

Expi293™ 表达系统

用户指南

采用 ExpiFectamine™ 293 转染试剂盒，在化学成分明确的无血清培养基中可扩展地转染 Expi293F™ 细胞系

采用 蛋氨酸缺失的 ExpiFectamine™ 293 转染试剂盒，在化学成分明确、无血清、无蛋氨酸的培养基中，对 Expi293F™ 细胞系进行可扩展的代谢蛋白标记

货号 A14635、A39250、A39251、A41275、A39252、A41276、A41249、A14524、A14525、A14526
、A39249、A14527CN、A39240CN、A39241CN、A39242CN、A14635CN、A39250CN、A41275CN
、A41276 CN

文件编号 MAN0007814

版本 A.0



有关产品标签或产品文档上的图标说明，请见 thermofisher.com/symbols-definition。

本指南之中的信息如有更改，恕不另行通知。

免责声明：在法律许可范围内，Thermo Fisher Scientific Inc.和/或其附属公司不承担因本文档引起或与之相关的任何特殊性、偶然性、间接性、惩罚性、多因性或继发性损害责任，包括与您使用本文档相关的责任。

修订记录：文件编号 MAN0007814

版本	日期	相关说明
A.0	2019年4月14日	用户指南更新为现有标准和风格。新增了 GNTI- 细胞、可诱导细胞和可诱导 GNTI- 细胞。为纳入新增的细胞系，更新了实验方案。
2.0	2018年6月11日	格式转换。新增了应用资料。
1.0	2013年6月	引入新格式
—	2012	新文档

重要许可信息：本产品可能受一项或多项限制使用标签许可的约束。使用本产品，即表示您接受所有相应的限制使用标签许可的条款及细则。

商标：除特别说明外，所有商标均为Thermo Fisher Scientific及其附属公司的财产。

©2019Thermo Fisher Scientific Inc.版权所有，保留所有权利。

目录

■ 第 1 章 产品信息	6
产品描述	6
内容及储存	7
Expi293™ 表达系统组件	10
Expi293F™ 细胞	10
Expi293F™ GnTI- 细胞	10
Expi293F™ 可诱导细胞	10
Expi293F™ 可诱导 GnTI- 细胞	10
Expi293™ 表达培养基	10
Expi293™ Met (-) 表达培养基	11
ExpiFectamine™ 293 试剂	11
ExpiFectamine™ 293 转染增强剂 1	11
ExpiFectamine™ 293 转染增强剂 2	11
ExpiFectamine™ 293 Met (-) 转染增强剂 2	12
Opti-Plex™ 复合缓冲液	12
pRABBIT IgG IRES-EmGFP 阳性对照载体	12
pcDNA™5/TO 哺乳动物表达载体	12
PNGase F 聚糖切割试剂盒	12
■ 第 2 章 操作方法	13
Expi293F™ 细胞培养操作步骤指南	13
一般细胞操作处理	13
细胞解冻和储存指南	13
细胞维持和传代指南	13
可诱导细胞指南	14
培养基指南	14
解冻和建立 Expi293F™ 细胞系	14
所需材料	14
解冻 Expi293F™ 细胞	15
传代 Expi293F™ 细胞系	15
所需材料	15
传代 Expi293F™ 细胞	16
冻存 Expi293F™ 细胞	16

采用 ExpiFectamine™ 293 转染试剂盒转染Expi293F™ 细胞	17
所需材料	17
转染指南	18
第 -2 天: 培养细胞	18
第 -1 天: 接种细胞	18
第 0 天: 转染细胞	18
第 +1 天: 加入增强剂	19
第 +5 天: 收获蛋白质	19
采用用于代谢蛋白标记的 ExpiFectamine™ 293 Met (-) 转染试剂盒转染Expi293F™ 细胞	19
所需材料	20
转染指南	20
第 -2 天: 培养细胞	20
第 -1 天: 接种细胞	20
第 0 天: 进行代谢物标记	21
第 0 天: 转染细胞	21
第 +1 天: 加入增强剂	22
第 +5 天: 收获蛋白质	22
■ 附录 A 补充指南	23
蛋白表达优化指南	23
所用设备	23
细胞	24
制备质粒 DNA 复合物	24
收获	24
细胞培养上清液澄清处理	24
■ 附录 B 用于转染和表达的阳性对照	25
pRABBIT IgG IRES-EmGFP 阳性对照载体	25
抗体表达阳性对照载体	25
转染和表达	25
■ 附录 C 扩大转染规模	27
扩大转染规模	27
■ 附录 D 订购信息	29
其他产品	29
悬浮培养摇瓶	30
质粒纯化产品	30

■ 附录 E 安全性.....	31
化学品安全性	32
生物危害安全性	33
■ 附录 F 文档和支持	34
客户和技术支持	34
有限产品质保	34



重要！在使用本品前，请仔细阅读和理解本文“安全性”附录部分的信息。

产品描述

Gibco™ Expi293™ 表达系统是基于悬浮培养的人胚肾(HEK)细胞的高产量瞬时表达系统。为了方便起见，我们提供4种不同的系统试剂盒。每种试剂盒均提供了细胞、培养基和试剂，可实现1升规模的细胞培养表达。

每个 Expi293™ 表达系统试剂盒分别包含以下一种（共四种）表达目的蛋白的Expi293F™ 细胞系。

- 用于常规蛋白表达的 Expi293F™ 细胞。
- 用于表达具有均一糖基化的蛋白的 Expi293F™ GnTI- 细胞。
- 用于通过四环素介导的诱导调节蛋白表达的 Expi293F™ 可诱导细胞。
- 用于诱导表达具有均一糖基化蛋白的 Expi293F™ 可诱导 GnTI- 细胞。

所有此类细胞系均表现出相同的生长动力学，遵循相同的转染方案，且可用于代谢蛋白标记研究。

进行蛋氨酸蛋白标记时，建议使用 Expi293™ Met (-) 表达培养基和 ExpiFectamine™ 293 Met (-) 转染试剂盒，通过 L-蛋氨酸（Methyl-13C）或 L-硒代蛋氨酸对目标蛋白进行代谢标记。

Expi293™ Met (-) 表达培养基和 ExpiFectamine™ 293 Met (-) 转染试剂盒可以单独订购，也可随 Expi293™ Met (-) 蛋白标记试剂盒一起订购。L-蛋氨酸 (Methyl-13C) 和 L-硒代蛋氨酸可以单独订购。

有关使用 Expi293™ 表达系统对蛋白质进行代谢标记的进一步说明，请参阅第 19 页“使用 ExpiFectamine™ 293 Met (-) 转染试剂盒转染Expi293F™ 细胞系，用于代谢蛋白表达”。

内容及储存

表 1 Expi293™ 表达系统试剂盒 (货号 A14635)

组分	规格	货号	储存
Expi293F™ 细胞 ^[1] (1×10 ⁷ 细胞/mL)	1 mL	A14527	液氮 ^[2]
Expi293™ 表达培养基	1 L	A1435101	2°C 至 8°C 避光 培养物
ExpiFectamine™ 293 转染试剂盒: • ExpiFectamine™ 293 试剂 • ExpiFectamine™ 293 转染增强剂 1 • ExpiFectamine™ 293 转染增强剂 2	适用于 1 L	A14524	
Opti-MEM™ I 减血清培养基	100 mL	31985062	
抗体表达 阳性对照载体 (1 mg/mL 溶于 TE ^[3] 缓冲液, pH 8.0)	150 µg	A14662	-20°C

[1] 细胞冻存于 90% Expi293™ 表达培养基和 10% DMSO 之中。

[2] 在收到冷冻的细胞后, 立即存储在液氮气相待用。切勿 -80°C 储存细胞。

[3] TE 缓冲液, pH 8.0: 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0.

