

使用说明书—CHO CDM10

基础信息介绍

产品简介

CHO CDM10 是化学成分限定 (Chemically-defined) 基础培养基, 不含蛋白、蛋白水解物及任何动物来源的成分, 适合于不同亚型中国仓鼠卵巢细胞 (CHO-K1、CHO DG44 和 CHO-S 等) 的高密度悬浮培养及瞬时转染, 可实现重组蛋白和抗体的高水平表达。CHO CDM10 基础培养基与商业化补料培养基 (Tobitec FA、Tobitec FB 等) 联用, 可支持细胞高密度生长及活率维持, 实现高水平、高质量的蛋白/抗体表达。



应用范围

CHO CDM10 可应用于 CHO 细胞的复苏、传代、高密度流加培养以及瞬时转染表达。该基础培养基适用于科研和基于细胞培养的大规模生物制品的生产, 但不可直接用于人体或作为药物使用。

储运及有效期

产品	货号	储存	运输	有效期
CHO CDM10	LQ10, 液体	2°C ~ 8°C, 避光	2°C ~ 8°C, 避光	12 个月
CHO CDM10	DP10, 干粉	2°C ~ 8°C, 避光	2°C ~ 8°C, 避光	24 个月

干粉培养基配液方法

1. 向配液容器中加入最终体积 80% 的纯化水 (25 ~ 30°C)。
2. 缓慢加入 21.27 g/L 的干粉培养基, 搅拌混合 30 分钟。
3. 用 5M 氢氧化钠溶液将 pH 调至 5.0 ~ 6.0。
4. 缓慢加入 1.80 g/L 的碳酸氢钠, 搅拌混合 5 分钟。
5. 用 5M 氢氧化钠或 1M 盐酸溶液将 pH 调至 6.8 ~ 7.2, 搅拌 10 分钟。
6. 用纯化水定容到最终体积, 搅拌混合 10 分钟。

7. 立即使用 0.22 微米的滤膜无菌过滤。

干粉及液体培养基质量指标

产品指标	CHO CDM10 (LQ10), 液体	CHO CDM10 (DP10), 干粉
外观	淡黄色澄清液体	类白色粉末
pH	6.8 ~ 7.4	6.8 ~ 7.2 (滤前)
渗透压(mOsmol/kg)	260 ~ 320	260 ~ 320
溶解性	--	按配液方法操作, 溶解良好
内毒素 (EU/mL)	< 3	< 3
无菌检测	阴性	--
微生物限度	--	需氧菌: < 200CFU/g 霉菌酵母菌: < 50CFU/g

细胞培养参考标准作业流程

细胞培养条件

参数		值
培养体积	50 mL TPP 管	10 ~ 30 mL
	125 mL 摇瓶	15 ~ 40 mL
	250 mL 摇瓶	40 ~ 80 mL
	500 mL 摇瓶	100 ~ 200 mL
	1000 mL 摇瓶	200 ~ 300 mL
摇床转速	TPP 管	50mm 振幅: 200 rpm
	摇瓶	25mm 振幅: 150 rpm
	摇瓶	50mm 振幅: 90 ~ 120 rpm
培养环境	接种密度	0.5×10^6 cells/mL
	培养温度	37°C
	CO ₂ 浓度	5%
	湿度	> 80% RH

细胞复苏

1. 37°C水浴中预热 CHO CDM10 培养基；
2. 使用 75%酒精喷洒培养基瓶，并置于生物安全柜；
3. 复苏 1 支细胞，并在 37°C水浴中，轻轻晃动冻存管，解冻 1 分钟；
4. 将冻存管中的细胞轻轻移到含有 30mL 已预热 CHO CDM10 培养基的离心管中；
5. 150g~300g（约 800rpm~1200rpm）离心 5 分钟，丢弃上清液并将细胞重悬于 10~30mL 新鲜预热的 CHO CDM10 培养基中，调节活细胞密度至 0.5×10^6 cells/mL；
6. 取 0.5mL 细胞悬液，用细胞计数仪分析活细胞密度 ($\times 10^6$ cells/mL) 和细胞活率 (%)。
7. 如果细胞活率 > 85%，将细胞置于规定的环境条件下进行细胞培养。

