

**GeticoFect™ EasyStyle Plus 293  
Transfection Kit**

**产品说明书**

## 操作步骤

### 一、实验前准备

#### (一) 试剂和材料准备

1. 从液氮罐中取出 EasyStyle™ 293-F 细胞(试剂盒提供, 每管含  $1 \times 10^7$  个细胞, 冻存于 90% EasyStyle™ 293 表达培养基和 10% DMSO 中), 使用前存放于液氮。
2. 准备 EasyStyle™ 293 表达培养基(试剂盒提供 1L, 4°C 避光保存), 使用前预热至 37°C。该培养基为无血清、化学成分确定的培养基, 添加谷氨酰胺补充剂, 无需额外添加成分。
3. EasyStyle™ PLUS 试剂(试剂盒提供 1mL, 4°C 保存, 不可冷冻), 用于细胞转染。
4. pCMV SPORT-βgal(试剂盒提供 25μg, -20°C 保存) 作为转染和表达的阳性对照质粒。
5. 准备纯化的目的质粒 DNA(浓度为 1mg/mL), 确保其清洁、无菌, 无酚和氯化钠污染, 推荐使用质粒提取试剂盒进行提取。
6. 准备 125-mL 聚碳酸酯一次性无菌透气盖锥形瓶、无菌一次性聚碳酸酯扣盖管、台盼蓝染液、细胞计数仪或血球计数板、37°C 恒温摇床(设置为 135rpm, 含 8% CO<sub>2</sub> 湿润环境)。
7. 若需添加抗生素, 可准备含青霉素、链霉素和两性霉素 B 的 Antibiotic-Antimycotic (100x, 单独购买), 添加量为 5mL/L。但不建议常规添加, 因其可能影响细胞生长和转染效率。
- 8.

#### (二) 仪器设备准备

1. 37°C 恒温水浴锅, 用于解冻细胞和预热培养基。
2. 超净工作台, 确保实验操作在无菌环境下进行。
3. 离心机, 用于细胞离心操作, 设置转速为  $100 \times g$ , 温度为室温。
4. 细胞培养箱, 设定温度为 37°C, CO<sub>2</sub> 浓度为 8%, 湿度适宜, 用于细胞培养。
5. 涡旋振荡器, 用于吹散细胞团块, 但在操作某些试剂(如 EasyStyle™ PLUS 试剂) 时需避免使用。
6. 电子细胞计数仪或血球计数板, 用于细胞密度和活力计数。

### 二、细胞复苏与建系

1. 从液氮中取出 EasyStyle™ 293-F 细胞冻存管, 迅速放入 37°C 恒温水浴锅中解冻, 期间轻轻晃动冻存管, 使其快速融化。
2. 在细胞即将完全解冻时, 用 70% 乙醇擦拭冻存管外壁进行消毒。轻轻吹打或晃动, 使可能存在的细胞团块和沉淀分散, 然后将冻存管内所有细胞转移至含有 30mL 预热至 37°C 的 EasyStyle™ 293 表达培养基的 125-mL 聚碳酸酯一次性无菌透气盖锥形瓶中。
3. 将锥形瓶放入 37°C、含 8% CO<sub>2</sub> 湿润环境的恒温摇床, 设置转速为 135rpm, 进行细胞培养。
4. 次日, 取少量细胞悬液, 采用台盼蓝拒染法, 使用细胞计数仪或血球计数板测定细胞的活力和总细胞数。正常情况下, 细胞活力应 > 70%; 若活力低于 60%, 则需解冻新一批细胞。
5. 细胞解冻后 24 - 48 小时, 将细胞以  $3 \times 10^5$  个 /mL 的密度接种到含有预热培养基的新摇瓶中进行传代培养。建议使用 125-mL 或 250-mL 聚碳酸酯一次性无菌透气盖锥形瓶, 工作体积分别为 40mL 或 80mL。注意, 在转染实验前, 细胞至少需传代 5 次, 以确保细胞从冻存状态中充分恢复。

