Version 1，2024

使用说明书—CHO CDM27

基础信息介绍

产品简介

CHO CDM27 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，适合于不同亚型中国仓鼠卵巢细胞（CHO-ZN、CHO-K1、CHO-S 和 CHO DG44 等）的高密度悬浮培养和稳转表达，可实现重组蛋白和抗体的高水平表达。CHO CDM27 基础培养基与补料培养基（Tobitec FA、Tobitec FB 等）联用，可支持细胞高密度生长及活率维持，实现高水平、高质量的蛋白/抗体表达。



应用范围

CHO CDM27 可应用于 CHO 细胞的复苏、传代、高密度流加培养以及稳转表达。该基础培养基适用于蛋白/抗体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
CHO CDM27	LQ27，液体	2℃～8℃，避光	2℃～8℃，避光	12 个月
CHO CDM27	DP27，干粉	2℃～8℃，避光	2℃～8℃，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(25～30℃)。
2. 缓慢加入 21.00 g/L 的干粉培养基，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，搅拌混合 10 分钟。
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	CHO CDM27 (LQ27)，液体	CHO CDM27 (DP27)，干粉
外观	淡黄色至黄色澄清液体	类白色粉末
pH	6.9 ~ 7.5	7.0 ~ 7.5（滤前）
渗透压(mOsmol/kg)	260 ~ 320	280 ~ 330
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	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	37℃
	CO_2 浓度	5%
	湿度	> 80% RH

细胞复苏

1. 37℃水浴中预热 CHO CDM27 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℃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 CHO CDM27 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 CHO CDM27 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（$\times10^6$ 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 CHO CDM27 培养基放入 37℃条件下预热 20～30 min；

2. 取活细胞密度 ≥2×10^6 cells/mL、细胞活率 ≥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 CHO CDM27 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 CHO CDM27 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 CHO CDM27 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 ≥2×10^6 cells/mL。

3. 用 CHO CDM27 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 CHO CDM27 培养基的比例。

4. 在完全使用 CHO CDM27 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≥90%。此时，细胞已经完全适应 CHO CDM27 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 ＞1×10^7 cells/mL。

3. 准备所需的冻存培养基：90% CHO CDM27 培养基 + 10%DMSO，4℃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℃）。

7. 将细胞转移到液氮罐中保存。

参考补料策略

补料策略

1. 将驯化好的细胞按照 0.5×10^6 cells/mL 接种至 CHO CDM27 培养基中。

2. D3 天开始，参考以下补料策略进行补料：

补料/时间	D3	D5	D7	D9	D11	D13
Tobitec FA / FB	**2/0.2%**	**2/0.2%**	**2/0.2%**	**2/0.2%**	**2/0.2%**	**2/0.2%**
Tobitec FA / FB	**3/0.3%**	**3/0.3%**	**3/0.3%**	**3/0.3%**	**3/0.3%**	**3/0.3%**
Tobitec FA / FB	**4/0.4%**	**4/0.4%**	**4/0.4%**	**4/0.4%**	**4/0.4%**	**4/0.4%**
葡萄糖	当葡萄糖浓度 ＜4 g/L 时，按 6 g/L 的终浓度添加葡萄糖					

注：

建议首次补料活细胞密度在 4～6×10^6 cells/mL，可根据细胞生长情况提前或延迟补料。

流加培养过程中为实现细胞高密度、高活率维持，建议当活细胞密度 ＞15×10^6 cells/mL 时，降低培养温度。

【技术支持】

根据销售条款，如您遇任何问题，请与我公司技术人员联系 ：

Tel：+86 21-64909996-393 Fax： +86 21-64909996-730

Email：bioreagent@tofflon.com