表 2 Expi293™ GnTI- 表达系统试剂盒 (货号 A39250)

组分	规格	货号	储存
Expi293F™ GnTI- 细胞 ^[1] (1×10 ⁷ 细胞/mL)	1 mL	A39240	液氮 ^[2]
Expi293™ 表达培养基	1 L	A1435101	2°C 至 8°C 避光 培养物
ExpiFectamine™ 293 转染试剂盒: • ExpiFectamine™ 293 试剂 • ExpiFectamine™ 293 转染增强剂 1 • ExpiFectamine™ 293 转染增强剂 2	适用于 1 L 培养物	A14524	
Opti-Plex™ 复合缓冲液	100 mL	A4096801	
pRABBIT IgG IRES-EmGFP 阳性对照载体 (1 mg/mL 溶于 TE ^[3] 缓冲液, pH 8.0)	150 µg	A39243	-20°C
PNGase F 聚糖切割试剂盒	1 个试剂盒	A39245	-20°C

[1] 细胞冻存于 90% Expi293™ 表达培养基和 10% DMSO 之中。

[2] 在收到冷冻的细胞后, 立即存储在液氮气相中待用。切勿 -80°C 储存细胞。

[3] TE 缓冲液, pH 8.0: 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0.

表 3 Expi293™ 可诱导表达系统试剂盒 (货号 A39251 或 A41275)

组分	规格	货号	储存
Expi293F™ 可诱导细胞 ^[1] (1×10 ⁷ 细胞/mL)	1 mL	A39241	液氮 ^[2]
Expi293™ 表达培养基	1 L	A1435101	2°C 至 8°C 避光

组分	规格	货号	储存
ExpiFectamine™ 293 转染试剂盒： • ExpiFectamine™ 293 试剂 • ExpiFectamine™ 293 转染增强剂 1 • ExpiFectamine™ 293 转染增强剂 2	适用于 1 L 培养物	A14524	2°C 至 8°C 避光
Opti-Plex™ 复合缓冲液	100 mL	A4096801	
pRABBIT IgG IRES-EmGFP 阳性对照载体 (1 mg/mL 溶于 TE ^[3] 缓冲液, pH 8.0)	150 µg	A39243	-20°C
pcDNA™5/TO 哺乳动物表达载体	20 µg	V103320	
盐酸四环素 ^[4]	500 mg	A39246	避光防潮室温

[1] 细胞冻存于 90% Expi293™ 表达培养基和 10% DMSO 之中。

[2] 在收到冷冻的细胞后, 立即存储在液氮气相中待用。切勿 -80°C 储存细胞。

[3] TE 缓冲液, pH 8.0: 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0。

[4] 货号 A41275 不包含该产品。

表 4 Expi293™ 可诱导 GnTI- 表达系统试剂盒 (货号 A39252 或 A41276)

组分	规格	货号	储存
Expi293F™ 可诱导 GnTI- 细胞 ^[1] (1 × 10 ⁷ 细胞/mL)	1 mL	A39242	液氮 ^[2]
Expi293™ 表达培养基	1 L	A1435101	2°C 至 8°C 避光
ExpiFectamine™ 293 转染试剂盒： • ExpiFectamine™ 293 试剂 • ExpiFectamine™ 293 转染增强剂 1 • ExpiFectamine™ 293 转染增强剂 2	适用于 1 L 培养物	A14524	
Opti-Plex™ 复合缓冲液	100 mL	A4096801	-20°C
pRABBIT IgG IRES-EmGFP 阳性对照载体 (1 mg/mL 溶于 TE ^[3] 缓冲液, pH 8.0)	150 µg	A39243	
pcDNA™5/TO 哺乳动物表达载体	20 µg	V103320	
盐酸四环素 ^[4]	500 mg	A39246	
PNGase F 聚糖切割试剂盒	1 个试剂盒	A39245	-20°C

[1] 细胞冻存于 90% Expi293™ 表达培养基和 10% DMSO 之中。

[2] 在收到冷冻的细胞后, 立即存储在液氮气相中待用。切勿 -80°C 储存细胞。

[3] TE 缓冲液, pH 8.0: 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0。

[4] 货号 A41276 不含该产品。

表 5 Expi293™ Met (-) 蛋白标记试剂盒 (货号 A41249)

组分	规格	货号	储存
ExpiFectamine™ 293 Met (-) 转染试剂盒 • ExpiFectamine™ 293 试剂 • ExpiFectamine™ 293 转染增强剂 1 • ExpiFectamine™ 293 Met (-) 转染增强剂 2 • Opti-Plex™ 复合缓冲液	适用于 1 L 培养物	A39249	2°C 至 8°C 避光。
Expi293™ Met (-) 表达培养基	1 L	A4096701	

表 6 ExpiFectamine™ 293 转染试剂盒 (货号 A14524、A14525 和 A14526)

组分	规格	货号	储存
ExpiFectamine™ 293 转染试剂盒: • ExpiFectamine™ 293 试剂 • ExpiFectamine™ 293 转染增强剂 1 • ExpiFectamine™ 293 转染增强剂 2	•适用于 1 L 培养物 •适用于 10 L 培养物 •适用于 50 L 培养物	•A14524 •A14525 •A14526	2°C 至 8°C 避光。

表 7 ExpiFectamine™ 293 Met (-) 转染试剂盒 (货号 A39249)

组分	规格	货号	储存
ExpiFectamine™ 293 Met (-) 转染试剂盒 • ExpiFectamine™ 293 试剂 • ExpiFectamine™ 293 转染增强剂 1 • ExpiFectamine™ 293 Met (-) 转染增强剂 2 • Opti-Plex™ 复合缓冲液	适用 1 L 培养物	A39249	2°C 至 8°C 避光。

Expi293™ 表达系统组分

Expi293™ 表达系统基于 Expi293™ 表达培养基中的高密度 Expi293F™ 细胞培养。此方法通过阳离子脂质体 ExpiFectamine™ 293 试剂与专门的转染增强剂，实现瞬时表达。与上一代瞬时表达系统（例如 FreeStyle™ 293 表达系统）相比，这些组分可协同实现蛋白产量 2 至 10 倍提高。对于某些抗体和非抗体蛋白，经实验证实蛋白产量可达大于 1 g/L（转染培养物）。

Expi293F™ 细胞

Expi293F™ 细胞是人源细胞，来源于 293F 细胞系，是 Expi293™ 表达系统的核心组分。它们在 Expi293™ 表达培养基中悬浮培养，并可生长至高密度。Expi293F™ 细胞具有高度可转染性，其在瞬时蛋白表达方面，与标准 293 细胞相比，其蛋白产量更高。

Expi293F™ GnTI- 细胞

Expi293F™ GnTI- 细胞来源于 Expi293F™ 细胞，经过工程改造，缺乏 N-乙酰氨基葡萄糖氨基转移酶 I (GnTI) 酶活性，从而产生的糖蛋白具有均一的(GlcNAc)2Man5 糖基修饰。

Expi293F™ 可诱导细胞

Expi293F™ 可诱导细胞来源于 Expi293F™ 细胞，稳定转染了 pcDNA™6/TR 质粒，高表达四环素阻遏蛋白 (TetR)。与兼容的可诱导载体（例如 pcDNA™5/TO 哺乳动物表达载体）一起使用时，在被四环素诱导前，目的基因的本底表达水平非常低，加入四环素后方被诱导表达。并且，可通过加入不同量的四环素来调节表达水平。为获得最佳结果，Expi293F™ 可诱导细胞需要在含有选择性抗生素杀稻瘟菌素的培养基中维持。有关更多详细信息，请参阅第 14 页“可诱导细胞指南”。

Expi293F™ 可诱导 GnTI- 细胞

Expi293F™ 可诱导 GnTI- 细胞来源于 Expi293F™ GnTI- 细胞，既稳定转染 pcDNA™6/TR 质粒表达四环素阻遏蛋白 (TetR)，又敲除了 GnTI 基因。与兼容的可诱导载体（例如 pcDNA™5/TO 哺乳动物表达载体）一起使用时，在被四环素诱导前，目的基因的本底表达水平非常低，加入四环素后方被诱导表达。且可通过加入不同量的四环素来调节表达水平。其表达的糖蛋白的糖基化模式与 Expi293F™ GnTI- 细胞的糖基化模式一致。为获得最佳结果，Expi293F™ 可诱导 GnTI- 细胞应在含有选择性抗生素杀稻瘟菌素的培养基中维持。有关更多详细信息，请参阅第 14 页“可诱导细胞指南”。

