

增强型293无血清培养液(含L-谷氨酰胺)

产品编号	产品名称	包装
C0905-500ml	增强型293无血清培养液(含L-谷氨酰胺)	500ml
C0905-1L	增强型293无血清培养液(含L-谷氨酰胺)	1L

产品简介:

- 碧云天生产的增强型293无血清培养液(含L-谷氨酰胺), 即Enhanced 293 Serum-free Culture Medium (with L-Glutamine), 简称Enhanced 293 SFM, 是一种化学成分确定的、无血清、无蛋白质或生长因子、不含任何动物源性物质(Animal origin-free, AOF)的, 专门用于各种亚型或衍生HEK293细胞的高密度悬浮培养和高效率瞬时转染表达的即用型液体培养液。本增强型293无血清培养液(含L-谷氨酰胺)可用于培养的293细胞包括293S、293F等悬浮细胞, 以及被驯化过的293H、293E、293T等[1-3], 特别适用于在普通293无血清培养液效果不佳或瞬转导致细胞大量死亡等情况下的替换。
- 293无血清培养液也被称为CD (Chemical-defined) 293培养液、CD 293 Medium、CD 293 Cell Culture Medium、CD 293细胞培养液、293 SFM (Serum-free Medium)、293 Expression Medium、293表达培养液等。培养液、细胞培养液、基础培养液、无血清培养液也分别称为培养基、细胞培养基、基础培养基、无血清培养基。HEK293即Human Embryonic Kidney 293, 简称293, 来源于人胚肾细胞[4]。
- 本产品经过过滤除菌处理, 可以直接用于293等细胞的无血清培养, 含L-谷氨酰胺(L-Glutamine), 浓度约为4mM, 一般无需额外添加L-谷氨酰胺, 也无须添加血清、抗生素、非离子表面活性剂物质(如F-68)以及抗结团试剂等。
- **成分说明:** 本增强型293无血清培养液(含L-谷氨酰胺)的化学成分确定, 含D-葡萄糖、L-谷氨酰胺、碳酸氢钠、酚红等组分; 不含动物源性物质、血清、蛋白质、水解物和生长因子。超纯水配制, 黄红色透明液体, pH为7.0-7.4, 渗透压为255-300 mOsm/kg, 内毒素低于1EU/ml。
- **产品特点:** 293细胞常用含血清的培养液进行贴壁培养。与悬浮培养相比, 贴壁培养较为费力且成本更高, 且蛋白质和血清的存在不仅会成为实验和数据分析中的混杂因素, 影响重复性, 还可能干扰下游纯化、影响产物质量。增强型293无血清培养液(含L-谷氨酰胺)支持各种亚型和衍生的293细胞的悬浮培养, 细胞通常无需任何适应, 即可进行高密度培养, 有助于提升细胞的活性, 以最大限度地生产重组病毒或重组蛋白[1-3]。此外, 本产品化学成分明确, 不含未知组分, 不含蛋白质, 也无需额外添加血清, 尽可能地减少了外源性物质的引入, 批次间稳定性好, 有效简化了目标产物的下游纯化, 提高了实验或生产的重复性。
- **瞬转后的细胞活率高, 瞬转效率佳:** 阳离子聚合物等转染试剂具有微量的细胞毒性, 通常会不同程度影响转染效果。使用本产品可维持细胞处于更好的状态和更高的活率, 转染后, 活细胞密度和活率受到更小的影响, 目标产物的产量可达最佳。
- **用途:** 增强型293无血清培养液(含L-谷氨酰胺)可以支持各种293悬浮细胞如293S、293F等的高密度培养和高效率瞬时转染表达, 广泛应用于糖基化重组蛋白和抗体的高产量制备生产、外泌体膜上蛋白的融合表达、病毒高效包装等。增强型293无血清培养液(含L-谷氨酰胺)也可以用于被驯化过的其它293细胞、亚型或衍生的细胞系, 如驯化过的293H、293E、293T等293细胞。使用本产品培养HEK293细胞的活细胞密度和活率效果参考图1。

