

使用说明书—LMH SFM01

基础信息介绍

产品简介

LMH SFM01 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 LMH 细胞的高密度悬浮培养，支持完全无血清无蛋白体系下 LMH 快速扩增、高密度培养及禽腺病毒疫苗生产。



应用范围

LMH SFM01 适用于 LMH 细胞悬浮驯化及规模化无血清悬浮培养，可用于禽腺病毒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
LMH SFM01	LQ42, 液体	2°C ~ 8°C, 避光	2°C ~ 8°C, 避光	6 个月
LMH SFM01	DP42, 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 23.30 g/L 的干粉培养基，搅拌混合 20 ~ 30 分钟。
3. 按 0.24 ± 0.01 g/L 用量，添加 5 M 的氢氧化钠溶液至上述溶液中，将 pH 缓慢调至 6.0~6.5。充分搅拌 10 ~ 22 分钟，此时溶液应为澄清透明。
4. 缓慢加入 2.00 ± 0.05 g/L 碳酸氢钠，混合 10 ~ 20 分钟。
5. 若此时溶液的 pH 值不在 7.0~7.4 的范围内，用 5M 氢氧化钠或 1M 盐酸溶液将 pH 调至 7.0~7.4。
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	LMH SFM01 (LQ42), 液体	LMH SFM01 (DP42), 干粉
外观	黄色澄清液体	淡黄色或相近颜色粉末
pH	7.0 ~ 7.6	7.0 ~ 7.4 (滤前)
渗透压 (mOsmol/kg)	280 ~ 340	280 ~ 340
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 霉菌酵母菌: < 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	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
	摇瓶	25mm 振幅: 120 ~ 130 rpm
	摇瓶	50mm 振幅: 100 ~ 120 rpm
培养环境	接种密度	1×10^6 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 LMH 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 30mL 已预热 LMH 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 10mL 新鲜预热的 LMH 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 LMH SFM01 培养基放入 37°C条件下预热 20 ~ 30 min；
2. 取活细胞密度 $\geq 4 \times 10^6$ 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 LMH 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 4.0×10^6 cells/mL，或细胞活率低于 90%，需要 170g ~ 190g（约 800rpm ~ 1000rpm）离心 5 分钟处理细胞。轻轻弃上清，使用已预热的 LMH 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 LMH 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 4×10^6 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 $\geq 4 \times 10^6$ cells/mL。
3. 用 LMH 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 LMH SFM01 培养基的比例。
4. 在完全使用 LMH SFM01 培养基接种 48 ± 3 小时之后，活细胞计数应该至少达到 4×10^6 cells/mL，细胞活率 $\geq 90\%$ 。此时，细胞已经完全适应 LMH 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，最终活细胞密度控制为 $2.5 \sim 3.5 \times 10^7$ cells/mL。
3. 准备所需的冻存培养基：93% LMH SFM01 培养基 + 7%DMSO，4°C冷藏保存。
4. 170g ~ 190g（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。