Expi293™ 表达培 养基

Expi293™ 表达培养基是化学成分明确、无血清、无蛋白、无动物源成分的培养基，用于培养和转染经过悬浮驯化的人胚肾 (HEK) 293 细胞。其经过专门设计，支持 Expi293F™ 细胞的高密度生长，是 Expi293™ 表达系统的一部分，用于可扩展的瞬时蛋白表达。Expi293™ 表达培养基含有 GlutaMAX™ 添加剂，可直接使用，无需补充额外营养成分。化学成分明确的配方提高了批次间重复性和可靠性。

Expi293™ 表达培养基不含人或动物来源成分。不建议将此培养基用于贴壁细胞培养。

Expi293™ 表达培养基具有以下特点：

- 支持 Expi293F™ 悬浮培养物生长至密度超过 15×10^6 细胞/mL。
- 可兼容转染，配合 ExpiFectamine™ 293 转染试剂使用可使转染效率达到约 80%
- 支持持续、高水平表达和高密度瞬时转染，重组蛋白的产量高达 1 克/L
- 既支持 Expi293F™ 细胞在多孔板中以小于 1 mL 培养物形式的生长和转染，又可在一次性生物反应器中进行 10 L 以上的生长和转染
- 不含酚红

Expi293™ Met (-) 表达培养基

Expi293™ Met (-) 表达培养基经过优化、化学成分明确，支持在悬浮培养系统中进行蛋白的蛋氨酸标记及 293 细胞（例如 Expi293F™ 细胞）的转染。该培养基不含蛋氨酸、蛋白、成分不明的裂解物或动物来源成分。Expi293™ Met (-) 表达培养基是含有 GlutaMAX™ 添加剂的即用型完全培养基，仅需要补充蛋氨酸。不建议将该培养基用于贴壁 293 细胞培养。

ExpiFectamine™ 293 试剂

ExpiFectamine™ 293 试剂经过优化，可将核酸转染到高密度 Expi293™ 细胞培养物中。

ExpiFectamine™ 293 试剂具有以下特性：

- 专为转染高密度悬浮培养细胞而设计，具有匹配的转染增强剂，可提高转染性能和蛋白表达
- 相对于其他转染高密度 293 细胞培养物的试剂，其蛋白产量可提高 2 至 10 倍
- 采用与现有低密度 293 悬浮培养系统相同的瞬时表达实验方案，可轻松从低密度系统切换到高产量、高密度 Expi293™ 表达系统
- 提供可靠且可重复的转染结果
- 可实现低至 1 mL 和高至 10 L 以上体积的可扩展转染，同时保持同等的单位体积蛋白产量

293 转染增强剂 1

ExpiFectamine™ 293 转染增强剂 1 经过优化、化学成分明确、无血清、无蛋白、无动物来源成分，可与 Expi293™ 表达培养基配合使用以支持高密度瞬时转染。ExpiFectamine™ 293 转染增强剂 1 是 ExpiFectamine™ 293 转染试剂盒中的一个组分。

293 转染增强剂 2

ExpiFectamine™ 293 转染增强剂 2 是一种无动物来源成分的专有试剂，可与 ExpiFectamine™ 293 试剂及 ExpiFectamine™ 293 转染增强剂 1 结合使用，以增强蛋白生产，实现尽可能高的蛋白产量。ExpiFectamine™ 293 转染增强剂 2 是 ExpiFectamine™ 293 转染试剂盒中的一个组分。

293 Met (-)转染增强剂 2

ExpiFectamine™ 293 Met (-) 转染增强剂 2 是一种专有的无动物来源成分、无蛋氨酸的试剂，可与 ExpiFectamine™ 293 试剂及 ExpiFectamine™ 293 转染增强剂 1 结合使用，以提高代谢蛋白质标记实验中的蛋白产量。ExpiFectamine™ 293 Met (-) 转染增强剂 2 是 ExpiFectamine™ 293 Met (-)转染试剂盒中的一个组分。

Opti-Plex™ 复合缓冲液

Opti-Plex™ 复合缓冲液是一种化学成分明确、无动物来源成分、无血清、无酚红、无蛋氨酸、无生物素的缓冲液，用于配制 ExpiFectamine™ 293 试剂与质粒 DNA复合物。

注意：在 Expi293™ 表达系统中，可以使用 Opti-Plex™ 复合缓冲液代替 Opti-MEM™ I 培养基。这两种培养基作为 Expi293™ 表达系统的一部分，制备瞬时转染的复合物时，表现出相同的性能。

注意：使用 ExpiFectamine™ 293 Met (-) 转染试剂盒表达蛋白质时，必须使用 Opti-Plex™ 复合缓冲液，以确保将标记的蛋氨酸最大限度掺入表达的蛋白质中。对于常规瞬时转染，Opti-Plex™ 中不含蛋氨酸，并不会影响转染效率和蛋白质表达水平。

pRABBIT IgG IRES-EmGFP 阳性对照载体

试剂盒中附带的 pRABBIT IgG IRES-EmGFP 阳性对照载体，作为 Expi293F™ 细胞系转染、表达和评估转染效率的阳性对照。转染对照载体后，Expi293F™ 细胞中产生的兔 IgG 分泌到培养基中，在转染后 5-7 天达到最佳产量（通常产量范围：450–500 mg/L）。EmGFP 是胞内蛋白，可用于在转染后 24-96 小时通过荧光显微镜、荧光酶标仪或流式细胞仪定性评估 Expi293F 细胞转染情况。有关使用 pRABBIT IgG IRES-EmGFP 阳性对照载体的更多信息，请参阅附录 B “转染和表达阳性对照”。

pcDNA™5/TO 哺乳动物表达载体

pcDNA™5/TO 哺乳动物表达载体是大小为 5.7 kb 的表达载体，利用全长的 CMV 启动子以及来自细菌四环素抗性操纵子的控制元件，对于已知最强哺乳动物启动子序列之一的转录，能够进行有效抑制。pcDNA™5/TO 载体能够在表达四环素阻遏蛋白 (TetR) 的哺乳动物宿主细胞中，通过四环素调节目的基因表达。

PNGase F 聚糖切割试剂盒

PNGase F 聚糖切割试剂盒包括从糖蛋白中酶促去除几乎所有 N-连接寡糖所需的所有组分。该试剂盒包括重组 PNGase F 酶，可在最内层的 GlcNAc 和高甘露糖、杂合和复合寡糖的天冬酰胺残基上切割 N-聚糖链。

Expi293F™ 细胞培养操作步骤指南

注意：以下细胞操作说明适用于所有Expi293F™ 细胞，包括 Expi293F™ 细胞、Expi293F™GnTI- 细胞、Expi293F™ 可诱导细胞和 Expi293F™ 可诱导 GnTI- 细胞。

常规细胞操作

- 所有与细胞接触的溶液和设备必须是无菌的。请务必采用正确的无菌技术并在生物安全柜中操作。
- 对于所有细胞操作，应通过轻晃混合细胞，避免剧烈摇振荡和吹打。细胞健康状况对于确保最佳性能至关重要。
- Expi293F™ 细胞适应于高密度的生长条件，其对数生长期的倍增时间约为 24 小时。

细胞解冻和储存指南

- 收到细胞后，可立即将其解冻到预热的 Expi293 表达培养基中，或立即将冷冻细胞置于液氮气相保存，直至使用。切勿 -80°C 储存细胞。
- 避免短期极端温度变化。将接收的细胞从干冰上储存到液氮气相时，应在液氮中保留 3-4 天，然后再解冻。
- 在开始实验之前，请确保已经进行了保种。收到Expi293F™ 细胞后，扩增并冻存细胞，确保您有足够的低代数细胞种子。

