

LipoInsect™转染试剂

产品编号	产品名称	包装
C0551-0.5ml	LipoInsect™转染试剂	0.5ml
C0551-1.5ml	LipoInsect™转染试剂	1.5ml
C0551-7.5ml	LipoInsect™转染试剂	5×1.5ml

产品简介:

- LipoInsect™转染试剂(LipoInsect™ Transfection Reagent)是一种基于阳离子脂质体等最新转染技术的非常高效的新型昆虫细胞转染试剂。本产品转染效率高、操作简单、细胞毒性低、重复性好,达到了国际最主流昆虫细胞转染试剂的转染效果。
- 本产品适用于将pFastBac1等杆状病毒表达载体质粒DNA转染到Sf9、Sf12和High Five™等昆虫细胞以用于Bac-to-Bac®、BaculoDirect™和InsectSelect™表达系统的蛋白表达。
- LipoInsect™转染试剂专门针对昆虫细胞进行了多方面的优化,转染效率非常高,对昆虫细胞Sf9的实测阳性率可达98%以上(参考图1)。常规的脂质体细胞转染试剂如Lipo6000™转染试剂、Lipofectamine 2000 Reagent等都是无法顺利转染昆虫细胞的,必须使用昆虫细胞专用的转染试剂。

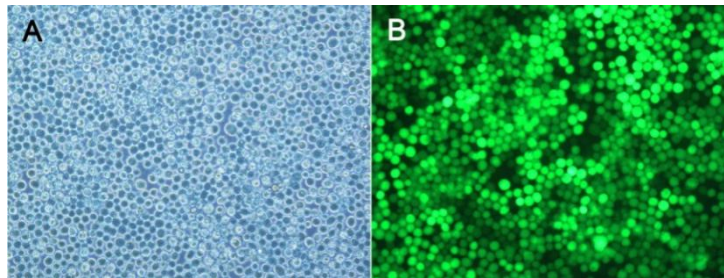


图1. LipoInsect™转染试剂用pFastBac1-EGFP质粒转化DH10Bac菌株后抽提获得的bacmid转染Sf9细胞96小时后的实拍效果图。A. 明场照片; B. 荧光照片。

- LipoInsect™转染试剂操作简单,使用方法和常用的Cellfectin® II Reagent完全一致。
- LipoInsect™转染试剂转染过表达质粒后,通常96小时后达到较高的蛋白表达水平。
- LipoInsect™转染试剂的转染效果可以通过转染表达EGFP等荧光蛋白的bacmid进行快速鉴定。
- 如果用于六孔板的细胞转染,一个包装的C0551-0.5ml转染试剂大约可以转染60个孔,一个包装的C0551-1.5ml转染试剂大约可以转染180个孔,一个包装的C0551-7.5ml转染试剂大约可以转染900个孔。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
C0551-0.5ml	LipoInsect™转染试剂	0.5ml
C0551-1.5ml	LipoInsect™转染试剂	1.5ml
C0551-7.5ml	LipoInsect™转染试剂	5×1.5ml
—	说明书	1份

保存条件:

4°C保存。长期不使用可以-20°C保存。

注意事项:

- 使用高纯度的DNA有助于获得较高的转染效率。
- 转染前昆虫细胞必须处于良好的生长状态。
- 需自备不含抗生素的无血清昆虫培养液,例如SFX-INSECT (SH30278, Hyclone)、Grace's Insect Medium, Unsupplemented (11595030, Gibco)、Grace's Insect Medium, Supplemented (11605094, Gibco)等。
- LipoInsect™转染试剂不能vortex或离心,宜缓慢晃动混匀。
- LipoInsect™转染试剂使用后请立即盖好盖子,避免长时间暴露在空气中,影响转染效率。
- 本产品对人体有害,操作时请小心,并注意有效防护以避免直接接触人体或吸入体内。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用,不得用于临床诊断或治疗,不得用于食品或药品,不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康,请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明:

