壹生科

IB907d

昆虫细胞全悬浮培养基

使用说明书

TS-ZB-S-002-C/01

目　　录

一、 产品概述 ····· 1
二、 订购信息 ····· 1
三、 产品参数 ····· 1
四、 使用范围 ····· 1
五、 昆虫悬浮细胞培养环境 ····· 2
六、 配制过程 ····· 2
七、 储存条件 ····· 4
八、 培养基适应 ····· 4
九、 昆虫悬浮细胞复苏： ····· 5
十、 昆虫悬浮细胞传代： ····· 5
十一、 昆虫悬浮细胞冻存： ····· 6

一、产品概述

IB907d 是一款昆虫细胞通用型无血清全悬浮培养基，广泛应用于昆虫杆状病毒表达平台。

二、订购信息

表 1 订购信息

产品名称	液体		固体	
	货号	规格	货号	规格
IB907d	L11007d	1L	Y1047d	1L-100L

三、产品参数

表 2 IB907d 培养基产品参数

理化特性	外观（固体）	均匀细致粉末
	外观（液体）	澄清浅黄色液体
	pH	6.35-6.45
	渗透压	400-450mOsm/kg
	内毒素	＜10 EU/mL
	是否含有谷氨酰胺	是
细胞相关	适用细胞	H5、SF9
	倍增时间	24h
保质期	保质期限（固体）	20 个月
	保质期限（液体）	12 个月

四、使用范围

仅用于科研及工业生产，不能用于人体。

五、昆虫悬浮细胞培养环境

5.1 粉末培养基配制时，建议使用电动或磁力搅拌（5-10L 培养基搅拌建议品牌：上海梅颖浦，货号：MYP13-2S；50-100L 培养基搅拌建议品牌：上海司乐，货号：HD2025W），并严格按照说明书操作；配制用水推荐使用注射用水（符合最新版《中国药典》要求）或 Millipore 纯水仪净化超纯水（纯水仪货号：Milli-Q Advantage A10）；pH 调节使用试剂为 5-10M NaOH 或浓盐酸，过滤装置建议使用囊式滤器（建议品牌：赛多利斯;货号：5-10L 培养基过滤：5441307-H5-00-B，50~100L 培养基过滤：5445307H9-00-A）。

5.2 细胞培养条件：温度曲线：27℃±0.5℃、湿度曲线：70%±20%（温湿度监控设备品牌建议：小米米家，型号：LYWSD03MMC。用途：可实时监控温湿度变化曲线，保证细胞培养环境平稳运行）、无需 CO2、120rpm（摇床建议品牌：上海智城分析仪器制造有限公司；货号：ZWY-2102；振幅：25）。培养过程中需注意以下三点：①保证摇床 24 小时正常运转；②防止外界环境温度过高，导致培养箱内温度失控；③防止培养箱内水盘缺水，导致培养箱内湿度过低。