细胞维持和传代指南

- 转染前，确保刚复苏的细胞已培养三代或更多代。
- 通过台盼蓝拒染法，在自动化细胞计数仪或血球计数板上测定细胞活力。对数期培养物中的细胞应具有≥95%的活率。
- 解冻或传代细胞时，将细胞转移到预热的培养基中。
- 解冻后 4-7 天内细胞活率应 ≥90%，此时活细胞密度通常 > 1×10⁶个活细胞/mL；如果活力未 ≥90%，则应再孵育细胞 3 天，以达到此标准。
- 第一次传代培养时，应在活细胞密度达到 1-3×10⁶活细胞/mL 时进行传代培养细胞。

- 对于常规培养细胞，当 Expi293F™ 细胞达到约 $3\text{--}5 \times 10^6$ 活细胞/mL 密度（即早期对数生长期），通常为每 3 至 4 天，传代一次。

注意：在超出早期对数期的密度下传代时，细胞可表现出更长的倍增时间和更低的蛋白滴度。为此需要调整初始接种密度，以传代时达到 $3\text{--}5 \times 10^6$ 活细胞/mL 的细胞密度。

可诱导细胞指南

对于 Expi293F™ 可诱导细胞或 Expi293F™ 可诱导 GnTI- 细胞：

- 进行常规培养时，在培养基中添加杀稻瘟菌素至终浓度 $20 \mu\text{g/mL}$ 。
- 在冻存细胞时，培养基中可存在杀稻瘟菌素而不影响细胞健康。
- 可诱导表达载体必须与 Expi293F™ 可诱导细胞和 Expi293F™ 可诱导 GnTI- 细胞结合使用。推荐采用 pcDNA™5/TO 表达载体，以实现最低的本地表达水平，和加入四环素诱导后最高的表达水平。
- 我们建议用水配制 1 mg/mL 的四环素储液。

培养基指南

Expi293™ 表达培养基含有 GlutaMAX™ 添加剂。对于悬浮培养和转染，Expi293™ 表达培养基无需添加任何添加剂。

重要！ Expi293™ 表达培养基对光敏感。为了获得最佳效果，请避光使用和保存该培养基。

注意： ExpiFectamine™ 293 转染增强剂 1 可呈淡黄色。内部研究表明，这对系统性能或蛋白滴度无影响。

Expi293F™ 细胞复苏和建立

注意：以下细胞系解冻和建立说明适用于所有 Expi293F™ 细胞，包括 Expi293F™ 细胞、Expi293F™ GnTI- 细胞、Expi293F™ 可诱导细胞和 Expi293F™ 可诱导 GnTI- 细胞。

所需材料

- 以下某一种 Expi293F™ 细胞系：
 - Expi293F™ 细胞
 - Expi293F™ GnTI- 细胞
 - Expi293F™ 可诱导细胞
 - Expi293F™ 可诱导 GnTI- 细胞
- 用于培养悬浮细胞的 125 mL 聚碳酸酯或 PETG 材质、无挡板、一次性无菌通气摇瓶，例如 Nalgene™ PETG Erlenmeyer 一次性平底无菌锥形瓶
- 预热 Expi293™ 表达培养基至 37°C
- 轨道摇床置于 $\geq 80\%$ 相对湿度和 $8\% \text{CO}_2$ 的 37°C 培养箱中
- 测定细胞活率所需的试剂和设备（例如，台盼蓝、血球计数板或自动细胞计数仪）

复苏 Expi293F™ 细胞

1. 从液氮中取出一管细胞，在 37°C 水浴中轻晃 1 至 2 分钟以快速解冻细胞，直到仅剩少量冰块为止。

请勿将冻存管浸入水中。

2. 在细胞完全解冻之前，用 70% 乙醇擦拭冻存管，然后在生物安全柜中打开。

3. 用 2 mL 或 5 mL 移液管，将冻存管的细胞转移到 125 mL 聚碳酸酯或 PETG 一次性无菌通气锥形瓶中（其中装有 30 mL 预热的 Expi293™ 表达培养基）。

4. 在 ≥80% 相对湿度和 8% CO₂ 浓度的 37°C 培养箱中培养细胞，根据下表选择轨道摇床的转速。

轨道直径	振荡速度 (rpm)
19 mm	125 ± 5
25 mm	120 ± 5
50 mm	95 ± 5

5. 解冻细胞后培养 3-4 天，然后测定活细胞密度和活率。

注意：解冻后 24 小时，活率可能降至 80%，但不应低于 70%。解冻后细胞最多可能需要 7 天才能恢复并达到 ≥90% 活率。

6. 当活细胞密度达到 1-3 × 10⁶ 活细胞/mL（通常在解冻后 4-7 天）时，进行第一次细胞传代。

Expi293F™ 细胞传代

注意：以下细胞操作和细胞冻存说明适用于所有 Expi293F™ 细胞，包括 Expi293F™ 细胞、Expi293F™ GnTI- 细胞、Expi293F™ 可诱导细胞和 Expi293F™ 可诱导 GnTI- 细胞。

所需材料

- Expi293F™ 细胞培养至 3-5 × 10⁶ 活细胞/mL
- Expi293™ 表达培养基预热至 37°C
- 用于培养悬浮细胞的聚碳酸酯或 PETG 材质、无挡板、一次性无菌通气摇瓶，例如 Nal-gene™ PETG Erlenmeyer 一次性平底无菌锥形瓶
- 测定活细胞密度和活率所需的试剂和设备（例如，台盼蓝、血球计数板或自动细胞计数仪）
- 轨道摇床置于 ≥80% 相对湿度和 8% CO₂ 的 37°C 培养箱

传代 Expi293F™ 细胞

1. 根据表 8 中推荐的接种密度和表 9 中推荐的培养体积，利用活细胞密度计算接种到新摇瓶所需的细胞悬液体积。

表8 常规细胞培养的推荐接种密度

传代时间	推荐接种密度
3天传代	0.4–0.5×10 ⁶ 活细胞/mL
4天传代	0.3–0.4×10 ⁶ 活细胞/mL

表 9 在无挡板通气培养瓶中进行细胞培养的建议体积

培养瓶体积规格	培养物体积 (mL)	振荡速度
125 mL	30-35 mL	125 ± 5 rpm (19 mm 轨道直径)
250 mL	60-70 mL	120 ± 5 rpm (25 mm 轨道直径)
500 mL	100-120 mL	95 ± 5 rpm (50 mm 轨道直径)
1 L	220-240 mL	
2 L	440-480 mL	
3 L	800-1,000 mL	90 ± 5 rpm (19 mm 轨道直径) 85 ± 5 rpm (25 mm 轨道直径) 80 ± 5 rpm (50 mm 轨道直径)

2. 将计算所得体积的细胞移到含有新鲜预热的Expi293™ 表达培养基的培养瓶中。

3. 将培养瓶放置于轨道摇床上，并设定培养箱为37°C、相对湿度≥80%和8% CO₂，直至培养物密度达到 3–5×10⁶活细胞/mL。

注意：常规培养期间，不要让细胞生长密度超过 5×10⁶活细胞/mL。

注意：在超出早期对数期的密度下传代时，细胞可表现出更长的倍增时间和更低的蛋白滴度。为此需要调整初始接种密度，在传代时达到 3–5×10⁶活细胞/mL 的细胞密度。

4. 重复步骤 1 到步骤 3，以培养或扩增细胞用于转染。

冻存Expi293F™ 细胞

1. 300×g 离心 5 分钟以收集底部的细胞。

2. 弃去上清液，将细胞重悬于预冷的含10%DMSO的Expi293™表达培养基中，轻柔地上下吹打混匀。

3. 使用含 10% DMSO 的新鲜 Expi293™ 表达培养基稀释细胞，至终密度 1×10^7 活细胞/mL。

注意：或者，在冻存之前通过离心获得的条件培养基也可按以下比例添加到新鲜的 Expi293™ 表达培养基中：45% 新鲜 Expi293™ 表达培养基，45% 条件培养基和 10% DMSO（以配制条件冻存培养基）。

4. 按照标准操作步骤，在自动或手动控制速率的冷冻设备中冻存细胞。

为实现理想的冻存，冷冻速度是每分钟降低 1°C 。

5. 将冻存的细胞转移到液氮的气相中，以便长期保存。

使用 ExpiFectamine™ 293 转染试剂盒

转染 Expi293F™ 细胞

注意：以下细胞转染说明适用于所有 Expi293F™ 细胞，包括 Expi293F™ 细胞、Expi293F™ GnTI- 细胞、Expi293F™ 可诱导细胞和 Expi293F™ 可诱导 GnTI- 细胞。