1. Bacmid转染:

- 昆虫细胞培养(以六孔板为例,其它培养板或培养皿可参考六孔板):按照每孔约80万Sf9或Sf21细胞(具体的细胞数量据细胞类型、大小和细胞生长速度等而定)用正常的细胞培养液接种到六孔板内,使细胞密度能达到约70-90%。在27-28°C培养,后续转染和培养也在该温度下进行。
- 15分钟后,将正常的细胞培养液更换为平板培养液(含1.5%胎牛血清不含抗生素的SFX-INSECT培养液)每孔0.8ml。
- 参考下表,对于待转染的六孔板中每一个孔的细胞,取两个洁净无菌离心管,分别加入100 μ l不含血清和抗生素的SFX-INSECT昆虫细胞培养液用于稀释bacmid和转染试剂。其中一管加入16 μ g bacmid,并用枪轻轻吹打混匀;另一管加入8 μ l LipoInsect™转染试剂,用枪轻轻吹打混匀,或者轻微Vortex混匀,但不可离心。稀释的bacmid和转染试剂室温静置约2-5min(最多不得超过30分钟)。随即把稀释的bacmid用移液器轻轻加入到稀释的LipoInsect™转染试剂中,轻轻颠倒离心管或者用枪轻轻吹打混匀,室温静置15-30分钟。

	96-well	48-well	24-well	12-well	6-well	6cm dish	10cm dish
LipoInsect™转染试剂	0.32 μ l	0.8 μ l	1.6 μ l	3.2 μ l	8μl	16 μ l	48 μ l
无血清无抗生素昆虫培养液	4 μ l	10 μ l	20 μ l	40 μ l	100μl	200 μ l	600 μ l
Bacmid	640ng	1.6 μ g	3.2 μ g	6.4 μ g	16μg	32 μ g	96 μ g
无血清无抗生素昆虫培养液	4 μ l	10 μ l	20 μ l	40 μ l	100μl	200 μ l	600 μ l
稀释好的bacmid滴加到稀释好的LipoInsect™转染试剂中,混匀后再室温静止放置15-30分钟							
每孔加入的混合物的量	8 μ l	20 μ l	40 μ l	80 μ l	200μl	400 μ l	1200 μ l
按照上述用量每孔均匀滴加LipoInsect™转染试剂和bacmid混合物,3-5小时后更换培养液							

注1:对于六孔板中一个孔的细胞,Bacmid用量建议在8-24 μ g范围内进行适当调节。最佳的转染条件,不同的细胞类型和培养条件有所不同,可以在上述推荐范围内自行优化转染条件。

注2:Bacmid的浓度在稀释前宜控制在0.5-5 μ g/ μ l范围内。

注3:对于多个孔转染相同数量相同bacmid的情况可以把这些孔所需的DNA混合物和LipoInsect™转染试剂分别合并在一起稀释,然后把稀释好的bacmid滴加到稀释好的LipoInsect™转染试剂中,混匀并室温放置30分钟后,可以按照推荐用量滴加到细胞培养器皿内。

注4:对于其它培养板或培养器皿,各种试剂的用量可以按照细胞培养器皿的培养面积(参考附录2)按比例进行换算。

- 按照六孔板每孔200 μ l LipoInsect™转染试剂-bacmid混合物的用量,均匀滴加到整个孔内,随后轻轻混匀。
- 为达到最高的转染效率,细胞在转染后培养3-5小时后宜更换为新鲜的完全培养液(对于Sf9细胞,推荐在转染4小时后更换培养液)。
- 继续在27-28°C培养约96小时后,收集每孔的培养液,500g离心5分钟,获得的上清即为P1代杆状病毒(病毒滴度通常为 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ pfu/ml)。P1代病毒4°C避光保存,如果包装病毒时的细胞培养液为无血清培养液宜添加胎牛血清至终浓度为2%以保护病毒被蛋白酶降解。P1代病毒近期不使用的情况,可以适当分装后-80°C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。
- 为获得更高滴度的杆状病毒,可以使用P1代病毒感染Sf9或Sf21细胞等来获得P2代杆状病毒(病毒滴度通常为 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$ pfu/ml)。具体操作请参照昆虫细胞Bac-to-Bac Baculovirus expression system的相关操作规程。大致的步骤为使用P1代病毒感染 2×10^6 个贴壁约1小时的Sf9或Sf21细胞,推荐的病毒的MOI为0.05-0.1,过高的MOI会导致获得的病毒质量下降。27-28°C培养48小时后,同步收集每孔的培养液,随后500g离心5分钟,获得的上清即为P2代杆状病毒。P2代病毒的保存条件同P1代。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。

