



分泌超强·极速瞬转

High Five 昆虫细胞

培养操作说明书

High five Insec Cell

适用细胞：High Five | 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-HighFive-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 细胞系特征	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 贴壁培养复苏	2
2.4 复苏后常见现象	3
第三章 细胞传代	3
3.1 传代总则	3
3.2 贴壁细胞「脱落法」传代	4
3.3 从贴壁建立悬浮培养	4
第四章 细胞冻存	5
4.1 冻存原则	5
4.2 冻存操作步骤	5
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	6
5.2 浓缩与换液	6
5.3 细胞分散	6
第六章 故障排除	6
6.1 贴壁培养——形态异常	6
6.2 贴壁培养——生长 / 活力下降	7
6.3 悬浮培养——形态异常	7
6.4 悬浮培养——生长 / 活力下降	7
6.5 High Five 悬浮培养——结团	8
6.6 培养容器的清洗	8
第七章 附录	8
7.1 含血清培养基向无血清培养基的梯度适应	8
7.2 常用抗生素	9

第一章 概述

1.1 适用范围

本说明书适用于 High Five 昆虫细胞系的常规培养、复苏、传代及冻存操作，可用于 NovaRapid™ 快速瞬时表达系统（货号：INK2001）的重组蛋白表达，以及 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
High Five 昆虫细胞	Bic1050	1 mL × 1 管	-80 °C / 液氮	长期

注意：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。冻存管不可反复冻融。

1.3 细胞系特征

细胞系	倍增时间	细胞形态	推荐起始培养基
High Five	18–24 小时	球形，略带颗粒感，大小不一；贴壁松散	Nova SFM™ 昆虫细胞无血清培养基

1.3.1 来源

- High Five (BTI-TN-5B1-4) 由 Boyce Thompson 植物研究所建立，来源于粉纹夜蛾 (*Trichoplusia ni*) 的卵巢细胞。

1.3.2 细胞系选择建议

- NovaRapid™ 快速瞬时表达（货号：INK2001）及分泌型重组蛋白表达：推荐 High Five，快速瞬时转染效率非常高，48 小时即可收样，其分泌表达量通常为 Sf9 的 5–10 倍（部分蛋白）。
- 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。

重要提示：经 RT-PCR 确认，High Five 细胞携带内源性 α -nodavirus。在某些条件下可产生病毒颗粒，但不影响异源蛋白表达及其预期研究用途。

1.4 培养基推荐

细胞系	无血清培养基
High Five	Nova SFM™ 昆虫细胞无血清培养基（货号：IM1011S）



■ 无血清培养基使用要点

- Nova SFM 昆虫细胞无血清培养基（货号：IM1011S）为完全配方，无需额外补充其他物质。
- 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（昆虫血淋巴温度，非湿度控制）
CO ₂	无需 CO ₂ 交换
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 或高于 28 °C：细胞生长变慢，倍增时间延长；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 SFM 昆虫细胞无血清培养基，货号：IM1011S）；
- 相应规格的培养瓶（T-25 / T-75）或 TC 处理的培养皿（9 cm）；
- 血球计数板或自动细胞计数仪、0.4 % 台盼蓝。

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）
3	细胞计数，确认细胞密度与活力
4	按推荐密度接种（贴壁： 2×10^4 – 5×10^4 cells/cm ² ）
5	贴壁长至约 90 % 汇合后再转入悬浮培养；悬浮密度 $> 2 \times 10^6$ cells/mL 时传代扩增
6	在第 3 代时冻存数管作为备份

2.3 贴壁培养复苏

1. 将培养基提前取出，平衡至室温。
2. 从液氮罐中取出冻存管，置于 37 °C 水浴中轻轻晃动，约 1–2 分钟至仅剩小冰晶。



3. 将冻存管外壁用 75 % 乙醇消毒，移入超净工作台。
4. 将冻存管内细胞悬液转入 15 mL 无菌离心管中。
5. 缓慢逐滴加入预温的 5 mL 新鲜培养基，边加边轻轻旋转管体，避免渗透冲击，提高回收率。
6. 取少量悬液进行计数，确定活细胞密度与活力。
7. 按 2×10^4 – 5×10^4 活细胞/cm² 的密度接种至合适规格的培养瓶中（见表 1）。

表 1 培养瓶或培养皿的生长面积及推荐体积

培养瓶 / 培养皿	生长面积 (cm ²)	建议体积 (mL)
6 cm 培养皿 (TC 处理)	21	5
10 cm 培养皿 (TC 处理)	55	12
15 cm 培养皿 (TC 处理)	152	35
T25 培养瓶	25	5
T75 培养瓶	75	10
T150 培养瓶	150	30

8. 置于 26–28 °C、非湿化、无 CO₂ 培养箱中静置培养。
9. 当细胞长至约 90 % 汇合时，按「脱落法 (Sloughing)」进行首次传代。

2.4 复苏后常见现象

- 解冻后细胞可能呈不规则形或略皱缩，并伴有碎片及漂浮细胞，属于正常现象，随传代可逐渐消除。
- 若 2–3 代后仍有大量碎片、活力低于 90 % 或倍增时间显著延长，请参阅第六章故障排除。

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与活力检测，活力应 $\geq 90\%$ (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。

培养方式	传代时机	接种密度
贴壁培养	约 90 % 汇合 (对数中期)	2×10^4 – 5×10^4 活细胞/cm ²
悬浮培养	2×10^6 – 5×10^6 cells/mL	3×10^5 – 5×10^5 活细胞/mL

