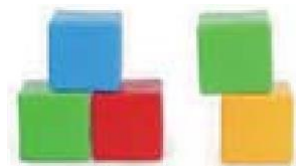


友康 HEK293 全悬浮无血清培养基 技术白皮书



友康 HEK293 全悬浮无血清培养基技术白皮书目录

1. 产品描述
2. 产品参数
3. 细胞培养
 - 3.1 细胞复苏
 - 3.2 细胞计数
 - 3.3 细胞传代
 - 3.3.1 复苏的细胞传代
 - 3.3.2 细胞连续传代
 - 3.4 扩大培养
 - 3.4.1 1 L 摇瓶 250 mL 培养体系
 - 3.4.2 3 L 摇瓶 1 L 培养体系
 - 3.4.3 5 L 反应器 1 L 培养体系
 - 3.5 细胞冻存
4. 培养数据及细胞形态
 - 4.1 125 mL 摇瓶 30 mL 培养体系
 - 4.2 1 L 摇瓶 125 mL 培养体系
 - 4.3 3 L 摇瓶 1 L 培养体系
 - 4.4 5 L 反应器 1 L 培养体系
5. 慢病毒包装
 - 5.1 125 mL 摇瓶 30 mL 转染体系
 - 5.2.1 换液转染
 - 5.2.2 补液转染
 - 5.2 1 L 摇瓶 220 mL 转染体系
 - 5.3 5 L 反应器 1.1 L 转染体系
6. 慢病毒滴度检测
 - 6.1 慢病毒滴度检测方法
 - 6.2 慢病毒滴度检测结果
 - 6.2.1 125 mL 摇瓶 30 mL 转染体系
 - 6.2.2 1 L 摇瓶 220 mL 转染体系
 - 6.2.3 5 L 反应器 1.1 L 转染体系
7. 常见问题解析

1. 产品描述

- 用于 HEK293T 全悬浮高产细胞株的培养，支持最大密度 $7e^6$ cells/mL；
- 不含血清，化学成分明确；
- 转染时可直接作为 DNA-转染试剂复合物的孵育培养基；
- 适用于 6 孔板至 5 L 反应器不同规模的细胞培养；
- 本品中不含谷氨酰胺，使用时需向培养基中添加 2 mM 的谷氨酰胺。

2. 产品参数

- 外观：淡黄色澄清液体
- 规格：1000 mL
- 内毒素：<5 EU/mL
- 渗透压：270-310 mOsm/kg
- pH：25 °C 时，6.9-7.4
- 保质期：12 个月
- 保存条件：2-8 °C，避光

3. 细胞培养

3.1 细胞复苏

- (1) 复苏细胞前 15 min 取添加有 2 mM 谷氨酰胺的 HEK293 全悬浮无血清培养基（以下称为“完全培养基”）20 mL 于 125 mL 摇瓶中，放入 37 °C 培养箱预温备用；
- (2) 解冻细胞前准备 10 mL 室温平衡的 PBS 于 15 mL 离心管备用；
- (3) 待水浴锅温度升至 37 °C，开始解冻细胞。将冻存的细胞从液氮中取出，用镊子捏住管体没入 37 °C 温水中，快速来回晃动，尽量在 1min 内将细胞解冻；
- (4) 尽快将解冻好的细胞加入上述准备好的 PBS（为避免部分细胞残留在冻存管中，可吸出 1 mL 的 PBS 轻轻冲洗冻存管底部后再加回离心管中）；
- (5) 170 g 离心 3 min，弃上清，用上述预温好的完全培养基重悬细胞，从摇瓶中吸取 5 mL 完全培养基，加入 15 mL 离心管重悬细胞后把细胞悬液加入摇瓶中（重悬细胞时，仅轻轻吹打 4、5 下即可，避免用力、过度吹打细胞）；
- (6) 37 °C、8% CO₂ 摇床中培养，摇床转速 100 rpm（振幅 50 mm）。

