

ExCell Bio

OptiVibro[®] 293 无血清补料培养基 HA02 说明书

本品仅用于科学研究及商业化生产，不适用于临床诊断和治疗

User Manual

Catalog Number	HA000-N011
Catalog Number	HA000-N012
Catalog Number	HA000-N021
Catalog Number	HA000-N022
Catalog Number	HA000-N023



产品概述

OptiVibro® 293 无血清补料培养基 HA02 (OptiVibro® 293 Serum-free Feed Medium HA02) 是专为蛋白表达设计的无血清、无蛋白、无动物源成分、化学成分明确 (Chemically-defined) 的补料培养基, 搭配 OptiVibro® 293 无血清蛋白表达培养基 HE02 可实现瞬转蛋白高产量表达。

产品规格及储存、运输要求

产品名称	货号	规格	存储条件	运输条件	有效期
OptiVibro®293无血清补料培养基HA02	HA000-N012	1000 mL	2- 8 °C 遮光	< 25°C 遮光运输	12个月
	HA000-N011	100 mL	2- 8 °C 遮光	< 25°C 遮光运输	12个月
OptiVibro®293无血清补料培养基HA02 (粉体)	HA000-N023	50 L	2- 8 °C 干燥遮光	< 10°C 遮光运输	24个月
	HA000-N022	10 L	2- 8 °C 干燥遮光	< 10°C 遮光运输	24个月
	HA000-N021	1 L	2- 8 °C 干燥遮光	< 10°C 遮光运输	24个月

产品特点、应用与使用限制

- 产品存储过程中需要遮光, 避免日光灯或其他灯光照射, 在冰箱或仓库储存需要使用有色包装袋。
- 产品运输过程中需要遮光运输, 避免日光灯或其他灯光照射对产品的外观产生影响导致外观变色。
- 产品在使用过程中, 需要进行转运至洁净区内时, 转移过程需要进行清洁灭菌, 灭菌方式只能采用消毒剂擦拭灭菌, 不能使用紫外辐照灭菌。
- 注意: 在经过带有紫外辐照灭菌的传递窗时, 需要主动关闭传递窗内的紫外灯。

I 操作方法:

细胞培养

细胞培养需要使用 293 无血清蛋白表达培养基 HE02 (ExCell Bio, HE000-N05#), 具体培养方法如下:

1. 建议摇床培养条件, 温度: 37°C; 相对湿度: 80%, CO₂ 浓度: 5% , 摇床转速: 90-120 rpm。

根据细胞生长情况, 每 2-3 天传一次代, 活细胞密度达到 $4.0-6.0 \times 10^6$ cells/mL 时即可进行传代, 传代密度为 $0.6-1.0 \times 10^6$ cells/mL。

2. 若 293 细胞原来使用的培养基为其他品牌, 可直接或逐步到本培养基进行传代培养, 传代 3 次 (9-10 天) 后细胞可适应本培养基, 细胞扩增速度及细胞活率达到稳定状态, 可进行后续实验。

3. 若 293 细胞是用其他品牌培养基培养后冻存的, 推荐用细胞冻存前使用的培养基来复苏细胞, 传一代后换成 HE02 培养基, 再传代 3 次, 细胞扩增速度及细胞活率达到稳定状态, 可进行后续实验。使用 HE02 培养基产品培养后冻存的细胞, 则可以使用 HE02 培养基产品复苏。

4. 培养过程无需额外添加谷氨酰胺。

粉体配制方法

以下介绍粉体配制液体的方法, 粉体为 293 无血清补料培养基 HA02 (粉体) (ExCell Bio , HA000-N02#)。

1. 以配制 1L 液体培养基为例, 取洁净的配制容器, 加入最终配制体积 60% 的注射用水或细胞培养级用水;

2. 称量干粉培养基 153.58 g, 缓慢加入水中, 搅拌 60 分钟左右;

3. 缓慢加入 5 M NaOH 溶液 (约 45 mL) , 调节 pH 至 8.5-8.8 后, 搅拌 60 分钟左右;

4. 缓慢加入 6 N HCl 溶液 (约 10 mL) , 调节 pH 至 7.5-7.7 后, 搅拌 10 分钟;