### 三、细胞传代培养

1. 当细胞密度达到  $1 - 3 \times 10^6$  个 /mL 时 (通常每 48 - 72 小时), 进行细胞传代。使用台盼蓝拒染法和细胞计数仪或血球计数板测定细胞活力和总细胞数。
2. 根据测得的细胞密度, 计算将细胞接种到新摇瓶中使其密度达到  $1 - 2 \times 10^5$  个 /mL 所需的稀释比例。
3. 吸取适量细胞悬液至无菌离心管, 室温下  $100 \times g$  离心 5 分钟, 小心吸除上清培养基。用预热的 EasyStyle™ 293 表达培养基重悬细胞沉淀, 将细胞稀释至  $1 - 2 \times 10^5$  个 /mL, 并调整至所需的总体积。
4. 将含有细胞悬液的摇瓶放入  $37^\circ\text{C}$ 、含 8%  $\text{CO}_2$  湿润环境的恒温摇床, 转速设置为 135rpm, 继续培养。
5. 定期观察细胞团块形成情况, 若细胞以 2 - 10 个细胞的聚集体形式生长, 在传代时可能需要涡旋振荡 10 - 30 秒, 直至细胞主要以单细胞形式生长。
6. 如需放大培养规模, 可在 Spinner flask 或生物反应器中进行。接种密度建议为  $3 - 5 \times 10^5$  个 /mL, 同时根据培养系统确定并优化搅拌速度。在 Celligen™ 搅拌式生物反应器中, 最佳叶轮转速为 70 - 100rpm; 在 Spinner flask 中, 最佳转速为 100 - 130rpm。若细胞与新鲜培养基的比例小于 1:2, 可先离心细胞悬液, 弃上清, 再用预热的新鲜培养基重悬细胞后接种。此外, 在高搅拌速度 ( $> 130\text{rpm}$ ) 或特定叶轮设计下, 可考虑添加额外的 Pluronic® F - 68 (2.5 - 5mL/L 的 10% Pluronic® F - 68), 以减少细胞受到的剪切力。

### 四、细胞冻存

#### (一) 冻存液制备

1. 在无菌离心管中, 按照每 1mL 冻存液需 0.9mL EasyStyle™ 293 表达培养基和 0.1mL DMSO 的比例配制冻存液。
2. 使用  $0.22\mu\text{m}$  滤膜对冻存液进行过滤除菌, 将除菌后的冻存液置于冰上备用, 使用后剩余的冻存液应丢弃。

#### (二) 细胞冻存

1. 在摇瓶中培养 EasyStyle™ 293-F 细胞, 当细胞密度达到  $0.5 - 1 \times 10^6$  个 /mL 时进行收获。将细胞悬液转移至无菌离心管。
2. 采用台盼蓝拒染法测定细胞活力和总细胞数, 计算使最终细胞密度达到  $1 \times 10^7$  个 /mL 所需的冻存液体积。
3. 室温下  $100 \times g$  离心细胞 5 分钟, 小心吸除上清培养基。
4. 用预冷的冻存液重悬细胞沉淀, 使细胞密度达到  $1 \times 10^7$  个 /mL。
5. 将重悬后的细胞悬液分装至冻存管中, 每管 1mL。
6. 将冻存管放入程序降温盒或使用程控降温仪, 按照每分钟降温  $1^\circ\text{C}$  的速率进行降温。
7. 待冻存管温度降至  $-80^\circ\text{C}$  后, 将其转移至液氮中进行长期保存。冻存 24 小时后, 可按照细胞复苏步骤解冻少量细胞, 检测细胞活力和复苏情况。

## 五、细胞转染

### (一) 实验前准备

1. 准备健康且活力 > 90% 的悬浮 EasyStyle™ 293-F 细胞，根据转染实验所需细胞数量进行细胞扩增。
2. 确保纯化的目的质粒 DNA 无菌、无污染，浓度为 1mg/mL。
3. 提前将 EasyStyle™ 293 表达培养基预热至 37°C，OptiPRO™ SFM 恢复至室温。
4. 准备 125-mL 聚碳酸酯一次性无菌透气盖锥形瓶、无菌一次性聚碳酸酯扣盖管、37°C 恒温摇床 (设置为 135rpm，含 8% CO<sub>2</sub> 湿润环境)。