为实现最佳的高密度悬浮 Expi293F™ 细胞转染，请使用转染试剂盒中配套的 ExpiFectamine™ 293 试剂。

与其他无血清培养基不同，Expi293™ 表达培养基不会抑制转染。Expi293™ 表达培养基配方经过专门设计，可直接用于转染，无需在转染前和转染后更换或添加培养基。

注意：有关使用 ExpiFectamine™ 293 Met (-) 转染试剂盒对蛋白质进行代谢标记的说明，请参阅第 19 页“采用用于代谢蛋白标记的 ExpiFectamine™ 293 Met (-) 转染试剂盒转染 Expi293F™ 细胞”。

所需材料

- 在 Expi293™ 表达培养基中培养的 Expi293F™ 细胞
- 质粒 DNA，无菌、不含苯酚和氯化钠，主要含超螺旋 DNA

注意：我们建议使用 PureLink™ HiPure 质粒试剂盒抽提质粒 DNA（有关订购信息，请参阅附录 D “订购信息”）。为确保无菌，可以在使用前通过 $0.22 \mu\text{m}$ 过滤器过滤 DNA。

注意：Expi293F™ 可诱导细胞和 Expi293F™ 可诱导 GnTI- 细胞需要可诱导表达载体（例如 pcDNA™5/TO 哺乳动物表达载体）才能诱导表达目的蛋白。有关更多信息，请参阅附录 D “订购信息”。

- pRABBIT IgG IRES-EmGFP 阳性对照载体
- ExpiFectamine™ 293 转染试剂盒
- Opti-Plex™ 复合缓冲液（也可使用 Opti-MEM™ I 培养基）
- Expi293™ 表达培养基，预热至 37°C

注意：转染过程中请勿向培养基中加入抗生素，否则会降低转染效率。如有必要，可在转染后约 24 小时添加抗生素。

- 用于培养悬浮细胞的聚碳酸酯或 PETG 材质、无挡板、一次性无菌通气摇瓶，例如 Nal-gene™ PETG Erlenmeyer 一次性平底无菌锥形瓶
- 轨道摇床置于 $\geq 80\%$ 相对湿度和 $8\% \text{CO}_2$ 的 37°C 培养箱
- 测定活细胞密度和活率所需的试剂和设备
- 使用 ExpiFectamine™ 293 试剂以外的其他转染试剂转染 Expi293F™ 细胞，会大幅降低性能。
- 使用前轻轻颠倒 ExpiFectamine™ 293 试剂 4-5 次，确保充分混匀。
- 在室温下孵育质粒 DNA 和 ExpiFectamine™ 293 试剂的复合物。
- 将 ExpiFectamine™ 293/DNA 复合物孵育 10–20 分钟，然后加入细胞中。孵育时间过长会导致性能稍稍下降。不建议孵育时间超过 20 分钟。
- 仅对于 Expi293F™ 可诱导细胞或 Expi293F™ 可诱导 GnTI- 细胞，存在杀稻瘟菌素不会影响转染，因此无需在转染前去除杀稻瘟菌素。
- 有关扩大转染规模的信息，请参阅附录 C “扩大转染规模”。

转染指南

第 -2 天：培养细胞

培养并扩增 Expi293F™ 细胞，直到转染前一天（第 -1 天）细胞密度达到大约 $3\text{-}5 \times 10^6$ 活细胞/mL。

第 -1 天：接种细胞

按照最终密度 $2.5\text{-}3 \times 10^6$ 活细胞/mL 接种细胞，让细胞过夜生长。

第 0 天：转染细胞

1. 测定活细胞密度和活率。

活细胞密度和活率应分别达到 $4.5\text{-}5.5 \times 10^6$ 活细胞/mL 和 $\geq 95\%$ ，才可进行转染。

2. 用新鲜预热的 Expi293™ 表达培养基将细胞稀释至 3×10^6 活细胞/mL，然后轻晃培养瓶以混匀细胞。

注意：丢弃剩余的细胞。请勿重复使用高密度细胞进行常规传代。

3. 使用前，将 ExpiFectamine™ 293 试剂瓶轻轻颠倒 4 至 5 次，确保充分混匀。

4. 用 Opti-Plex™ 复合缓冲液（或 Opti-MEM™ I 培养基）稀释质粒 DNA，然后轻晃或颠倒混匀。

注意：对于大多数蛋白，转染培养物中的总质粒 DNA 浓度为 $1.0 \mu\text{g}/\text{mL}$ 即可。

5. 采用 Opti-Plex™ 复合缓冲液（或 Opti-MEM™ I 培养基——如果在步骤 4 中使用）稀释 ExpiFectamine™ 293 试剂然后轻晃或颠倒混匀。

6. 室温孵育 5 分钟。

7. 将稀释的 ExpiFectamine™ 293 试剂加入稀释的质粒 DNA 中，然后轻晃或颠倒混匀。
8. 室温孵育 ExpiFectamine™ 293/质粒 DNA 复合物 10–20 分钟。
9. 将复合物缓慢转移到细胞中，在加入过程中轻晃培养瓶，然后将其放置于轨道摇床上，在 $\geq 80\%$ 相对湿度和 $8\% \text{ CO}_2$ 的 37°C 培养箱中培养细胞（建议的摇床转速请参见表 10）。

第 +1 天：加入增强剂

1. 转染后 18–22 小时，在转染瓶中加入 ExpiFectamine™ 293 转染增强剂 1 和 ExpiFectamine™ 293 转染增强剂 2，加入过程中轻晃培养瓶。

注意： ExpiFectamine™ 293 转染增强剂 1 和 ExpiFectamine™ 293 转染增强剂 2 加入之前无需预热。

ExpiFectamine™ 293 转染增强剂 1 和 ExpiFectamine™ 293

转染增强剂 2 可在临加入前混合。

- 2.（可选）如果转染 Expi293F™ 可诱导细胞或 Expi293F™ 可诱导 GnTI- 细胞，请添加 1 mg/mL 四环素至终浓度 $1 \text{ }\mu\text{g/mL}$ 以诱导蛋白表达。

注意： 可以加入不同浓度的四环素（ 10 ng/mL 到 $1 \text{ }\mu\text{g/mL}$ ），以剂量依赖性方式调节目的蛋白的表达。

3. 立即将培养瓶放回轨道摇床上，在相对湿度 $\geq 80\%$ 和 $8\% \text{ CO}_2$ 浓度的 37°C 培养箱中培养细胞。

收获蛋白的最佳时间取决于所表达蛋白的特性。

第 +5 天：收获蛋白

- 对于许多分泌的蛋白，通常在转染后 5-7 天达到最大滴度。
- 对于膜蛋白和胞内蛋白，通常需要 3-4 天达到最大滴度。

使用用于代谢蛋白标记的 ExpiFectamine™ 293 Met (-) 转染试剂盒转染 Expi293F™ 细胞

注意： 以下细胞转染说明适用于所有 Expi293F™ 细胞，包括 Expi293F™ 细胞、Expi293F™ GnTI- 细胞、Expi293F™ 可诱导细胞和 Expi293F™ 可诱导 GnTI- 细胞。

为确保 Expi293F™ 细胞培养物能实现最佳转染效果，请使用转染试剂盒中配套的 ExpiFectamine™ 293 试剂。

与其他无血清培养基试剂不同，Expi293™ 表达培养基不会抑制转染。Expi293™ 表达培养基配方经过专门设计，可直接用于转染，无需在转染前和转染后更换或添加培养基。

注意：对于常规的转染，请参考第17页“使用 ExpiFectamine™ 293 转染试剂盒转染 Expi293F™ 细胞”

所需材料

- 在 Expi293™ 表达培养基中培养 Expi293F™ 细胞培养基
- 质粒 DNA，无菌、不含苯酚和氯化钠，主要含超螺旋 DNA

注意：我们建议使用 PureLink™ HiPure 质粒试剂盒抽提质粒 DNA（有关订购信息，请参阅附录 D “订购信息”）。为确保无菌，可以在使用前通过 0.22 μm 过滤器过滤 DNA。