5. 加入注射用水或细胞培养级用水并定容至 1L, 继续搅拌 5 分钟;
6. 0.22 μm 滤膜除菌过滤后, 2-8°C 遮光保存。

转染方法建议

以下介绍 293 无血清蛋白培养基 HE02 和 293 无血清补料培养基 HA02 的使用方法, 高产量蛋

白表达需要两者搭配使用

- 1 细胞复苏后, 稳定传代 3 次后用于转染实验, 保证细胞活率大于 90%;
- 2 转染前一天, 注意将种子细胞全部离心更换至新鲜的 OptiVibro® 293 无血清蛋白表达培养基 HE02 中, 按照 1.7×10^6 cells/mL 接种。

- 3 转染当天, 按照 20 mL/125 mL 摇瓶培养体系, 将细胞用新鲜的 OptiVibro® 293 无血清蛋白表达培养基 HE02 调整至 18 mL, 细胞总量 6×10^7 cells, 保证当天细胞转染密度为 3.3×10^6 cells/mL 左右;

- 4 制备 PEI/DNA 复合物:

- 4.1 本方案中, 转染体系 20 mL, 密度 3.3×10^6 cells/mL, DNA 浓度 1.5 μg /mL, DNA: PEI=1.5 : 4,

具体操作如下:

- 4.1.1 PEI Max: 将 80 μg PEI Max 用 OptiVibro® 293 无血清蛋白表达培养基 HE02 稀释至 1 mL 体系, 室温孵育 5 min;

- 4.1.2 DNA: 将 30 μg DNA 用 OptiVibro® 293 无血清蛋白表达培养基 HE02 稀释至 1 mL 体系;

- 5 将 PEI Max 加入到 DNA 中, 形成 PEI/DNA 复合物, 混匀, 室温孵育 10 min;
- 6 将制备好的 2 mL PEI/DNA 复合物缓慢添加到培养体系中, 转移到培养箱继续培养;
- 7 转染 18-24 小时后, 添加 5% 体积的 OptiVibro® 293 无血清补料培养基 HA02, 并补糖 6 g/L;
- 8 转染后的第 5 天, 可收获上清。若继续培养, 可补糖 3 g/L, 转染后的第 7 天收获上清, 结束实

验。

9 若需扩大培养体系，可按比例增加相应物质的添加量，不同规格条件的添加量可参考表 1

表 1 不同转染规格推荐添加量

细胞培养容器	125 mL	500 mL	1 L	备注
细胞数量($\times 10^6$ cells)	60	300	600	密度 3.3×10^6 cells/mL 左右
培养体系(mL)	18	90	180	初始转染体积
DNA 稀释液 (mL)	1	5	10	
PEI 稀释液 (mL)	1	5	10	
DNA (μ g)	30	150	300	DNA : PEI=1.5 : 4
PEI 试剂 (μ g)	80	400	1200	
补料培养基 HA02 (mL)	1	5	10	初始转染体积的 5%
最终培养体系 (mL)	~21	~105	~210	

10 HA02 补料培养需要搭配 HE02 基础培养基使用，HE02 相关货号见表 2。

表 2 相关产品货号

产品	货号	规格
OptiVetro®葡萄糖溶液	M101381C	10 mL 液体
	M101382C	100 mL 液体
OptiVetro®293 无血清蛋白表达培养基 HE02	HE000-N052	1000 mL 液体
	HE000-N061	1 L 粉体
	HE000-N062	10 L 粉体
	HE000-N063	100 L 粉体
	HE000-N064	500 L 粉体

【注意事项】

- 1 转染前一天的接种密度是为了转染时密度能够达到 3.3×10^6 cells/mL 左右, 客户可根据自己的细胞扩增速度对转染前一天的接种密度稍做调整; 此外, 若此步骤采用稀释传代的方式, 可能会降低蛋白产量 (不同表达分子及表达体系有所不同)
- 2 上文描述的转染方法仅供参考, 为获得针对不同 293 细胞最优转染条件, 可进行 DoE 设计 (细胞密度、DNA 含量、DNA 与 PEI 比例), 确定最佳实验方案
- 3 可定期监测培养过程中的细胞生长和葡萄糖含量, 根据目的蛋白特性和细胞活率确定合适的收获时间。
- 4 若出现转染后细胞活率下降的情况, 可从转染工艺、细胞状态、补料工艺等方面考虑, 如细胞转染密度过高、转染时细胞状态差等情况都会导致细胞快速死亡, 导致产量较低。

| 其他

NA

| 免责声明

1. 产品应按照说明书指导使用, 实验者未按说明书指导操作, 本公司不对由此导致的产品性能偏离承担责任;
2. 产品仅用于科学研究及商业化生产, 不适用于临床诊断和治疗, 否则所产生的一切后果, 由实验者承担, 本公司概不负责。