

货号	品名	规格	有效期	外观	储存条件	运输条件
H715LJ	293Pro®CD293 无血清培养基, 干粉	50L	24 个月	干粉	2 ~ 8 °C, 避光	蓝冰

1. 产品描述

293Pro® CD293 无血清培养基适合 293 悬浮细胞的高密度培养, 专用于腺病毒 (AV) 的扩增

本产品使用注射用水 (Water-For-Injection) 配置。

本产品关注点

含有 (+)

- D-葡萄糖
- L-谷氨酰胺
- L-丙氨酰-谷氨酰胺

不含 (-)

- 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

物理外观: 白色至浅粉红色粉末

内毒素: ≤ 3 EU/mL

储藏条件: 2 ~ 8 °C, 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

1. 向洁净的混合容器中加入总体积 95%、温度为室温 (20°C 至 30°C) 的纯化水 (如: 注射用水)。
2. 边搅拌边缓慢加入 23.10 g/L 的干粉培养基, 避免结块, 不要将水加热。

3. 冲洗包装内部遗留粉末至混合容器中, 搅拌 15 ~ 30 分钟至干粉溶解。
4. 边搅拌, 边慢慢添加 5M 的氢氧化钠, 调整 pH 值至 6.8 ~ 7.0, 搅拌 15 ~ 30 分钟使干粉溶解。
5. 加入 1.9 g/L 碳酸氢钠, 搅拌至溶解。
6. 搅拌滴加 1M 的氢氧化钠或盐酸, 调整 pH 值使其低于最终工作 pH 0.1 ~ 0.2 个单位。
7. 加水定容, 继续搅拌混匀, 建议搅拌时间 10 ~ 30 分钟, 不超过 30 分钟, 保持容器密闭。
8. 立即用 0.2 μ m 孔径滤膜过滤至无菌容器中, 如需大体积配制培养基, 建议在 0.2 μ m 孔径滤器前端添加 0.45 μ m 孔径滤器。

6. 细胞培养的条件

培养基: 完全 293Pro® CD293 无血清培养基

细胞系: 293 悬浮细胞

细胞类型: 悬浮细胞

培养容器和设备: 摇瓶、生物反应器或 CO₂ 恒温摇床

培养条件: 36 ~ 37 °C, CO₂ 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 CO₂ 含量的校验和设置。

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 30mL 预热的完全培养基, 然后立刻开始冻存细胞的解冻;
2. 在 37 °C 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 3×10^5 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 2×10^6 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。此处指从贴壁生长到悬浮生长的适应过程，即改变细胞培养方式的驯化方法。

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 %

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

1. 细胞传代时，吸出旧培养基之后，加入消化液消化细胞，然后轻轻吸除消化液，用手多次敲击培养瓶侧壁，帮助细胞脱落；
2. 使用 5 mL 预热的完全的 293Pro® CD293 无血清培养基 (以下称完全培养基) 重悬细胞；
3. 如果 293 细胞以 2~10 个的数量聚集成簇，可使用移液器枪头吹打细胞，直到细胞簇解离为单个细胞，也可添加细胞抗结团剂；
4. 进行细胞计数，计算细胞密度，细胞活率和活细胞密度；
5. 准备转移并稀释悬浮细胞。以 1×10^6 个/mL 的最终活细胞密度计算所需的预热的完全培养基的体积 V (注意转移时，细胞悬浮液自有体积 5 mL 应扣除)；
6. 在合适规格的无菌摇瓶中，加入 V 体积的新培养基，然后将步骤 3 所述细胞 悬液转移至瓶内；

7. 将摇瓶放在摇床中，设置转速 120 ~ 140rpm 进行细胞培养；

8. 每日检测细胞密度，当活细胞数值达到 2×10^6 个/mL 时，再次使用预热的完全培养基将培养液稀释到活细胞密度 1×10^6 个/mL。此后，每当活细胞密度达到 2×10^6 个/mL 时，循环此步骤。经过几次传代，确认细胞生长、形态良好，即驯化成功；

驯化结束，需要放大生产规模时，请根据实际情况，调节摇床转速或生物反应器叶轮的搅拌速度。

注意：推荐在驯化成功前，做好原始培养物的备份；

40 °C 是 HEK293 细胞的致死温度。请注意培养条件中局部或瞬时的温度变化。由于细胞培养设备中电机和机械传动部分的产热、振荡产热，以及细胞生长代谢释放热能，使摇瓶中培养基的实际温度要比显示温度高 2 °C 左右，且在强烈振荡时，此温差更为明显。因此，在实验过程中设计高温点时必须认真注意到这一问题。

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 (ρ_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 (V1)，以及所需的冻存培养基的体积 (V2)。一般冻存时的活细胞密度 (ρ_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×g, 5~10 分钟) V1 体积的培养物收集细胞，除去上清；使用 V2 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
H731KJ	293Pro®CD 293 M 无血清培养基	500mL	2 ~ 8 °C, 避光	蓝冰
H732KJ	293Pro®CD293 无血清培养基, 无动物源	500mL	2 ~ 8 °C, 避光	蓝冰
H740KJ	293Pro®293S 无血清培养基	500mL	2 ~ 8 °C, 避光	蓝冰
H450KJ	CellTurbo®293 瞬转表达用补料, 25 ~ 100X	500mL	2 ~ 8 °C, 避光	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
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
S210JV	L-谷氨酰胺溶液, 200mM	100mL	-30 ~ -5 °C	干冰
S240JV	L-丙氨酸-谷氨酰胺溶液, 200mM	100mL	2 ~ 8 °C	蓝冰
S490J7	抗细胞结团剂	10mL	2 ~ 8 °C	蓝冰
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。