

货号	品名	规格	有效期	外观	储存条件	运输条件
H320KJ	AdvaCHO 无血清培养基	500mL	12个月	液体	2~8℃, 避光	蓝冰

## 1. 产品描述

AdvaCHO 无血清培养基是不含动物源成分并且化学成分限定的培养基。可广泛适用于多种中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞的高密度悬浮培养, 可采用批次和连续灌注等培养方式, 用于重组蛋白、疫苗和单克隆抗体等的生产。

本产品使用注射用水 (Water-For-Injection) 配置。

### 本产品关注点

含有 (+)

- 6.0 g/L D-葡萄糖
- 碳酸氢钠

不含 (-)

- L-谷氨酰胺
- HT 添加剂
- 酚红

本产品供科学研究和生产使用, 用于组织和细胞的体外培养。

**严禁用于临床。**

## 2. 质量体系

上海源培生物科技股份有限公司的产品是在 cGMP 标准车间中生产的。

上海源培生物科技股份有限公司已取得 ISO9001:2015、ISO13485:2016 质量体系认证。

## 3. 产品参数

本产品为过滤除菌产品

物理外观: 浅黄色澄清液体

内毒素:  $\leq 3$  EU/mL

渗透压: 270 ~ 340 mOsm/kg·H<sub>2</sub>O

pH 值: 7.0 ~ 7.4

储藏条件: 2 ~ 8℃, 避光

运输条件: 蓝冰

用途: 仅供科研和生产使用

## 4. 使用指南

使用时请穿戴合适的安全手套、实验服和护目镜。产品不能用于人体。

细胞直接接触的环境必须是无菌的, 用于细胞培养的试剂必须是无菌的。请在无菌环境中进行细胞实验, 任何器皿或工具, 移入无菌环境之前, 应在入口处去除外包装并使用酒精擦拭进行消毒。

## 5. 制备培养基

以准备 500mL 完全的 AdvaCHO 无血清培养基为例:

1. 使用前需加入终浓度 4~8mM 的 L-谷氨酰胺或 L-丙氨酰-谷氨酰胺溶液。例如: 在 500mL 培养基中加入 200mM 的 L-谷氨酰胺或 L-丙氨酰-谷氨酰胺母液 10~20mL。

2. 培养基准备完全后, 请在 2 ~ 8℃ 下避光保存, 并尽快使用完毕。

**注意:** 在培养过程中, 当有细胞簇产生时, 需要加入终浓度 1mL/L 的抗细胞团剂 (货号 S490J7)。

当发生任何培养基品种替换时, 细胞至少需要在新培养基中传代 3 次, 才能进行其它实验或应用。

当您使用的细胞系对氨毒性敏感时, 请考虑降低 L-谷氨酰胺的使用浓度或者改用 L-丙氨酰-谷氨酰胺溶液。

产品无需额外添加表面活性剂。

## 6. 细胞培养的条件

培养基: 完全 AdvaCHO 无血清培养基

细胞系: 中国仓鼠卵巢细胞 (CHO)

细胞类型: 悬浮细胞

培养容器和设备: 摇瓶、生物反应器或 CO<sub>2</sub> 恒温摇床

培养条件: 36 ~ 37℃, CO<sub>2</sub> 含量 5~10% 的湿润空气, 避光。

实验前应对细胞培养仪器进行温度和 CO<sub>2</sub> 含量的设置。

## 7. 复苏

以下实验方案, 均以 125mL 锥形瓶为例。

以一管冻存细胞体积 1.5mL, 活细胞密度  $0.5 \times 10^7 \sim 1 \times 10^7$  个/mL 为例:

1. 准备无菌的培养容器 (125mL 锥形瓶), 在容器中加入 28.5mL 预热的完全培养基, 然后立刻开始冻存细胞的解冻;
2. 在 37℃ 水浴中, 迅速 (< 1 分钟) 解冻一管冻存细胞。当最后一丝冰融化时, 迅速从水浴中移出细胞冻存管;
3. 轻轻吸出管中内容物, 并转移到第 1 步预先准备好的锥形瓶中, 采用合适的封闭材质封闭瓶口, 确保适当的气体交换;
4. 将锥形瓶放到摇床中, 设置转速 120~140rpm, 进行细胞培养;
5. 细胞复苏 3~5 天后, 挑选对数生长期的细胞进行传代; 推荐以  $3 \times 10^5$  个/mL 的活细胞密度进行传代, 传代 3 次后再进行细胞应用。

