

GeticoFect™ EasyStyle Plus CHO Expression Kit

产品说明书

操作步骤

一、实验准备

(一) 试剂与材料准备

1. 系统组件：依据实验需求，准备 EasyStyle PLUS CHO 表达系统各组件，确认数量与质量，检查是否有损坏或变质。具体包括：
 - EasyStyle CHO-S® 细胞：储存于液氮，使用前取出，1 管含 1×10^7 个细胞，由 90% EasyStyle CHO 表达培养基和 10% DMSO 组成。
 - EasyStyle PLUS 试剂：保存于 4°C，不可冷冻，1mL 可用于 25 次转染及 1 次对照实验（每次转染用 37.5μL），成分保密。
 - EasyStyle CHO 表达培养基：储存于 4°C 避光处，使用前添加 L-谷氨酰胺至终浓度 8mM（如 1L 培养基加 40mL 200mM 储存液），1L 装，成分保密，无血清、化学成分明确。
 - OptiPRO™ SFM：存放于 4°C 避光处，100mL 装，成分保密，无血清，用于促进 DNA-脂质复合物形成。
 - pCMV SPORT-βgal：保存于 -20°C，25μg (0.5μg/μL)，作为转染和表达的阳性对照。
2. 耗材与设备：
 - 无菌耗材：125 - mL、250 - mL、500 - mL、1L、3L 一次性无菌透气盖聚碳酸酯锥形瓶（VWR 或 Corning 品牌，具体货号见文档）；无菌移液管、枪头；冻存管。
 - 仪器设备：液氮罐；37°C 水浴锅；CO₂培养箱（湿度 8%，CO₂浓度 8%）；恒温摇床（可设置 120 - 135rpm，用于细胞培养；必要时设置 70 - 80rpm，用于大体积转染）；离心机（可设置 100×g）；细胞计数仪（如 Coulter Counter）或血球计数板；涡旋振荡器；超净工作台。

(二) 实验环境准备

1. 所有实验操作在超净工作台内进行，使用前开启紫外灯照射 30 分钟以上消毒，确保台面清洁、无菌。
2. 实验过程中，保持操作区域整洁，避免交叉污染，使用的仪器设备提前调试至正常工作状态。

二、细胞培养

(一) 解冻与建系

1. 准备工作：从液氮罐取出 EasyStyle CHO - S® 细胞冻存管，同时将适量 EasyStyle CHO 表达培养基（已添加 8mM L-谷氨酰胺）在 37°C 水浴预热；准备 125 - mL 一次性无菌透气盖聚碳酸酯锥形瓶；在 CO₂培养箱中设置好摇床参数（37°C、8% CO₂、125rpm）。
2. 解冻细胞：将冻存管迅速放入 37°C 水浴中，轻轻晃动，使其快速解冻。当管内仅剩余少量冰渣时，取出冻存管，用 70% 乙醇擦拭外壁消毒。

3. 细胞接种：在超净台内，将细胞悬液转移至含有 30mL 预热培养基的 125 - mL 锥形瓶中，轻轻混匀。
4. 培养观察：将锥形瓶放入 CO₂培养箱摇床上培养。次日，取少量细胞悬液，用 Trypan Blue 染色法检测细胞活力和细胞密度。若细胞活力 > 70%，可继续培养；若活力 < 60%，则需解冻新的细胞批次。
5. 首次传代：解冻后 24 - 48 小时，当细胞密度达到一定程度时进行首次传代，接种密度为 0.3×10^6 个活细胞 /mL，使用预热的含 8mM L - 谷氨酰胺的培养基，一般使用 125 - mL 或 250 - mL 锥形瓶，分别加入 40mL 或 80mL 细胞悬液。传代至少 5 次后，细胞方可用于转染实验。

