

M5 Super Lipoinsect Transfection Reagent

昆虫细胞专用转染试剂

使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 Super Lipoinsect Transfection Reagent	0.25ml	MF1113-01
M5 Super Lipoinsect Transfection Reagent	0.50ml	MF1113-02

【储存条件】 2-8℃储存，保质期 1 年。

【产品简介】

昆虫细胞表达是一种用于产生具有简单翻译后修饰的蛋白质的平台。瞬时转染和重组杆状病毒的产生是昆虫细胞表达的常用方法。M5 Super Lipoinsect Transfection Reagent 是一种新型高效的阳离子聚合物。它可以与核酸（包括质粒、siRNA、寡聚核苷酸）相互作用形成一种复合物将核酸转运到真核细胞内，特别适用于昆虫细胞（包括 Sf9、High Five™ 和 S2）表达体系中转染杆状病毒质粒（bacmid）的转染。相比传统的磷酸钙、DEAE 右旋糖苷和其它的一些试剂具有更佳的转染效率。尤其对于杆状病毒表达系统（BEVS）具有特殊的高效转染性能。

【产品特性】

- 1) 细胞毒性低，转染后可不换液，24h 后加入新鲜培养基即可。
- 2) 用量少，通过悬浮培养转染 10×10^6 个细胞（获得约 10 mL P1 病毒悬液）只需 15 μ L；
- 3) 转染过程简单，极大降低了污染的风险。

【注意事项】

- 1) 细胞状态非常重要，请使用正常分裂的细胞（倍增时间大约 20-22h）。
- 2) 昆虫细胞本身可以通过贴壁和悬浮培养两种方式进行转染。
- 3) 对于后续进行大规模悬浮培养表达蛋白的实验推荐使用悬浮培养方式进行转染。

【使用方法】（以悬浮培养为例）**一、昆虫细胞转染（制备 P1 病毒）**

- 1、转染前一天，给细胞换液稀释使细胞密度达到 1×10^6 个细胞/mL；转染当天，细胞密度应达到约 2×10^6 个细胞/mL，
- 2、取 10×10^6 个细胞（约 5 mL）于无菌 50 mL 离心管中，500 g 转速离心 3-5 min，使细胞沉淀于离心管底部，小心吸去培养基上清。
- 3、取 1 mL Grace's 昆虫细胞培养基（不需添加任何血清或其他添加剂）加入到无菌 1.5 mL EP 管中，加入 15 μ L M5 Super Lipoinsect Transfection Reagent 和 5 μ g bacmid DNA，轻弹 EP 管混匀，室温孵育 10-15 min。
- 4、取 1 ml 培养基和转染试剂与质粒混合物加入第 2 步制备的细胞中，轻弹 50ml 离心管，混匀。
- 5、将 50 mL 离心管盖拧松，用锡箔纸包裹，于 27°C，130-140 rpm 摇床培养
注意：离心管尽量大倾角倾斜且培养物不会流出管口。
- 6、24 h 后加入 5 ml sf-900 培养基继续培养，48 h 后再次加入 5 ml sf-900 培养基，并转移到 100 ml 玻璃三角瓶中继续培养，
- 7、48 h 后镜检细胞是否变大。如细胞明显变大，且细胞密度约为 $2-3 \times 10^6$ 个细胞/mL，可将细胞于 3000 rpm 离心 5 min，上清加入 2-4% 血清后用 0.22 μ m 滤膜过滤分装后，4°C 避光保存。
注意：长期保存应采用液氮速冻，保存于 -80°C。

二、扩增 P2 病毒：

在不测定 P1 病毒滴度的情况下，可以通过以下方法确定 P1 病毒的稀释比例：

- 1、稀释细胞到 $1.2-1.5 \times 10^6$ 个细胞/mL，在 1：500-1:10000 稀释范围内取不同的稀释比例进行 P2 扩增。
- 2、72 h 后细胞均明显变大，且细胞密度约为 3×10^6 个细胞/mL 的稀释比例为最佳。
- 3、离心后细胞培养液上清为 P2，该 P2 可以用于目标蛋白的高效表达（表达时 P2 与细胞的体积比约为 1:50）。

【附录】

如果用贴壁的方式制备病毒，参考如下流程：

一、 昆虫细胞转染：

- 1、 Sf9 细胞计数，取 6 孔板中的两孔，每孔加入 9×10^5 个细胞(其中一孔设为正常对照)，并以全培养至少 1 小时，使细胞贴壁。
- 2、 准备重组质粒和细胞转染试剂的混合物：
 - A、 溶解 $1 \mu\text{g}$ 纯化重组杆状病毒重组质粒于 $100 \mu\text{l}$ 无添加成分的 Grace' s Medium。
 - B、 转染试剂充分摇匀后取 $6 \mu\text{l}$ 加入 $100 \mu\text{l}$ 无添加成分的 Grace' s Medium，混匀。
 - C、 将上述稀释好的质粒及稀释好的转染剂混匀，室温孵育 20min。
- 3、 重组质粒与转染剂混合液孵育的同时，以 2ml 无添加成分的 Grace' s Medium 洗涤待转染的一孔细胞并弃去洗液。
- 4、 取 0.8ml 无添加成分的 Grace' s Medium 加入质粒与转染剂的混合液中，轻轻混匀后，总体积约为 1ml。加入上步洗涤后的细胞孔中， 27°C 继续培养 5h。
- 5、 移除质粒、转染剂混合物，加入 2ml 全培。 27°C 湿盒孵育，直到病变现象产生。

二、 病毒贮液的制备：

- 1、 病毒感染晚期（正常 24-72h）可见细胞停止生长、黏附，呈颗粒状外观。即收集含病毒的培养上清，500g 离心 5min，去除细胞和碎片。
- 2、 上清即为 P1 病毒贮液，移入新的离心管中 4°C 避光保存。长期保存分装冻存于 -80°C 。
- 3、 病毒贮液的扩增，按以下公式进行所需病毒 P1 贮液的量：

$$\text{感染所需病毒贮液量(ml)} = [\text{MOI}(\text{pfu/cell}) \times \text{细胞数} \div \text{病毒贮液效价}(\text{pfu/ml})]$$

注：若不进行病毒空斑测定，P1 贮液效价按照 1×10^6 到 1×10^7 计。

- 4、 扩增 P1 液制备 P2 病毒贮液方法如下：
 - A、 转染当天，取 2×10^6 个细胞/孔加入六孔板中，贴壁生长至少 1h。
 - B、 每孔加入适量的 P1 贮液， 27°C 湿盒孵育 48h。
 - C、 根均细胞病变情况（约 48h 后）收集各孔中的病毒上清液，500g 离心 5min 取上清，即为 P2 病毒贮液。 4°C 避光保存。长期保存分装冻存于 -80°C 。
 - D、 P3 扩大：每个 15cm 细胞盘加入 1.5×10^7 细胞（如细胞浓度 2×10^6 ，则加入 7-8ml），加入培养基至 30ml，前后、左右十字晃动混匀，静置 5min，加入 1ml P2 病毒液， 28°C 培养 4 天。

【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。