

货号	品名	规格	有效期	外观	储存条件	运输条件
H832KJ	InsectPro® 昆虫细胞无血清培养基, 无动物源	500mL	12个月	液体	2~8℃, 避光	蓝冰

1. 产品描述

InsectPro® 昆虫细胞无血清培养基, 可用于草地贪夜蛾 (Sf9 和 Sf21) 细胞的悬浮培养, 也可用于 High Five 细胞 (BTI-TN-5B1-4) 的高密度悬浮培养。通过培养这类细胞, 可利用杆状病毒表达系统大规模生产重组蛋白。

本产品使用注射用水 (Water-For-Injection) 配制。

本产品关注点

含有 (+)

- D-葡萄糖
- 1.5g/L L-谷氨酰胺
- 碳酸氢钠

不含 (-)

- 酚红

本产品供科学研究和生产使用, 用于组织和细胞的体外培养。

禁止临床使用。

2. 质量体系

上海源培生物科技股份有限公司的产品是在 cGMP 标准车间中生产的。

上海源培生物科技股份有限公司已取得 ISO9001:2015、ISO13485:2016 质量体系认证。

3. 产品参数

本产品为过滤除菌产品

物理外观: 淡黄色澄清液体

内毒素: ≤ 10 EU/mL

渗透压: 360 ~ 440 mOsm/kg·H₂O

pH 值: 6.0 ~ 6.4

储藏条件: 2 ~ 8℃, 避光

运输条件: 蓝冰

用途: 仅供科研和生产使用

4. 使用指南

使用时请穿戴合适的安全手套、实验服和护目镜。产品不能用于人体。

细胞直接接触的环境必须是无菌的, 用于细胞培养的试剂必须是无菌的。请在无菌环境中进行细胞实验, 任何器皿或工具, 移入无菌环境之前, 应在入口处去除外包装并使用酒精擦拭进行消毒。

5. 制备培养基

InsectPro® 昆虫细胞无血清培养基为完全培养基, 正常使用时无需额外加入其它成分。

6. 细胞培养的条件

培养基: InsectPro® 昆虫细胞无血清培养基

细胞系: Sf9、Sf21、HighFive 细胞

培养工艺: 悬浮培养

培养容器和设备: 培养瓶、摇瓶、生物反应器或恒温摇床

培养条件: 27-28℃, 湿润的普通恒温培养箱, 避光。

7. 复苏

以下实验方案, 悬浮培养采用容器均以 125mL 锥形瓶为例。

以一管冻存细胞体积 1.5mL, 活细胞密度 $0.5 \times 10^7 \sim 1 \times 10^7$ 个/mL 为例:

1. 准备无菌的培养容器 (125mL 锥形瓶), 在容器中加入 28.5mL 预热的完全培养基, 然后立刻开始冻存细胞的解冻;
2. 在 37℃ 水浴中, 迅速 (< 1 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;
3. 轻轻吸出管中内容物, 并转移到第 1 步预先准备好的锥形瓶中, 建议使用带滤膜瓶盖的锥形瓶, 确保适当的气体交换;
4. 将锥形瓶放到摇床中, 设置转速 120~140rpm, 进行细胞培养;
5. 细胞复苏 3~5 天后, 挑选对数生长期的细胞进行传代; 推荐以 3×10^5 个/mL 的活细胞密度进行传代, 传代 3 次后再进行细胞应用。

注意: 由于复苏的细胞非常脆弱, 一般无需离心去除 DMSO。

8. 悬浮细胞传代

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。在细胞传代 30 次或者持续 3 个月以上时, 复苏新的冻存细胞进行传代。

推荐当细胞满足以下条件时进行传代:

- ① 对数生长期;
- ② 细胞活率大于 90 %
- ③ 活细胞密度达到 $\sim 2 \times 10^6$ 个/mL。

传代步骤:

1. 离心收集细胞 (100×g, 5~10 分钟);
2. 使用少量预热培养基重悬细胞, 进行细胞计数, 确定细胞活率, 计算活细胞密度;
3. 在无菌的培养容器 (125mL 锥形瓶) 中加入合适体积的预热的完全培养基; 然后立即以 $3 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 个/mL 的最终活细胞密度, 把细胞接种入锥形瓶中;
4. 将锥形瓶放到摇床中, 设置转速 120~140rpm, 进行细胞培养;
5. 当活细胞密度达到 2×10^6 个/mL 时, 可以进行传代;

