

套件内容和存储

运输/储存EasyStyle Plus 293 表达系统的组件在运输时应按下表所列存储。有关每种试剂的供应量和组成的更多信息,请参见下文。

内容	运输	贮存
293-F 细胞 (可选)	干冰	液氮
EasyStyle Plus 试剂EasyStyle	蓝冰	+4°C
293 表达培养	室温 +4°C,避光	
SFM 培养基	室温 +4°C,避光	
PGTK-ES 载体	蓝冰	-20°C

293-F 细胞

储存条件:液氮

供应量:一瓶含有 1×10^7 个细胞组成:1 mL 细胞在 90% 293 表达培养基和 10% DMSO 中。

EasyStyle Plus 转染试剂

储存条件:+4°C,不要冷冻。

供应量:1 mL (足够 25 次转染和 30 mL 体积中的一个对照,每次转染使用 37.5 μ L EasyStyle Plus Reagent)

EasyStyle 表达培养基

储存条件:+4°C,避光

包装规格:1升

成分:专有的、确定的、无血清培养基**搭配专有的添加剂**

SFM培养基

储存条件:+4°C,避光

供应量:100 毫升

组成:专有的、确定的、无血清培养基

载体

储存条件: -20°C

供应量:25 μ g 成分:0.5 μ g/ μ L 在 10 mM Tris-HCl,pH 7.4,5 mM NaCl,0.1 mM EDTA 中

产品用途

仅供研究使用。不用于任何动物或人类诊断或治疗用途。

实验方法

一般细胞的处理

按照以下一般指南培养和培养 EasyStyle 293-F 细胞。

- 所有与细胞接触的溶液和设备都必须是无菌,始终使用适当的无菌技术并在层流罩中工作。开始实验前,确保已建立细胞 (至少 5 段落), 并且手头还有一些冷冻库存。我们建议使用用于您的实验的早期传代细胞 (低于 30 代)。

- 对于细胞的一般维护,当 EasyStyle 293-F 细胞达到密度在 $1-3 \times 10^6$ 个活细胞/mL 之间 (通常每 48-72 小时)。不要稀释低于 0.1×10^6 个活细胞/mL。

- 解冻或传代培养细胞时,将细胞转移到预热的培养基中。

重要的注意事项

拥有生长良好的 EasyStyle 293-F 细胞对于获得高产量的蛋白质表达非常重要,请严格遵循本手册中关于培养 EasyStyle 293-F 细胞的指南以获得最佳效果。

与其他人类细胞系一样,在使用 EasyStyle 293-F 细胞时,应在至少 2 级生物安全防护下作为潜在的生物危害材料进行处理。

准备培养基

对于悬浮生长和转染应用,请使用 EasyStyle 293 表达培养基。

- 不推荐使用抗生素,然而,5 mL/L 的抗生素含有青霉素、链霉素和两性霉素 B 的抗真菌剂可在需要时使用 (。

注意: EasyStyle 293 表达培养基对光极为敏感。为获得最佳效果,请避光保存和使用。

解冻和孵育细胞

介绍

按照以下方案解冻 EasyStyle 293-F 细胞以开始细胞培养。 EasyStyle 293-F 细胞系以小管形式提供,其中含有 1 mL 细胞。

所需材料在开始之前,您需要准备好以下试剂:

- 93-F 细胞
- EasyStyle 293 表达培养基

使用我们不建议在培养基中添加抗生素,因为这可能对细胞生长产生负面影响。

- 125-mL 聚碳酸酯一次性无菌锥形瓶,带通气盖
 - 37°C 培养箱中的轨道摇床,加湿空气为 8% CO₂
 - 确定活细胞和总细胞计数的试剂
-

解冻细胞

1. 将冷冻细胞储存在液氮中,直到准备好使用。解冻和建立细胞: 1. 将细胞冷冻管从液氮中取出, **置于37 °C 水浴快速解冻。**

2. **使用70%乙醇**,在细胞完全解冻之前,对细胞冻存管外部进行去污处理。轻轻打散团块和细胞团块(如果存在),将冷冻管的全部内容物转移到 125-mL 培养瓶中,使用一次性无菌锥形摇瓶,并含有 30 mL 预热的 EasyStyle 293 表达培养基。

