GeticoFect™ CHO 表达系统说明书

产品基本信息

GeticoFect™ CHO 表达系统（目录号 G20322）是基于悬浮适应的中国仓鼠卵巢（CHO）细胞的高产瞬时表达系统，可用于在化学成分确定的无血清培养基中转染 GeticoFect-S™细胞，仅用于研究，不可用于诊断程序。该系统提供细胞、培养基和试剂，可转染 1 升细胞培养物。

系统组成及储存

该系统包含多种组件，各组件的数量和储存条件如下：

- GeticoFect-S™细胞（1×10^7个细胞 /mL）：2 × 1 mL，需储存在液氮中，且不能在 - 80°C 储存。
- GeticoFect™ CHO 表达培养基：1 升，储存于 2°C 至 8°C，需避光。
- GeticoFect™ CHO 转染试剂盒 1L，包含 GeticoFect™ CHO 试剂（3.2 mL）、GeticoFect™补料（330mL）、GeticoFect™ CHO 增强剂（6 mL），其中 GeticoFect™ CHO 试剂储存于 2°C 至 8°C 且需避光，GeticoFect™补料和 GeticoFect™ CHO 增强剂均储存于 2°C 至 8°C。
- OptiGetico™ SFM 复合培养基：100 mL，储存于 2°C 至 8°C，需避光。

各组件特点

- GeticoFect-S™细胞：是 CHO-S 细胞系的克隆衍生物，适应在 GeticoFect™表达培养基中进行高密度悬浮培养。其具有源自 CHO-S 亲代细胞系、解冻后恢复迅速（3 天内存活率≥90%）、适应无血清高密度悬浮生长、倍增时间约 17 小时、在摇瓶培养中最大细胞密度约 20×10^6个细胞 /mL、高蛋白表达能力以及多代次稳定的瞬时表达等特点，且以冻存形式提供，含 90% GeticoFect™表达培养基和 10% DMSO，可直接解冻到 GeticoFect™表达培养基中。
- GeticoFect™表达培养基：为化学成分确定、无血清、无蛋白、无动物来源的培养基，专为 GeticoFect-S™细胞的高密度培养和转染优化。含 GlutaMAX™-I，无需额外补充，不抑制 GeticoFect™ CHO 试剂活性，支持可扩展的瞬时转染和长达 14 天的长期培养，对光敏感，储存和使用时需避光。
- GeticoFect™ CHO 转染试剂盒组件：
    - GeticoFect™ CHO 试剂：为高密度 GeticoFect-S™培养物的高效转染而优化，与质粒 DNA 形成的复合物可直接加入 GeticoFect™表达培养基中的细胞，转染后无需更换培养基。
    - GeticoFect™补料：是化学成分确定、无血清、无动物来源的补充剂，与 GeticoFect™表达培养基配合使用，支持长期、高密度的瞬时转染。
    - GeticoFect™ CHO 增强剂：专有无动物来源的制剂，与 GeticoFect™ CHO 试剂和 GeticoFect™补料联合使用可提高蛋白产量，实现最大产率。

- OptiGetico™ SFM 复合培养基：无血清、无动物来源，用于将质粒 DNA 与 GeticoFect™ CHO 试剂复合，确保高效转染和高蛋白表达。
- 抗体表达阳性对照载体：转染级质粒，表达兔 IgG 的重链和轻链，作为转染和表达的阳性对照，在标准方案中 8-10 天、高滴度方案中 10-12 天、最大滴度方案中 12-14 天可获得最佳产量。

细胞培养方法

一般细胞操作

所有溶液和设备必须无菌，需在超净工作台中使用适当的无菌技术；冻存细胞保存在液氮中，收到干冰包装的细胞后，需在液氮中放置 3-4 天再解冻；通过轻轻摇晃混合细胞，避免剧烈振荡或移液；收到细胞后立即建立细胞培养并制备冻存 stock；刚解冻的细胞需在培养中恢复至少 2 代后再进行转染；常规传代时，需将细胞维持在对数生长期（4×10^6-6×10^6个活细胞 /mL），通常每 3-4 天一次；使用台盼蓝排斥法或自动细胞计数器监测存活率，对数期培养物存活率应 > 95%；解冻和传代时，将细胞转移到预热的培养基中。