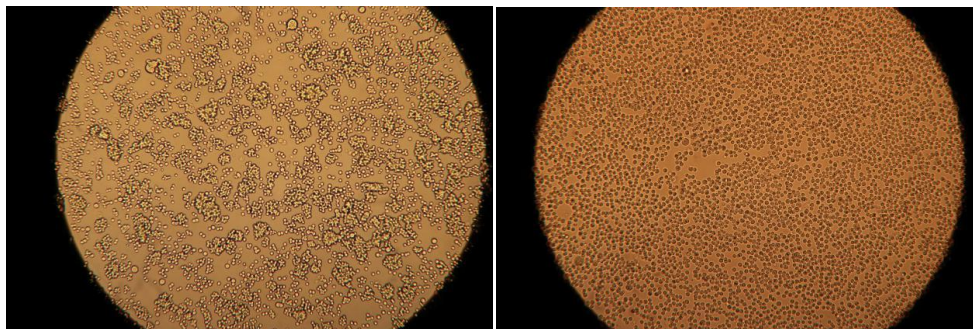
注：复苏的细胞较脆弱，建议培养 72 h 准备传代时再计数。

3.2 细胞计数

- (1) 模拟摇床运动方式晃动摇瓶将细胞培养液摇匀，取出 100 μ L 于 1.5 mL EP 管中；
- (2) 加入等体积（100 μ L）HEK293 细胞分散液（货号 NC1006），于 37 $^{\circ}$ C 摇床培养箱中放置 5-10 min，若细胞结团严重，细胞团紧密，可再适当延长（最长不超过 30 min）；
- (3) 混合液吹打均匀，可在镜下观察细胞是否完全分散为单个细胞；
- (4) 确认细胞完全分散，取适量体积使用台盼蓝染色计数、细胞计数仪计数或使用流式细胞仪计数。

注 1：前期培养过程中可记录分散液处理的时间，此后以该时间作为参考可不必每次计数都镜下观察。

注 2：细胞密度较大时，加入 HEK293 细胞分散液后会出现白色絮状物，用移液器吹打使其分散即可，不影响计数结果。



分散液处理前

分散液处理后

3.3 细胞传代

3.3.1 复苏的细胞传代

- (1) 细胞复苏后培养 72 h 可进行传代；
- (2) 细胞计数确认细胞密度，若细胞密度达到 2.5×10^6 cells/mL，则总细胞数为 2.5×10^6 cells/mL * 20 mL = 5×10^7 ，以 5×10^5 cells/mL 密度传代可接 100 mL，此时建议传 3*30 mL，复苏的细胞状态较差，传代接种密度宜高不宜低；
- (3) 取 3 个 125 mL 摇瓶分别加入新鲜完全培养基 23.5 mL，放入培养箱预温 15 min；
- (4) 吸取 6.5 mL 细胞培养液直接加入 23.5 mL 预温好的新鲜完全培养基中；
- (5) 将细胞置于 37 $^{\circ}$ C、8%CO₂ 摇床中培养，摇床转速 100 rpm；
- (6) P1 传代培养 48 h 后取样监测细胞密度，若细胞密度大于 2×10^6 cells/mL 可传 P2，若细胞密度低于 2×10^6 cells/mL，则再培养 12-24 h 传至 P2（此时应注意不可让种子细胞

密度超过 3.5×10^6 cells/mL)，传代方式与复苏的细胞传 P1 一致；

- (7) P2 传代培养 48h 后取样监测细胞密度，若细胞密度大于 2×10^6 cells/mL 可传 P3，若细胞密度低于 2×10^6 cells/mL，则再培养 12-24 h 传至 P3（此时应注意不可让种子细胞密度超过 3.5×10^6 cells/mL），传代方式与复苏的细胞传 P1 一致。

3.3.2 细胞连续传代

- (1) 细胞复苏连续培养 3 代后，若以 3.5×10^5 cells/mL 接种，细胞培养 72 h 后密度大于 3×10^6 cells/mL，此时认为细胞状态已恢复，可选择离心去除上清传代或不离心直接传代；若低于 3×10^6 cells/mL，则不能离心传代；
- (2) 细胞状态恢复后，传代接种密度可根据需求控制在 $3-5 \times 10^5$ cells/mL 之间，接种后 48-72 h 进行传代，一般以 $3-5 \times 10^5$ cells/mL 密度接种后培养 72 h、密度在 3×10^6 cells/mL 左右时是最佳传代时间；
- (3) 若种子细胞密度大于 4.5×10^6 cells/mL，部分细胞生长已经进入衰亡期，建议停止传代，重新复苏种子细胞。

3.4 扩大培养

3.4.1 1 L 摇瓶 250 mL 培养体系

- (1) 125 mL 摇瓶 30 mL 培养体系的种子细胞计数，取对数期细胞用于接种；
- (2) 取新鲜的完全培养基 200 mL 于 1 L 摇瓶中， 37°C 培养箱中预温 1 h；
- (3) 若种子细胞密度为 3×10^6 cells/mL，直接将种子细胞 30 mL 加入预温好的完全培养基中，此时接种密度为 $(3 \times 10^6 \text{ cells/mL} * 30 \text{ mL}) / 230 \text{ mL} = 3.9 \times 10^6$ cells/mL；
- (4) 37°C 、8% CO_2 摇床中培养，摇床转速 100 rpm（振幅 50 mm）。