3. 在 37°C 的培养箱中培养细胞,135 rpm,8% 的 CO₂。

4. 第二天,确定活细胞计数和总细胞计数,**要求细胞存活率 > 70%**

5. EasyStyle 293-F 细胞在解冻后 24-48 小时通过接种传代培养

重要提示:在用于转染实验之前,传代细胞至少传代 5 代,以便有机会从解冻中恢复。

传代细胞

传代细胞

当密度在 $1-3 \times 10^6$ 个活细胞/mL 之间时,通常每 48-72 小时传代细胞一次。维护 EasyStyle 293-F 细胞时,我们通常使用 125-或 250-mL 聚碳酸酯一次性无菌锥形瓶,带通气盖,分别含有 25-40 mL 或 50-80 mL 总工作体积的细胞悬液。注意:可以使用不带挡板的玻璃烧瓶,但每次使用后都要彻底清洁,以避免潜在的毒性,这在无血清培养中更成问题。

1. 确定活细胞计数和总细胞计数 (参见第 5 页的方案)。
 2. 使用步骤 1 中确定的细胞密度,计算所需的分流比以 $1-2 \times 10^5$ 活细胞/mL 接种新的摇瓶。
 3. 在新鲜预热的 EasyStyle 293 表达培养基中稀释细胞至最终细胞密度为 $1-2 \times 10^5$ 个活细胞/mL。
 4. 在 37°C 的培养箱中培养, 135rpm, 8% CO₂。
 5. 根据需要重复步骤 1-5 以维持或扩大细胞。
-

EasyStyle 293-F 悬浮培养物可以生长为 2-10 个细胞簇。在每次传代培养时可能需要剧烈涡旋 10-30 秒以进行多次传代,直到培养物主要作为单细胞生长。

扩大细胞培养

可以在转瓶或生物反应器中放大 EasyStyle 293-F 培养物。应为每个系统确定和优化适当的旋转器或叶轮速度。

冻存细胞

介绍

您可以直接在含有 10% DMSO 的 EasyStyle 293 表达培养基中冷冻 EasyStyle 293-F 细胞。冷冻 EasyStyle 293-F 细胞系时,我们建议如下: 以 1×10^7 个活细胞/mL 的密度冷冻细胞。

使用由 90% 新鲜 EasyStyle 293 表达培养基和 10% DMSO 组成的冷冻培养基。

本节提供了制备冷冻培养基和冷冻细胞的指南。

冷冻培养基

使用前立即准备冷冻培养基。

1. 在无菌锥形离心管中,将以下试剂混合在一起每需要 1 mL 冷冻培养基: EasyStyle 293 表达培养基 0.9ml, DMSO 0.1ml。
 2. 对冷冻介质进行过滤灭菌,并将试管置于冰上直至使用。
-

冷冻细胞

在开始之前,标记冷冻管并准备冷冻培养基。保持冷冻冰上中等。

1. 在摇瓶中培养所需数量的 EasyStyle 293-F 细胞,当细胞密度达到 $0.5-1 \times 10^6$ 个活细胞/mL时收获。将细胞转移到无菌锥形离心管中。
2. 确定活细胞计数和总细胞计数(参见第 5 页的协议)和计算产生最终细胞所需的冷冻培养基体积 1×10^7 个活细胞/mL 的密度。
3. 在室温下以 $100 \times g$ 离心细胞 5 分钟,并小心吸出培养基。
4. 将细胞重新悬浮在预先确定的冷冻体积中
5. 将冷冻管置于微量离心机架中并分装 1 mL 细胞悬浮到每个冷冻管中。
6. 在自动或手动、可控速率冷冻装置中冷冻细胞

遵循标准程序,对于理想的冷冻保存,冷冻速率应该是每分钟降低 1°C 。

7. 将冷冻小瓶转移到液氮中进行长期储存。
-

转染细胞

介绍

要转染悬浮 EasyStyle 293-F 细胞,您将使用试剂盒中包含的阳离子脂质转染试剂 EasyStyle Plus Reagent。与其他一些无血清培养基配方不同,EasyStyle 293 表达培养基不会抑制阳离子脂质介导的转染。EasyStyle 293 表达培养基经过专门配制,无需更换或添加培养基即可实现悬浮 EasyStyle 293-F 细胞的高转染效率。

