



货号	品名	规格	有效期	外观	储存条件	运输条件
H732KJ	293Pro® CD293M 无血清培养基,	500mL	12个月	液体	2~8℃, 避光	蓝冰

## 1. 产品描述

293Pro® CD293M 无血清培养基适合 293F 细胞的高密度悬浮培养, 可用于腺病毒的扩增, AAV 病毒、LV 病毒的包装, 以及重组蛋白瞬转表达。

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
- 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

本产品为过滤除菌产品

物理外观: 浅橙黄色澄清液体

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。

**如客户使用 293F 细胞做瞬转表达, 建议如下:**

※ CD293M 无血清培养基不含抗结团剂;

※ 抗结团试剂会抑制阳离子试剂的转染效果。所以:

① 在使用阳离子试剂转染之前, 293 细胞培养基中必须不含抗结团剂 (或者转染之前, 离心收集细胞, 使用不含钙镁离子的 PBS 洗涤细胞 1~3 次, 并用 CD293M (H731KJ) 无血清培养基至少传代一次);

② 进行阳离子试剂转染实验;

③ 转染成功后, 如果细胞结团, 再额外添加抗结团剂。

## 5. 制备培养基

**以准备 500mL 完全的 293Pro® CD293M 无血清培养基为例:**

1. 进行 293F 细胞悬浮培养时, 一般无需加入抗结团试剂, 当细胞结团严重时, 则可适量加入细胞抗结团试剂 (如需用阳离子试剂进行转染请先重点阅读注意事项中的相关描述)。

2. 不推荐使用抗生素。

3. 无需额外加入表面活性剂, 比如 F-68。

4. 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:** 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

## 6. 细胞培养的条件

培养基: 完全 293Pro® CD293M 无血清培养基

细胞系: 293F 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 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℃ 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  $2 \times 10^6$  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® CD293M 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  $1 \times 10^6$  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  $2 \times 10^6$  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  $1 \times 10^6$  个/mL。此后，每当活细胞密度达到  $2 \times 10^6$  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 ( $\rho_1$ )；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 (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 ( $\rho_2$ ) 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×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~-2 °C/min)。当温度达-25°C以下时, 温度降速可增至-5~-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
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
S120JV	抗生素-抗真菌素 (三抗), 100X	100mL	-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
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
S916J0	促细胞贴壁添加剂, 100X	1mL	2 ~ 8 °C	蓝冰
S917JV	CD-Freezer®化学成分限定细胞低温保存液	500mL	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
H450KJ	CellTurbo®293 瞬转表达用补料, 25 ~ 100X	500mL	2 ~ 8 °C, 避光	蓝冰
H450JV	CellTurbo®293 瞬转表达用补料, 25 ~ 100X	100mL	2 ~ 8 °C, 避光	蓝冰
H710KJ	293Pro®CD293 无血清培养基, 无动物源	500mL	2 ~ 8 °C, 避光	蓝冰
H731KJ	293Pro®CD293M 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

\* 100X 代表产品的浓度是工作浓度的 100 倍。