**注意:** 由于复苏的细胞非常脆弱, 一般无需离心去除 DMSO。

## 8. 悬浮细胞传代

推荐在细胞传代 30 次或者持续 3 个月以上时，复苏新的冻存细胞进行传代。

**推荐当细胞满足以下条件时进行传代:**

- ① 对数生长期；
- ② 细胞活率大于 90 %
- ③ 活细胞密度达到  $\sim 2 \times 10^6$  个/mL。

**传代步骤：**

1. 离心收集细胞 (100×g, 5~10 分钟)；
2. 使用少量预热培养基重悬细胞，进行细胞计数，确定细胞活率，计算活细胞密度；
3. 在无菌的培养容器 (125mL 锥形瓶) 中加入合适体积的预热的完全培养基；然后立即以  $3 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$  个/mL 的最终活细胞密度，把细胞接种入锥形瓶中；
4. 将锥形瓶放到摇床中，设置转速 120~140rpm，进行细胞培养；
5. 当活细胞密度达到  $2 \times 10^6$  个/mL 时，可以进行传代；

**注意：**悬浮细胞传代过程最好使用上面推荐的步骤，也可以不离心，直接细胞计数然后添加预热的新培养基分瓶培养。但是为减少细胞代谢物和碎片在培养基中的积累，进而影响细胞活性，每 1~2 周应该彻底更换一次培养基。

如果距复苏或者上次传代已满 5 天，活细胞密度仍然不达标要求，请彻底更换培养基，或者复苏新的冻存细胞。

## 9. 细胞驯化

细胞驯化指细胞从不同培养基或者不同培养方式中转换的过程。此处指从含血清培养基转到无血清培养基 (SFM) 中生长的适应过程。

**推荐当细胞满足以下条件时进行传代:**

- ① 对数生长期；
- ② 细胞活率大于 90 %
- ③ 活细胞密度达到  $\sim 1 \times 10^6$  个/mL。

驯化成功标准：每 4~6 天，细胞活率达 90%，活细胞密度可达  $2 \times 10^6$  个/mL，细胞的比生长速率与驯化前一致。

**下述步骤，待替换的培养基称为 A；目标培养基称为 B。**

**直接驯化，**即细胞直接从 A 转换到 B 中培养。

1. 离心收集细胞 (100×g, 5~10 分钟)；
2. 使用少量预热的 B 重悬细胞，进行细胞计数，确定细胞活率，计算活细胞密度；

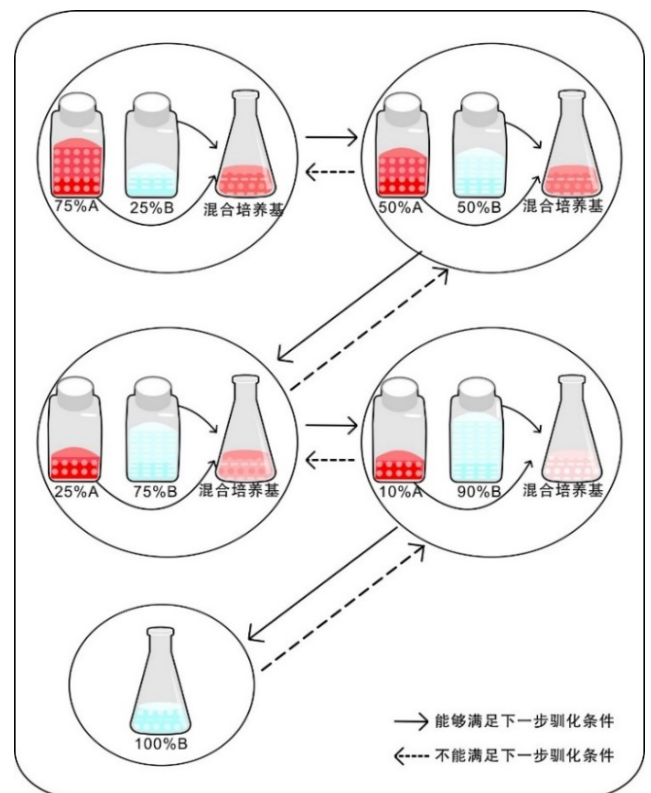
3. 在无菌的培养容器 (125mL 锥形瓶) 中加入合适体积的预热的 B；然后立即以  $3 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$  个/mL 的最终活细胞密度，把细胞接种入锥形瓶中；

4. 后续传代，继续采用此接种密度，直到驯化成功；

**注意：**如果直接驯化 3~5 代后细胞表现不佳，仍未达到驯化成功标准，请采用间接驯化法。

**间接驯化，**即分几步把细胞从 A 转换到 B 中培养。与直接驯化相比较，间接驯化带来的培养条件变化更加温和。

与直接驯化传代操作步骤 1~4 相同，过程中使用的培养基为按照下图方案配置的混合培养基，最后一次驯化则用 100 %B (一定要确定细胞在当前浓度的混合培养基中生长情况达到前述的驯化条件，才能进行下一步培养基的更换)：



