LipoInsect 转染试剂(昆虫细胞转染专用)

产品详情

产品货号	产品名称	储存条件
S11031	LipoInsect 转染试剂(昆虫细胞转染专用)	4℃/-20℃

产品简介：

1.LipoInsect 转染试剂(LipoInsectTransfection Reagent)是一种基于阳离子脂质体等最新转染技术的非常高效的新型昆虫细胞转染试剂。本产品转染效率高、操作简单、细胞毒性低、重复性好，达到了国际最主流昆虫细胞转染试剂的转染效果。

2.本产品适用于将 pFastBac1 等杆状病毒表达载体质粒 DNA 转染到 Sf9、Sf12 和 High Five 等昆虫细胞以用于 Bac-to-Bac®、BaculoDirect 和 InsectSelect 表达系统的蛋白表达。

3.LipoInsect 转染试剂专门针对昆虫细胞进行了多方面的优化，转染效率非常高，对昆虫细胞 Sf9 的实测阳性率可达 98%以上(参考图 1)。常规的脂质体细胞转染试剂如 Lipo6000 转染试剂、Lipofectamine 2000 Reagent 等都是无法顺利转染昆虫细胞的，必须使用昆虫细胞专用的转染试剂。

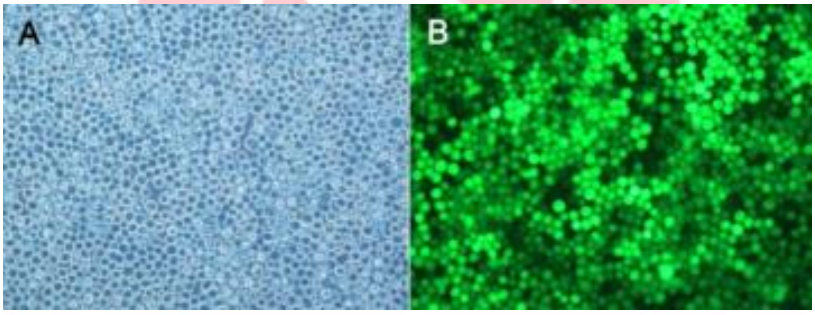

图 1.LipoInsect 转染试剂用 pFastBac1-EGFP 质粒转化 DH10Bac 菌株后抽提获得的 bacmid 转染 Sf9 细胞 96 小时后的实拍效果图。A.明场照片；B.荧光照片。

4.LipoInsect 转染试剂操作简单，使用方法和常用的 Cellfectin®IIReagent 完全一致。

5.LipoInsect 转染试剂转染过表达质粒后，通常 96 小时后达到较高的蛋白表达水平。

6.LipoInsect 转染试剂的转染效果可以通过转染表达 EGFP 等荧光蛋白的 bacmid 进行快速鉴定。

7.如果用于六孔板的细胞转染，一个包装的本转染试剂大约可以转染 12 个孔。

保存条件：

4℃保存。长期不使用可以-20℃保存。

使用说明：

1.Bacmid 转染：

a.昆虫细胞培养(以六孔板为例，其它培养板或培养皿可参考六孔板)：按照每孔约 80 万 Sf9 或 Sf21 细胞(具体的细胞数量据细胞类型、大小和细胞生长速度等而定)用正常的细胞培养液接种到六孔板内，使细胞密度能达到约 70-90%。在 27-28℃培养，后续转染和培养也在该温度下进行。

b.15 分钟后，将正常的细胞培养液更换为平板培养液(含 1.5%胎牛血清不含抗生素的 SFX-INSECT 培养液)每孔 0.8ml。

c.参考下表，对于待转染的六孔板中每一个孔的细胞，取两个洁净无菌离心管，分别加入 100μl 不含血清和抗生素的 SFX-INSECT 昆虫细胞培养液用于稀释 bacmid 和转染试剂。其中一管加入 16μgbacmid，并用枪轻轻吹打混匀；另一管加入 8μl LipoInsect 转染试剂，用枪轻轻吹打混匀，或者轻微 Vortex 混匀，但不可离心。稀释的 bacmid 和转染试剂室温静置约 2-5min(最多不得超过 30 分钟)。随即把稀释的 bacmid 用移液器轻轻加入到稀释的 LipoInsect 转染试剂中，轻轻颠倒离心管或者用枪轻轻吹打混匀，室温静置 15-30 分钟。

	96-well	48-well	24-well	12-well	6-well	6cmdish	10cmdish
LipoInsect 转染试剂	0.32μl	0.8μl	1.6μl	3.2μl	8μl	16μl	48μl
无血清无抗生素昆虫培养液	4μl	10μl	20μl	40μl	100μl	200μl	600μl
Bacmid	640ng	1.6μg	3.2μg	6.4μg	16μg	32μg	96μg
无血清无抗生素昆虫培养液	4μl	10μl	20μl	40μl	100μl	200μl	600μl
稀释好的 bacmid 滴加到稀释好的 LipoInsect 转染试剂中，混匀后再室温静止放置 15-30 分钟							
每孔加入的混合物的量	8μl	20μl	40μl	80μl	200μl	400μl	1200μl
按照上述用量每孔均匀滴加 LipoInsect 转染试剂和 bacmid 混合物，3-5 小时后更换培养液							

