

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。

(三) 订购信息

产品名称	产品编号	规格	储存
GeticoFect IC-Lite Transfection Reagent	181601	0.75 mL	2-8°C
GeticoFect IC-Lite Transfection Reagent	181602	1.5 mL	2-8°C
GeticoFect IC-Lite Transfection Reagent	181603	15 mL	2-8°C

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

项目	规格 / 型号	备注
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 μ g/mL)。
- 用 0.22 μ m 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 \times 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 cm² 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 1×10^6 cells/mL。

1.3 细胞计数方法:

- 取 10 μ L 细胞悬液和 10 μ L 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) $\times 10^4$ \times 稀释倍数。

2. 转染试剂准备

2.1 试剂稀释操作:

- 从 4 $^{\circ}$ 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 μ L 移液器吸取 8 μ L 试剂, 加入到 1.5 mL 离心管中。
- 再加入 100 μ L 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 μ g Bacmid DNA (浓度 ≥ 0.5 μ g/ μ L), 加入到 1.5 mL 离心管中。
- 加入无血清 Grace' s 培养基至 100 μ L, 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 μ L, 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 210 μ L 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 2 mL 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 50 μ g/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 5 μ L 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	$\geq 95\%$	台盼蓝染色法
复合物粒径	100 - 200 nm	动态光散射仪
转染效率	$\geq 80\%$ (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

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 4 μ L/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 μ g、1 μ g、2 μ g、3 μ g。
- 试剂体积梯度：4 μ L、6 μ L、8 μ L、10 μ L。
- 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 Na₂ HPO₄、0.24 g KH₂ PO₄。
- 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。