

IPL-41 昆虫培养基 (1X)

产品编号: PWL204

规格: 100ml / 500ml / 1000ml

产品内容

产品组成	PWL204-1	PWL204-2	PWL204-3
IPL-41 昆虫培养基 (1X)	100ml	500ml	1000ml
说明书	1 份	1 份	1 份

产品简介

IPL-41昆虫培养基最初设计用于支持草地贪夜蛾 (Sf9) 细胞的生长, 以及使用杆状病毒表达载体系统 (BEVS) 表达重组苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒 (rAcNPV)。IPL-41昆虫培养基含有昆虫细胞培养所必需的独特组分, 包括苹果酸、富马酸和 α -酮戊二酸。IPL-41昆虫培养基需要环境CO₂以维持生理pH值。IPL-41昆虫培养基在使用前通常补充10%胎牛血清 (FBS)。

本产品含有: L-谷氨酰胺、碳酸氢钠; 不含: 酚红、胰蛋白示磷酸盐肉汤、酵母提取物。

使用方法

(一) 培养条件

完全培养基: IPL-41为基础培养基, 作为生长培养基使用时需添加10%的FBS, 配制成为IPL-41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°C, 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°C, 100%湿润空气。

(二) 细胞复苏

1. 在37°C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IPL-41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IPL-41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IPL-41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IPL-41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IPL-41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IPL-41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IPL-41培养基，每孔2ml。



3. 按照转染试剂要求，用不含血清的IPL-41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	200.0	2.666667
Hydroxy L-proline	131.0	800.0	6.10687
L-Arginine hydrochloride	211.0	800.0	3.791469
L-Asparagine	132.0	1300.0	9.848485



L-Aspartic acid	133.0	1300.0	9.774436
L-Cystine-2Na	286.0	119.14	0.41657344
L-Glutamic Acid	147.0	1500.0	10.204082
L-Glutamine	146.0	1000.0	6.849315
L-Histidine	155.0	200.0	1.2903225
L-Isoleucine	131.0	750.0	5.7251906
L-Leucine	131.0	250.0	1.908397
L-Lysine hydrochloride	183.0	700.0	3.8251367
L-Methionine	149.0	1000.0	6.7114096
L-Phenylalanine	165.0	1000.0	6.060606
L-Proline	115.0	500.0	4.347826
L-Serine	105.0	200.0	1.9047619
L-Threonine	119.0	200.0	1.6806723
L-Tryptophan	204.0	100.0	0.49019608
L-Tyrosine disodium salt dihydrate	261.0	360.4	1.3808429
L-Valine	117.0	500.0	4.2735043
beta-Alanine	89.0	300.0	3.3707864
Vitamins			
Biotin	244.0	0.16	6.557377E-4
Choline chloride	140.0	20.0	0.14285715
D-Calcium pantothenate	477.0	0.008	1.677149E-5
Folic Acid	441.0	0.08	1.8140589E-4
Nicotinic acid (Niacin)	123.0	0.16	0.0013008129
Para-Aminobenzoic Acid	137.0	0.32	0.0023357663
Pyridoxine hydrochloride	206.0	0.4	0.0019417476
Riboflavin	376.0	0.08	2.1276595E-4
Succinic acid	118.0	4.8	0.04067797
Thiamine hydrochloride	337.0	0.08	2.3738873E-4
Vitamin B12	1355.0	0.24	1.7712176E-4
i-Inositol	180.0	0.4	0.0022222223
Inorganic Salts			
Ammonium Molybdate ((NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O)	1236.0	0.04	3.236246E-5
Calcium Chloride (CaCl ₂) (anhyd.)	111.0	500.0	4.5045047
Cobalt Chloride (CoCl ₂ ·6H ₂ O)	238.0	0.05	2.1008404E-4
Cupric chloride (CuCl ₂ ·2H ₂ O)	170.0	0.2	0.0011764707
Ferric sulfate (FeSO ₄ ·7H ₂ O)	278.0	0.55	0.0019784174
Magnesium Sulfate (MgSO ₄) (anhyd.)	120.0	918.0	7.65
Manganese chloride (MnCl ₂ ·4H ₂ O)	198.0	0.02	1.010101E-4
Potassium Chloride (KCl)	75.0	1200.0	16.0
Sodium Bicarbonate (NaHCO ₃)	84.0	350.0	4.1666665
Sodium Chloride (NaCl)	58.0	2850.0	49.13793
Sodium Phosphate monobasic (NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O)	138.0	1160.0	8.405797
Zinc chloride (ZnCl ₂)	136.0	0.04	2.9411764E-4
Other Components			
Alpha-Ketoglutaric acid	146.0	29.6	0.20273973
D-Glucose (Dextrose)	180.0	2500.0	13.888889
Fumaric acid	116.0	4.4	0.037931036
Malic acid	134.0	53.6	0.39999998
Maltose	342.0	1000.0	2.9239767
Sucrose	342.0	1650.0	4.8245616

Y240401