GeticoFect™ IC 昆虫细胞转染试剂使用说明书

一、产品概述

GeticoFect™ IC 转染试剂是一款专有的阳离子配方，专为昆虫细胞 DNA 转染设计。该试剂已通过优化，可配合杆状病毒表达系统高效转染各类昆虫细胞。

二、成分与储存

产品名称	规格	储存条件
GeticoFect™ IC 昆虫细胞转染试剂	0.75mL/1.5ml/15ml	4° C 保存，禁止冷冻

三、所需材料

（一）本产品提供

- GeticoFect™ IC 昆虫细胞转染试剂

（二）需用户自备

其他材料清单
Sf9/Sf21 等昆虫细胞
昆虫培养基
Opti-MEM I 减血清培养基
Bacmid DNA
无菌 PETG 平底三角瓶（125 mL）
24 孔深孔板
27° C 无 CO_2 培养箱（非加湿）
轨道摇床平台（悬浮转染用）
可选：Sf9/Sf21 细胞

其他材料清单
可选：Sf-900 SFM 培养基
可选：6 孔细胞培养板

四、操作指南

（一）通用注意事项

1. **DNA 制备**：建议使用专用质粒提取试剂盒纯化 Bacmid DNA，使用前通过 0.22 μm 滤膜除菌。
2. **细胞复苏**：新解冻细胞需传代 2 次以上方可使用。
3. **试剂混匀**：使用前轻柔颠倒试剂瓶 5-10 次，确保充分混匀。
4. **复合物制备**：必须在无血清培养基（如 Opti-MEM I）中进行。
5. **抗生素禁忌**：转染期间培养基中不得添加抗生素。
6. **细胞状态**：使用处于对数生长期且存活率≥90% 的健康细胞。

（二）实验步骤时间估算

步骤	耗时
细胞准备	0-60 分钟
转染试剂试剂稀释孵育	5 分钟
DNA - 转染试剂复合物形成	5 分钟
转染后培养	72-96 小时

五、转染方案

（一）悬浮细胞转染方案（125 mL 摇瓶）

1. 细胞准备

- **检查细胞状态**：在显微镜下观察细胞的形态和密度，确保细胞处于对数生长期且存活率≥90%，并将细胞稀释到 2.5×10^6 cells/mL，总体积为 25ml，可使用 125ml 的培养瓶。可以通过台盼蓝染色法来准确测定细胞存活率。取适量细胞悬液与等体积的 0.4% 台盼蓝溶液混合，在显微镜下计数，活细胞不着色，死细胞被染成蓝色。

- **收集细胞**：将培养瓶中的细胞（细胞总数为 62.5×10^6）转移至 50 mL 离心管中，使用低速离心机，设置转速为 300×g，离心 5 分钟。在离心过程中，要确保离心管对称放置，以保证离心机的平衡，避免因不平衡导致离心机损坏或影响离心效果。
- **弃上清**：离心结束后，小心地将上清液倒掉。为了避免细胞丢失，可以将离心管倾斜，用移液器缓慢吸去上清，最后保留少量上清，约 0.5-1mL，以防止吸走细胞沉淀。
- **重悬细胞**：向含有细胞沉淀的离心管中加入 25 mL 新鲜的培养基。使用移液器轻轻吹打细胞沉淀，使细胞充分分散，形成均匀的细胞悬液。吹打时要注意力度适中，避免产生过多气泡，以免损伤细胞。
- **转移细胞**：将重悬好的细胞悬液转移至 125 mL 透气摇瓶中。在转移过程中，要注意避免细胞悬液洒出。转移完成后，将摇瓶放入 27° C 的轨道摇床平台上预培养 10-30 分钟。摇床的转速设置为 125±5 rpm，振幅为 19-25 mm；或者转速设置为 95±5 rpm，振幅为 50 mm。在预培养过程中，要确保摇床的运行稳定，以保证细胞在均匀的环境中生长。

2. 试剂准备

- **准备无菌离心管**：从无菌包装中取出一个 1.5 mL 的离心管，做好标记，注明 “GeticoFect™ IC 试剂稀释”。
- **吸取试剂**：使用移液器准确吸取 30 μL 的 GeticoFect™ IC 转染试剂。在吸取试剂前，要确保移液器的量程设置正确，并且移液器的吸头是无菌的。吸取试剂时，要缓慢操作，避免产生气泡。
- **加入培养基**：将吸取的 30 μL GeticoFect™ IC 试剂加入到含有 1 mL Opti-MEM I 培养基的离心管中。加入后，轻轻颠倒离心管 5-10 次，使试剂与培养基充分混合。注意不要剧烈振荡，以免影响试剂的活性。
- **室温孵育**：将混合好的溶液在室温下孵育 5 分钟。在孵育过程中，要避免溶液受到震动和光照。

3. 复合物制备

- **加入杆粒 Bacmid DNA**：直接向稀释后的 GeticoFect™ IC 试剂中加入 12.5 μg 的 Bacmid DNA。如果 Bacmid DNA 的浓度已知，可以根据浓度计算所需的 DNA 体积，并使用移液器准确吸取。加入 DNA 后，再次轻轻颠倒离心管 5-10 次，使 DNA 与试剂充分混合。
- **室温孵育**：将含有 DNA 和试剂的混合溶液在室温下孵育 5 分钟，让 DNA 与转染试剂试剂充分结合形成复合物。在孵育过程中，要保持溶液的稳定，避免外界因素的干扰。

