

Grace's Insect Medium, Unsupplemented

G778238

储存温度 2-8℃ 储存

产品介绍

Grace 昆虫培养基是由 Grace 改良的 Wyatt 培养基，最初设计用于澳大利亚白星橙天蚕蛾 (*Antheraea eucalypti*) 细胞的生长。适当补充添加剂后，Grace 昆虫培养基目前广泛用于草地贪夜蛾细胞 Sf9 和 Sf21 的生长。Sf9 和 Sf21 细胞通常用于借助杆状病毒表达载体系统 (BEVS) 来表达重组蛋白。Grace 昆虫培养基含有多种细胞培养所需的氨基酸、维生素、无机盐等成分，不含蛋白、脂类或生长因子，因此本产品需要补充剂，通常需搭配 10% 胎牛血清 (FBS) 或无血清添加物使用。Grace 昆虫培养基需要环境 CO₂ 以维持生理 pH 值。

本产品含有：L-谷氨酰胺、碳酸氢钠；不含：酚红、乳清蛋白水解物、酵母粉、蛋氨酸。

使用说明

(一) 培养条件

- 1、完全培养基：Grace 为基础培养基，作为生长培养基使用时需添加 10% 的 FBS，配制成 Grace 昆虫细胞完全培养基。作为转染培养基使用时不需添加 FBS。
- 2、悬浮培养摇床设置：27-28℃，100% 湿润空气，120-140rpm (振幅 25mm) 或 90-110rpm (振幅 50mm)。
- 3、贴壁培养培养箱设置：27-28℃，100% 湿润空气。

(二) 细胞复苏

- 1、在 37℃ 水浴中，迅速 (<2 分钟) 解冻一管冻存细胞。当最后一丝冰融化时，迅速从水浴中移出细胞冻存管。
- 2、轻轻混匀并吸出管中细胞悬液。悬浮培养：转移细胞悬液至含有 20-30mL 的 Grace 昆虫细胞完全培养基的 125mL 摇瓶中，使细胞接种密度为 $3-5 \times 10^5$ 个/mL；贴壁培养：转移细胞悬液至含有 5mL 的 Grace 昆虫细胞完全培养基的 T25 培养瓶中，使细胞接种密度为 $2-5 \times 10^4$ 个/cm²。
- 3、悬浮培养：将摇瓶放到摇床中进行细胞培养；贴壁培养：将培养瓶放到培养箱中进行细胞培养。
- 4、细胞复苏 3-5 天后，挑选对数生长期的细胞进行传代。建议细胞传代至少 3 次，待其完全复苏，倍增时间稳定后，再进行细胞应用。

【注】由于复苏的昆虫细胞非常脆弱，一般无需离心去除 DMSO。

(三) 悬浮细胞传代

【注】昆虫细胞对机械剪切力非常敏感，请注意操作轻柔，避免过多的机械损伤。

1、从摇床中取出含细胞悬液的摇瓶，无菌取样并计数，当细胞满足以下条件时进行传代：

①对数生长期；②细胞存活率 > 90%；③活细胞密度 > 2×10^6 个/mL。

【注】如果观察到细胞碎片，请将细胞悬液在 $100 \times g$ 下离心 5-10 分钟，然后将细胞沉淀重悬在新鲜的 Grace 昆虫细胞完全培养基中，以减少细胞碎片和代谢废物副产物的积累。建议每 1-2 周使用离心的方式彻底更换一次培养基；如果距复苏或者上次传代已满 5 天，活细胞密度仍然不达要求，请离心彻底更换培养基或者复苏新的冻存细胞。

2、按接种密度为 $0.5-1.0 \times 10^6$ 个/mL 和最终传代体积，计算所需细胞悬液的量。

3、在新的无菌摇瓶中加入合适体积的预热的 Grace 昆虫细胞完全培养基；然后按照计算的所需量将细胞接种入此摇瓶中。

4、将摇瓶继续放到摇床中进行细胞培养。当活细胞密度达到 2×10^6 个/mL (2-4 天) 时，可以再次进行传代。

【注】在细胞传代 30 次或者持续 3 个月以上时，需要复苏新的冻存细胞进行传代。

(四) 贴壁细胞传代

1、当细胞融合度达到 80-90% 时，可以进行传代。吸出培养瓶中的旧培养基和脱落的细胞，然后用 4mL (T25 瓶用量) 预热的 Grace 昆虫细胞完全培养基重悬细胞。反复轻轻吹打单层贴壁细胞进行重悬。