注意：Expi293F™ 可诱导细胞和 Expi293F™ 可诱导 GnTI- 细胞需要诱导表达载体（例如 pcDNA™5/TO 哺乳动物表达载体）才能诱导表达目的蛋白。有关更多信息，请参阅附录 D “订购信息”。

- pRABBIT IgG IRES-EmGFP 阳性对照载体
- ExpiFectamine™ 293 Met (-) 转染试剂盒
- Expi293™ Met (-) 表达培养基，预热至 37°C

注意：转染过程中请勿向培养基中加入抗生素，否则会降低转染效率。如有必要，可在转染后约 24 小时添加抗生素。

- 用于培养悬浮细胞的聚碳酸酯或 PETG 材质、无挡板、一次性无菌通气摇瓶，例如 Nal-gene™ PETG Erlenmeyer 一次性平底无菌锥形瓶
- 轨道摇床置于 ≥80% 相对湿度和 8% CO₂ 的 37°C 培养箱
- 测定活细胞密度和活率所需的试剂和设备

转染指南

- 使用 ExpiFectamine™ 293 试剂以外的其他转染试剂转染 Expi293F™ 细胞培养物，会大幅降低性能。
- 使用前轻轻颠倒 ExpiFectamine™ 293 试剂 4-5 次，确保充分混匀。
- 在室温下孵育质粒 DNA 和 ExpiFectamine™ 293 试剂的复合物。
- 将 ExpiFectamine™ 293/DNA 复合物孵育 10-20 分钟，然后加入细胞中。孵育时间过长会导致性能稍稍下降。不建议孵育时间超过 20 分钟。
- 仅对于 Expi293F™ 可诱导细胞或 Expi293F™ 可诱导 GnTI- 细胞，存在杀稻瘟菌素不会影响转染，因此无需在转染前去除杀稻瘟菌素。
- 有关扩大转染规模的信息，请参阅附录 C “扩大转染规模”。

第 -2 天：培养细胞

培养并扩增 Expi293F™ 细胞，直到转染前一天（第 -1 天）细胞密度达到大约 3-5×10⁶ 活细胞/mL。

第 -1 天：接种细胞

以最终密度 2.5-3×10⁶ 活细胞/mL 接种 Expi293F™ 细胞，然后让细胞过夜生长。

第 0 天：进行代谢物标记

1. 确定转染所需的细胞数量。

通常，每 25 mL 培养物需要转染 75×10^6 个细胞（ 3×10^6 细胞/mL）。我们建议至少多保留 10% 的细胞余量，以抵消离心过程中的细胞损失。

2. 将所需数量的细胞 $300 \times g$ 离心 5 分钟。

3. 丢弃上清液，然后将细胞重悬于预热至 37°C 的新鲜 Expi293™ Met (-) 表达培养基中。

4. 在置于 $\geq 80\%$ 相对湿度、 $8\% \text{CO}_2$ 浓度的 37°C 培养箱中的轨道摇床上孵育细胞 5-7 个小时，直至耗尽细胞中的蛋氨酸。

5. 使用全自动细胞计数仪和台盼蓝拒染法测定细胞密度和细胞活率。

注意：活率 $\geq 95\%$ 且活细胞密度为 3×10^6 细胞/mL 时，才可进行转染。如有必要，通过添加新鲜预热的 Expi293™ Met (-) 表达培养基来稀释细胞，以达到 3×10^6 活细胞/mL。

6. 根据下表，立即将标记的蛋氨酸添加到培养瓶中：

蛋氨酸来源	终浓度
L-蛋氨酸 (Methyl-13C)	225 mg/L
L-硒代蛋氨酸	50 mg/L

注意：根据经验，优化标记的蛋氨酸浓度。

注意：L-硒代蛋氨酸对细胞有毒。因此，请尽可能将浓度控制在实现表达蛋白标记所需的最低浓度。

注意：对于使用 L-蛋氨酸 (Methyl-13C) 进行代谢标记的实验，可以在转染前在含有标记试剂的 Expi293™ Met (-) 表达培养基中培养细胞最多 3 代。这种策略可以提高 L-蛋氨酸 (Methyl-13C) 掺入目的蛋白的效率。

第 0 天：转染细胞

1. 测定活细胞密度和活率。

2. 如有必要，用新鲜预热的 Expi293™ Met (-) 表达培养基将细胞稀释至 3×10^6 活细胞/mL，然后轻晃培养瓶以混匀细胞。

注意：丢弃剩余的细胞。请勿重复使用高密度细胞进行常规传代。

3. 使用前，将 ExpiFectamine™ 293 试剂瓶轻轻颠倒 4 至 5 次，确保充分混匀。

4. 用 Opti-Plex™ 复合缓冲液稀释质粒 DNA，然后轻晃或颠倒混匀。

注意：对于大多数蛋白质，转染培养物的总质粒 DNA 浓度为 1.0 µg/mL 即可。

5. 采用 Opti-Plex™ 复合缓冲液稀释 ExpiFectamine™ 293 试剂然后轻晃或颠倒混匀。

6. 室温孵育 5 分钟。

7. 将稀释的 ExpiFectamine™ 293 试剂加入稀释的质粒 DNA 中，然后轻晃或颠倒混匀。

8. 室温孵育 ExpiFectamine™ 293/质粒 DNA 复合物 10–20 分钟。

9. 将复合物缓慢转移到细胞中，在加入过程中轻晃培养瓶，然后将其放置于轨道摇床上，在 ≥80% 相对湿度和 8% CO₂ 的 37°C 培养箱中培养细胞（建议的摇床转速请参见表 10）。

第 +1 天：加入增强剂

1. 转染后 18–22 小时，加入 ExpiFectamine™ 293 转染增强剂 1 和 ExpiFectamine™ 293 Met (-) 转染增强剂 2，同时在加入过程中轻晃培养瓶。

注意：ExpiFectamine™ 293 转染增强剂 1 和 ExpiFectamine™ 293 Met (-) 转染增强剂 2 加入之前无需预热。

ExpiFectamine™ 293 转染增强剂 1 和 ExpiFectamine™ 293 Met (-) 转染增强剂 2 可在加入前混合。

2.（可选）如果转染 Expi293F™ 可诱导细胞或 Expi293F™ 可诱导 GnTI- 细胞，请添加 1 mg/mL 四环素至终浓度 1 µg/mL 以诱导蛋白表达。

注意：可以加入不同浓度的四环素（10 ng/mL 到 1 µg/mL），以剂量依赖性方式调节蛋白的表达。

3. 立即将培养瓶放回轨道摇床上，在相对湿度 ≥80%、8% CO₂ 的 37°C 培养箱中培养细胞。

第 +5 天：收获蛋白质

收获蛋白的最佳时间取决于所表达蛋白的特性。

- 对于许多分泌的蛋白，通常在转染后 5-7 天达到最大滴度。
- 对于膜蛋白和胞内蛋白，通常需要 3-4 天达到最大滴度。



优化蛋白表达指南

- 表达水平将取决于所表达的特定重组蛋白和使用的载体；对于特定蛋白，Expi293™ 表达系统在任意两次转染之间能够保持表达水平基本一致。
- 首次表达某个蛋白时，可能需要摸索最佳蛋白表达时间（例如，在转染后几个时间点收集细胞或培养基）。
- 在表达构建在两个单独质粒上的抗体重链和轻链分子时，我们建议针对每种抗体优化重链与轻链的比例，建议重链：轻链为1：2作为起始进行测试。

设备

- 为实现最佳性能，关键是确保轨道直径、转速、培养瓶大小/类型和待转染的培养体积必须遵守本方案中常规传代培养和蛋白表达运行建议。
- 建议使用恒湿培养箱（相对湿度 $\geq 80\%$ ）以减少表达过程中的蒸发。使用多孔板时，应使用高湿度设置（如有），因为此时蒸发程度会更大。
- 确保设备已针对温度进行了校准。在某些情况下，来自培养箱和轨道摇床的总热量可能导致细胞培养基中的实际温度超过建议范围，并导致细胞生长减缓、结团或死亡。在这种情况下，请降低培养箱的温度设置，以抵消轨道摇床产生的热量。
- 确保设备已针对 CO_2 进行了校准。 CO_2 含量不得超过 8%。

