Version 1，2024

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℃～8℃，避光	2℃～8℃，避光	6 个月
LMH SFM01	DP42，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 100% 的纯化水(20~ 30℃)。
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℃
	CO_2 浓度	5%
	湿度	＞80% RH

细胞复苏

1. 37℃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℃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（$\times10^6$ 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℃条件下预热 20～30 min；

2. 取活细胞密度 ≥4×10^6cells/mL、细胞活率 ≥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 $\times10^6$ 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 4×10^6cells/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 ≥4×10^6 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 ≥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 2.5～3.5 $\times10^7$ cells/mL。

3. 准备所需的冻存培养基：93% LMH SFM01 培养基 ＋7%DMSO，4℃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℃）。

7. 将细胞转移到液氮罐中保存。

【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