昆虫细胞无血清培养基（Sf-900）

产品编号：PWL206　　规格：100ml / 500ml / 1000ml

产品内容

产品组成	PWL206-1	PWL206-2	PWL206-3
昆虫细胞无血清培养基（Sf-900）	100ml	500ml	1000ml
说明书	1 份	1 份	1 份

产品简介

昆虫细胞-杆状病毒表达系统（baculovirus expression vector system, BEVS）是基于昆虫杆状病毒及其宿主细胞建立的表达体系，与大肠杆菌、酵母和哺乳动物细胞表达系统并称基因工程的四大表达系统。昆虫细胞无血清培养基（Sf-900）是专门针对Sf9、Sf21、High Five等昆虫细胞设计开发的无血清、无蛋白培养基，适用于昆虫细胞高密度悬浮培养以及BEVS高效蛋白表达。昆虫细胞无血清培养基（Sf-900）可应用于药品研发、重组蛋白生产、人用/兽用疫苗生产和基因治疗等多个方面。昆虫细胞无血清培养基（Sf-900）需要环境CO_2以维持生理pH值。

本产品含有：L-谷氨酰胺、碳酸氢钠、D-葡萄糖；不含：酚红。

使用方法

（一）培养条件

完全培养基：昆虫细胞无血清培养基（Sf-900）为完全培养基，正常使用时无需额外加入其它成分。

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的昆虫细胞无血清培养基的125ml摇瓶中，使细胞接种密度为3-5×10^5个/ml；贴壁培养：转移细胞悬液至含有5ml的昆虫细胞无血清培养基的T25培养瓶中，使细胞接种密度为2–5×10^4个/cm^2。

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＞2×10^6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昆虫细胞无血清培养基中，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$0.5\text{-}1.0\times10^6$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昆虫细胞无血清培养基；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2×10^6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）预热的昆虫细胞无血清培养基重悬细胞。反复轻轻吹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. 在含有预热的昆虫细胞无血清培养基的培养瓶（5ml/T25瓶）中加入$2\text{-}5\times10^4$个/cm^2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）细胞驯化

细胞驯化主要包括直接驯化和连续适应驯化，一般昆虫细胞可直接接种至本产品中，不需经过连续适应驯化。对于一些直接接种状态欠佳的细胞可以采用连续适应驯化。具体操作方法如下：

1. 直接驯化：将细胞以0.5-1.0×10^6个/ml的密度直接接种至昆虫细胞无血清培养基中，每2-4天传代一次，至少传代3次。待倍增时间稳定，且存活率维持在85%以上时，即可认为细胞已适应昆虫细胞无血清培养基。

2. 连续适应驯化：建议采用昆虫细胞无血清培养基与原培养基比例分别为25%：75%、50%：50%、75%：25%、100%：0%的梯度进行连续传代适应，适应过程中接种密度控制在0.5-1.0×10^6个/ml之间。最终在100%昆虫细胞无血清培养基中传代过程中，倍增时间稳定，且存活率维持在85%以上时，即可认为驯化完成。

（六）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8×10^4个/孔，用昆虫细胞无血清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（美仑货号：PWL203）或IPL-41培养基（美仑货号：PWL204），每孔2ml。

3. 按照转染试剂要求，用不含血清的Grace培养基（美仑货号：PWL203）或IPL-41培养基（美仑货号：PWL204）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昆虫细胞无血清培养基。

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，可以选择添加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 Baculovious 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。

（七）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1-3×10^7个/ml/支计算所需细胞量。准备程序性冻存液：45%新鲜昆虫细胞无血清培养基+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。

Y250102