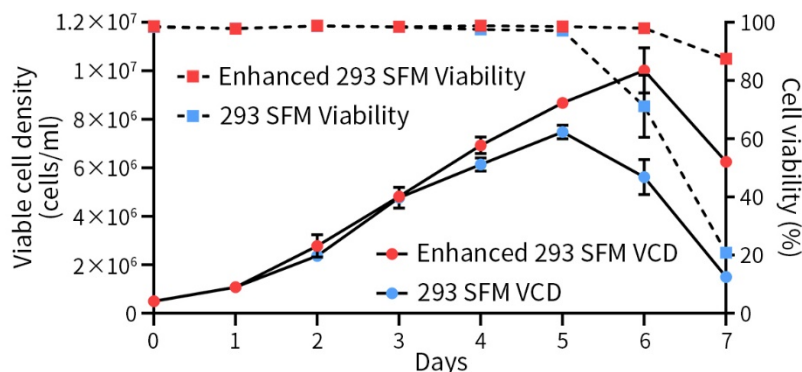


图1. 碧云天增强型293无血清培养液(含L-谷氨酰胺) (C0905)培养HEK293细胞的活细胞密度和活率图。如图所示, 接种同样密度的HEK293细胞, 相较于普通的293无血清培养液(含L-谷氨酰胺) (C0901) (293 SFM), 使用增强型293无血清培养液(含L-谷氨酰胺) (Enhanced 293 SFM)培养7天的HEK293细胞活细胞密度和存活率更高。VCD, Viable cell density。实际检测效果会因检测仪器、实验条件的不同而存在差异, 本图仅供参考。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
C0905-500ml	增强型293无血清培养液(含L-谷氨酰胺)	500ml
C0905-1L	增强型293无血清培养液(含L-谷氨酰胺)	1L
—	说明书	1份

保存条件:

4°C避光保存, 一年有效。

注意事项:

- 本产品4°C保存时应避免靠近冰箱壁, 以免局部温度过低导致沉淀析出。如果有沉淀析出, 室温摇晃片刻, 再放置在4°C冰箱过夜或更长时间, 待沉淀消失后再使用。
- 本产品一般适用于293细胞悬浮培养, 不推荐用于没有经驯化过的贴壁293细胞的培养。
- 使用本产品应注意无菌操作, 避免污染。一般不建议补充抗生素, 以免影响细胞的正常生长速度, 但如果不能在高洁净度细胞培养室内操作, 仍需加入适量的抗生素。
- 若使用过程中发现培养液浑浊、沉淀等异常现象, 则不能继续使用。
- 本产品中已添加的L-谷氨酰胺(约4mM)是细胞培养所必需的营养成分, 一般无需额外再添加, 否则可能产生细胞毒性。但L-谷氨酰胺在溶液中不太稳定、易分解, 若本培养液长期放置后再使用, 发现细胞生长变慢, 可在使用前加入适量的L-Glutamine (100X) (C0212)或可以稳定保存的L-Ala-Gln (100X) (C0211), 以维持细胞的正常生长代谢。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品, 不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明:

1. 293悬浮细胞的复苏。

- 将细胞冻存管从液氮或超低温冰箱中取出, 并在37°C水浴锅中迅速完全融化(保持冻存管的盖子在液面以上以防止污染), 并适当轻轻摇晃促融, 切勿vortex。快速、完全融化可以提高细胞的复苏效果。
- 打开冻存管前用70%酒精擦拭细胞冻存管外壁, 注意某些记号笔不耐酒精, 小心标注的记号被擦拭掉, 推荐使用碧云天LAB MARKER (耐酒精记号笔, 黑色, 0.4/1.0mm) (FPP21)。
- 将完全融化的细胞直接离心, 或者转移至无菌1.5ml或其它合适无菌离心管中, 200×g室温离心5分钟, 吸除上清, 注意不要吸走细胞沉淀。
- 用新鲜、预热至37°C的增强型293无血清培养液(含L-谷氨酰胺)重悬后转移至培养容器中, 推荐碧云天的BeyoGold™透气盖三角摇瓶系列产品, 混匀, 置于37°C、5-8% CO₂、湿度80%的细胞培养摇床中培养, 设置转速为130rpm (振幅26mm)。注: 如摇床振幅为50mm, 设置转速为120rpm。