### (二) 30mL 体系转染操作 (优化条件)

1. 转染前约 24 小时，将 EasyStyle™ 293-F 细胞以  $6 - 7 \times 10^5$  个 /mL 的密度传代，放入 37°C、8% CO<sub>2</sub>、135rpm 的恒温摇床培养。
2. 转染当天，测定细胞密度，应达到  $1.2 - 1.5 \times 10^6$  个 /mL，将细胞密度调整为  $1 \times 10^6$  个 /mL。确保细胞活力 > 90%，取 30mL 细胞悬液加入到 125-mL 摇瓶中。
3. 轻轻颠倒 EasyStyle™ PLUS 转染试剂管数次，使其充分混匀，避免涡旋振荡。
4. 在无菌管中，将 37.5μg 质粒 DNA 加入 OptiPRO™ SFM 中，定容至 0.6mL，轻轻混匀；在另一无菌管中，将 37.5μL EasyStyle™ PLUS 试剂加入 OptiPRO™ SFM 中，定容至 0.6mL，轻轻颠倒混匀 (切勿涡旋)。立即将稀释后的 EasyStyle™ PLUS 试剂加入稀释后的 DNA 溶液中，总体积变为 1.2mL，轻轻混匀。
5. 将 DNA - 脂质混合物室温孵育 10 分钟，使复合物充分形成，孵育时间不得超过 20 分钟。
6. 缓慢将 1.2mL DNA - 脂质混合物加入含有细胞的 125-mL 摇瓶中，同时缓慢旋转摇瓶，使混合物均匀分散。
7. 将转染后的细胞培养物放入 37°C、8% CO<sub>2</sub> 的恒温摇床，转速 135rpm 继续培养。在培养的前 6 - 7 天，无需更换或补充培养基。
8. 转染后 4 - 8 小时，部分蛋白质可能开始表达；转染后 1 - 7 天，通常可获得最大蛋白质产量，但具体时间取决于所表达的蛋白质。

### (三) 转染条件优化

1. 首次表达某种蛋白质时，在转染后 1 - 9 天进行时间进程实验，以确定蛋白质产量的峰值时间，并监测细胞活力。
2. 对于 30mL 培养体系，尝试使用 24 - 42μg DNA 和 24 - 42μL EasyStyle™ PLUS 试剂，优化转染条件。
3. 若通过表达 GFP 类荧光蛋白评估转染效率，建议在转染后 24 小时开始监测培养物。但需注意，转染效率可能在实验过程中下降，而蛋白质产量仍可能增加，因此不能仅依据转染效率评估结果，必须同时测定蛋白质产量。

### (四) 放大转染规模

1. 若需进行更大体积的转染，按照培养体积等比例放大各试剂的用量。参考如下建议条件：
  - 250mL 培养体系 (使用 1L 摇瓶)：细胞总数  $2.5 \times 10^8$  个，DNA 用量 312.5μg (优化范

围 200 - 350 $\mu$ g), 稀释至 5mL; EasyStyle™ PLUS 试剂用量 312.5 $\mu$ L (优化范围 200 - 350 $\mu$ L), 稀释至 5mL。

- 1L 培养体系 (使用 3L 摇瓶): 细胞总数  $1 \times 10^9$  个, DNA 用量 1.25mg (优化范围 0.8 - 1.4mg), 稀释至 20mL; EasyStyle™ PLUS 试剂用量 1.25mL (优化范围 0.8 - 1.4mL), 稀释至 20mL。
2. 对于大于 30mL 的培养体积, 若摇床产生泡沫, 应适当降低摇床转速。在 1L 培养体系中, 建议转速为 90rpm。由于转染效率可能随体积增加而降低, 因此建议对大规模转染条件进行优化。

## 六、实验结果检测

1. 若使用 pCMVSPORT- $\beta$ gal 作为阳性对照, 可通过检测  $\beta$  - 半乳糖苷酶活性评估转染效果。使用细胞裂解液, 采用 FluoReporter® lacZ / 半乳糖苷酶定量试剂盒 (Catalog no. F - 2905) 进行检测。
2. 根据实验目的, 选择合适的方法检测目的蛋白的表达, 如 Western blot、ELISA 等。对于分泌型 IgG 蛋白, 通常在转染后 5 - 7 天可达到产量峰值。