【注】观察细胞脱落情况，如果需要，可轻轻敲打瓶壁，帮助细胞解离。

2、将细胞悬液转移至无菌的 15mL 离心管中，细胞将会在 1-2 分钟快速沉降于管底。轻轻吹打分散细胞。

3、进行细胞计数，确定细胞存活率，计算活细胞密度。

4、在含有预热完全培养基的培养瓶 (5mL/T25 瓶) 中加入 $2-5 \times 10^4$ 个/cm² 的活细胞，轻轻混匀。

5、将培养瓶继续放到培养箱中进行细胞培养。当细胞融合度达到 80-90% (3-5 天) 时，可以再次进行传代。

(五) Bacmid 转染 (仅供参考，具体步骤请按照转染试剂要求进行)

1、以六孔板为例：细胞按照 8×10^4 个/孔，用 Grace 昆虫细胞完全培养基重悬并接种到六孔板内，每孔 2mL，使细胞密度能达到约 70-90%。放置于培养箱中培养。

【注】具体的接种细胞数量请根据细胞类型、大小和细胞生长速度等而定。

2、至少 1 小时后，将完全培养基更换为不含血清的 Grace 培养基，每孔 2mL。

3、按照转染试剂要求，用不含血清的 Grace 培养基制备转染试剂-bacmid 混合物，并均匀滴加到六孔板的细胞中，随后轻轻混匀。

4、放置于培养箱中培养，3-5 小时后将培养基更换为完全培养基。

5、继续在培养箱培养约 96 小时后，收集每孔的培养液， $500 \times g$ 离心 5 分钟，获得的上清即为 P1 代杆状病毒。P1 代病毒应 2-8℃ 避光保存，如果包装病毒时的完全培养基为其他无血清培养基，则宜添加 FBS 至终浓度为 2% 以保护病毒不被蛋白酶降解。

【注】P1 代病毒近期不使用的情况，可以适当分装后-80℃长期保存。尽量避免反复冻融病毒，反复冻融可能导致病毒滴度下降 10-100 倍。

6、为获得更高滴度的杆状病毒，可以使用 P1 代病毒感染昆虫细胞等来获得 P2 代杆状病毒。具体操作请参照 Bac-to-Bac Baculovirus expression system 的相关操作规程。

【注】由于杆状病毒在每一代的扩增过程中均易出现缺少突变，因此推荐最多扩增至 P3 代病毒。

（六）细胞冻存

- 1、选取培养至对数生长期、细胞存活率 > 90%、状态良好的细胞进行冻存。
- 2、细胞计数并按照冻存密度为 $1-3 \times 10^7$ 个/mL/支计算所需细胞量。准备程序性冻存液：45% 新鲜完全培养基+45% 培养上清液+10%DMSO；或者直接使用无蛋白非程序性冻存液。
- 3、将细胞以 $100 \times g$ 离心 5-10 分钟，弃去上清，使用混匀的冻存液重悬，1mL/管分装至冻存管。
- 4、如使用程序性冻存液则需要程序性降温至-80℃过夜，如使用无蛋白非程序性冻存液则可直接放入-80℃过夜，次日转移至液氮保存。

产品优势

- 1、最经典的昆虫细胞培养基，含有多类昆虫细胞培养所需的氨基酸、维生素、无机盐等成分，有助于维持昆虫细胞的健康生长和代谢活动。
- 2、支持昆虫细胞的悬浮生长和贴壁生长。
- 3、高效转染杆状病毒质粒。
- 4、注射用水配制，参考 GMP 管理体系生产，工艺稳定，批间差异小。
- 5、原料均选用自产或者经过严格检测和纯化的低内毒素高纯药用级别原料。
- 6、严格的质量检测程序，远高于同行业要求指标，产品性能突出，指标媲美进口。
- 7、热原（内毒素）水平低，减少外源内毒素干扰。

注意事项

- 1、为保持本产品的最佳使用效果，请勿进行冻融处理。
- 2、本产品为无菌包装，请注意无菌取用。
- 3、本培养基中碳酸氢钠含量为 350mg/L，为了能与空气中的二氧化碳达到平衡从而起到缓冲作用，可以直接于无二氧化碳培养箱中培养昆虫细胞，而不能放于 5%二氧化碳环境中。
- 4、为了您的安全和健康，操作时请穿着实验服并佩戴一次性手套。