

## 使用说明书—HEK293 CDM26

### 基础信息介绍

#### 产品简介

HEK293 CDM26 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，可实现重组蛋白、慢病毒、腺病毒的高水平表达，可用于相关产品的研发和生产过程。HEK293 CDM26 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 CDM26 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 CDM26	LQ26, 液体	2°C ~ 8°C, 避光	2°C ~ 8°C, 避光	12 个月
HEK293 CDM26	DP26, 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 23.00 g/L 培养基干粉，搅拌混合 10 分钟。
3. 缓慢加入 5M 氢氧化钠溶液，将 pH 调至 7.0 ~ 7.3 之间。然后继续搅拌 10 分钟以上。
4. 缓慢加入 2.30 g/L 的碳酸氢钠粉末，搅拌混合 10 分钟。
5. 用 5M 氢氧化钠或 1M 盐酸溶液将 pH 调至 7.1 ~ 7.4，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	HEK293 CDM26 (LQ26) 液体	HEK293 CDM26 (DP26) 干粉
外观	淡黄色澄清液体	类白色至淡黄色粉末
pH	6.9 ~ 7.5	7.1 ~ 7.6 (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	$0.5 \times 10^6$ cells/mL
	培养温度	36 ~ 38°C
	CO <sub>2</sub> 浓度	5%
	湿度	> 80% RH

## 细胞复苏

1. 37°C水浴中预热 HEK293 CDM26 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 CDM26 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 CDM26 培养基中，调节活细胞密度至  $0.5 \times 10^6$  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 CDM26 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  $0.5 \times 10^6$  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 CDM26 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  $2.0 \times 10^6$  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 CDM26 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 CDM26 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  $2 \times 10^6$  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  $0.5 \times 10^6$  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 CDM26 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 CDM26 培养基的比例。
4. 在完全使用 HEK293 CDM26 培养基接种 3~4 天之后，活细胞计数应该至少达到  $2 \times 10^6$  cells/mL，细胞活率  $\geq 90\%$ 。此时，细胞已经完全适应 HEK293 CDM26 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 CDM26 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  $0.5 \times 10^6$  cells/mL 浓度接种到 HEK293 CDM26 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 CDM26 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
4.5x10 <sup>6</sup> 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±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±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<sup>6</sup> cells/mL 浓度接种到 HEK293 CDM26 培养基中。
3. 细胞培养 2~3 天后, 活细胞密度可达到 2~4×10<sup>6</sup> cells/mL, 用相同体积的预热 HEK293 CDM26 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 (×10<sup>6</sup> 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 $\leq 3$ 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。