注 1：对于六孔板中一个孔的细胞，Bacmid 用量建议在 8-24μg 范围内进行适当调节。最佳的转染条件，不同的细胞类型和培养条件有所不同，可以在上述推荐范围内自行优化转染条件。

注 2：Bacmid 的浓度在稀释前宜控制在 0.5-5μg/μl 范围内。

注 3：对于多个孔转染相同数量相同 bacmid 的情况可以把这些孔所需的 DNA 混合物和 LipoInsect 转染试剂分别合并在一起稀释，然后把稀释好的 bacmid 滴加到稀释好的 LipoInsect 转染试剂中，混匀并室温放置 30 分钟后，可以按照推荐用量滴加到细胞培养器皿内。

注 4：对于其它培养板或培养器皿，各种试剂的用量可以按照细胞培养器皿的培养面积(参考附录 2)按比例进行换算。

d. 按照六孔板每孔 200μl LipoInsect 转染试剂-bacmid 混合物的用量，均匀滴加到整个孔内，随后轻轻混匀。

e. 为达到最高的转染效率，细胞在转染后培养 3-5 小时后宜更换为新鲜的完全培养液(对于 Sf9 细胞，推荐在转染 4 小时后更换培养液)。

f. 继续在 27-28℃培养约 96 小时后，收集每孔的培养液，500g 离心 5 分钟，获得的上清即为 P1 代杆状病毒(病毒滴度通常为 1×10^{6}~1×10^{7}pfu/ml)。P1 代病毒 4℃避光保存，如果包装病毒时的细胞培养液为无血清培养液宜添加胎牛血清至终浓度为 2%以保护病毒被蛋白酶降解。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。

g. 为获得更高滴度的杆状病毒，可以使用 P1 代病毒感染 Sf9 或 Sf21 细胞等来获得 P2 代杆状病毒(病毒滴度通常为 1×10^{7}~1×10^{8}pfu/ml)。具体操作请参照昆虫细胞 Bac-to-Bac Baculovious expression system 的相关操作规程。大致的步骤为使用 P1 代病毒感染 2×10^{6} 个贴壁约 1 小时的 Sf9 或 Sf21 细胞，推荐的病毒的 MOI 为 0.05-0.1，过高的 MOI 会导致获得的病毒质量下降。27-28℃培养 48 小时后，同步骤 f 收集每孔的培养液，随后 500g 离心 5 分钟，获得的上清即为 P2 代杆状病毒。P2 代病毒的保存条件同 P1 代。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。

常见问题：

1. 转染效率低：

a. 优化 bacmid 与 LipoInsect 转染试剂比例，对于难转染的细胞，可适当加大质粒用量。

b. 使用高纯度、无菌、无污染物的 bacmid 进行转染，DNA 纯度方面 A260/A280 比值要接近 1.8，通常宜控制在 1.8-1.9 范围内，偏低则有可能有蛋白污染，偏高则有可能有 RNA 污染。可以使用萨默斯生产的质粒抽提试剂盒中的溶液 I、II、III，参考附录 1 进行抽提，以保证可以获得较高的转染效率。

c. 昆虫细胞转染时状态良好，细胞密度达 70-90%时才可进行转染，过稀或过密都可能影响转染效率，不同细胞的最佳转染密度需要自行摸索。悬浮细胞宜在对数生长期进行转染。

d. 需使用无抗生素和无血清培养液配制 LipoInsect 转染试剂和 bacmid 的混合物。

e. 转染后培养时间不足，而被误以为转染效率偏低。不同细胞转染后至显著表达所需要培养的时间通常为 72-96 小时。

f. 检查细胞是否有支原体感染，支原体感染会影响细胞增殖，并很可能影响转染效率。

g. 如果没有检测到目的蛋白表达，应该仔细核对转染质粒的测序结果，确保测序结果和读码框完全正确。

2.细胞毒性较大：

a.缩短转染时间，在转染后较短时间内更换新鲜的细胞培养液。

b.减少 bacmid 用量，按照比例减少 LipoInsect 转染试剂。

c.检查是否转染时细胞密度太低。

注意事项：

1.使用高纯度的 DNA 有助于获得较高的转染效率。

2.转染前昆虫细胞必须处于良好的生长状态。

3.需自备不含抗生素的无血清昆虫培养液，例如 SFX-INSECT(SH30278,Hyclone)、Grace’sInsect Medium,Unsupplemented(11595030,Gibco)、Grace’sInsect Medium,Supplemented(11605094,Gibco)等。

4.LipoInsect 转染试剂不能 vortex 或离心，宜缓慢晃动混匀。

5.LipoInsect 转染试剂使用后请立即盖好盖子，避免长时间暴露在空气中，影响转染效率。

6.本产品对人体有害，操作时请小心，并注意有效防护以避免直接接触人体或吸入体内。

7.为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。

8.为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

9.实验结果受多种因素影响，相关处理仅限于产品本身，不涉及其他赔偿。

免责声明：本公司将不为任何不正常使用此产品时所发生的意外负责。

北京伊事达科技有限公司

电话:13564444959

官网:www.followme-shop.com

地址:北京市海淀区东北旺西路58号尚科办公社区C区一楼

公众号　客服