

使用说明书—BHK SFM01

基础信息介绍

产品简介

BHK SFM01 是一款无血清培养基 (Serum-Free Media), 不含血清、蛋白及任何动物源成分等, 采用高品质原料配制, 产品的质量以及稳定性高, 培养过程不需要添加血清, 适合于 BHK 细胞的高密度悬浮培养, 支持完全无血清无蛋白体系下 BHK 快速扩增、高密度培养及病毒疫苗生产。



应用范围

BHK SFM01 培养基适用于 BHK 细胞悬浮驯化及规模化无血清悬浮培养, 可用于狂犬疫苗等生物制品的研发和生产过程, 可支持从研发至规模化生产, 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
BHK SFM01	LQ16, 液体	2°C ~ 8°C, 避光	2°C ~ 8°C, 避光	12 个月
BHK SFM01	DP16, 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 100% 的纯化水(20 ~ 30 °C)。
2. 缓慢加入 24.724 g/L 的干粉培养基, 搅拌混合 10 分钟。
3. 用 200 g/L 氢氧化钠将 pH 调至 6.0 ~ 6.5, 充分搅拌 20 分钟。
4. 缓慢加入 2.438 g/L 碳酸氢钠, 混合 10 分钟。
5. 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	BHK SFM01 (LQ16), 液体	BHK SFM01 (DP16), 干粉
外观	黄色澄清液体	淡黄色、淡粉色或相近颜色粉末
pH	7.0 ~ 7.4	7.0 ~ 7.4 (滤前)
渗透压 (mOsmol/kg)	300 ~ 355	310 ~ 350
溶解性	--	按配液方法操作, 溶解良好
内毒素 (EU/mL)	< 10	< 10
无菌检测	阴性	--
微生物限度	--	需氧菌: < 200CFU/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	1.0×10^6 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 BHK SFM01 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 10mL 已预热 BHK SFM01 培养基的离心管中；
5. 170g~190g（约 800rpm~1000rpm）离心 5 分钟，丢弃上清液并将细胞重悬于 10~30mL 新鲜预热的 BHK SFM01 培养基中，调节活细胞密度至 1×10^6 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 > 90%，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 BHK SFM01 培养基放入 37°C条件下预热 20~30 min；
2. 取活细胞密度 $\geq 7 \times 10^6$ cells/mL、细胞活率 $\geq 90\%$ 、处于对数生长期中期的细胞进行传代；
3. 根据 1×10^6 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 BHK SFM01 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 48 ± 3 小时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 7.0×10^6 cells/mL，或细胞活率低于 90%，需要 170g~190g（大约 800rpm~1000rpm）离心 5 分钟处理细胞。轻轻弃上清，使用已预热的 BHK SFM01 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 BHK SFM01 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 48 ± 3 小时内达到 7×10^6 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 1×10^6 cells/mL。
2. 监测细胞生长情况，直到活细胞密度达到 $\geq 7 \times 10^6$ cells/mL。
3. 用 BHK SFM01 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 BHK SFM01 培养基的比例。
4. 在完全使用 BHK SFM01 培养基接种 48 ± 3 小时之后，活细胞计数应该至少达到 7×10^6 cells/mL，细胞活率 $\geq 90\%$ 。此时，细胞已经完全适应 BHK SFM01 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：93% BHK SFM01 培养基 + 7%DMSO，4°C冷藏保存。
4. 170g ~ 190g（大约 800rpm ~ 1000rpm）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。