细胞解冻和建立

所需材料包括 GeticoFect-S™细胞、预热至 37°C 的 GeticoFect™表达培养基、125 mL 聚碳酸酯、一次性、无菌、带通气口的锥形摇瓶、用于确定活细胞密度和存活率的试剂和设备、37°C 培养箱中的 orbital 摇床（相对湿度≥80%，含 8% CO_2）。

操作步骤：从液氮中取出细胞瓶，在 37°C 水浴中摇晃 1-2 分钟快速解冻，直至仅剩少量冰残留，注意不要将瓶浸入水中；在细胞完全解冻前，用 70% 乙醇擦拭瓶身消毒，然后在超净工作台中打开；用 2 mL 或 5 mL 移液管将冻存管中的全部内容物转移到含有 30 mL 预热的 GeticoFect™表达培养基的 125 mL 聚碳酸酯、一次性、无菌、带通气口的锥形摇瓶中；将细胞在 37°C 培养箱中（相对湿度≥80%，含 8% CO_2）的 orbital 摇床平台上培养，其中对于 19mm 摇径的摇床，摇速设置为 125±5 rpm；对于 25mm 摇径的摇床，摇速为 120±5 rpm；对于 50mm 摇径的摇床，摇速为 95±5 rpm；解冻后 3 天，测定活细胞密度和存活率，此时细胞存活率应≥90%；继续监测细胞密度和存活率，一旦培养物达到 4×10^6-6×10^6个活细胞 /mL（通常在解冻后 3-4 天），使用第 9 页的方法传代细胞。

细胞传代

所需材料包括密度为 4×10^6-6×10^6个活细胞 /mL 的 GeticoFect-S™细胞培养物、GeticoFect™表达培养基、聚碳酸酯、一次性、无菌、带通气口的锥形摇瓶、用于确定活细胞密度和存活率的试剂和设备、37°C 培养箱中的 orbital 摇床（相对湿度≥80%，含 8% CO_2）。

操作步骤：根据表 1 中推荐的接种密度和表 2 中推荐的培养体积，使用活细胞密度计算接种新摇瓶所需的细胞悬液体积。

表 1. 常规细胞培养维持的推荐接种密度

传代时间	推荐接种密度
传代后 3 天可用	0.2×10^6-0.3×10^6个活细胞/mL
传代后 4 天可用	0.15×10^6-0.2×10^6个活细胞/mL

表 2. 常规细胞培养维持的推荐体积

摇瓶尺寸	125 mL	250 mL	500 mL	1 L	2 L	3 L
培养体积（mL）	30-35	60-70	120-140	240-280	500-560	600-1000
摇速 [1]	125±5 rpm（19mm 摇径） 120±5 rpm（25mm 摇径） 95±5 rpm（50mm 摇径）	125±5 rpm（19mm 摇径） 120±5 rpm（25mm 摇径） 95±5 rpm（50mm 摇径）	125±5 rpm（19mm 摇径） 120±5 rpm（25mm 摇径） 95±5 rpm（50mm 摇径）	125±5 rpm（19mm 摇径） 120±5 rpm（25mm 摇径） 95±5 rpm（50mm 摇径）	125±5 rpm（19mm 摇径） 120±5 rpm（25mm 摇径） 95±5 rpm（50mm 摇径）	90±5 rpm（19mm 摇径） 85±5 rpm（25mm 摇径） 80±5 rpm（50mm 摇径）
摇瓶类型	带通气口、无挡板	带通气口、无挡板	带通气口、无挡板	带通气口、无挡板	带通气口、无挡板	带通气口、无挡板