4. 转染操作

- **逐滴加入复合物**：将孵育好的 Bacmid DNA -转染试剂复合物缓慢加入到含有细胞悬液的 125 mL 摇瓶中。在加入过程中，要缓慢操作，使复合物均匀地分散在细胞悬液中。可以一边加入复合物，一边轻轻转动摇瓶，以促进混合。
- **混匀细胞与复合物**：加入复合物后，将摇瓶轻轻摇晃，使细胞与复合物充分混合。注意不要剧烈振荡，以免损伤细胞。
- **培养细胞**：将摇瓶放回 27° C 的轨道摇床平台上，继续培养 72-96 小时。在培养过程中，要定期观察细胞的状态，如细胞的形态、密度和颜色等，以判断转染是否成功。一般来说，转染成功后，细胞会出现病毒感染的迹象，如细胞肿胀、悬浮等。

（二）贴壁细胞转染方案（6 孔板）

1. 细胞准备

- **准备细胞悬液**：从培养瓶中收集适量的细胞，使用细胞计数板或自动细胞计数器准确计数细胞数量。确保细胞处于对数生长期且存活率≥90%。
- **接种细胞**：根据细胞计数结果，用移液器将适量的细胞悬液接种到 6 孔板的每个孔中，使每孔的细胞数量为 1×10^6个。每孔加入 3mL 的昆虫培养基。在接种过程中，要注意移液器的操作规范，避免细胞悬液洒出或产生气泡。
- **培养细胞**：将接种好细胞的 6 孔板放入 27° C 的培养箱中培养 30-60 分钟，让细胞贴壁。在培养过程中，要保持培养箱的温度和湿度稳定，避免频繁打开培养箱门，以免影响细胞的贴壁效果。
- **检查细胞贴壁情况**：培养结束后，在显微镜下观察细胞的贴壁情况。如果大部分细胞已经贴壁，且形态正常，说明细胞准备工作完成，可以进行下一步操作。

2. 试剂准备

- **准备无菌离心管**：取一个无菌的 1.5 mL 离心管，做好标记，注明 “GeticoFect™ IC 试剂稀释”。
- **吸取试剂**：使用移液器准确吸取 10 μL 的 GeticoFect™ IC 转染试剂。在吸取试剂时，要注意移液器的量程设置和吸头的无菌性。
- **加入培养基**：将吸取的 10 μL GeticoFect™ IC 试剂加入到含有 250 μL Opti-MEM I 培养基的离心管中。加入后，轻轻颠倒离心管 5-10 次，使试剂与培养基充分混合。
- **室温孵育**：将混合好的溶液在室温下孵育 5 分钟，使试剂充分稀释。

3. 复合物制备

- **加入 DNA**：直接向稀释后的 GeticoFect™ IC 试剂中加入 1 μg 的 Bacmid DNA。根据 DNA 的浓度计算所需的 DNA 体积，并使用移液器准确吸取。加入 Bacmid DNA 后，轻轻颠倒离心管 5-10 次，使 Bacmid DNA 与试剂充分混合。
- **室温孵育**：将含有 DNA 和试剂的混合溶液在室温下孵育 5 分钟，让 DNA 与转染试剂试剂充分结合形成复合物。

4. 转染操作

- **逐滴加入复合物**：将孵育好的 DNA-转染试剂复合物缓慢加入到 6 孔板的每个孔中，尽量使复合物均匀地分布在细胞表面。在加入过程中，要避免移液器的吸头接触到细胞，以免损伤细胞。
- **混匀复合物与细胞**：加入复合物后，轻轻晃动 6 孔板，使复合物与细胞充分接触。注意不要剧烈晃动，以免细胞脱落。
- **培养细胞**：将 6 孔板放回 27° C 的培养箱中继续培养 72-96 小时。在培养过程中，要定期观察细胞的状态，如细胞的形态、密度和颜色等，以判断转染是否成功。一般来说，转染成功后，细胞会出现病毒感染的迹象，如细胞肿胀、悬浮等。

六、悬浮细胞转染规模调整指南

参数	培养类型			
	悬浮细胞			
容器类型	深孔板	摇瓶		
容器尺寸	24孔	125 ml	250 ml	500 ml
所需细胞数量	10×10^6 个细胞	62.5×10^6 个细胞	125×10^6 个细胞	250×10^6 个细胞
转染培养体积	4ml/孔	25ml	50ml	100ml
转速	250±5 rpm（19mm 直径）	125±5rpm(19mm 直径) 125±5rpm(25mm 直径） 95±5rpm(50mm 直径）		
Bacmid DNA	1μg	12.5 μg	25μg	50μg
GeticoFect IC 转染试剂体积	5μL	30μL	60μL	120μL
Opti-MEM 减血清培养基体积	250μL	1ml	2ml	4ml
Bacmid DNA 体积	2-4μL	25-50μL	50-100 μL	100-200μL

七、注意事项

- **摇床速度优化**：需根据设备实际测试确定最佳转速。不同的摇床可能会有一定的差异，因此在进行大规模转染之前，建议进行小规模的预实验，以确定最适合的摇床速度。
- **细胞毒性**：本试剂细胞毒性低，转染后无需更换培养基。但如果在转染过程中发现细胞状态不佳，可以根据实际情况考虑更换部分培养基。
- **保存条件**：4° C 储存，避免冷冻，使用前恢复至室温。在储存过程中，要确保试剂瓶的密封良好，避免试剂受到污染。