serine	105.0	550.0	5.2380953
L-Threonine	119.0	175.0	1.4705882
L-Tryptophan	204.0	100.0	0.49019608
L-Tyrosine	181.0	50.0	0.2762431
L-Valine	117.0	100.0	0.85470086
beta-Alanine	89.0	200.0	2.247191
Vitamins			
Biotin	244.0	0.01	4.0983607E-5
Choline chloride	140.0	0.2	0.0014285714
D-Calcium pantothenate	477.0	0.02	4.192872E-5
Folic Acid	441.0	0.02	4.5351473E-5
Nicotinic acid (Niacin)	123.0	0.02	1.6260162E-4
Para-Aminobenzoic Acid	137.0	0.02	1.459854E-4
Pyridoxine hydrochloride	206.0	0.02	9.708737E-5
Riboflavin	376.0	0.02	5.319149E-5
Thiamine hydrochloride	337.0	0.02	5.934718E-5
i-Inositol	180.0	0.02	1.11111105E-4
Inorganic Salts			
Calcium Chloride (CaCl ₂) (anhyd.)	111.0	750.0	6.756757
Magnesium Chloride (MgCl ₂ ·6H ₂ O)	203.0	2280.0	11.231527
Magnesium Sulfate (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	246.0	2780.0	11.300813
Potassium Chloride (KCl)	75.0	4100.0	54.666668
Sodium Bicarbonate (NaHCO ₃)	84.0	350.0	4.1666665
Sodium Phosphate monobasic (NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O)	138.0	1013.0	7.3405795
Other Components			
Alpha-Ketoglutaric acid	146.0	370.0	2.5342467
D-Fructose	180.0	400.0	2.2222223
D-Glucose (Dextrose)	180.0	700.0	3.8888888
Fumaric acid	116.0	55.0	0.47413793
Malic acid	134.0	670.0	5.0
Succinic acid	118.0	60.0	0.5084746
Sucrose	342.0	26680.0	78.011696

Y240401