细胞

- 在常规细胞培养过程中，细胞应表现出方案指南中的生长特性（请参阅第 10 页“Expi293F™ 细胞”）。

注意：复苏后 24 小时，细胞活率可能降至 80%，但不应低于 70%。解冻后细胞最多可能需要 7 天才能复苏并达到 $\geq 90\%$ 活率。

- Expi293F™ 细胞是高密度细胞，当密度达到对数生长期、 $3-5 \times 10^6$ 活细胞/mL 浓度时，进行细胞传代。细胞达到对数生长期之前传代，会对细胞性能产生负面影响。
- 在所有细胞操作过程中，轻晃混匀细胞；避免剧烈混合/吹打——尤其是在转染前。转染前的细胞健康状况对于确保最佳性能至关重要。
- 始终保持专用的培养物用于细胞维持：请勿将转染过程中剩余的高密度细胞重新用于常规传代培养。

制备质粒 DNA 复合物

- 质粒 DNA 在 Opti-Plex™ 复合缓冲液（或 Opti-MEM™ I 培养基）中高度稳定。用 Opti-Plex™ 或 Opti-MEM™ I 培养基稀释 ExpiFectamine™ 293 试剂后，通过轻晃试管和/或倒置，或者轻轻吹打 2-3 次进行混匀。请勿涡旋。
- 为实现最佳性能，将稀释的 ExpiFectamine™ 293 试剂加入稀释的质粒 DNA 中后，轻晃试管和/或倒置，或者轻轻吹打 2-3 次即可混匀；请勿涡旋。混合后孵育 10-20 分钟，然后将其逐滴加入培养瓶中并轻晃。
- 使用 Expi293F™ 可诱导细胞或 Expi293F™ 可诱导 GnTI- 细胞时，必须使用可诱导载体（如 pcDNA™ 5/TO 哺乳动物表达载体），加入四环素处理后能够诱导表达目的蛋白。

收获

转染后，应在细胞活率约 60% 或更高时收集蛋白。收获蛋白的最佳时间取决于所表达蛋白的特性。对于许多分泌的蛋白，通常在转染后 5-7 天达到最大滴度。对于膜蛋白和胞内蛋白，通常 3-4 天为收获时机。

细胞培养上清液澄清处理

- 收获后，将上清液 $3000-5000 \times g$ 冷冻离心 20-30 分钟。
- 通过 $0.22 \mu\text{m}$ 过滤器过滤上清液。



转染和表达阳性对照

目前有两种表达抗体的阳性对照载体（有/无 GFP），可供评估 Expi293™ 表达系统中的表达条件。

pRABBIT IgG IRES-EmGFP 阳性对照载体

pRABBIT IgG IRES-EmGFP 阳性对照载体在多种试剂盒中均有提供，可作为 Expi293F™ 细胞转染和表达的阳性对照。该对照载体是表达兔 IgG 的重链、轻链以及 EmGFP 的 pcDNA™ 3.4 质粒的混合物。该对照是即用型转染级质粒混合物，浓度为 1 mg/mL，重链与轻链 IgG 比率为 1:2，足够转染最多 150 mL Expi293F™ 细胞。

表达抗体的阳性对照载体

表达抗体的阳性对照载体是在 Expi293™ 细胞中转染和表达的另一种阳性对照载体，包含表达兔 IgG 重链和轻链的 pcDNA™ 3.4 质粒混合物。该对照是即用型转染级质粒混合物，浓度为 1 mg/mL，重链与轻链 IgG 比率为 1:2，足够转染最多 150 mL Expi293™ 细胞。有关更多信息和订购途径，请访问 thermofisher.com。

转染和表达

注意：无论使用哪种阳性对照载体，以下转染条件均相同。

遵循第 17 页“使用 ExpiFectamine™ 293 转染试剂盒转染 Expi293F™ 细胞”中提供的方案，使用 25 μL 任一种阳性对照载体转染 25 mL 悬浮 Expi293™ 细胞（即，每 1 mL Expi293™ 培养物使用 1 μg 阳性对照）。

使用任一对照载体转染后，Expi293™ 细胞中产生的兔 IgG 都会分泌到培养基中，在转染后 5-7 天达到最佳产量（通常产量范围：450–500 mg/L）。

使用 pRABBIT IgG IRES-EmGFP 阳性对照载体时，EmGFP 在转染后 24–96 小时在细胞内累积。可通过荧光显微镜、荧光酶标仪或流式细胞仪（使用 488 nm 激发光和 510 nm 发射光的标准 GFP 设置）检测 GFP 荧光，定性评估细胞转染情况。



扩大转染规模

您可以在转瓶或生物反应器中扩大 Expi293F™ 细胞的培养规模，确定培养系统的最佳旋转速度和接种密度。我们建议按 0.3×10^6 到 0.5×10^6 活细胞/mL 密度接种。最佳转瓶速度约为 100–130 rpm，而 Celligen™ 搅拌罐式生物反应器中的最佳旋转速度为 70–100 rpm。如果新鲜培养基的细胞接种比例小于 1:2，请在接种培养之前离心细胞悬液，然后使用新鲜培养基重悬细胞。

使用以下条件扩大转染规模：

表 10 各种规模的推荐转染体积

容器类型	96 孔深孔板	24 孔深孔板	微型生物反应器	125 mL 培养瓶	250 mL 培养瓶	1 L 培养瓶	2 L 培养瓶	3 L 培养瓶
所需的细胞数	2.0×10^6	7.5×10^6	45×10^6	75×10^6	150×10^6	600×10^6	1.2×10^9	2.25×10^9
转染体积	800 μ L	2.5 mL	15 mL	25 mL	50 mL	200 mL	400 mL	800 mL
转速 ^[1] (rpm)	900 \pm 50 (3 mm 轨道直径)	225 \pm 5 250 \pm 5 235 \pm 5	240 \pm 5 250 \pm 5 245 \pm 5	125 \pm 5 (19 mm 轨道直径) 120 \pm 5 (25 mm 轨道直径) 95 \pm 5 (50 mm 轨道直径)				90 \pm 5 90 \pm 5 55 \pm 5
质粒 DNA 用量 ^[2]	1.0 μ g 总质粒 DNA/ mL (待转染培养基体积)							
质粒 DNA 体积	0.8 μ L	2.5 μ L	15 μ L	25 μ L	50 μ L	200 μ L	400 μ L	800 μ L
Opti-Plex™ 复合缓冲液或 Opti-MEM™ I 培养基 ^[3]	50 μ L	150 μ L	900 μ L	1.5 mL	3 mL	12 mL	24 mL	48 mL
ExpiFectamine™ 293 试剂	2.5 μ L	8 μ L	50 μ L	80 μ L	160 μ L	640 μ L	1.3 mL	2.6 mL
Opti-Plex™ 复合缓冲液或 Opti-MEM™ I 培养基 ^[4]	1.4 mL	140 μ L	850 μ L	1.4 mL	2.8 mL	11.2 mL	22.5 mL	45 mL

容器类型	96 孔深孔板	24 孔深孔板	微型生物反应器	培养瓶125 mL	培养瓶250 mL	1 L 培养瓶	2 L 培养瓶	3 L 培养瓶
ExpiFectamine™ 293 转染增强剂 1	5 µL	15 µL	90 µL	150 µL	300 µL	1.2 mL	2.4 mL	4.8 mL
ExpiFectamine™ 293 转染增强剂 2	50 µL	150 µL	900 µL	1.5 mL	3 mL	12 mL	24 mL	48 mL
最终培养体积	~1 mL	~3 mL	~20 mL	~30 mL	~60 mL	~240 mL	~480 mL	~960 mL

