Version 1，2024

# 使用说明书—Vero SFM01

## 基础信息介绍

### 产品简介

Vero SFM01 是无血清（Serum-Free）基础培养基，不含任何动物来源的成分，专门为 VERO 细胞系开发，可用于 Vero 细胞贴壁静态培养以及微载体悬浮规模化培养，支持细胞高密度生长及活率维持，可用于流感疫苗等相关产品的研发和生产过程。




### 应用范围

Vero SFM01 可应用于 Vero 细胞的复苏、传代、贴壁静态培养以及微载体悬浮规模化培养。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 |
|---|---|---|---|---|
| Vero SFM01 | LQ25，液体 | 2℃～8℃，避光 | 2℃～8℃，避光 | 12 个月 |
| Vero SFM01 | DP25，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，水温 25～30℃。
2. 加入培养基干粉 15.00 g/L 和 L-谷氨酰胺 584 mg/L，连续充分搅拌 40 分钟至完全澄清（禁止加热）。
3. 加入 $NaHCO_3$ 2200 mg/L，搅拌 3～5 分钟溶解。
4. 定容至终体积，搅拌均匀。
5. 用 1M HCl 或 NaOH 调整 pH 值至 7.1～7.3。
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 | Vero SFM01（LQ25），液体 | Vero SFM01（DP25），干粉 |
|---|---|---|
| 外观 | 红色澄清液体 | 类粉色粉末 |
| pH | 7.1～7.5 | 7.1～7.3（滤前） |
| 渗透压（mOsmol/kg） | 270～320 | 270～320 |
| 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：＜200CFU/g<br>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 | T25 细胞培养瓶 | 5～10 mL |
| | T75 细胞培养瓶 | 15～25 mL |
| | T175 细胞培养瓶 | 40～55 mL |
| | 1 层细胞工厂 | 130～200 mL |
| | 2 层细胞工厂 | 260～400 mL |
| | 10 层细胞工厂 | 1300～2000 mL |
| 培养环境 | 接种密度 | $2\sim4\times10^{4}$ cells/cm$^{2}$ |
| | 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 Vero 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 10mL 已预热 Vero SFM01 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 10mL 新鲜预热的 Vero SFM01 培养基中，调节活细胞密度至 2～4×$10^4$ cells/$cm^2$；

6. 取 0.5mL 细胞悬液，用细胞计数仪分析活细胞密度（×106 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

以 T75 培养瓶为例：

1. 将 Vero SFM01 培养基放入 37℃条件下预热 20～30 min；

2. 取细胞活率 ≥90%、处于对数生长期中期的细胞进行传代；

3. 使用移液管将培养容器内培养基去除，加入适量的 DPBS 进行清洗，去除清洗液后重复清洗一次；

4. 加入 3mL 重组胰蛋白酶消化液 (PDE RecTrypsin-LQ02 (1×), PDE-LQ02/ PDE RecTrypsin-LQ03 (10×), PDE-LQ03)，浸润所有培养表面，置室温消化 3～5 分钟；

5. 待细胞从瓶壁脱落，拍打瓶壁，加入 3mL 已预热好的培养基吹打分散细胞，收集细胞，将细胞悬液室温 300g 离心 5～10 分钟；；

6. 弃上清，将细胞沉淀用 Vero SFM01 培养基重悬；

7. 根据 2～4×$10^4$ cells/$cm^2$ 的接种密度和传代体积，计算所需种子液量；

8. 无菌转移所需量的种子液，添加至含所需体积的已预热 Vero SFM01 培养基的 T75 瓶中；

9. 每 3～5 天传代一次。

## 细胞适应

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 Vero 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. 推荐细胞传代接种密度 2～4×$10^4$ cells/$cm^2$，每 4～6 天传代一次。一般 3 次传代细胞可完全适应。

## 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 ＞$1\times10^7$ cells/mL。
3. 准备所需的冻存培养基：90% Vero SFM01 培养基 + 10% DMSO，4℃冷藏保存。
4. 按照细胞消化程序制备细胞悬液。
5. 300g 离心 5 分钟，弃去上清，用冻存培养基重新悬浮细胞。
6. 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。
7. 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℃）。
8. 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