注意: 悬浮细胞传代过程最好使用上面推荐的步骤, 也可以不离心, 直接细胞计数后添加预热的新培养基分瓶培养, 但是为减少细胞代谢物和碎片在培养基中的积累, 进而影响细胞活性, 每 1~2 周应该通过离心换液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标要求, 请彻底更换培养基, 或者复苏新的冻存细胞。

9. 贴壁细胞传代

以下实验方案, 贴壁细胞培养容器均以 T25 培养瓶为例。

1. 当细胞发生 80~90 % 融合时, 可以进行传代。吸出培养瓶中旧培养基和脱落的细胞, 然后用 2ml 不含 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 离子的 PBS 洗涤细胞, 去除 PBS, 加入 2ml 含 EDTA 0.25 % 的胰酶 (完全覆盖细胞表面)。然后在 37 °C 孵育 5 到 10 分钟, 去除胰酶;
2. 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;
3. 向细胞中加入 5ml 完全培养液, 移入锥形离心管, 离心 (1100 rpm) 沉淀细胞, 去除培养基, 用新的培养基重新悬浮细胞
4. 进行细胞计数, 确定细胞活率, 计算活细胞密度;
5. 在含有预热培养基的培养瓶 (5mL/25 cm²) 中加入 $2 \sim 5 \times 10^4$ 个/cm² 的活细胞;
6. 在推荐的培养条件下培养, 一般 3~5 天, 细胞发生 80~90% 的融合之后可进行传代。

10. 细胞驯化

细胞驯化指细胞从不同培养基或者不同培养方式中转换的过程。此处指从含血清培养基转到无血清培养基 (SFM) 中生长的适应过程。

推荐当细胞满足以下条件时进行驯化:

- ① 对数生长期;
- ② 细胞活率大于 90 %
- ③ 活细胞密度达到 $\sim 1 \times 10^6$ 个/mL。

驯化成功标准: 每 4~6 天, 细胞活率达 85%, 活细胞密度可达 2×10^6 个/mL, 细胞的比生长速率与驯化前一致。

下述步骤, 待替换的培养基称为 A; 目标培养基称为 B。

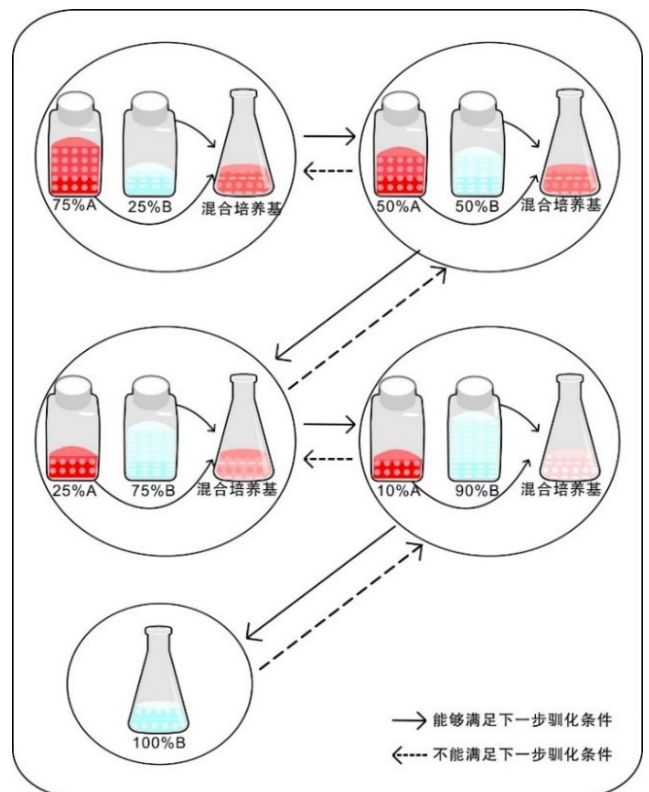
直接驯化, 即细胞直接从 A 转换到 B 中培养。

1. 离心收集细胞 (100×g, 5~10 分钟);
2. 使用少量预热的 B 重悬细胞, 进行细胞计数, 确定细胞活率, 计算活细胞密度;
3. 在无菌的培养容器 (125mL 锥形瓶) 中加入合适体积的预热的 B; 然后立即以 $3 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 个/mL 的最终活细胞密度, 把细胞接种入锥形瓶中;
4. 后续传代, 继续采用此接种密度, 直到驯化成功;