2. 293悬浮细胞的传代。

- 取处于对数生长期、细胞存活率大于95%、活细胞密度达到2-4×10⁶个/ml以上的293细胞进行传代。
注1: 不同类型的293细胞可能具有不同的对数生长期范围。
注2: 在细胞传代30次或者持续3个月以上时, 推荐复苏新的冻存细胞进行传代。
注3: 推荐使用碧云天生产的台盼蓝染色细胞存活率检测试剂盒(C0011)或细胞计数仪进行细胞存活率检测。
- 将适量细胞悬液转移到无菌离心管内, 200×g室温离心5分钟, 弃去上清, 加入适量预热的增强型293无血清培养液(含L-谷氨酰胺), 用吸管小心吹散沉淀细胞, 获取细胞悬液。
- 将细胞悬液以3×10⁵-6×10⁵个/ml的密度接种到新的培养容器中, 培养条件与细胞复苏培养条件保持一致。
注1: 每2-3天用增强型293无血清培养液(含L-谷氨酰胺)按上述步骤进行传代。
注2: 为减少液体摇动产生的机械剪切力对细胞的损伤, 装载大体积三角细胞摇瓶的摇床转速应适当调低。
注3: 293悬浮细胞可能形成由2-10个细胞组成的细胞团, 传代时可能需要剧烈涡旋细胞悬液40秒或适当时间, 直到细胞团分散为单细胞悬液。
注4: 请勿使用过高密度的细胞进行常规传代培养。

3. 293悬浮细胞的驯化。

- 直接驯化法:**
大部分情况下, 培养于其它品牌无血清培养液中的293细胞, 可以直接适应本增强型293无血清培养液(含L-谷氨酰胺)的培养, 只需参照步骤2进行细胞传代即可。
- 梯度驯化法:**
梯度驯化法又称渐进式驯化或适应性驯化。由于增强型293无血清培养液(含L-谷氨酰胺)为化学成分限定培养液, 有些293细胞需要进行梯度驯化, 即在一段时间内用本增强型293无血清培养液(含L-谷氨酰胺)和原培养液的混合液培养细胞, 培养过程中需逐渐降低原培养液占比、提升增强型293无血清培养液(含L-谷氨酰胺)占比。
(a) 用原培养液复苏293细胞, 并使用该培养液继续培养2-3代直至293悬浮细胞稳定生长。
注: 应选用低代数、处于对数生长期的细胞进行驯化。
(b) 参照下表对细胞进行梯度驯化。

增强型293无血清培养液(含L-谷氨酰胺)占比(%)	原培养液占比(%)	细胞接种密度(个/ml)	细胞生长状态检测指标	进行下一阶段的标准
0	100%	-	VCD* & Cell viability	VCD $\geq 3 \times 10^6$ cells/ml; Cell viability $\geq 95\%$
30%	70%	0.6×10^6	VCD & Cell viability	VCD $\geq 2 \times 10^6$ cells/ml; Cell viability $\geq 90\%$
70%	30%	0.5×10^6	VCD & Cell viability	VCD $\geq 2 \times 10^6$ cells/ml; Cell viability $\geq 90\%$
100%	0%	0.4×10^6	VCD & Cell viability	VCD $\geq 2 \times 10^6$ cells/ml; Cell viability $\geq 90\%$

* VCD, Viable cell density.

注1: 每阶段应至少传代2次。

注2: 在完全使用增强型293无血清培养液(含L-谷氨酰胺)接种3-4天之后, 若VCD $\geq 3 \times 10^6$ cells/ml, Cell viability $\geq 95\%$, 则表明细胞生长、状态良好, 该细胞已经完全驯化至适应增强型293无血清培养液(含L-谷氨酰胺)。

4. 293悬浮细胞的冻存。

a. 细胞的准备: 使用对数生长期且细胞活率大于95%的细胞用于冻存。

注: 须保存适量的已经培养过的培养液上清即条件培养液(Conditioned media)用于细胞冻存液的配制。

b. 进行细胞计数, 确定活细胞密度, 并计算活细胞密度为 $0.5-1 \times 10^7$ 个/ml时所需细胞冻存液的体积。

c. 细胞冻存液的配制: 45%新鲜的增强型293无血清培养液(含L-谷氨酰胺)+45%条件培养液+10% DMSO, 并在4°C避光条件下预冷。配制的细胞冻存液须当天使用。为方便起见, 推荐使用碧云天的BeyoAOF™无血清细胞冻存液(C0210B), 可以直接使用无须进行配制。

d. 将细胞室温 $200 \times g$ 离心5分钟, 除去上清, 用预冷的细胞冻存液将离心收集的细胞重悬。

e. 后续操作和普通细胞冻存一致, 具体参考BeyoAOF™无血清细胞冻存液(C0210B)中的使用说明。

注: 建议细胞冻存24小时之后, 或者长期冻存(例如半年或一年后), 进行细胞复苏, 检测细胞复苏的效果。

5. 293悬浮细胞的瞬时转染。

a. 下表转染条件仅供参考, 用户可根据实验的具体情况进行优化。此处以瞬时转染1L 293悬浮细胞为例:

