



Sf9 经典 · 高密 · 全能 | Sf21 耐毒强健 · 膜蛋白友好

Sf9 / Sf21 昆虫细胞

培养操作说明书

Sf9/Sf21 Insect Cell

适用细胞：Sf9、Sf21 | 仅限科研用途，不用于诊断

文件编号	版本号	生效日期	页码
WD-IFU-Sf9Sf21-CELL	V1.0	2026 年 08 月 10 日	见页脚

目 录

第一章 概述.....	1
1.1 适用范围.....	1
1.2 规格、储存与运输.....	1
1.3 细胞系特性对比.....	1
1.4 培养基推荐.....	1
1.5 培养条件通用要求.....	2
第二章 细胞复苏.....	2
2.1 复苏前准备.....	2
2.2 复苏流程概览.....	2
2.3 悬浮培养复苏.....	3
第三章 细胞传代.....	3
3.1 传代总则.....	3
3.2 悬浮细胞传代 (Sf9 / Sf21)	4
第四章 细胞冻存.....	4
4.1 冻存原则.....	4
4.2 冻存操作步骤.....	4
4.3 冻存后预验证 (Pre-qualification)	5
第五章 细胞计数与活力检测.....	5
5.1 台盼蓝排染法.....	5
5.2 浓缩与换液.....	5
5.3 细胞分散.....	6
第六章 故障排除.....	6
6.1 悬浮培养——形态异常.....	6
6.2 悬浮培养——生长 / 活力下降.....	6
6.3 培养容器的清洗.....	6
第七章 附录.....	7
7.1 含血清培养基向无血清培养基的梯度适应.....	7
7.2 常用抗生素.....	7



第一章 概述

1.1 适用范围

本说明书适用于 Sf9、Sf21 昆虫细胞系的常规培养、复苏、传代及冻存操作，可用于 NovaBac™ 杆状病毒表达系统（货号：INK1001）。

1.2 规格、储存与运输

产品名称	货号	规格	储存条件	有效期
Sf9 昆虫细胞	Bic1009	1 mL × 1 管	-80 °C/液氮	2 年/长期
Sf21 昆虫细胞	Bic1021	1 mL × 1 管	-80 °C/液氮	2 年/长期

注意：运输条件：干冰运输。收到后请立即检查冻存管状态，并尽快转入 -80 °C 或液氮气相保存。
-80 °C 保存不超过 2 年；需长期保存请转入液氮气相。冻存管不可反复冻融。

1.3 细胞系特性对比

细胞系	倍增时间	细胞形态	推荐起始培养基
Sf9	24-30 小时	球形，略带颗粒感，大小规则；贴壁牢固	Nova 921 SFM™ 昆虫细胞无血清培养基
Sf21	24-30 小时	球形，略带颗粒感，大小不一；贴壁牢固	Nova 921 SFM™ 昆虫细胞无血清培养基

1.3.1 来源

- Sf9 与 Sf21 源自 IPLB-SF-21 细胞系，取自秋粘虫 (*Spodoptera frugiperda*) 蛹期卵巢组织；Sf9 是 IPLBSF21-AE (Sf21) 的克隆株。

1.3.2 细胞系选择建议

- Bacmid 转染、病毒纯化及扩增：推荐 Sf9/Sf21。Sf9 细胞大小均一、易于操作，形成的单层和蚀斑更规整；Sf21 对部分毒性蛋白与分泌型蛋白耐受性更好，可作为 Sf9 表达不佳时的备选宿主。
- 分泌型重组蛋白表达及 NovaRapid 快速瞬时表达系统（货号：INK2001）：推荐 High Five，其分泌表达量通常为 Sf9 的 5-10 倍（部分蛋白），快速瞬时转染效率非常高，48 小时即可收样。

1.4 培养基推荐



细胞系	无血清培养基
Sf9	Nova 921 SFM™ 昆虫细胞无血清培养基（货号：IM1001S）
Sf21	Nova 921 SFM™ 昆虫细胞无血清培养基（货号：IM1001S）

