

CHO SFM Kit 细胞瞬时转染蛋白表达使用说明书

【产品信息】：

产品名称	产品货号	包装规格	存储条件	有效期
ACE CHO SFM	ACE06101	1000ml	2~8℃ 避光保存	9 个月
ACE Trans	ACE05102	1ml*5	-20℃	12 个月
ACE ProEnhance	ACE05103	1ml*6	-20℃	12 个月
ACE PepPlus	ACE05104	20ml	2~8℃ 避光保存	9 个月



温馨提醒：

- (1) 产品切勿紫外照射；
- (2) 使用前无需预热处理；
- (3) 储存培养基请使用医用冰箱，切勿冷冻。
- (4) 低温冷冻产品（-20℃储存），建议用户根据需求分装冻存，避免反复冻融；开封后在 4℃存储，建议在一周内用完。

【适用范围】：仅限于科研使用，不适于临床诊断和治疗。

【主要成分】：该产品为无血清培养基，不含动物源成分。主要含糖类、氨基酸、无机盐及微量元素等。

【预期用途】：本系统适合于 CHO 细胞低密度悬浮培养、DNA 瞬时转染及蛋白表达。

【运输要求】：

ACE CHO SFM：湿冰避光运输。

ACE ProEnhance:湿冰避光运输。

ACE Trans:湿冰避光运输。

ACE PepPlus:湿冰避光运输。

1. 实验步骤

本实验方法根据 CHO 细胞的三角烧瓶悬浮培养经验总结而成，但此蛋白表达系统同时适用于其它悬浮培养方式的 CHO 细胞的 DNA 转染及蛋白表达。

1.1 转染细胞的准备

(1) 将 CHO 细胞置于 5%的 CO₂ 恒温摇床中，37℃、120rpm 恒温震荡培养，确定其细胞密度及存活率。为确保转染效果，建议使用生长处于对数生长期（密度约为 3-5×10⁶cells/ml），存活率大于 97% 的细胞转染；

【技术支持】：如您遇到任何问题，请与我司技术支持人员联系， Tel:0756-3631186

(2) 待细胞密度长至 $3-5 \times 10^6$ cells/ml 时, 计算并吸取所需细胞悬液的体积, 置于离心管中, 1000rpm 离心 5min, 弃上清, 将细胞重悬于新鲜 ACE CHO SFM 中, 使其密度为 3.0×10^6 cells/ml, 客户也可根据实际需求摸索;

(3) 接种好的细胞放回培养箱中, 震荡培养 10min 后做转染。

操作要点及注意事项:

- 请确保细胞处于对数生长期, 使用处于非对数生长期的 CHO 细胞做转染, 转染效率及表达量会偏低;
- 使用非细胞计数仪的客户, 若因细胞计数误差较大, 应注意尽量控制细胞转染密度为 $2.5 \sim 3.5 \times 10^6$ cells/ml;
- 请确保细胞存活率高于 97%, 使用状态不佳的细胞转染效率、表达量、表达天数会受影响;
- 细胞稀释至 3.0×10^6 cells/ml 后, 细胞悬液需置于摇床中平衡 10min 再做转染。
- 转染效率与质粒大小有关, 质粒较大时, 建议接种低细胞密度进行转染, 客户可根据自身质粒大小摸索合适的细胞转染密度 ($\leq 3.5 \times 10^6$ cells/ml)。
- 摇床参数设置建议: 温度 $36-37^\circ\text{C}$, CO_2 浓度为 5%, 转速 $\leq 120\text{rpm}$ (振幅 26); 不同振幅摇床计算公式如下:

如振幅 50 按照公式计算: $m \times \omega_1^2 \times \frac{26}{2} = m \times \omega_2^2 \times \frac{50}{2}$, 所以 ω_1 和 ω_2 的关系是: $\omega_1 \approx 1.4 \omega_2$, 就是 86rpm 左右。

1.2 瞬时转染 (以转染 100ml 细胞悬液为例)

- 准备两支 15ml 无菌离心管, 在其中一支中加入 5ml ACE CHO SFM 和 $100\mu\text{g}$ 无菌质粒 DNA, 轻轻吹打混匀; 取另一支离心管, 加入 5ml ACE CHO SFM 和 $500\mu\text{l}$ 的 ACE Trans 转染试剂, 轻轻吹打混匀;
- 将含有转染试剂的离心管中所有液体转移至含质粒的离心管中, 轻轻吹打混匀;
- 室温下静置 10min 制备出质粒-载体复合物 (如图 1);
- 从恒温摇床中取出细胞, 边摇边加入制备好的质粒-载体复合物, 放回 CO_2 恒温摇床中震荡培养。3 小时后可根据需要加入适量抗生素。