[1] 对于上述较大的培养体积，使用推荐摇速范围的较高值。

将计算体积的细胞转移到含有新鲜预热的 GeticoFect™表达培养基的摇瓶中；将摇瓶在 37°C 培养箱中（相对湿度≥80%，含 8% CO_2）的 orbital 摇床平台上培养，直至培养物达到 4×10^6-6×10^6个活细胞 /mL。需要注意的是，在对数生长期之外的密度传代细胞可能会导致倍增时间延长和滴度降低，可调整初始接种密度，使传代时达到 4×10^6-6×10^6个活细胞 /mL 的目标密度；对于 125 mL-2 L 摇瓶中的常规细胞生长，19mm 摇径的摇床摇速设置为 125±5 rpm，25mm 摇径的为 120±5 rpm，50mm 摇径的为 95±5 rpm；对于 3 L 摇瓶，19mm 摇径的摇床摇速设置为 90±5 rpm，25mm 摇径的为 85±5 rpm，50mm 摇径的为 80±5 rpm；重复步骤 1-3 以维持或扩大用于转染的细胞，关于细胞冷冻的建议见第 10 页。

细胞冻存

GeticoFect-S™可直接在 GeticoFect™表达培养基中冷冻。冷冻时需遵循以下建议：将 GeticoFect-S™细胞以 1×10^7个活细胞 /mL 的终密度冷冻在 1 mL 总体积的 90% 新鲜 GeticoFect™表达培养基和 10% DMSO 中；在收获前，让细胞达到 4×10^6-6×10^6个细胞 /mL 的活细胞密度和 > 95% 的存活率；以 300×g 离心细胞 5 分钟使其沉淀，弃去用过的培养基，用含 10% DMSO 的冰冷 GeticoFect™表达培养基替换；通过移液轻轻重悬细胞沉淀；将细胞稀释至 1×10^7个活细胞 /mL 的终密度，每支冻存管分装 1 mL；按照标准程序，在自动或手动控制速率的冷冻装置中冷冻细胞，理想的冷冻速率应为每分钟下降 1°C；将冻存管转移到液氮中长期储存。

细胞转染方法

所需材料

包括在 GeticoFect™表达培养基中培养的 GeticoFect-S™细胞、无菌且不含苯酚和氯化钠、主要含超螺旋 DNA 的质粒 DNA 制备物（建议使用 GeticoFect™ HiPure 质粒试剂盒分离质粒 DNA，使用前可通过 0.22 µm 过滤器过滤 DNA 制剂以确保无菌）、抗体表达阳性对照载体（试剂盒中提供的 1 mg/mL 溶液 100 µL）、GeticoFect™ CHO 试剂（4°C 冷藏，不要预热）、OptiGetico™ SFM 复合培养基（4°C 冷藏，不要预热）、

预热至 37°C 的 GeticoFect™表达培养基（转染期间不要向培养基中添加抗生素，否则可能会降低转染效率）、聚碳酸酯、一次性、无菌锥形摇瓶、37°C 培养箱中的 orbital 摇床（相对湿度≥80%，含 8% CO_2），以及可选的用于高滴度和最大滴度方案的 32°C 培养箱中的 orbital 摇床（含 5% CO_2的 humidified 气氛）和用于确定活细胞密度和存活率的试剂和设备。

转染指南

刚解冻的细胞在转染前需在培养中恢复至少 2 代；在所有细胞操作过程中，通过轻轻摇晃混合细胞，避免剧烈混合 / 移液，细胞健康对获得最佳性能至关重要；使用 GeticoFect™ CHO 试剂以外的转染试剂转染高密度 GeticoFect-S™培养物可能会导致性能显著下降；使用前将 GeticoFect™ CHO 试剂瓶轻轻倒置 4-5 次以确保充分混合；在即将加入稀释的 DNA 之前，用冰冷的 OptiGetico™培养基稀释 GeticoFect™ CHO 试剂，将稀释的 GeticoFect™ CHO 试剂在加入稀释的质粒 DNA 前放置超过 5 分钟可能会导致蛋白滴度降低，更多信息见故障排除部分；质粒 DNA 和 GeticoFect™ CHO 试剂的复合在室温下使用冰冷试剂（4°C）进行；混合后，可立即将 GeticoFect™ CHO/DNA 复合物加入细胞中，或等待最多 5 分钟，不会损失性能，较长的保存时间（最多 10 分钟）可能会导致性能略有损失，不建议保存时间超过 10 分钟。