■ 无血清培养基使用要点

- Nova 921 SFM™ 昆虫细胞无血清培养基为完全配方，无需额外补充其他物质。
- 已含有 Pluronic F-68 等表面活性剂，无需额外添加。
- 感染期间可额外加入 2 % 血清，以降低蛋白酶活性。
- 从含血清培养基过渡到无血清培养基时，建议采用梯度适应法（见第七章附录 7.1）。

1.5 培养条件通用要求

参数	要求
培养温度	26–28 °C
CO ₂	无需 CO ₂
操作环境	在二级生物安全柜或超净工作台中进行，严格无菌操作

温度注意：低于 26 °C：细胞生长变慢，倍增时间延长；高于 28–30 °C：倍增时间增加；持续高于 30 °C：活力下降，即使恢复至 26–28 °C 也可能无法恢复，应弃用。

第二章 细胞复苏

2.1 复苏前准备

- 液氮罐中取出的冻存管、37 °C 水浴、75 % 乙醇、无菌离心管（15 mL）；
- 预温至室温的培养基（Nova 921 SFM™ 昆虫细胞无血清培养基，货号：IM1001S）；
- 相应规格的培养瓶（T-25 / T-75）或摇瓶（125 mL 起步）；
- 血球计数板或自动细胞计数仪。

2.2 复苏流程概览

步骤	操作
1	从液氮中快速取出冻存管
2	37 °C 水浴中快速解冻（约 1-2 分钟，保留小冰晶即可）并滴加培养液
3	细胞计数，确认细胞密度与活力
4	按推荐密度接种（悬浮： 3×10^5 – 5×10^5 cells/mL；贴壁： 2×10^4 – 5×10^4 cells/cm ² ）
5	悬浮密度 $> 2 \times 10^6$ cells/mL 或贴壁长至约 90 % 汇合时传代
6	在第 3 代时冻存数管作为备份

2.3 悬浮培养复苏

1. 培养基预温至室温。
2. 取冻存管，37 °C 水浴快速解冻至仅剩小冰晶（约 1-2 分钟）。
3. 用 75 % 乙醇擦拭冻存管外壁，移入超净工作台。
4. 将细胞悬液转入 15 mL 无菌离心管。
5. 缓慢逐滴加入 5 mL 预温新鲜培养基，同时轻旋管体混匀，避免渗透冲击，提高回收率。
6. 取样计数，确定细胞密度与活力。
7. 转入 125 mL 摇瓶，补加培养基至终体积 25–30 mL，终密度 3×10^5 – 5×10^5 活细胞/mL（首次复苏最低须 $\geq 3 \times 10^5$ cells/mL，推荐 5×10^5 活细胞/mL）。
8. 置于 26–28 °C 非湿化培养箱中，摇床转速 90–100 rpm（振幅 50 mm）；应根据摇床振幅确定转速，见表 1。

表 1 摇床振幅与推荐转速

振荡轨道直径（振幅）	推荐转速
19 mm	125 ± 5 rpm
25 mm	125 ± 5 rpm
50 mm	95 ± 5 rpm

9. 复苏后 4–5 天细胞密度通常可达 $> 2 \times 10^6$ cells/mL；若未达到但活力良好，可 100 × g 离心 3–5 分钟，以原体积的新鲜培养基重悬后继续培养。
10. 1–3 天后再次计数。
11. 当密度达 2×10^6 – 4×10^6 cells/mL 时进行首次传代。

第三章 细胞传代

3.1 传代总则

- 在对数生长中期（mid-log phase）传代，此时细胞状态最佳。

- 每次传代前后进行细胞计数，活力 $\geq 90\%$ （悬浮培养通常 $\geq 95\%$ ）。
- 一般每 3 个月重新复苏一次新细胞（无论每周传代 2 次还是 3 次），避免过高代次影响实验重复性。
- 尽量在低代次（ < 10 代）冻存细胞作为工作储备。