5.3 细胞培养推荐使用进口摇瓶（建议品牌：Corning，125mL 货号:431143；500mL 货号:431145）。

六、配制过程

IB907d 培养基含有三个组分：

表 3 IB907d 配方量

组分	配方量
Part1	38.284g/L
Part2	5g/L
Part3（液体）	1mL/L

IB907d 液体配制说明（**以 1000mL 为例**）：

6.1 以体积定容

6.1.1 确定配制总体积，选择两个容器进行配制，其中容器 1 体积大于总体积，容器 2 体积大于总体积 10%；

6.1.2 在容器 1 中 800mL 超纯水或注射用水，按配方量加入 38.284g Part1 培养基粉末，搅拌 30min；

6.1.3 在容器 2 中加入 100mL 超纯水或注射用水，按配方量加入 5g Part2 培养基粉末，搅拌 30min；

6.1.4 将容器 2 中溶解后的液体移入容器 1 中混合；

6.1.5 按照配方量体积加入 1mL Part3 液体培养基；

6.1.6 用 5-10M 的 NaOH 溶液调整 pH 至 6.35-6.45；

6.1.7 加入超纯水或注射用水定容至 1000mL；

6.1.8 搅拌至少 60min 至粉末全部溶解；

6.1.9 无菌过滤。

6.2 以质量定容

6.2.1 确定配制总体积，选择两个容器进行配制，其中容器 1 体积大于总体积，容器 2 体积大于总体积 10%；

6.2.2 在容器 1 中 800g 超纯水或注射用水，按配方量加入 38.284g Part1 培养基粉末，搅拌 30min；

6.2.3 在容器 2 中加入 100g 超纯水或注射用水，按配方量加入 5g Part2 培养基粉末，搅拌 30min；

6.2.4 将容器 2 中溶解后的液体移入容器 1 中混合；

6.2.5 按照配方量体积加入 1mL Part3 液体培养基；

6.2.6 用 5-10M 的 NaOH 溶液调整 pH 至 6.35-6.45；

6.2.7 加入超纯水或注射用水定容至 1025g；

6.2.8 搅拌至少 60min 至粉末全部溶解；

6.2.9 无菌过滤。

注：Part1 和 Part2 需分开溶解，以保证培养基的滤过性。

七、储存条件

2-8℃低温避光保存。

八、培养基适应

8.1. 直接适应：最初培养阶段，H5 细胞按初始密度 0.5×10^6 cells/mL 接种，SF9 细胞按初始密度 1.0×10^6 cells/mL 接种，直接将培养基更换为 IB907d 进行培养。待细胞培养 2-3 代，且生长稳定后进行后续实验。H5 细胞稳定生长时按 0.5×10^6cells/mL 密度接种,SF9 细胞稳定生长时按 1.0×10^6cells/mL 密度接种，培养 72h 后均可达到 5-7×10^6 cells/mL，细胞活率≥90%。

8.2. 间接适应：IB907d 与细胞原培养基 1：1 混合培养细胞，连续传 2-3 代，细胞稳定生长后可将培养基更换为 IB907d，再传 2-3 代，细胞生长稳定后进行后续实验。H5 细胞稳定生长时按 0.5×10^6 cells/mL 密度接种，SF9 细胞稳定生长时按 1.0×10^6cells/mL 密度接种，培养 72h 后均可达到 5-7×10^6 cells/mL，细胞活率≥90%。

8.3. 注意事项：

8.3.1. 根据细胞具体情况选择进行培养基直接适应或者间接适应。

8.3.2. 细胞驯化初期，若出现细胞生长密度较低、细胞结团等其他不稳定状态，根据当天细胞密度选择传代方式（稀释传代、离心传代）。

8.3.3. 稀释传代：根据细胞密度计算传代时所需细胞悬液，去除多余细胞悬液并补加新鲜培养基至培养体积。

8.3.4. 离心传代：根据细胞密度计算传代时所需细胞悬液，进行 800rpm 离心 5min，去除上清，用新鲜培养基重悬细胞。

8.4. 细胞恢复正常状态传代：

表 4 细胞正常生长数据

细胞名称	培养基	接种密度（cells/mL）	第 3 天细胞密度[1]（cells/mL）	细胞活率（%）	平均倍增时间（h）
H5	IB907d	0.5-0.8×10^6	5-7×10^6	≥90	24
SF9		0.8-1.2×10^6			