表达方案

为获得最大灵活性，GeticoFect™表达系统提供三种不同的表达方案：

- 标准方案：转染后第 1 天添加 GeticoFect™ CHO 增强剂和单次补料，在整个表达过程中将细胞维持在 37°C。
- 高滴度方案：转染后第 1 天添加 GeticoFect™ CHO 增强剂和单次补料，转染后第 1 天将细胞转移至 32°C。
- 最大滴度方案：转染后第 1 天添加 GeticoFect™ CHO 增强剂和第一次补料，转染后第 5 天添加第二次补料，转染后第 1 天将细胞转移至 32°C。

对于许多蛋白质，使用高滴度和最大滴度方案获得的滴度是标准方案的 2-3 倍，然而，根据蛋白质的性质，有些蛋白质使用标准方案表达相当或更好。方案的选择应根据要表达的特定蛋白质的要求和对该特定蛋白质的经验来确定。

转染扩大

GeticoFect™表达系统可直接从 125 mL 摇瓶扩大到 2 L 摇瓶尺寸。对于大摇瓶尺寸（即 3 L 摇瓶），必须降低培养物的摇速。

操作步骤

传代和扩大 GeticoFect-S™细胞，直至细胞达到约 4×10^6-6×10^6个活细胞 /mL 的密度；转染前一天（第 -1 天），将步骤 1 中的 GeticoFect-S™培养物传代至终密度为 3×10^6-4×10^6个活细胞 /mL，让细胞过夜生长；转染当天（第 0 天），确定活细胞密度和存活率，细胞应已达到约 7×10^6-10×10^6个活细胞 /mL 的密度，存活率应在 95-99% 才能进行转染；用新鲜的、预热至 37°C 的 GeticoFect™表达培养基将步骤 2 中的细胞稀释至终密度为 6×10^6个活细胞 /mL，轻轻摇晃摇瓶以混合细胞，注意丢弃剩余细胞，不要将高密度细

胞重新用于常规传代；按照以下方法使用冰冷试剂（4°C）制备 GeticoFect™ CHO / 质粒 DNA 复合物，在复合过程中无需将试剂放在冰上，只需从冰箱中取出试剂并开始 DNA 复合即可，其中大多数蛋白质适合使用每 mL 待转染的培养物体积 0.5-1.0 µg 的总质粒 DNA。具体为：轻轻倒置 GeticoFect™ CHO 试剂瓶 4-5 次进行混合；用冰冷的 OptiGetico™培养基稀释质粒 DNA，通过摇晃试管和 / 或倒置混合；用 OptiGetico™培养基稀释 GeticoFect™ CHO 试剂，通过摇晃试管和 / 或倒置或轻轻移液 2-3 次混合，注意用冰冷的 OptiGetico™培养基稀释 GeticoFect™ CHO 试剂，在即将加入稀释的 DNA 之前进行，将稀释的 GeticoFect™ CHO 试剂在加入稀释的质粒 DNA 前放置超过 5 分钟可能会导致蛋白滴度降低，更多信息见故障排除部分；将稀释的 GeticoFect™ CHO 试剂加入稀释的 DNA 中，通过摇晃试管或倒置混合。

将 GeticoFect™ CHO / 质粒 DNA 复合物（来自步骤 5d）在室温下孵育 1-5 分钟，然后缓慢转移到步骤 4 的摇瓶中，在添加过程中轻轻摇晃摇瓶；将细胞在 37°C 培养箱中（含 8% CO_2的 humidified 气氛）的 orbital 摇床上培养，建议的摇速参见第 13 页表 3。