3.2 悬浮细胞传代 (Sf9 / Sf21)

3.2.1 复苏后细胞的传代

1. 待细胞密度达 $2 \times 10^6 - 5 \times 10^6$ cells/mL 时传代，接种至摇瓶（125 mL）或转瓶（100–250 mL），起始密度 $0.5 \times 10^6 - 1 \times 10^6$ 活细胞/mL。
2. 摇瓶：26–28 °C，90–100 rpm（振幅 50 mm）；转瓶：80–90 rpm，叶轮需浸没 ≥ 1 cm。
3. 密度达 $2 \times 10^6 - 4 \times 10^6$ cells/mL 时传代，接种密度 $3 \times 10^5 - 5 \times 10^5$ 活细胞/mL。

3.2.2 摇瓶培养体积参考

摇瓶规格	建议总培养体积
125 mL	30–50 mL
250 mL	75–100 mL
> 500 mL	瓶体积的 1/4 – 1/3

3.2.3 转瓶培养基体积参考

转瓶 (Spinner Flask) 规格	最低培养体积	其他要求
100 mL	30 mL	活力 $\geq 95\%$ ；起始密度 $\geq 0.5 \times 10^6$ cells/mL；叶轮浸没 ≥ 1 cm
250 mL	80 mL	同上
500 mL	200 mL	同上；不推荐直接从冻存起始

第四章 细胞冻存

4.1 冻存原则

- 冻存时细胞须 $> 90\%$ 活力并处于对数中期（贴壁约 90% 汇合；悬浮以生长曲线确定）。
- Sf9 / Sf21 一般在 15 代以下冻存。
- 同批冻存多管，冷冻后次日即行复苏预检。
- 在预检合格前，保留原有生长培养作为备份。

4.2 冻存操作步骤

1. 准备冻存管 (cryovial)，标注细胞名称、代次、密度、日期。



2. 将待冻细胞转入 15 mL 或 50 mL 无菌离心管（多瓶可合并）。
3. 取样计数与活力检测。
4. $100\text{--}200 \times g$ 离心 5 分钟，收集细胞沉淀。
5. 轻轻弹松管底松动沉淀；缓慢加入适量 $2\text{--}8^\circ\text{C}$ 放置的 NovaCryo™ 无血清昆虫细胞冻存液（货号：INR1001），用移液器轻柔吹打重悬至目标密度（ $1.0 \times 10^7\text{--}2.0 \times 10^7$ cells/mL）。
6. 分装至冻存管，一般 1 mL/管；分装过程中频繁轻摇悬液以保持均匀。
7. 直接置于 -80°C 过夜。
8. 次日转入液氮长期保存。

4.3 冻存后预验证（Pre-qualification）

转入液氮次日，必须随机取一管冻存细胞复苏，完成以下预检：

- 细菌、真菌及支原体检测阴性；
- 形态正常，无明显碎片。

若不合格，再复检同一批次第二管；如仍失败，扩增原生长细胞后重新冻存。所有冻存批次均应预检，且在预检通过前不可丢弃原生长培养。

第五章 细胞计数与活力检测

5.1 台盼蓝排染法

1. 使用预温培养基按需调整稀释比例，取 15–50 μL 细胞悬液，加等体积 0.4 % 台盼蓝溶液，轻柔混匀。
2. 按需调整稀释比例，使血球计数板单个大方格（ 1 mm^2 ）内可见 10–50 个细胞。
3. 加样至计数板， $10\times$ 目镜 / $10\times$ 物镜下计数。
4. 分别记录蓝染（死）和透亮（活）细胞数，计算活力与密度。