注意: 如果直接驯化 3~5 代后细胞表现不佳, 仍未达到驯化成功标准, 请采用间接驯化法。

间接驯化, 即分几步把细胞从 A 转换到 B 中培养。与直接驯化相比较, 间接驯化带来的培养条件变化更加温和。

与直接驯化传代操作步骤 1~4 相同, 过程中使用的培养基为按照下图方案配置的混合培养基, 最后一次驯化则用 100 % B (一定要确定细胞在当前浓度的混合培养基中生长情况达到前述的驯化条件, 才能进行下一步培养基的更换):



- 继续监控细胞生长 3~5 代，直到驯化成功；
- 驯化过程最后一次传代时，采用 $2 \times 10^5 \sim 3 \times 10^5$ 个/mL 的最终活细胞接种密度即可。

注意：在驯化过程中，最好不要让细胞过度生长。

推荐在驯化成功前，做好原始培养物的备份；间接驯化时，每次适应新比例的混合培养基之前，做好当前培养物的备份。

11. 细胞冻存

推荐采用对数生长期且细胞活率大于 90% 的细胞进行冻存。

推荐准备足够的细胞培养物，保存适量条件培养基。

- 准备冻存培养基（45 % 新鲜的完全培养基 + 45 % 条件培养基 + 10 % DMSO），并在 $2 \sim 8^\circ\text{C}$ 避光条件下预冷（不超过 24 小时）；

推荐使用源培生物 CD-Freezer[®] 化学成分限定细胞冻存液 (S919JV)，该冻存液已含有 7.5% 的 DMSO，可做细胞冻存培养基。

- 进行细胞计数，计算细胞密度，细胞活率和活细胞密度 (ρ_1)；然后根据待保存的细胞数 (n)，计算需要离心收集的细胞培

养物的体积 (V_1)，以及所需的冻存培养基的体积 (V_2)。一般冻存时的活细胞密度 (ρ_2) 为 $0.5 \times 10^7 \sim 1 \times 10^7$ 个/mL。 $V_1 = n/\rho_1, V_2 = n/\rho_2$ 。

- 离心 ($100 \times g$, 5~10 分钟) V_1 体积的培养物收集细胞，除去上清；使用 V_2 体积预冷的细胞冻存液将细胞重悬；

4. 根据后续使用需求，将上述细胞重悬液分装到细胞冻存管中（一般 1.5mL 每管）；

- 在冻存管上做适当标识(例如细胞名称、冻存时间及操作者)；

6. 可使用程序化降温仪或者人工控制细胞的温度下降（标准的冻存降温速率为 $-1 \sim -2^\circ\text{C}/\text{min}$ ）。当温度达 -25°C 以下时，温度降速可增至 $-5 \sim -10^\circ\text{C}/\text{min}$ ；到 -100°C 时，则可迅速浸入液氮中；

7. 人工降温的操作方法可以是：将细胞冻存管放入含有异丙醇的冻存盒中，置于 -20°C 冰箱 2 小时，然后置于 -80°C 冰箱中过夜，最后单独取出冻存管移入液氮容器内。

注意：细胞冻存 24 小时之后，或者长期冻存（比如半年后），应进行细胞复苏能力检测。

12. 相关产品

货号	品名	规格	存储条件	运输条件
H836LJ	InsectPro [®] 昆虫细胞无血清培养基, 无动物源, 干粉	50 L	$2 \sim 8^\circ\text{C}$	蓝冰
H861KJ	InsectPro [®] 昆虫细胞无血清培养基补料, 无动物源	500mL	$2 \sim 8^\circ\text{C}$	蓝冰
H840KJ	TC-100 昆虫细胞培养基	500mL	$2 \sim 8^\circ\text{C}$	蓝冰
B210KJ	Dulbecco's 磷酸盐缓冲液 (DPBS), 不含钙、镁离子和酚红	500mL	$2 \sim 30^\circ\text{C}$	常温
S120JV	抗生素-抗真菌素 (三抗), 100X	100mL	$-30 \sim -5^\circ\text{C}$	干冰
S210JV	L-谷氨酰胺溶液, 200mM	100mL	$-30 \sim -5^\circ\text{C}$	干冰
S240JV	L-丙胺酰-谷氨酰胺溶液, 200mM	100mL	$2 \sim 8^\circ\text{C}$	蓝冰