5. 继续监控细胞生长 3~5 代，直到驯化成功；

6. 驯化过程最后一次传代时，采用  $2 \times 10^5 \sim 3 \times 10^5$  个/mL 的最终活细胞接种密度即可。

**注意：**在驯化过程中，最好不要让细胞过度生长。

推荐在驯化成功前，做好原始培养物的备份；间接驯化时，每次适应新比例的混合培养基之前，做好当前培养物的备份。

## 10. 细胞冻存

推荐采用对数生长期且细胞活率大于 90% 的细胞进行冻存。



推荐准备足够的细胞培养物，保存适量条件培养基。

1. 准备冻存培养基（45 %新鲜的完全培养基+45 %条件培养基+10 %DMSO），并在 2~8 °C避光条件下预冷（不超过 24 小时）；

推荐使用源培生物 CD-Freezer®化学成分限定细胞冻存液（S919JV），该冻存液已含有 7.5%的 DMSO，可做细胞冻存培养基。

2. 进行细胞计数，计算细胞密度，细胞活率和活细胞密度（ $\rho_1$ ）；然后根据待保存的细胞数（ $n$ ），计算需要离心收集的细胞培养物的体积（ $V_1$ ），以及所需的冻存培养基的体积（ $V_2$ ）。一般冻存时的活细胞密度（ $\rho_2$ ）为  $0.5 \times 10^7 \sim 1 \times 10^7$  个/mL。 $V_1 = n/\rho_1, V_2 = n/\rho_2$ 。

3. 离心（ $100 \times g$ ，5~10 分钟） $V_1$  体积的培养物收集细胞，除去上清；使用  $V_2$  体积预冷的细胞冻存液将细胞重悬；

4. 根据后续使用需求，将上述细胞重悬液分装到细胞冻存管中（一般 1.5mL 每管）；

5. 在冻存管上做适当标识(例如细胞名称、冻存时间及操作者)；

6. 可使用程序化降温仪或者人工控制细胞的温度下降（标准的冻存降温速率为  $-1 \sim -2$  °C/min）。当温度达  $-25$  °C 以下时，温度降速可增至  $-5 \sim -10$  °C/min；到  $-100$  °C 时，则可迅速浸入液氮中；

7. 人工降温的操作方法可以是：将细胞冻存管放入含有异丙醇的冻存盒中，置于  $-20$  °C 冰箱 2 小时，然后置于  $-80$  °C 冰箱中过夜，最后单独取出冻存管移入液氮容器内。

注意：细胞冻存 24 小时之后，或者长期冻存（比如半年后），应进行细胞复苏能力检测。

## 11. 相关产品

货号	品名	规格	存储条件	运输条件
H420KJ	CellTurbo® AdvaFeed 补料	500mL	2 ~ 8 °C	蓝冰
B210KJ	Dulbecco's 磷酸盐缓冲液 (DPBS), 不含钙、镁离子和酚红	500mL	2 ~ 30 °C	常温
S110JV	青霉素-链霉素 (双抗), 100X	100mL	-30 ~ -5 °C	干冰
S120JV	抗生素-抗真菌素 (三抗), 100X	100mL	-30 ~ -5 °C	干冰
S140J0	Zeocin 选择性抗生素, 100 mg/mL	1mL	-30 ~ -5 °C	干冰
S150J7	G418 选择性抗生素, 50 mg/mL	10mL	-30 ~ -5 °C	干冰
S160J7	潮霉素 B (Hygromycin B), 50 mg/mL	10mL	2 ~ 8 °C	蓝冰
S180J0	杀稻瘟菌素 S (Blasticidin S), 10 mg/mL	1mL	-30 ~ -5 °C	干冰
S210JV	L-谷氨酰胺溶液, 200mM	100mL	-30 ~ -5 °C	干冰
S240JV	L-丙氨酰-谷氨酰胺溶液, 200mM	100mL	2 ~ 8 °C	蓝冰
S250J0	嘌呤霉素 (Puromycin), 10 mg/ML	1mL	-30 ~ -5 °C	干冰
S490J7	抗细胞结团剂	10mL	2 ~ 8 °C	蓝冰
S912JV	HAT 添加剂	100mL	-30 ~ -5 °C	干冰
S911JJ	HT 添加剂, 100X	50mL	2 ~ 8 °C	蓝冰
S919JV	CD-Freezer®化学成分限定细胞冻存液	100mL	2 ~ 8 °C	蓝冰

\* 100X 代表产品的浓度是工作浓度的 100 倍。