注意：台盼蓝对细胞有毒性，加入染液后应在 3–5 分钟内完成镜检，否则活细胞也会着色，导致活率被低估。

5.1.1 计算公式

项目	计算公式
稀释倍数	$(\text{细胞悬液体积} + \text{染液体积}) / \text{细胞悬液体积}$
活细胞数 / mL	$(\text{计数总活细胞数} \times \text{稀释倍数} \times 10^4) / \text{计数方格数}$
细胞活力 (%)	$\text{活细胞数} / \text{总细胞数} \times 100\%$

5.2 浓缩与换液

当培养 4–5 天仍密度偏低、或碎片明显时，应浓缩细胞并换用新鲜培养基：

1. $100\text{--}200 \times g$ 离心 3–5 分钟收集细胞。
2. 小心吸除上清，弹管松散沉淀。
3. 用适量新鲜培养基轻柔重悬，取样计数后按标准接种密度转入新容器。

5.3 细胞分散

转染和蚀斑实验前需使细胞均匀分布。

1. 将培养瓶或培养皿置于水平桌面。
2. 前后、左右各摇晃 4 次，使液体覆盖整个生长面。
3. 切勿转圈摇晃——这会使细胞富集于边缘，导致分布不均。

第六章 故障排除

6.1 悬浮培养——形态异常

现象	可能原因	建议措施
细胞裂解 / 碎片增加	代次过高；搅拌或摇床速度过高；杆状病毒污染；容器洗涤残留洗涤剂	复苏新细胞；降低转速或摇速，补加 0.1 % Pluronic™ F-68；按 6.3 节清洗容器
细胞肿胀、核内包涵体	杆状病毒污染	丢弃并重建培养，更换耗材

6.2 悬浮培养——生长 / 活力下降

现象	可能原因	建议措施
倍增时间延长	接种密度过低；未在对数中期传代；通气不足	$100 \times g$ 离心，以小体积重悬至 5×10^5 cells/mL；培养体积 $\leq$ 瓶体 1/2；保证叶轮稳定运转
活力 $< 90\%$	剪切损伤（搅拌 / 摇床过快）；通气不足；微生物或病毒污染	降低转速，补加 0.1 % Pluronic™ F-68；调整叶轮浸没深度；弃去受污染培养，必要时添加抗生素

6.3 培养容器的清洗

杆状病毒颗粒可耐受 1 次高压灭菌循环，因此涉及病毒操作的容器必须严格清洗并双灭菌：

1. 使用 10 % 乙酸，搅拌或振荡浸泡 2 小时。不得使用普通洗涤剂（残留对细胞有毒）。
2. 自来水冲洗 5 次。
3. 蒸馏水冲洗 5 次。
4. 瓶盖松扣。
5. 加入去离子水高压灭菌 1 次（液体循环，45 分钟）。

6. 排水后干燥灭菌 1 次（45 分钟）。

第七章 附录

7.1 含血清培养基向无血清培养基的梯度适应

1. 取对数中期细胞，计数并确认活力。
2. 按含血清：无血清 = 75 : 25 的比例配制过渡培养基，按 2 倍常规接种密度接种。
3. 待细胞达对数中期后，分瓶传代至 75 : 25 和 50 : 50 两种比例。
4. 再次达对数中期后，继续传代至 50 : 50 和 25 : 75。
5. 逐步降低血清比例，每步均保留前一比例的备份培养，以便回退。
6. 当细胞在纯无血清培养基中形态正常、倍增时间达标（Sf9 / Sf21：24–30 h），视为 100 % 适应完成。

遇阻时的回退策略：如低血清比例下生长不良，改用 40 : 60 代替 25 : 75，或在同一比例下多传 1–2 代后再降低血清含量。

7.2 常用抗生素

抗生素	工作浓度	作用机制
庆大霉素（Gentamicin）	10 µg/mL	抑制细菌蛋白合成
两性霉素 B（Amphotericin B）	0.25 µg/mL	结合甾醇，破坏真菌膜通透性
青霉素（Penicillin）	50–100 U/mL	抑制细菌细胞壁合成
链霉素（Streptomycin）	50–100 µg/mL	抑制细菌蛋白合成