细胞传代

1. 将 CHO CDM10 培养基放入 37°C条件下预热 20~30 min；
2. 取活细胞密度 $\geq 2 \times 10^6$ cells/mL、细胞活率 $\geq 85\%$ 、处于对数生长期中期的细胞进行传代；
3. 根据 0.5×10^6 cells/mL 的接种密度和传代体积，计算所需种子液量；
4. 无菌转移所需量的种子液，添加至含所需体积的已预热 CHO CDM10 培养基的摇瓶中；
5. 将摇瓶置于规定的环境条件下进行细胞培养；
6. 每 2~3 天用新鲜的培养基按上述步骤进行传代培养。
7. 传代前，如果活细胞密度低于 2.0×10^6 cells/mL，或细胞活率低于 85%，需要 150g~300g（大约 800rpm~1200rpm）离心 5 分钟处理细胞。轻轻弃上清，使用已预热的 CHO CDM10 培养基重悬细胞，取样计数后进行细胞传代。

细胞适应

直接适应

1. 对于可以直接适应的细胞，可以从无血清培养基中直接接种到 CHO CDM10 培养基中，接种密度参考传代步骤，并需要依据具体情况而定。
2. 继续传代细胞，直到细胞稳定生长。
3. 传代几次后，活细胞密度在接种的 3~4 天内达到 2×10^6 cells/mL 及以上、细胞活率 > 90%，且倍增时间稳定，此时可以认为细胞已被驯化成功。

连续适应

1. 对于传统的生长在 5~10%血清或无血清的细胞，采用连续适应法，接种密度 0.5×10^6 cells/mL。
2. 监测细胞生长情况，直到活细胞密度达到 $\geq 2 \times 10^6$ cells/mL。
3. 用 CHO CDM10 培养基：原始培养基 = 25:75 的比例稀释细胞。直到这个比例的培养基细胞生长良好，再进一步稀释培养，按 25 : 75, 50 : 50, 75 : 25, 90 : 10, 100 : 0。逐步提高 CHO CDM10 培养基的比例。
4. 在完全使用 CHO CDM10 培养基接种 3~4 天之后，活细胞计数应该至少达到 2×10^6 cells/mL，细胞活率 $\geq 90\%$ 。此时，细胞已经完全适应 CHO CDM10 培养基。

细胞冻存

1. 准备处于对数生长中期的、细胞活率 $> 90\%$ 、状态较好的细胞。
2. 测定活细胞密度，计算所需的冻存培养基体积，最终活细胞密度 $> 1 \times 10^7$ cells/mL。
3. 准备所需的冻存培养基：90% CHO CDM10 培养基 + 10%DMSO，4°C冷藏保存。
4. 300g 离心 5 分钟，弃去上清，用冻存培养基重新悬浮细胞。
5. 根据项目具体需要，将悬浮液进行等分保存于适宜规格的冻存管中。
6. 按照标准程序，对冻存管进行自动或手工操作降温（每分钟降 1°C）。
7. 将细胞转移到液氮罐中保存。

参考瞬转及补料策略

瞬转表达

1. 已经完成适应性培养的 CHO 细胞，再经过 3 次传代培养后可进行转染操作。转染前准备新鲜 CHO CDM10 培养基，如细胞株不是 expi CHO，需添加终浓度为 4mg/L EDTA；
2. 150g ~ 300g（大约 800rpm ~ 1200rpm）离心 5 分钟处理待转染细胞，并使用新鲜培养基进行重悬；
3. 取样检测活细胞密度及细胞活率，根据计数结果添加新鲜培养基，将活细胞密度稀释至 $4 \sim 6 \times 10^6$ cells/mL；
4. 执行转染作业，最佳转染条件应根据具体情况进行优化，以下转染条件仅供参考使用；

VCD	DNA	PEI
$4 \sim 6 \times 10^6$ cells/mL, 活率 $> 95\%$	1.5mg/L	7.5mg/L

5. 将摇瓶置于规定的环境条件下进行细胞培养。

补料策略

补料/时间	D1	D4	D7
Tobitec FA/FB	4/0.4%	4/0.4%	4/0.4%
葡萄糖	当葡萄糖浓度 < 4 g/L 时，按 6 g/L 的终浓度添加葡萄糖		
谷氨酰胺	转染后控制谷氨酰胺 2 ~ 6mmol/L 或在补料时按培养体积添加 4mmol/L 谷氨酰胺		