Version 1，2024

# 使用说明书—CHO CDM29

## 基础信息介绍

### 产品简介

CHO CDM29 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 细胞）的高密度悬浮培养及转染表达，可实现重组蛋白和抗体的高水平表达。CHO CDM29 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 CDM29 可应用于 CHO 细胞的复苏、传代、高密度流加培养以及后续转染表达。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 |
|---|---|---|---|---|
| CHO CDM29 | LQ29，液体 | 2℃～8℃，避光 | 2℃～8℃，避光 | 12 个月 |
| CHO CDM29 | DP29，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 21.12 g/L 的干粉培养基，搅拌混合 30 分钟。
3. 用 5M 氢氧化钠溶液将 pH 调至 6.8～7.0，搅拌 10 分钟。
4. 缓慢加入 2.30 g/L 的碳酸氢钠，搅拌混合 5 分钟。
5. 用 5M 氢氧化钠或 1M 盐酸溶液将 pH 调至 7.0～7.4，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 CDM29（LQ29）液体 | CHO CDM29（DP29）干粉 |
|---|---|---|
| 外观 | 淡粉色澄清液体 | 类白色粉末 |
| pH | 7.1～7.6 | 7.1～7.6（滤前） |
| 渗透压(mOsmol/kg) | 260～320 | 260～320 |
| 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：＜200 CFU/g<br>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 | $0.5\times10^6$ 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 CDM29 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 CDM29 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 CDM29 培养基中，调节活细胞密度至 $0.5\times10^6$ 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 CDM29 培养基放入 37℃条件下预热 20～30 min；

2. 取活细胞密度 ≥$2\times10^6$ 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 $0.5\times10^6$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 CDM29 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 $2.0\times10^6$ 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 CDM29 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 CDM29 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 $2\times10^6$ 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 CDM29 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 CDM29 培养基的比例。

4. 在完全使用 CHO CDM29 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 CDM29 培养基。

## 细胞冻存

1. 准备处于对数生长中期的、细胞活率 ＞90%且状态较好的细胞。

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 CDM29 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 CDM29 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