

## 昆虫系统蛋白表达纯化测试SOP

### 1. 主要仪器

仪器名称	型号/厂家
生物安全柜	苏州安泰空气技术有限公司
组合式全温度振荡培养箱	上海知楚仪器有限公司
显微镜	上海无陌光学仪器有限公司
Count star自动细胞计数仪	上海睿钰生物科技有限公司
低速离心机	安徽中科中佳科学仪器有限公司
冰箱	长虹美菱股份有限公司
电热恒温水箱	天津市泰斯特仪器有限公司
电动移液器	Thermo

### 2. 主要试剂

试剂名称	货号	生产公司
SF-900 II SFM9	10902-088	Life
Express Five SFM	10486-025	Gibco
cellfectin II Reagent	10362-100	Life

### 3. 实验步骤

#### 3.1 昆虫转染

(1) 转染前一天处理SF9悬浮细胞，密度为 $1 \times 10^6$  Cells/ml。

(2) 转染前处理细胞

细胞铺板（需加对照孔）：转染当天处理SF9细胞，取 $1.2 \times 10^6$ 个细胞加入6孔板内并添加无双抗含10% FBS的SF9培养基，放置27°C培养箱静置培养15-30min，镜检观察贴壁情况。

(3) 制备转染混合物

a 使用前，将转染试剂平衡至室温并混匀。

b 将250  $\mu$ l SF9培养基放入1.5ml无菌EP管中。

c 轻柔加入1  $\mu$ g质粒DNA。

d 用枪头轻柔混匀至完全混合。

e 向稀释后的DNA混合物中加入2  $\mu$ l cellfectin（转染试剂 :DNA=2:1）。

f 用枪头轻柔混匀至完全混合。

g 在室温下孵育15-30分钟。

#### 3.2 P1表达测试

(1) 铺板（需做平行孔和对照孔）：取 $1 \times 10^6$  cells个SF9细胞加入6孔板中并添加2ml SF培养基，十字摇匀，放置27°C培养箱静置培养15min使细胞均匀贴壁，镜检。

(2) 将六孔板中的SF9培养基弃掉，每孔加300 $\mu$ L 无血清SF9培养基和100 $\mu$ L P1病毒，27 $^{\circ}$ C 培养箱静置培养1h。

(3) 1h后，分别向转染孔补加3mL 含5%FBS SF9培养基27 $^{\circ}$ C静止培养48h。48h后进行表达测试分析。

### 3.3 P2生产及表达测试

(1) 以生产200mLP2为例：细胞计数，处理 $1 \times 10^6$  cells/ mL  $\times$  200mL，加入100 $\mu$ L P1，27 $^{\circ}$ C 悬浮培养7d后收样。

(2) 样品处理：2000rpm离心5min，取上清做好标记，4 $^{\circ}$ C避光保存。

(3) 对P2病毒进行表达测试：MOI 1 15ml SF9细胞 +300 $\mu$ L P2， MOI 5 13.5ml SF9细胞 +1.5ml P2 MOI 10 12ml SF9细胞+3ml P2。培养72小时后进行SDS-PAGE分析。

### 3.4 纯化测试

根据MOI测试结果确定昆虫放大条件，按照最优表达条件，将P2代病毒加入到对应体积的细胞体系中即可。

The end



• 一站式蛋白抗体发现服务

重组蛋白 · 抗体 · 噬菌体文库 · 诊断原料

武汉国家生物产业基地 · 光谷抗体发现与筛选公共服务平台