3.2 贴壁细胞「脱落法」传代

1. 吸除培养瓶中大部分旧培养基，保留约 5 mL（与培养瓶规格无关）。
2. 将培养瓶倾斜，使剩余培养基流向培养瓶底部。
3. 用无菌吸管（巴氏吸管）吸取部分培养基，从培养瓶底部开始，以左右来回的方式冲洗单层细胞，流速应轻柔。
4. 首批细胞脱落后，其余细胞更易被冲下，可重复冲洗 1-2 次。
5. 取少量悬液计数，按 2×10^4 – 5×10^4 活细胞/cm² 接种至新瓶。
6. 补加新鲜培养基至推荐体积，置于 26–28 °C 静置培养。

关键提示：昆虫细胞对机械力敏感。过度吹打、剧烈振荡、以及反复过早或过晚传代（< 80 % 或 > 90 % 汇合）均会导致倍增时间延长、活力下降。

3.3 从贴壁建立悬浮培养

注意：High Five 不能由冻存液直接起始悬浮培养，需先以贴壁形式扩增，再在含肝素的 Nova SFM™ 昆虫细胞无血清培养基中逐步适应至悬浮。

1. 扩增足够数量的贴壁对数期细胞（活力必须 > 95 %），一般取 4 瓶汇合的 T-75 贴壁 High Five 细胞。
2. 使用「脱落法」使细胞脱落，接种至摇瓶（125 mL）或转瓶（100–250 mL），起始密度 0.5×10^6 – 1×10^6 活细胞/mL。
3. 于 Nova SFM™ 昆虫细胞无血清培养基中加入肝素至终浓度 10 U/mL（购买本公司的细胞株和培养基可省略此步）。
4. 摇瓶：26–28 °C，90–100 rpm（摇床振幅 50 mm）；转瓶：80–90 rpm，叶轮需浸没 ≥ 1 cm。
5. 密度达 2×10^6 – 4×10^6 cells/mL 时传代，接种密度 3×10^5 – 5×10^5 活细胞/mL。
6. 当倍增时间稳定在 18–24 小时、活力 > 90 % 时，视为适应成功。
7. 适应成功后可逐步撤除肝素；若去除后仍能稳定悬浮且无大聚集（> 10 细胞/团），即完全适应悬浮培养。

3.3.1 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

3.3.2 转瓶培养基体积参考

转瓶规格	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 > 500 mL 转瓶

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）。
- High Five 建议在 15 代次以下冻存。
- 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

- 准备冻存管（cryovial），标注细胞名称、代次、密度、日期。
- 将待冻细胞转入 15 mL 或 50 mL 无菌离心管（多瓶可合并）。
- 取样计数与活力检测。
- $100-200 \times g$ 离心 5 分钟，收集细胞沉淀。
- 轻轻弹松管底使沉淀松动；缓慢加入适量 $2-8^\circ\text{C}$ 预冷的 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。
- 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。
- 使用程序降温盒以约 $1^\circ\text{C}/\text{min}$ 的速率降温；若无程序冷冻设备，可先于 -5°C 至 -20°C 放置 30 分钟，再置于 -80°C 过夜。
- 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（推荐 Nova SFM™ 昆虫细胞无血清培养基）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. 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	(细胞悬液体积 + 染液体积) / 细胞悬液体积
活细胞数 / mL	(计数总活细胞数 $\times$ 稀释倍数 $\times 10^4$) / 计数方格数
细胞活力 (%)	活细胞数 / 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. 100–200 $\times g$ 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。

培养基保鲜原则：培养基在培养箱中长时间温育会降解，营养物质也被消耗。细胞在同一瓶培养基中静置时间不应超过 4–5 天。

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 贴壁培养——形态异常



现象	可能原因	建议措施
复苏后颗粒状 / 漂浮细胞多	代次过高 (> 30)	用低代次细胞重新复苏
细胞裂解、碎片多	被野生型或重组杆状病毒污染；培养基污染	丢弃培养并重新复苏；消毒通风柜和器具；更换培养基；细胞培养与病毒操作独立进行
细胞肿胀、核内可见包涵体	野生型或重组杆状病毒污染	丢弃并重新建立培养，严格隔离病毒操作
活力下降 / 生长减慢	传代机械操作过重；汇合前过早传代	改用脱落法；等待至约 90 % 汇合再传代
漂浮细胞 > 10 %	培养过度汇合	更换培养基并传代

6.2 贴壁培养 —— 生长 / 活力下降

现象	可能原因	建议措施
倍增时间延长	传代手法粗糙；汇合程度不当 (< 80 % 或 > 90 %)；代次 > 30	改用脱落法；严格在约 90 % 汇合时传代；复苏低代次新细胞
活力 < 90 %	机械损伤；细菌 / 真菌污染；杆状病毒污染	改用温和传代法；丢弃后重新复苏并消毒；分瓶保存细胞培养基与病毒培养基

6.3 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 6.6 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

6.4 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 × g 离心，以小体积重悬至 5×10^5 cells/mL；制作生长曲线确定对数中期；培养体积 ≤ 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

6.5 High Five 悬浮培养 —— 结团

可能原因	建议措施
密度过高	将转瓶或摇瓶静置 30–45 分钟使大团沉降，取上 1/3 含小团或单细胞的液体转移至新瓶继续培养；严格在对数中期传代
搅拌 / 摇速过高	转瓶 80–90 rpm，摇瓶 125–150 rpm
适应不充分	补加 10 U/mL 肝素，延长适应时间；若结团 > 50 %，重新从贴壁开始适应

6.6 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次灭菌：

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（High Five: 18–24 h；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