[1] 建议的转速范围；最佳转速应根据所用的特定实验室设备确定。

[2] 假设质粒 DNA 储备液浓度 1mg/mL，终浓度为 1.0µg/mL。

[3] 用于稀释质粒 DNA 的 Opti-MEM™ I 培养基或 Opti-Plex™ 复合缓冲液体积。

[4] 用于稀释 ExpiFectamine™ 293 试剂的 Opti-MEM™ I 培养基或 Opti-Plex™ 复合缓冲液体积。



订购信息

除非另有说明，否则所有材料均可通过 thermofisher.com 获得。

其他产品

产品	规格	货号
Expi293F™ 细胞	1 mL	A14527
	6 × 1 mL	A14528
Expi293F™ 细胞 (cGMP 建档)	1 瓶	100044202
Expi293F™ GnT1- 细胞	1 mL	A39240
Expi293F™ 可诱导细胞	1 mL	A39241
Expi293F™ 可诱导 GnT1- 细胞	1 mL	A39242
Expi293™ Met (-) 蛋白标记试剂盒	1个试剂盒	A41249
ExpiFectamine™ 293 转染试剂盒	适用于 1 L 培养物	A14524
ExpiFectamine™ 293 Met (-) 转染试剂盒	适用于 1 L 培养物	A39249
Expi293™ 表达培养基	1 L	A1435101
Expi293™ Met (-) 表达培养基	1 L	A4096701
Opti-Plex™ 复合缓冲液	100 mL	A4096801
pRABBIT IgG IRES-EmGFP 阳性对照载体	1个试剂盒	A39243
表达抗体的阳性对照载体	1 瓶	A14662
PNGase F 聚糖切割试剂盒	1 个试剂盒 (500,000 单位)	A39245
pcDNA™5/TO 哺乳动物表达载体	1个试剂盒	V103320
pcDNA™ 3.4-TOPO™ TA 克隆试剂盒	1个试剂盒	A14697
L-蛋氨酸 (Methyl-13C)	225 mg	A39248
L-硒代蛋氨酸	250 mg	A39247

产品	规格	货号
盐酸四环素	500 mg	A39246
台盼蓝染色液	100 mL	15250-061

悬浮培养摇瓶

项目	容量	货号
Nalgene™ PETG Erlenmeyer 一次性平底无菌锥形瓶	125 mL	4115-0125
	250 mL	4115-0250
	500 mL	4115-0500
	1,000 mL	4115-1000
	2,000 mL	4115-2000
	2,800 mL	4115-2800

质粒纯化产品

项目	规格	货号
PureLink™ HiPure 质粒中提试剂盒	25次制备	K210004
PureLink™ HiPure 质粒过滤中提试剂盒	25次制备	K2100-14
PureLink™ HiPure 质粒大提试剂盒	10次制备	K210006
PureLink™ HiPure 质粒过滤大提试剂盒	10次制备	K2100-16
PureLink™ HiPure Expi 质粒超大量试剂盒	4次制备	K210008XP



警告! 一般安全性。未按用户文档中的说明使用本品, 可能导致人身伤害或使仪器或设备受损。请确保任何使用本产品的个人均接受了实验室常规安全措施培训, 并已了解本文档中提供的安全信息。

- 在使用仪器或设备之前, 请阅读和理解该仪器或设备生产商所提供的用户文档中的安全信息内容。
 - 在操作化学品之前, 请阅读和理解所有相关的安全技术说明书 (SDS), 并确保使用适当的个人的防护设备 (手套、实验服、护目镜等)。请参见本文档中的“文档和支持”部分, 以获得相关的SDS信息。
-

化学品安全性



警告! 一般化学品安全性。为最大限度规避危险，请确保实验室人员阅读下述有关化学品使用、存储和废弃物处理的一般安全指南，并就此接受过实训。请参阅相应 SDS 了解具体注意事项和说明：

- 在储存、操作处置或使用任何化学品或有害物质之前，请阅读并理解化学品生产商所提供的安全技术说明书（SDS）。请参见本文档中的“文档和支持”部分，以获得相关的 SDS 信息。
 - 尽可能避免接触化学品。操作处置化学品时，请穿戴适当的个人防护装备（例如防护眼镜、手套或防护服）。
 - 尽可能避免吸入化学品。请勿任由化学品容器敞开。仅可在充分通风条件下使用（例如，在通风柜中）。
 - 定期检查，避免化学品泄漏或溢出。如发生泄漏或溢出，请遵照 SDS 文档建议的制造商清理操作步骤。
 - 请在通风柜中操作处置化学废弃物。
 - 提供存放废物的主容器和辅助容器。（主容器保存直接产生的废弃物。辅助容器负责盛放主容器溢出或泄漏的废物。这两个容器必须与废物材料的化学特性相容，并符合本国、本省/州和当地有关废物存放的法规要求）。
 - 清空废物容器之后，请使用随附的盖子将容器密封好。
 - 根据您的实验室所开展的应用及所用的试剂和物质，对产生的废弃物进行分类（必要时进行分析）。
 - 确保遵守所有当地、本州/省和/或本国的有关法规储存、传输、运送和处置废弃物。
 - 切记！放射性或生物危害性材料可能需要采取特殊操作方法，并可能要遵循废弃规定。
-



警告! 存在危险废弃物（来自仪器）。仪器产生的废弃物具有潜在危害性。请遵循前述“一般化学品操作处置”警告中记载的指南。



警告! 4L 试剂和废液瓶安全性。4L 试剂瓶和废液瓶可能会破裂和泄漏。每个 4L 瓶应固定在低密度聚乙烯安全容器中，盖紧盖子并将手柄锁定在直立位置。

生物危害安全性



警告! 潜在危害。根据仪器上使用的样品, 表面可能会被视为具有生物危害性。处理生物危害时, 请使用适当的净化方法。



警告! 生物危害。生物样本, 如组织、体液、传染源及人和动物血液等生物样本具有传染疾病的潜在风险。所有的相关工作都应在装备有适当安全装备(例如物理屏障设备)的设施内进行。安全设备也包括个人防护物品, 例如手套、外套、实验服、鞋套、实验靴、防毒面罩、防护面罩、防护眼镜或风镜。任何个人在操作潜在生物危害性材料之前, 应按照现行法规和公司/机构的要求进行培训。请遵循所有适用的本地、本州/省和/或本国法规。以下参考文献为实验室环境下操作生物样本提供了通用指南。

- 美国健康和人类服务部指南, 见Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL) (微生物与生物医学实验室生物安全), 第5版, HHS 发行编号. (CDC) 21-1112, 2009年12月修订; 文件位置:<https://www.cdc.gov/labs/pdf/>
 - 世界卫生组织, 实验室生物安全手册, 第3版, WHO/CDS/CSR/LYO/2004.11; 文件位置: www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/Biosafety7.pdf
-



客户和技术支持

请访问 thermofisher.com/support 获取最新服务和支持信息，包括：

- 全球联系号码
- 产品支持信息，包括：
 - 产品常见问题解答(FAQ)
 - 软件、补丁和更新
 - 针对诸多应用和仪器的培训
- 订购和网页支持
- 产品文档，包括
 - 用户指南、手册和实验方案
 - 分析证书
 - 安全技术说明书(SDS/MSDS)

注意：其他厂商的试剂和化学品的安全技术说明书，请联系对应制造商。

有限产品质保

Life Technologies公司和/或其附属公司按照Life Technologies一般销售条款及条件 (www.thermofisher.com/us/en/home/global/terms-and-conditions.html) 中的规定为其产品担保。如果您有任何疑问，请通过 www.thermofisher.com/support 联系Life Technologies。

thermofisher.com/support | thermofisher.com/askaquestion

thermofisher.com

14 April 2019

2019年4月14日



赛默飞
官方微信



赛默飞
生命科学官方微信

免费服务电话：800 820 8982/400 820 8982
信息咨询邮箱：cnbidmarketing@thermofisher.com

ThermoFisher
SCIENTIFIC

仅供研究使用。不可用于诊断程序。© 2019 Thermo Fisher Scientific Inc.保留所有权利。所有商标均为Thermo Fisher Scientific或其子公司的资产。macOS是Apple Inc.的商标。Windows是Microsoft Corporation的商标。