Version 1，2024

使用说明书—HEK293 CDM15

基础信息介绍

产品简介

HEK293 CDM15 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 HEK293 细胞（如 HEK293F、HEK293T、HEK293H、Expi293 等）的高密度悬浮培养及瞬时转染，可用于重组蛋白、慢病毒、腺病毒的高水平表达，腺相关病毒相关产品的研发和生产过程。HEK293 CDM15 基础培养基与补料培养基（Tobitec FC Pro 等）联用，可支持细胞高密度生长及活率维持，实现目标产物高效表达。



应用范围

HEK293 CDM15 可应用于 HEK293 细胞的复苏、传代、高密度流加培养以及瞬时转染表达。该基础培养基适用于重组蛋白、慢病毒、腺病毒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
HEK293 CDM15	LQ15，液体	2℃～8℃，避光	2℃～8℃，避光	12 个月
HEK293 CDM15	DP15，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(20～30 ℃)。
2. 缓慢加入 20.30 g/L 的干粉培养基，搅拌混合 30 分钟。
3. 缓慢加入 0.59 g/L 的谷氨酰胺，搅拌混合 10 分钟。
4. 用 5M 氢氧化钠溶液将 pH 调至 6.0～6.5。
5. 缓慢加入 2.30 g/L 的碳酸氢钠，搅拌混合 5 分钟。
6. 用 5M 氢氧化钠或 1M 盐酸溶液将 pH 调至 6.8～7.4，搅拌 10 分钟。

7. 用纯化水定容到最终体积，搅拌混合 10 分钟。

8. 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	HEK293 CDM15（LQ15），液体	HEK293 CDM15（DP15），干粉
外观	粉红色澄清液体	白色至淡粉色及相近颜色粉末
pH	6.8 ~ 7.4	6.8 ~ 7.4（滤前）
渗透压（mOsmol/kg）	260 ~ 320	270 ~ 320
溶解性	--	按配液方法操作，溶解良好
内毒素（EU/mL）	< 3	< 10
无菌检测	阴性	--
微生物限度	--	需氧菌：< 200 CFU/g 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	0.5×10^6 cells/mL
	培养温度	36 ~ 38℃
	CO_2 浓度	5%
	湿度	> 80% RH

细胞复苏

1. 37℃水浴中预热 HEK293 CDM15 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 HEK293 CDM15 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 HEK293 CDM15 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（×10^6 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 HEK293 CDM15 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 HEK293 CDM15 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 HEK293 CDM15 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 HEK293 CDM15 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 0.5×10⁶ cells/mL。

2. 监测细胞生长情况，直到活细胞密度达到 ≥2×10⁶ cells/mL。

3. 用 HEK293 CDM15 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 HEK293 CDM15 培养基的比例。

4. 在完全使用 HEK293 CDM15 培养基接种 3～4 天之后，活细胞计数应该至少达到 2×10⁶ cells/mL，细胞活率 ≥90%。此时，细胞已经完全适应 HEK293 CDM15 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 ＞1×10⁷ cells/mL。

3. 准备所需的冻存培养基：90% HEK293 CDM15 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。

参考瞬转及补料策略

蛋白类瞬转表达

1. 已经完成适应性培养的 HEK293 细胞，再经过 3 次传代培养后可进行转染操作。

2. 将 HEK293 细胞按照 0.5×10⁶ cells/mL 浓度接种到 HEK293 CDM15 培养基中。

3. 细胞培养 2～3 天后，活细胞密度可达到 2～4×10⁶ cells/mL，用相同体积的预热 HEK293 CDM15 培养基稀释培养物（体积比 ＝1 : 1），继续培养细胞，每天取样检测活细胞密度（×10⁶ cells/mL）和细胞活率（%）。

4. 执行转染作业，最佳转染条件应根据具体情况进行优化，以下转染条件仅供参考使用：

VCD	DNA	PEI
4.5x10⁶ cells/mL，活率> 95%	1.5mg/L	4.5mg/L

5. 补料策略

方法 1：Tobitec FD & Tobitec FB 补料策略

补料/时间	D1	D5
Tobitec FD	5%	5%
Tobitec FB	0.5%	0.5%
谷氨酰胺	4mmoL/L	4mmoL/L
葡萄糖	当葡萄糖 ≤3 g/L 时，按 5 g/L 的终浓度添加葡萄糖	
参数建议：转染后初始培养温度 36.5℃，不降温，pH：7.1±0.2，DO：40%。		

注：转染后培养低于五天，可不加 Tobitec FB。

方法 2：Tobitec FC Pro 补料策略

补料/时间	D0	D1	D3
Tobitec FC Pro	--	5～8%	5～8%
谷氨酰胺	--	4mmoL/L	4mmoL/L
葡萄糖	当葡萄糖 ≤3 g/L 时，按 5 g/L 的终浓度添加葡萄糖		
参数建议：转染后初始培养温度 36.5℃，不降温，pH：7.1±0.2，DO：40%。			

病毒类瞬转表达

1. 已经完成适应性培养的 HEK293 细胞，再经过 3 次传代培养后可进行转染操作。

2. 将 HEK293 细胞按照 0.5×10^6 cells/mL 浓度接种到 HEK293 CDM15 培养基中。

3. 细胞培养 2～3 天后，活细胞密度可达到 2～4×10^6 cells/mL，用相同体积的预热 HEK293 CDM15 培养基稀释培养物（体积比=1:1），继续培养细胞，每天取样检测活细胞密度（×10^6 cells/mL）和细胞活率（%）。

4. 病毒类瞬转：根据具体情况摸索最佳转染条件，进行转染。

5. 补料策略：

方法 1：Tobitec FA & Tobitec FB 补料策略

补料/时间	D1	D5
Tobitec FA	5%	5%
Tobitec FB	0.5%	0.5%
谷氨酰胺	4mmoL/L	4mmoL/L
葡萄糖	当葡萄糖 ≤3 g/L 时，按 5 g/L 的终浓度添加葡萄糖	
参数建议：转染后初始培养温度 36.5℃，不降温，pH：7.1±0.2，DO：40%。		

注：转染后培养低于五天，可不加 Tobitec FB。

方法 2：Tobitec FC 补料策略

转染后 24h，每 2 天按 5～8% 添加 Tobitec FC 补料产品，根据培养体积补加 4mmoL/L 谷氨酰胺。

【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