注释：[1] 不同计数方式可能存在差异（建议使用：Countstar 自动细胞计数仪，货号：IC1000，品牌：上海睿珏生物科技有限公司）。

九、昆虫悬浮细胞复苏：

9.1. 预热培养基：取 20mL 的对应培养基置于 27℃预热，保证预热充分。

9.2. 将冻存管从液氮罐或-80℃冰箱中取出，迅速转移至 37℃水浴中，快速摇晃，直至完全融化。

9.3. 取预热好的培养基 5mL 于无菌离心管中，并将解冻后的细胞悬液移入此离心管中。800rpm 离心 5min（除去冻存液中 DMSO）。

9.4. 离心后弃去上清，用 15mL 预热好的培养基（保证较高细胞密度）重悬细胞，移至相应摇瓶，放于培养箱中悬浮培养。

十、昆虫悬浮细胞传代：

10.1. H5 细胞复苏初期传代：

细胞复苏后前两代，如果细胞密度＞2×10^6 cells/mL，取部分细胞悬液离心传代，按初始密度 0.8×10^6 cells/mL 接种；如果细胞密度≤2×10^6 cells/mL，进行全部离心换液（细胞刚复苏会有细胞碎片，属正常现象）。

10.2. SF9 细胞复苏初期传代：

复苏后 2-3 天取样计数，若细胞密度＜2×10^6cells/mL 以下，细胞不做任何处理，继续培养 2-3 天（复苏后 4-6 天），取样计数，若细胞密度 2-5×10^6cells/mL，直接向摇瓶中加入新鲜培养基将细胞密度调整至 1×10^6cells/mL 左右，切忌不要离心传代，继续培养，若细胞密度＞5×10^6cells/mL，可正常稀释传代。

10.3. H5 活细胞初期传代：

收到细胞后，将细胞转移至摇瓶中，取样计数并查看细胞状态，如果细胞密度＞2×10^6 cells/mL，可以稀释传代，按 0.8×10^6 cells/mL 接种；如果细胞密度≤2×10^6 cells/mL，建议全部离心传代。（细胞经历运输过程会有细胞碎片，属正常现象）。

10.4. SF9 活细胞初期传代：

收到细胞后，将细胞转移至摇瓶中，取样计数并查看细胞状态，如果细胞密度≥5×10^6 cells/mL，可以稀释传代，按 2×10^6 cells/mL 接种；如果细胞密度＜5×10^6 cells/mL，继续培养 1-4 天，此期间需每 24h 取样计数查看细胞状态，当细胞密度≥5×10^6 cells/mL，按 2×10^6 cells/mL 接种，稀释传代，直至细胞恢复正常状态后，按 1×10^6 cells/mL 接种。（细胞经历运输过程会有细胞碎片，属正常现象）。

十一、昆虫悬浮细胞冻存：

11.1. 待细胞恢复至正常状态后，扩大细胞培养体积准备冻存建库。尽量多建细胞库，保证备份充足（冻存管建议品牌：Corning，货号：430488）。

11.2. **含血清冻存：**选择处于对数生长期、活率＞90%细胞进行冻存，冻存细胞密度:15-20$\times10^6$ cells/mL，推荐 20×10^6 cells/mL。

无血清冻存：选择处于对数生长期、活率＞90%细胞进行冻存，冻存细胞密度:30-40$\times10^6$ cells/mL，推荐 40×10^6 cells/mL。

11.3. 准备冻存盒：向程序降温盒注入适量异丙醇，置于 4℃冰箱预冷。

11.4. **含血清细胞冻存液配制：**冻存液=40%新鲜培养基+50%FBS(建议使用进口胎牛血清)+10%DMSO，冻存液配好后置于 4℃冰箱预冷。

无血清细胞冻存液配制：冻存液=45%新鲜培养基+45%细胞培养上清+10%DMSO，冻存液配好后置于 4℃冰箱预冷。

冻存液配制时，先加培养基再加血清或 DMSO，防止 DMSO 浓度过高导致血

清有效成分变性 。

11.5. 取细胞悬液，800rpm 离心 5min，弃去上清，用适量细胞冻存液重悬细胞，调整细胞密度至目标值。

11.6. 快速分装细胞液至冻存管中。

11.7. 将冻存管放入程序降温盒中，放于-80℃冰箱，24h 后转至液氮罐中储存。一段时间后复苏检测。

浙江壹生科生物技术有限公司

地址：浙江省诸暨市陶朱街道聚力路 16 号 1 号厂房

电话：0575-80709355