## 七、常见问题及解决方法

### (一) 细胞培养问题

问题	原因	解决方法
解冻后无活细胞	冻存细胞保存不当	订购新的细胞冻存管, 储存于液氮中, 解冻前一直保存于液氮
自制细胞冻存管细胞无活力	冻存细胞密度不当; 冻存液配方错误; 使用高代次细胞冻存; 冻存操作不规范	按照 $1 \times 10^7$ 个 /mL 的密度冻存细胞; 使用 90% 新鲜 EasyStyle™ 293 表达培养基和 10% DMSO 配制冻存液; 使用低代次 (<30 代) 细胞冻存; 严格按照细胞冻存步骤操作; 获取新的 EasyStyle™ 293-F 细胞
解冻培养基错误	使用了错误的解冻培养基; 添加了影响细胞生长的抗生素	使用 EasyStyle™ 293 表达培养基 (使用前预热); 不添加抗生素
摇床设置错误	摇床转速、温度或 CO <sub>2</sub> 浓度设置不当	将摇床设置为 37°C、135rpm, 8% CO <sub>2</sub> 湿润环境
细胞稀释过度	细胞接种密度过低	离心细胞培养物, 在较小体积的培养基中培养细胞
细胞生长	生长培养基错误; 添	使用 EasyStyle™ 293 表达培养基 (使用前预热); 不添

问题	原因	解决方法
长缓慢	加了影响细胞生长的抗生素；摇床设置错误	加抗生素；将摇床设置为 37°C、135rpm，8% CO <sub>2</sub> 湿润环境
培养基产生泡沫	摇床速度过快；培养瓶体积过小	适当降低摇床速度，直至泡沫消失；使用至少为培养体积 2.5 倍大小的培养瓶
细胞老化	使用高代次细胞；细胞培养时间过长	使用传代次数小于 30 代的健康 EasyStyle™ 293-F 细胞，避免细胞过度生长
细胞培养物结块	培养过程中搅拌不充分；细胞传代不规律；细胞密度过高或过低	充分搅拌培养物，建立规律、频繁的细胞传代计划，维持细胞在推荐密度范围内培养

## (二) 转染和蛋白质生产问题

问题	原因	解决方法
转染效率低和/或蛋白质产量低	细胞传代次数过多 (> 30 代)；转染前 24 小时未传代；细胞培养不当；转染时培养基中添加了抗生素；EasyStyle™ Plus 试剂处理不当；使用低质量的表达构建体质粒 DNA；转染条件不佳；DNA 未灭菌；目的基因对细胞有毒性；蛋白质收获时间不当	解冻一批新的低代次细胞；转染前约 24 小时，将细胞以 $6 - 7 \times 10^5$ 个 /mL 的密度传代；严格按照细胞传代培养步骤操作；转染时不添加抗生素；将 EasyStyle™ Plus 试剂储存于 4°C，使用时轻轻颠倒混匀，避免涡旋；不使用小量制备的质粒 DNA 进行转染，使用 PureLink® HiPure 质粒提取试剂盒制备低内毒素污染的质粒 DNA；使用阳性对照质粒 pCMV SPORT-βgal 进行转染，评估转染条件；通过表达 GFP 类荧光蛋白评估转染效率（建议转染后 24 小时开始监测）；调整 DNA 和 EasyStyle™ PLUS 试剂的用量；对 DNA 进行灭菌处理；避免构建含有激活癌基因或有害基因的质粒；尝试使用 EasyStyle™ PLUS CHO 表达系统；首次表达蛋白质时，在转染后 1 - 9 天进行时间进程实验，确定蛋白质产量峰值时间并监测细胞活力

## 八、注意事项

1. 所有与细胞接触的溶液和设备必须无菌，操作过程中始终遵循无菌技术，在超净工作台内进行实验。
2. 实验开始前，确保已建立细胞系（至少传代 5 次），并保存有冻存细胞。建议使用低代次（< 30 代）细胞进行实验。收到细胞后，应冻存多管细胞，以确保有足够的低代次细胞供应。
3. EasyStyle™ 293 表达培养基对光敏感，使用和储存过程中应避免光照。
4. 处理 EasyStyle™ 293-F 细胞时，应按照生物安全 2 级标准操作，将其视为潜在的生物危害材料。
5. 转染实验时，务必设置阳性对照（pCMV SPORT-βgal）和阴性对照（无 DNA 和 EasyStyle™ PLUS 试剂），以便评估实验结果。
6. 本产品仅用于科研，不得用于动物或人类的诊断、治疗用途。