（二）细胞传代

1. 常规传代（48 - 72 小时传代一次）：
 - 细胞计数：当细胞密度达到 $1 - 1.5 \times 10^6$ 个活细胞 /mL 时，取少量细胞悬液，用 Trypan Blue 染色法检测细胞活力和细胞密度。
 - 计算与稀释：根据细胞密度计算分瓶比例，用预热的含 8mM L - 谷氨酰胺的培养基将细胞稀释至 $0.5 - 2 \times 10^5$ 个活细胞 /mL，置于合适体积的锥形瓶中。
 - 培养条件：将锥形瓶放入 37°C、8% CO₂的摇床，以 120 - 135rpm 转速培养。
2. 每日传代：
 - 细胞处理：细胞密度达到 2×10^6 个活细胞 /mL 时进行传代，分瓶至 0.5×10^6 个活细胞 /mL。若需细胞扩增，可分瓶至 $0.8 - 1.0 \times 10^6$ 个活细胞 /mL。
 - 后续操作：次日，检测细胞密度，若达到预期密度，继续每日传代，确保细胞密度不超过规定上限，以免影响转染效率。
3. 大量细胞培养：若需大量细胞，接种密度为 0.5×10^6 个活细胞 /mL，当细胞密度达到 5×10^6 个活细胞 /mL（3 - 4 天）时收集细胞，不可让细胞继续生长，以防转染效率降低。期间注意观察细胞聚团情况，若有聚团，传代时涡旋 10 - 30 秒，直至细胞主要以单细胞形式生长。

（三）细胞冻存

1. 冻存液准备：使用前在无菌离心管中配制冻存液，每 1mL 冻存液含 0.9mL 添加 8mM L - 谷氨酰胺的新鲜培养基和 0.1mL DMSO，过滤除菌后置于冰上备用。
2. 细胞准备：在摇床培养细胞至密度达 1×10^7 个活细胞 /mL 以上，将细胞转移至无菌离心管，检测细胞活力和细胞密度。
3. 离心重悬：100×g 室温离心 5 分钟，小心吸除上清，用预冷冻存液重悬细胞，使细胞密度为 1×10^7 个活细胞 /mL。
4. 分装冻存：将细胞悬液分装至冻存管，每管 1mL，放入程序降温盒或使用程控降温仪，以 1°C / 分钟的速率降温，然后转移至液氮长期保存。24 小时后可复苏少量细胞检测冻存效果。

三、细胞转染

（一）质粒制备

使用质粒试剂盒提取用于转染的质粒 DNA，确保其清洁、无菌、无酚和氯化钠污染。提取后进行 0.22μm 过滤除菌，测定浓度并调整至 1mg/mL 备用。

（二）转染准备

1. 准备处于对数生长期、活力 > 95% 的 EasyStyle CHO - S® 细胞，根据转染体积和细胞密度要求计算所需细胞量并进行扩培。
2. 准备 EasyStyle PLUS 试剂、OptiPRO™ SFM、添加 8mM L - 谷氨酰胺并预热至 37°C 的 EasyStyle CHO 表达培养基，以及 125 - mL 一次性无菌透气盖聚碳酸酯锥形瓶、涡旋振荡器、摇床、CO₂培养箱等设备。
- 3.

（三）转染操作（以 30mL 体积转染为例）

1. 细胞准备：转染前约 24 小时，将细胞以 $5 - 6 \times 10^5$ 个细胞 /mL 的密度传代，置于摇床培养。转染当天，检测细胞密度，应为 $1.2 - 1.5 \times 10^6$ 个细胞 /mL，若不符合，进行稀释或离心浓缩调整至 1×10^6 个细胞 /mL，取 30mL 细胞悬液加入 125 - mL 锥形瓶。
2. 试剂准备：轻轻颠倒 EasyStyle PLUS 试剂管使其混匀，避免涡旋。分别取 37.5μg 质粒 DNA 和 37.5μL EasyStyle PLUS 试剂，各用 OptiPRO™ SFM 稀释至 0.6mL，轻轻颠倒混匀。
3. 复合物形成：将稀释后的 EasyStyle PLUS 试剂迅速加入稀释后的 DNA 溶液，总体积为 1.2mL，轻轻混匀，室温孵育 10 分钟（不超过 20 分钟），形成 DNA - 脂质复合物。
4. 转染细胞：将复合物缓慢加入含细胞的锥形瓶中，同时缓慢旋转锥形瓶使其均匀分布，放入 37°C、8% CO₂ 的摇床，以 135rpm 转速培养，培养的前 6 - 7 天无需换液或补加培养基。

