

## 使用说明书—Vero SFM01

### 基础信息介绍

#### 产品简介

Vero SFM01 是无血清 (Serum-Free) 基础培养基, 不含蛋白及任何动物来源的成分, 专门为 VERO 细胞系开发, 可用于 Vero 细胞贴壁静态培养以及微载体悬浮规模化培养, 支持细胞高密度生长及活率维持, 可用于流感疫苗等相关产品的研发和生产过程。



#### 应用范围

Vero SFM01 可应用于 Vero 细胞的复苏、传代、贴壁静态培养以及微载体悬浮规模化培养。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
Vero SFM01	LQ25, 液体	2°C ~ 8°C, 避光	2°C ~ 8°C, 避光	12 个月
Vero SFM01	DP25, 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, 水温 25 ~ 30°C。
2. 加入培养基干粉 15.00 g/L 和 L-谷氨酰胺 584 mg/L, 连续充分搅拌 40 分钟至完全澄清 (禁止加热)。
3. 加入 NaHCO<sub>3</sub> 2200 mg/L, 搅拌 3 ~ 5 分钟溶解。
4. 定容至终体积, 搅拌均匀。
5. 用 1M HCl 或 NaOH 调整 pH 值至 7.1 ~ 7.3。
6. 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	Vero SFM01 (LQ25), 液体	Vero SFM01 (DP25), 干粉
外观	红色澄清液体	类粉色粉末
pH	7.1 ~ 7.5	7.1 ~ 7.3 (滤前)
渗透压 (mOsmol/kg)	270 ~ 320	270 ~ 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	T25 细胞培养瓶	5 ~ 10 mL
	T75 细胞培养瓶	15 ~ 25 mL
	T175 细胞培养瓶	40 ~ 55 mL
	1 层细胞工厂	130 ~ 200 mL
	2 层细胞工厂	260 ~ 400 mL
	10 层细胞工厂	1300 ~ 2000 mL
培养环境	接种密度	$2 \sim 4 \times 10^4$ cells/cm <sup>2</sup>
	培养温度	37°C
	CO <sub>2</sub> 浓度	5%
	湿度	> 80% RH

## 细胞复苏

1. 37°C水浴中预热 Vero 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 Vero SFM01 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 10mL 新鲜预热的 Vero SFM01 培养基中，调节活细胞密度至  $2 \sim 4 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>；
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

以 T75 培养瓶为例：

1. 将 Vero SFM01 培养基放入 37°C条件下预热 20 ~ 30 min；
2. 取细胞活率  $\geq 90\%$ 、处于对数生长期中期的细胞进行传代；
3. 取待传代细胞，倒去培养基，用 7 ~ 10mL DPBS 润洗一遍，弃掉，重复一次；
4. 加入 1mL 重组胰蛋白酶消化液 (PDE RecTrypsin-LQ02 (1 $\times$ ), PDE-LQ02/ PDE RecTrypsin-LQ03 (10 $\times$ ), PDE-LQ03)，浸润所有培养表面，置室温消化 3 ~ 5 分钟；
5. 待细胞从瓶壁脱落，拍打瓶壁，加入已预热好的混合液(含有 1mL 0.5%胰蛋白酶抑制剂和 9mL Vero SFM01 培养基，共 10mL) 吹打分散细胞，收集细胞，将细胞悬液室温 300g 离心 5 ~ 10 分钟；
6. 弃上清，将细胞沉淀用 Vero SFM01 培养基重悬；
7. 根据  $2 \sim 4 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> 的接种密度和传代体积，计算所需种子液量；
8. 无菌转移所需量的种子液，添加至含所需体积的已预热 Vero SFM01 培养基的 T75 瓶中；
9. 每 3 ~ 5 天传代一次。

## 细胞适应

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 Vero 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. 推荐细胞传代接种密度  $2 \sim 4 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>，每 4 ~ 6 天传代一次。一般 3 次传代细胞可完全适应。

## 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% Vero SFM01 培养基 + 10% DMSO，4°C 冷藏保存。
4. 按照细胞消化程序制备细胞悬液。
5. 300g 离心 5 分钟，弃去上清，用冻存培养基重新悬浮细胞。
6. 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。
7. 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）。
8. 将细胞转移到液氮罐中保存。