# GeticoFect™ IC-Lite 昆虫细胞转染试剂使用说明书

## 一、产品信息

### （一）产品特性

| 参数 | 详情 |
|---|---|
| 主要成分 | 阳离子混合物 |
| 外观 | 呈现为略带乳光的无色液体 |
| pH 值 | 6.8-7.2（25° C 条件下） |
| 渗透压 | 280-320 mOsm/kg |

### （二）储存条件

- 应存放在 4° C 的环境中，可保存 24 个月。
- 要避免冷冻，因为冷冻会使转染试剂体结构遭到破坏。
- 从冰箱取出后，需在室温下平衡 30 分钟，然后颠倒 10 次，才能使用。

## 二、实验准备工作

### （一）仪器与耗材清单

| 项目 | 规格 / 型号 | 备注 |
|---|---|---|
| $CO_2$ 培养箱 | 371 型（Thermo Fisher） | 设置温度为 27° C，湿度在 70-80% 之间 |
| 离心机 | 5810R 型（Eppendorf） | 配备 15 mL 和 50 mL 转头 |
| 涡旋振荡器 | Vortex - Genie 2（Scientific Industries） | 调节至低速档 |
| 移液器 | 各规格 | 需进行校准，误差要小于 1% |
| 6 孔板 | Corning 3516（TC 处理） | 使用前用紫外线照射 30 分钟 |
| 离心管 | 1.5 mL、15 mL、50 mL（Axygen） | 需经过高压灭菌处理 |

（二）溶液配制方法

1. Grace’s 培养基（10% FBS）：

- 取 85 mL Grace’s 基础培养基。
- 加入 15 mL 胎牛血清（FBS，需经过热灭活处理）。
- 添加 1% 双抗（青霉素 100 U/mL+链霉素 100 μg/mL）。
- 用 0.22 μm 的滤膜过滤除菌。
- 分装入 50 mL 离心管，在 4° C 下保存，保存期不超过 2 周。

2. 铺板培养基（1.5% FBS）：

- 量取 1.5 mL 含 10% FBS 的 Grace’s 培养基。
- 加入 8.5 mL 无血清 Grace’s 培养基。
- 现用现配。

## 三、转染详细流程

### （一）使用杆粒(Bacmid)转染 Sf9 细胞

#### 1. 细胞培养与计数

1.1 细胞复苏操作：

- 从液氮罐中取出冻存管，立即放入 37° C 的水浴锅中，不断摇晃，使细胞在 1 分钟内完全解冻。
- 用 75% 的酒精对冻存管进行消毒，然后将细胞悬液转移到 15 mL 离心管中。
- 缓慢加入 5 mL 含 10%FBS 的 Grace’s 培养基，轻轻吹打均匀。
- 以 300×g 的离心力离心 5 分钟，弃去上清液。
- 用 10 mL 新鲜培养基重悬细胞，转移到 25 $cm^2$ 的培养瓶中，在 27° C 的培养箱中静置培养 24 小时。

1.2 细胞传代操作：

- 当细胞密度达到 80%时，进行传代。
- 吸出旧培养基，用 PBS 轻轻洗涤细胞 2 次。
- 加入 2 mL 0.05% 的胰酶 - EDTA 溶液，在室温下消化 2 分钟。
- 加入等体积的含 10% FBS 的培养基终止消化。
- 用移液器轻轻吹打细胞，使其形成单细胞悬液。
- 进行细胞计数，将细胞密度调整为 $1\times10^6$ cells/mL。

### 1.3 细胞计数方法：

- 取 10μL 细胞悬液和 10μL 台盼蓝溶液，在 1.5 mL 离心管中混合均匀。
- 将混合液滴加到血球计数板的计数池中，静置 3 分钟。
- 在显微镜下，计数四个大方格中的活细胞数（活细胞不着色）。
- 计算细胞密度：细胞密度（cells/mL）=（活细胞总数/4）×$10^4$ ×稀释倍数。

## 2. 转染试剂准备

### 2.1 试剂稀释操作：

- 从 4° C 冰箱取出 GeticoFect™ IC-Lite 试剂，在室温下平衡 30 分钟。
- 颠倒试剂瓶 10 次，使试剂充分混匀。
- 用 10 μL 移液器吸取 8μL 试剂，加入到 1.5 mL 离心管中。
- 再加入 100μL 无血清 Grace’s 培养基，用移液器轻轻吹打 10 次，使其混合均匀。
- 将离心管放在涡旋振荡器上，低速振荡 5 秒。
- 室温静置，在 30 分钟内使用。

### 2.2 DNA 准备操作：

- 取 1 μg Bacmid DNA（浓度≥0.5μg/μL），加入到 1.5 mL 离心管中。
- 加入无血清 Grace’s 培养基至 100μL，用移液器轻轻吹打 10 次。