Items	Value
VCD	$2-4 \times 10^6$ cells/ml
DNA	0.7-2 μ g/ml
DNA/PEI ratio	1:2~1:6

注: 推荐使用碧云天专门适用于悬浮293细胞转染的Lipo293F™转染试剂(C0518/C0519)或线性聚乙烯亚胺(Polyethylenimine, Linear)(C0537/C0541), 使用方法也同样可以参考。

b. 取处于对数生长期、细胞存活率 $>95\%$ 、活细胞密度为 $2-4 \times 10^6$ 个/ml的293悬浮细胞进行转染。

c. 用10ml增强型293无血清培养液(含L-谷氨酰胺)稀释0.7-2mg质粒DNA, 轻轻混匀。

d. 用10ml增强型293无血清培养液(含L-谷氨酰胺)稀释适量PEI, 轻轻混匀。

e. 将PEI稀释液加到质粒DNA稀释液中, 轻轻颠倒4-5次以充分混匀, 室温孵育15-20分钟。

注: PEI稀释液与质粒DNA稀释液的混合顺序不可颠倒。

f. 将混合物逐滴加入细胞中, 在加入过程中轻轻摇动三角细胞摇瓶。

g. 将细胞置于细胞培养摇床中培养, 培养条件与细胞正常培养条件保持一致。

h. 一般本增强型293无血清培养液(含L-谷氨酰胺)可维持48-72小时的培养时间, 无须添加补料; 也可以在转染后每隔24小时向细胞中添加一定量的补料, 在加入过程中轻轻摇动培养容器。随后将细胞放回细胞培养摇床中继续培养。

i. 当细胞存活率 $<80\%$ 时收集细胞上清液或细胞进行后续纯化。

参考文献:

- Schneider MD, French BA. Circulation. 1993. 88(4 Pt 1):1937-42.
- Fisher KJ, Jooss K, Alston J, Yang Y, Haecker SE, et al. Nat Med. 1997. 3(3):306-12.
- Yan SB, Chao YB, van Halbeek H. Glycobiology. 1993. 3(6):597-608.
- Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. J Gen Virol. 1977. 36(1):59-74.

相关产品:

产品编号	产品名称	包装
C0212	L-Glutamine (100X)	100ml
C0211-100ml	L-Ala-Gln (100X)	100ml
C0901-500ml	293无血清培养液(含L-谷氨酰胺)	500ml
C0901-1L	293无血清培养液(含L-谷氨酰胺)	1L
C0905-500ml	增强型293无血清培养液(含L-谷氨酰胺)	500ml

C0905-1L	增强型293无血清培养液(含L-谷氨酰胺)	1L
C0537-20mg	线性聚乙烯亚胺(Polyethylenimine, Linear)	20mg
C0537-100mg	线性聚乙烯亚胺(Polyethylenimine, Linear)	100mg
C0541-1ml	BeyoPEI™转染试剂	1ml
C0541-10ml	BeyoPEI™转染试剂	10ml
C0541-100ml	BeyoPEI™转染试剂	100ml
C0518-1ml	Lipo293F™转染试剂	1ml
C0518-10ml	Lipo293F™转染试剂	10ml
C0518-100ml	Lipo293F™转染试剂	100ml
C0519-1ml	Lipo293F™ Plus转染试剂	1ml
C0519-10ml	Lipo293F™ Plus转染试剂	10ml
C0519-100ml	Lipo293F™ Plus转染试剂	100ml
FFLK125	BeyoGold™ 125ml透气盖三角摇瓶	24个/箱
FFLK250	BeyoGold™ 250ml透气盖三角摇瓶	12个/箱
FFLK500	BeyoGold™ 500ml透气盖三角摇瓶	12个/箱
FFLK810	BeyoGold™ 1L透气盖三角摇瓶	12个/箱
FFLK820	BeyoGold™ 2L透气盖三角摇瓶	6个/箱
FFLK830	BeyoGold™ 3L透气盖三角摇瓶	4个/箱
FFLK850	BeyoGold™ 5L透气盖三角摇瓶	4个/箱

Version 2023.10.11