

使用说明书—HEK293 CDM15

基础信息介绍

产品简介

HEK293 CDM15 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 HEK293 细胞 (如 HEK293F、HEK293T、HEK293H、Expi293 等) 的高密度悬浮培养及瞬时转染, 可用于重组蛋白、慢病毒、腺病毒的高水平表达, 腺相关病毒相关产品的研发和生产过程。HEK293 CDM15 基础培养基与补料培养基 (Tobitec FC Pro 等) 联用, 可支持细胞高密度生长及活率维持, 实现目标产物高效表达。



应用范围

HEK293 CDM15 可应用于 HEK293 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重组蛋白、慢病毒、腺病毒相关产品的研发和生产过程, 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 |
|--------------|----------|---------------|---------------|-------|
| HEK293 CDM15 | LQ15, 液体 | 2°C ~ 8°C, 避光 | 2°C ~ 8°C, 避光 | 12 个月 |
| HEK293 CDM15 | DP15, 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 90% 的纯化水 (20 ~ 30 °C)。
2. 缓慢加入 20.30 g/L 的干粉培养基, 搅拌混合 30 分钟。
3. 缓慢加入 0.59 g/L 的谷氨酰胺, 搅拌混合 10 分钟。
4. 用 5M 氢氧化钠溶液将 pH 调至 6.0 ~ 6.5。
5. 缓慢加入 2.30 g/L 的碳酸氢钠, 搅拌混合 5 分钟。
6. 用 5M 氢氧化钠或 1M 盐酸溶液将 pH 调至 6.8 ~ 7.4, 搅拌 10 分钟。

7. 用纯化水定容到最终体积，搅拌混合 10 分钟。
8. 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 | HEK293 CDM15 (LQ15), 液体 | HEK293 CDM15 (DP15), 干粉 |
|-----------------|-------------------------|---------------------------------------|
| 外观 | 粉红色澄清液体 | 白色至淡粉色及相近颜色粉末 |
| pH | 6.8 ~ 7.4 | 6.8 ~ 7.4 (滤前) |
| 渗透压 (mOsmol/kg) | 260 ~ 320 | 270 ~ 320 |
| 溶解性 | -- | 按配液方法操作, 溶解良好 |
| 内毒素 (EU/mL) | < 3 | < 10 |
| 无菌检测 | 阴性 | -- |
| 微生物限度 | -- | 需氧菌: < 200 CFU/g 霉菌酵母菌: < 50 CFU/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 | 36 ~ 38°C |
| | CO ₂ 浓度 | 5% |
| | 湿度 | > 80% RH |

细胞复苏

1. 37°C水浴中预热 HEK293 CDM15 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 HEK293 CDM15 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 HEK293 CDM15 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 HEK293 CDM15 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 HEK293 CDM15 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 HEK293 CDM15 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 HEK293 CDM15 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 HEK293 CDM15 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 HEK293 CDM15 培养基的比例。
4. 在完全使用 HEK293 CDM15 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 HEK293 CDM15 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% HEK293 CDM15 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

蛋白类瞬转表达

1. 已经完成适应性培养的 HEK293 细胞，再经过 3 次传代培养后可进行转染操作。
2. 将 HEK293 细胞按照 0.5×10^6 cells/mL 浓度接种到 HEK293 CDM15 培养基中。
3. 细胞培养 2~3 天后，活细胞密度可达到 $2 \sim 4 \times 10^6$ cells/mL，用相同体积的预热 HEK293 CDM15 培养基稀释培养物（体积比 = 1 : 1），继续培养细胞，每天取样检测活细胞密度（ $\times 10^6$ cells/mL）和细胞活率（%）。
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 |
|---|---------|---------|
| 4.5×10^6 cells/mL, 活率 $> 95\%$ | 1.5mg/L | 4.5mg/L |

5. 补料策略

方法 1: Tobitec FD & Tobitec FB 补料策略

| 补料/时间 | D1 | D5 |
|--|--|---------|
| Tobitec FD | 5% | 5% |
| Tobitec FB | 0.5% | 0.5% |
| 谷氨酰胺 | 4mmol/L | 4mmol/L |
| 葡萄糖 | 当葡萄糖 ≤ 3 g/L 时, 按 5 g/L 的终浓度添加葡萄糖 | |
| 参数建议: 转染后初始培养温度 36.5°C, 不降温, pH: 7.1 \pm 0.2, DO: 40%。 | | |

注: 转染后培养低于五天, 可不加 Tobitec FB。

方法 2: Tobitec FC Pro 补料策略

| 补料/时间 | D0 | D1 | D3 |
|--|--|---------|---------|
| Tobitec FC Pro | -- | 5 ~ 8% | 5 ~ 8% |
| 谷氨酰胺 | -- | 4mmol/L | 4mmol/L |
| 葡萄糖 | 当葡萄糖 ≤ 3 g/L 时, 按 5 g/L 的终浓度添加葡萄糖 | | |
| 参数建议: 转染后初始培养温度 36.5°C, 不降温, pH: 7.1 \pm 0.2, DO: 40%。 | | | |

病毒类瞬转表达

1. 已经完成适应性培养的 HEK293 细胞, 再经过 3 次传代培养后可进行转染操作。
2. 将 HEK293 细胞按照 0.5×10^6 cells/mL 浓度接种到 HEK293 CDM15 培养基中。
3. 细胞培养 2 ~ 3 天后, 活细胞密度可达到 $2 \sim 4 \times 10^6$ cells/mL, 用相同体积的预热 HEK293 CDM15 培养基稀释培养物 (体积比=1:1), 继续培养细胞, 每天取样检测活细胞密度 ($\times 10^6$ cells/mL) 和细胞活率 (%)。
4. 病毒类瞬转: 根据具体情况摸索最佳转染条件, 进行转染。

5. 补料策略:

方法 1: Tobitec FA & Tobitec FB 补料策略

| 补料/时间 | D1 | D5 |
|---|--|---------|
| Tobitec FA | 5% | 5% |
| Tobitec FB | 0.5% | 0.5% |
| 谷氨酰胺 | 4mmol/L | 4mmol/L |
| 葡萄糖 | 当葡萄糖 ≤ 3 g/L 时, 按 5 g/L 的终浓度添加葡萄糖 | |
| 参数建议: 转染后初始培养温度 36.5℃, 不降温, pH: 7.1 \pm 0.2, DO: 40%。 | | |

注: 转染后培养低于五天, 可不加 Tobitec FB。

方法 2: Tobitec FC 补料策略

转染后 24h, 每 2 天按 5~8% 添加 Tobitec FC 补料产品, 根据培养体积补加 4mmol/L 谷氨酰胺。