## 3. 复合物形成过程

### 3.1 混合操作：

- 将稀释后的 DNA 溶液缓慢倒入稀释后的试剂中，边倒边用移液器轻轻吹打。
- 总体积约为 210 μL，用移液器轻柔混匀 3 次，避免产生气泡。

### 3.2 孵育操作：

- 将离心管放在室温下静置 20 分钟，期间每 5 分钟轻弹管底 1 次，以促进复合物的形成。

## 4. 细胞转染操作

### 4.1 铺板操作：

- 用移液器吸取 2 mL 含 1.5% FBS 的铺板培养基，加入到 6 孔板的每个孔中。
- 用移液器吸取 1 mL 细胞悬液（8×$10^5$ cells），加入到 6 孔板的每个孔中，轻轻摇匀。
- 将 6 孔板放在室温下静置 15 分钟，使细胞贴壁。

4.2 加样操作：

- 用移液器吸取 210μL DNA-转染试剂复合物，在距离细胞层 1 cm 的高度，逐滴加入到 6 孔板的每个孔中。
- 每孔分 5 个不同的位置进行滴加，确保复合物均匀分布。

4.3 培养操作：

- 用封口膜将 6 孔板密封，防止培养基蒸发。
- 将 6 孔板放入 27° C 的培养箱中，静置培养 3 小时。
- 每小时观察一次细胞状态，若发现培养基颜色变为黄色，应及时更换。

5. 后续培养与检测

5.1 换液操作：

- 3 小时后，用移液器小心吸除转染液，注意不要触碰细胞层。
- 用移液器吸取 2mL 含 10%FBS 的 Grace’s 培养基，加入到 6 孔板的每个孔中。
- 可以选择加入抗生素（如庆大霉素 50μg/mL）。

5.2 病毒检测操作：

- 每天在显微镜下观察细胞形态，记录细胞肿胀、颗粒增多等病毒感染的迹象。
- 感染后 72 小时，收集上清液，进行病毒滴度测定（采用空斑实验或 TCID50 法）。
- 收集细胞沉淀，进行 Western blot 检测，以确认目的蛋白的表达。

（二）使用质粒 DNA 转染 High Five 细胞

1. 特殊准备工作

1.1 ER 试剂处理（需要另外购买）：

- 取 5μL PLUS 试剂，加入到稀释后的 DNA 溶液中。
- 轻轻混匀，室温静置 5 分钟。

1.2 培养基选择：

- 推荐使用 Express Five SFM 培养基，以提高转染效率。

2. 转染操作差异

2.1 复合物孵育时间：

- 室温静置 15 分钟即可，无需延长孵育时间。

2.2 换液时间：

- 如果使用 SFM 培养基，无需更换培养基，直接培养 24 小时。
- 如果使用 Grace’s 培养基，3 小时后更换为完全培养基。

## 四、质量控制标准

### （一）关键参数要求

| 参数 | 标准 | 检测方法 |
|---|---|---|
| DNA 纯度 | OD260/280 = 1.8 - 2.0 | 分光光度计 |
| 细胞存活率 | ≥95% | 台盼蓝染色法 |
| 复合物粒径 | 100 - 200 nm | 动态光散射仪 |
| 转染效率 | ≥80%（GFP 报告基因） | 流式细胞术 |

## 五、故障排除指南

### （一）常见问题及解决办法

| 问题现象 | 可能原因 | 解决措施 |
|---|---|---|
| 转染效率低 | DNA 降解 | 使用新鲜制备的 DNA，并且通过琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的完整性 |
| 细胞大量死亡 | 复合物浓度过高 | 将试剂用量减少至 4μL/孔，同时延长孵育时间至 4 小时 |
| High Five™细胞贴壁差 | 未使用 PLUS 试剂 | 严格按照说明书的要求，添加 PLUS 试剂 |
| 病毒滴度低 | 转染后培养时间不足 | 延长培养时间至 96 小时，同时降低培养温度至 25° C |

### （二）进阶优化方案

1. 梯度实验设计：

- DNA 浓度梯度：0.5 μg、1 μg、2 μg、3 μg。

- 试剂体积梯度：4 μL、6 μL、8 μL、10 μL。
- 孵育时间梯度：2 小时、3 小时、4 小时、5 小时。

2. **电镜观察：**

- 对转染后的细胞进行负染处理，使用透射电镜观察复合物的内化过程。

## 六、附录

### （一）溶液配方

1. **台盼蓝染液：**

- 称取 0.4 g 台盼蓝粉末，加入 100 mL 生理盐水，搅拌溶解。
- 用滤纸过滤，去除未溶解的颗粒。
- 分装入棕色瓶中，室温保存。

2. **PBS 缓冲液：**

- 称取 8 g NaCl、0.2 g KCl、1.44 g $Na_2HPO_4$ 、0.24 g $KH_2PO_4$ 。
- 加入 800 mL 去离子水，搅拌溶解。
- 用 HCl 调节 pH 值至 7.4。
- 定容至 1000 mL，高压灭菌后室温保存。