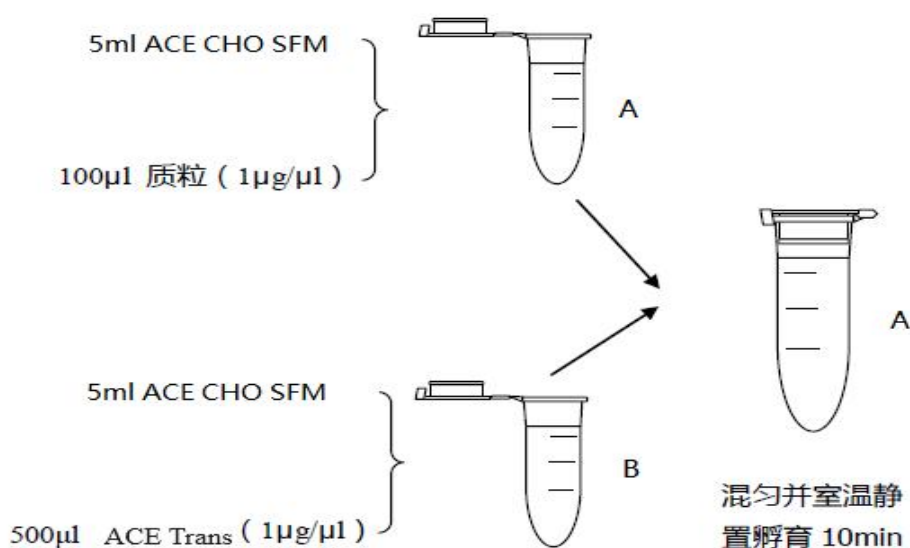


图 1: 质粒-载体复合物的配制及蛋白表达

操作要点及注意事项:

- ACE CHO SFM 的使用总量为细胞悬液的 1/10; 质粒使用量为 1 μ g/ml;
- 质粒: 转染试剂的质量比例可为 1: 3、1: 4、1: 5、1: 6, 多数质粒比例使用 1: 5 效果最好, 少数质粒使用其他比例, 客户可根据自己的实际经验进行条件摸索, 但不建议使用低于 1: 3 或高于 1: 6 的比例;
- ACE Trans (浓度为 1 μ g/ μ l) 为透明液体, 使用前需摇匀或吹打均匀;
- 质粒-转染试剂孵育时请勿摇晃, 剧烈震荡可能会导致孵育失败;
- 质粒-载体复合物制备好后再从摇床中取出细胞, 边摇边滴加复合物。

1.3 产物表达与检测

- 转染 24 小时后可加入 6 μ l/ml CHO 细胞蛋白表达增强剂 (ACE ProEnhance), 以增加产物表达量;
- 20 μ l/ml 的瞬时转染营养添加剂 (ACE PepPlus 50 $\times$) 可提高产物的表达量, 可在转染 24 小时后添加一次;
- 转染后第 6~8 天测定产物表达量;
- 多数重组蛋白的表达量在转染后第 7 天左右可达到最高值, 客户可根据细胞状态及表达量选择适宜的收获时间。

操作要点及注意事项:

- ACE ProEnhance 原液浓度为 100%, 工作浓度为 0.6%, 添加后细胞生长速度可能变缓, 此为正常现象;
- ACE PepPlus 是含有植物水解物的营养添加剂, 可选择性添加, 以补充培养基中消耗的营养成分, 从而提高蛋白表达量;
- 用户在根据细胞存活率收获上清时, 建议不要在细胞存活率低于 75% 以下时收获。

2. 常见问题及解决方法

2.1 转染效率低

如果细胞转染效率低, 可能由以下原因造成:

- 细胞存活率低于 95%;
- 细胞增长速度过慢;
- 细胞转染前结团 (正常生长的细胞在 ACE CHO SFM 培养液中一般不存在结团现象, 结团可能是培养液中混入其它物质或由大量死亡细胞及细胞分泌物等造成);
- 使用的质粒 DNA 含有过多的蛋白质或其它物质, 或含有过多的内毒素;
- 质粒与转染试剂的比例不当。不同质粒可能需要使用不同比例的转染试剂, 范围一般在 1:3 至 1:6 之间;
- ACE CHO SFM 体积使用不当。每 100ml 细胞悬液加入 ACE CHO SFM 的体积为 10ml, 即比例为 10:1。

2.2 转染后细胞存活率降低

转染后细胞存活率降低属于正常现象, 转染 7 天后的存活率一般在 70% 以上。客户可适当增加转染后的细胞培养天数, 以尝试增加蛋白表达量, 但尽量不要让细胞存活率低于 70%。

2.3 转染后细胞结团

（1）若转染后出现松散的细胞结团现象，可能是细胞成团粘附于瓶壁上并在震动中脱落下来所致，这种情况多数是摇瓶本身不干净或细胞存活率低而引起。若转染后细胞结团现象比较严重，可在转染 1 天后加入抗结团剂例如硫酸葡聚糖（使用浓度为 20mg/L 左右）。