

293Pro® CD293M 无血清培养基，干粉



源培·培源
BasalMedia

货号	品名	规格	有效期	外观	储存条件	运输条件
H735L7	293Pro® CD293M 无血清培养基，干粉	10L	24 个月	干粉	2 ~ 8 °C，避光	蓝冰
H735LJ	293Pro® CD293M 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® 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。

本产品建议使用注射用水（Water-For-Injection）配置。

本产品关注点

含有（+）

- 6.0 g/L D-葡萄糖

不含（-）

- 酚红
- 碳酸氢钠
- L-谷氨酰胺

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。

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

1. 将配制总量 95% 的室温（20°C 至 30°C）注射用水加入混合容器。

2. 边搅拌边将干粉培养基加入到水中，不要将水加热。

3. 冲洗包装内部所有残留粉末至混合容器中，搅拌均匀。

4. 边搅拌，边慢慢添加 5M 的氢氧化钠，将 pH 值调整至 6.8，搅拌 15-30 分钟使干粉溶解。

5. 每升培养基加入 1.9g 碳酸氢钠，搅拌至溶解。

6. 边搅拌，边慢慢添加 5M 的氢氧化钠或盐酸，调整 pH 值使其低于最终工作 pH0.1 到 0.2 个单位（溶液过滤后 pH 值会升高 0.1 到 0.2 个单位）。

7. 加水至所需容量，搅拌均匀，不要过度搅拌，将容器密闭。

8. 立即用 0.2µm 孔径滤膜过滤至无菌容器中。

备注：本产品不含 L-谷氨酰胺、L-丙氨酰-谷氨酰胺和酚红，请根据需要自行添加。

建议使用量 L-谷氨酰胺或 L-丙氨酰-谷氨酰胺为 4-8mM。

6. 细胞培养的条件

培养基：完全 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 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, 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 5mL 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 1×10^6 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 (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 (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 ($100 \times g$, 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
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-丙氨酰-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	500mL	2 ~ 8 °C, 避光	蓝冰
H732KJ	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。