常见问题:

1. 转染效率低:

- 优化bacmid与LipoInsect™转染试剂比例,对于难转染的细胞,可适当加大质粒用量。
- 使用高纯度、无菌、无污染物的bacmid进行转染,DNA纯度方面A₂₆₀/A₂₈₀比值要接近1.8,通常宜控制在1.8-1.9范围内,偏低则有可能有蛋白污染,偏高则有可能有RNA污染。可以使用碧云天生产的质粒抽提试剂盒中的溶液I、II、III,参考附录1进行抽提,以保证可以获得较高的转染效率。
- 昆虫细胞转染时状态良好,细胞密度达70-90%时才可进行转染,过稀或过密都可能影响转染效率,不同细胞的最佳转染密度需要自行摸索。悬浮细胞宜在对数生长期进行转染。
- 需使用无抗生素和无血清培养液配制LipoInsect™转染试剂和bacmid的混合物。
- 转染后培养时间不足,而被误以为转染效率偏低。不同细胞转染后至显著表达所需要培养的时间通常为72-96小时。
- 检查细胞是否有支原体感染,支原体感染会影响细胞增殖,并很可能影响转染效率。
- 如果没有检测到目的蛋白表达,应该仔细核对转染质粒的测序结果,确保测序结果和读码框完全正确。

2. 细胞毒性较大:

- 缩短转染时间,在转染后较短时间内更换新鲜的细胞培养液。
- 减少 bacmid 用量,按照比例减少 LipoInsect™转染试剂。
- 检查是否转染时细胞密度太低。

附录:

1. 常用多孔板和培养皿的尺寸、培养面积、细胞培养量和推荐的培养体积等相关数据表:

Multiple Well Plates or Dishes	Single Well Only for Plates					
	Diameter (Bottom, mm)*	Growth Area (cm ²)*	Average Cell Yield	Total Well Volume (ml)	Working Volume (ml)	Recommended Volume (ml)
6 well	34.8	9.5	9.5×10^5	16.8	1.9-2.9	2
12 well	22.1	3.8	3.8×10^5	6.9	0.76-1.14	1
24 well	15.6	1.9	1.9×10^5	3.4	0.38-0.57	0.5
48 well	11.0	0.95	9.5×10^4	1.6	0.19-0.285	0.25
96 well	6.4	0.32	3.2×10^4	0.36	0.10-0.20	0.1
384 well	2.7	0.056	5.6×10^3	0.112	0.025-0.050	0.030
1536 well	$1.63 \times 1.63^{**}$	0.025	2.5×10^3	0.0125	0.005-0.010	0.010
3.5 cm dish	34	9	9.0×10^5	NA	1.8-2.7	2
6 cm dish	52	21	2.1×10^6	NA	4.2-6.3	5
10 cm dish	8.4	55	5.5×10^6	NA	11-16.5	12
15cm dish	14	152	1.5×10^7	NA	30.4-45.6	35
24.5cm dish	$22.4 \times 22.4^{**}$	500	5.0×10^7	NA	100-150	120

*Diameter and growth area may vary depending on the manufacturer, and the listed sizes are from Corning.

**These wells or dishes are square.

相关产品:

产品编号	产品名称	包装
C0551-0.5ml	LipoInsect™转染试剂	0.5ml
C0551-1.5ml	LipoInsect™转染试剂	1.5ml
C0551-7.5ml	LipoInsect™转染试剂	5×1.5ml
C0526	Lipo6000™转染试剂	0.5ml
C0528	Lipo6000™转染试剂	1.5ml
C0529	Lipo6000™转染试剂	5×1.5ml

Version 2017.09.05