（四）转染优化与放大

1. 优化表达：首次表达蛋白时，在转染后 1 - 7 天进行时间进程实验，监测蛋白产量和细胞活力，确定最佳收获时间；尝试不同量的质粒 DNA（30 - 45μg）和 EasyStyle PLUS 试剂（30 - 45μL），优化转染条件；若使用 GFP 等荧光蛋白评估转染效率，转染 24 小时后开始监测，但不能仅依据转染效率评估结果，需同时检测蛋白产量。
2. 放大转染：若需进行更大体积转染，按比例增加各试剂体积。

四、结果检测与分析

（一）β - 半乳糖苷酶活性检测

1. 转染一定时间后，收集细胞，按照 FluoReporter® lacZ / 半乳糖苷酶定量试剂盒说明书操作，制备细胞裂解液。
2. 加入相应底物，在合适条件下反应，使用酶标仪或其他检测设备测定 β - 半乳糖苷酶活性，评估转染效果。

（二）目的蛋白检测

1. 根据目的蛋白特性，选择合适检测方法，如 Western blot、ELISA、蛋白免疫印迹等。
2. 确定蛋白表达最佳时间点，收集细胞培养上清或细胞裂解液，进行目的蛋白检测与定量分析。

五、问题排查与解决

(一) 细胞培养问题

问题	原因	解决方案
解冻后无活细胞	储存不当；自制冻存管问题；解冻培养基错误；摇床设置错误	订购新的细胞冻存管并正确储存于液氮；冻存细胞密度调整为 1×10^7 个活细胞 /mL；使用 90% 新鲜培养基和 10% DMSO 的冻存液；使用低代次细胞冻存；使用添加 8mM L - 谷氨酰胺的 EasyStyle CHO 表达培养基解冻细胞, 且不添加抗生素；将摇床设置为 37°C、8% CO ₂ 、125rpm
细胞生长缓慢	培养基错误；抗生素添加过多；摇床设置错误；培养基起沫；培养瓶体积不合适；细胞代数过多	使用添加 8mM L - 谷氨酰胺的 EasyStyle CHO 表达培养基；不超过 5mL/L 0.5X Pen - Strep 添加抗生素；正确设置摇床；降低摇床转速消除泡沫；使用至少为培养体积 2.5 倍的培养瓶；使用 25 代以内的健康细胞
细胞聚团	搅拌不足；传代不规律；细胞密度不合理	加强搅拌；建立规律传代计划；维持细胞在推荐密度范围内生长

(二) 转染与蛋白生产问题

问题	原因	解决方案
转染效率和 / 或蛋白产量低	细胞代数过多；转染前未传代；细胞培养不当；抗生素过多；试剂使用不当；质粒 DNA 质量差；转染条件不佳；DNA 污染；目的基因有毒性；蛋白收获时间不当	解冻新的低代次细胞；转染前 24 小时按 $5 - 6 \times 10^5$ 个细胞 /mL 传代；严格按细胞传代步骤操作；减少抗生素用量；正确保存和使用 EasyStyle PLUS 试剂；不使用小提质粒 DNA，用合格试剂盒制备低内毒素污染的质粒 DNA；用阳性对照评估转染条件，监测转染效率，调整 DNA 和试剂用量；确保 DNA 无菌；尝试更换表达系统；进行时间进程实验确定最佳收获时间