转染后第 1 天：添加 GeticoFect™ CHO 增强剂和 GeticoFect™补料，在转染后第 1 天（转染后 18-22 小时），根据所选方案进行以下添加，添加的体积参见第 13 页表 3，其中无需在加入摇瓶前预热 GeticoFect™ CHO 增强剂或 GeticoFect™补料，且 GeticoFect™ CHO 增强剂和 GeticoFect™补料可在加入摇瓶前立即预混合。

- 标准方案：向摇瓶中加入 GeticoFect™ CHO 增强剂和 GeticoFect™补料（根据第 13 页表 3），在添加过程中轻轻摇晃摇瓶，将摇瓶放回 37°C 培养箱（含 8% CO_2的 humidified 气氛）中摇晃培养。
- 高滴度方案：向摇瓶中加入 GeticoFect™ CHO 增强剂和 GeticoFect™补料（根据第 13 页表 3），在添加过程中轻轻摇晃摇瓶，将摇瓶转移至 32°C 培养箱（含 5% CO_2的 humidified 气氛）中摇晃培养。
- 最大滴度方案：向摇瓶中加入 GeticoFect™ CHO 增强剂和 GeticoFect™补料（根据第 13 页表 3），在添加过程中轻轻摇晃摇瓶，将摇瓶转移至 32°C 培养箱（含 5% CO_2的 humidified 气氛）中摇晃培养。

仅最大滴度方案：在转染后第 5 天，向摇瓶中加入第二体积的 GeticoFect™补料（根据第 13 页表 3），并立即将摇瓶放回 32°C 培养箱中摇晃培养。

收获蛋白的最佳时间取决于所表达蛋白质的特定性质和所选方案。各种方案达到最大滴度的典型收获时间如下：

- 标准方案：转染后 8-10 天
- 高滴度方案：转染后 10-12 天
- 最大滴度方案：转染后 12-14 天

表达水平将因所表达的特定重组蛋白和所用载体而异，然而，对于任何特定蛋白质，GeticoFect™表达系统在每次转染之间将表现出一致的表达水平。首次表达蛋白质时，可能需要进行时间进程（例如，在转染后

的多个时间点收获细胞或培养基）以优化表达运行的长度。GeticoFect™表达培养基设计用于在最大滴度方案中与 GeticoFect™ CHO 增强剂和 GeticoFect™补料一起支持瞬时转染的培养物长达 14 天，然而，对于给定的蛋白质，并不总是需要或希望将表达运行延长至 14 天。

安全注意事项

一般安全

警告！一般安全。以用户文档中未指定的方式使用本产品可能导致人身伤害或仪器损坏。确保任何使用本产品的人员都已接受实验室一般安全操作以及本文件中提供的安全信息的培训。在使用仪器或设备之前，阅读并理解仪器或设备制造商提供的用户文档中的安全信息。在处理化学品之前，阅读并理解所有适用的安全数据表（SDS），并使用适当的个人防护装备（手套、 gown、护目镜等）。

化学安全

警告！一般化学品处理。为最大限度地减少危险，确保实验室人员阅读并遵守以下关于化学品使用、储存和废物处理的一般安全指南，并查阅相关 SDS 以获取具体的预防措施和说明：在储存、处理或使用任何化学品或危险材料之前，阅读并理解化学品制造商提供的安全数据表（SDS）；尽量减少与化学品的接触，处理化学品时佩戴适当的个人防护装备（例如安全眼镜、手套或防护服）；尽量减少化学品的吸入，不要让化学品容器敞开，仅在通风良好的环境（例如通风橱）中使用；定期检查化学品泄漏或溢出情况，如果发生泄漏或溢出，请按照 SDS 中推荐的制造商清理程序进行处理；在通风橱中处理化学废物；确保使用一级和二级废物容器，一级废物容器容纳直接废物，二级容器容纳一级容器的泄漏物，两个容器都必须与废物材料兼容，并符合联邦、州和地方对容器储存的要求；清空废物容器后，用提供的盖子密封；通过分析（如有必要）表征由实验室中使用的特定应用、试剂和底物产生的废物；确保废物的储存、转移、运输和处置符合所有地方法规。