EasyStyle Plus Reagent 是一种专有配方,适用于将 DNA 转染到真核细胞中。在 EasyStyle Plus 293 表达系统中。

EasyStyle Plus 转染试剂

- EasyStyle Plus 试剂展示了高转染效率和蛋白质, **无需更换培养基。**

质粒准备

用于转染真核细胞的质粒 DNA 必须是清洁、无菌和游离由苯酚和氯化钠制成。污染物可能会杀死细胞,盐会干扰络合,降低转染效率。

注意:确保您的 DNA 制剂是无菌的,例如在使用前通过 0.22 μm 过滤器进行过滤。

阳性对照

pGTK-ES 作为阳性对照载体提供,用于在 EasyStyle 293-F 细胞中转染和表达。

转染细胞

β-半乳糖苷酶检测

使用试剂盒检测 β-半乳糖苷酶的表达。

需要的材料

在开始之前,您需要准备好以下试剂:

- 悬浮在 EasyStyle 293 中培养的 EasyStyle 293-F 细胞
- 纯化的目的质粒 DNA (1 mg/mL)
- EasyStyle Plus 试剂
- SFM培养基
- EasyStyle 293 表达培养基
- 转染细胞数: 3×10^7 个细胞, 细胞密度建议 1×10^6 细胞/mL
- 质粒DNA 量: 37.5 μg (起始点;可在24–42 μg 之间变化)
- EasyStyle Plus 试剂: 37.5 μL (起始点,可在24–42 μL 之间变化。)

转染细胞

转染程序

按照以下程序转染 30 mL 体积的悬浮 EasyStyle 293-F 细胞。请记住,您可以在转染过程中将细胞保存在 EasyStyle 293 表达培养基中。我们建议您在实验中加入阳性对照 (pCMV SPORT-βgal) 和阴性对照 (无 DNA,无 EasyStyle Plus 试剂),以帮助您评估结果。

1. 转染前约 24 小时,将 EasyStyle 293-F 细胞培养到 $6-7 \times 10^5$ /ml
2. 转染当天,细胞密度应在 $1.2-1.5 \times 10^6$ /mL 左右。
3. 轻轻倒置 EasyStyle Plus Transfection Reagent 试管数次,混合。不要涡旋。
4. 将 37.5 μg 质粒 DNA 稀释到 OptiPRO™ SFM 中,总体积为 0.6 mL 并混合。在单独的试管中,稀释 37.5 μL EasyStyle Plus Reagent OptiPRO™ SFM 至总体积 0.6 mL,并通过倒置离心管轻轻混匀管 (不要涡旋)。立即将稀释的 EasyStyle Plus 试剂加入稀释的 DNA 溶液总体积为 1.2 mL,轻轻混匀。
5. 将 DNA-脂质混合物在室温下孵育 10 分钟,使形成的络合物。不要孵育超过 20 分钟。
6. 将 1.2 mL DNA-脂质混合物缓慢加入到装有细胞的 125 mL 烧瓶中同时慢慢地旋转烧瓶。
7. 在 37°C、8% CO₂ 的轨道摇床平台上孵育转染的细胞培养物,以 **135 转/分** 的速度旋转培养。
8. 转染后 4-8 小时内可检测到蛋白表达,最大蛋白质产量通常在转染后 1 至 7 天之间,取决于表达的蛋白质。

优化蛋白质表达

- 第一次表达蛋白质时,在转染后第 1 天和第 9 天之间确定蛋白质峰值生产,并监测细胞活力。
- 测试不同数量的质粒 DNA 和 EasyStyle Plus 试剂, 30 mL 培养物, 尝试 24–42 μg DNA 和 24–42 μL EasyStyle Plus 试剂。
- 对于分泌型 IgG 蛋白的生产,我们观察到 5-7 天的产量峰值转染后。
- 通过表达 GFP 荧光来评估转染效率。

扩大转染

可以按照以下体系调整试剂的用量

Cell Culture			DNA			EasyStyle Plus Reagent		
Culture Volume	Culture Flask	Total Number Cells*	Starting Point	Range for Optimizing	Dilution Volume	Starting Point	Range for Optimizing	Dilution Volume
30 mL	125 mL	3×10^7	37.5 μg	24–42 μg	to 0.6 mL	37.5 μL	24–42 μL	to 0.6 mL
250 mL	1 liter	2.5×10^8	312.5 μg	200–350 μg	to 5 mL	312.5 μL	200–350 μL	to 5 mL
1 liter	3 liter	1×10^9	1.25 mg	0.8–1.4 mg	to 20 mL	1.25 mL	0.8–1.4 mL	to 20 mL

*Cell density of 1×10^6 cells/mL on day of transfection