3.4.2 3 L 摇瓶 1 L 培养体系

- (5) 1 L 摇瓶 150 mL 培养体系的种子细胞计数，取对数期细胞用于接种；
- (6) 取新鲜的完全培养基 900 mL 于 3 L 摇瓶中， 37°C 培养箱中预温 1h；
- (7) 若种子细胞密度为 3×10^6 cells/mL，直接将种子细胞 150 mL 加入预温好的完全培养基中，此时接种密度为 $(3 \times 10^6 \text{ cells/mL} * 150 \text{ mL}) / 1050 \text{ mL} = 4.2 \times 10^5$ cells/mL；
- (8) 37°C 、8% CO_2 摇床中培养，摇床转速 100 rpm（振幅 50 mm）。

3.4.3 5 L 反应器 1 L 培养体系

反应器在接种细胞之前请提前做好灭菌、pH 和溶氧校准等前期准备工作。

- (1) 1 L 摇瓶 250 mL 培养体系的种子细胞计数，取对数期的细胞准备用于接种；
- (2) 超净台内，将 900 mL 新鲜完全培养基倒入 2 L 接种用的瓶中，将培养基加入反应器内。连接接种瓶与反应器的胶管上安装有胶管夹，只有在向罐中添加培养基的过程中才将夹子松开，培养基加完后再重新夹住；
- (3) 打开搅拌（80-110 rpm）、温度（37 °C）、PH（7.2）、溶氧（40%）、CO₂ 控制器开关，等待所有参数稳定，不可在温度过高或过低时接种；
- (4) 在接种瓶内加入接种所需的种子细胞（根据接种密度、培养体积算好种子细胞用量，例如，种子细胞密度为 3e⁶ cells/mL，接种密度为 5e⁵ cells/mL，则所需种子细胞体积为 200 mL），接种前将搅拌关闭；
- (5) 种子细胞从接种瓶中流入至反应器内，使用 100 mL 新鲜完全培养基冲洗接种管路；
- (6) 接种结束，细胞在反应器内培养，开始计时；
- (7) 细胞培养 24 h、48 h 取样计数监测细胞密度。

3.5 细胞冻存

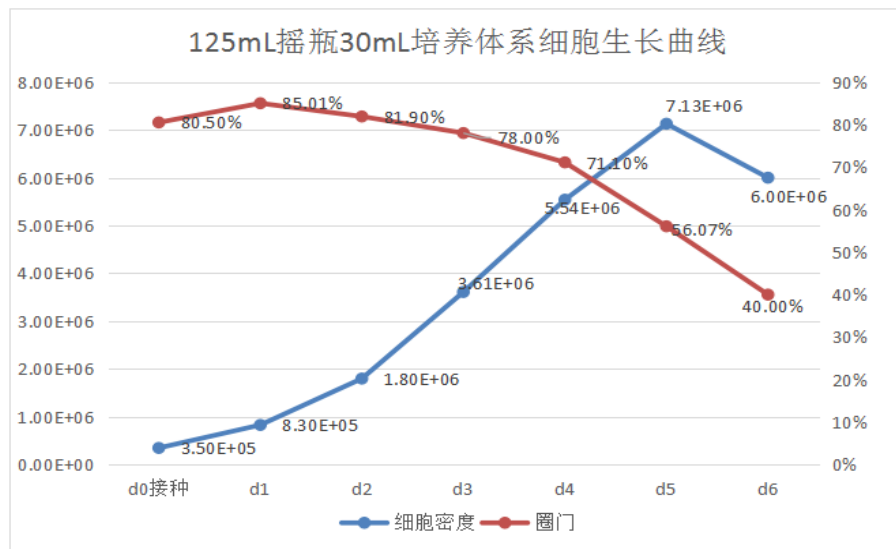
- (1) 取样计数确认细胞密度，宜冻存对数期、活率大于 90%的细胞（一般细胞密度在 3e⁶ cells/ml 左右为对数期）；
- (2) 细胞培养液 170 g 室温离心 3 min，除尽上清；
- (3) 采用在 4 °C 放置的友康无血清冻存液（货号 NC1001）重悬细胞，按照冻存密度为 1e⁷ cells/mL 加入相应体积的冻存液，重悬后的细胞在低温环境下（如冰盒或冰袋上）快速分装至冻存管中；
- (4) 分装好的细胞立即放入 - 80 °C 冰箱中，24 h 后移入液氮长期保存。

注：复苏后建议连续培养 3 代细胞状态恢复后再冻存种子细胞。

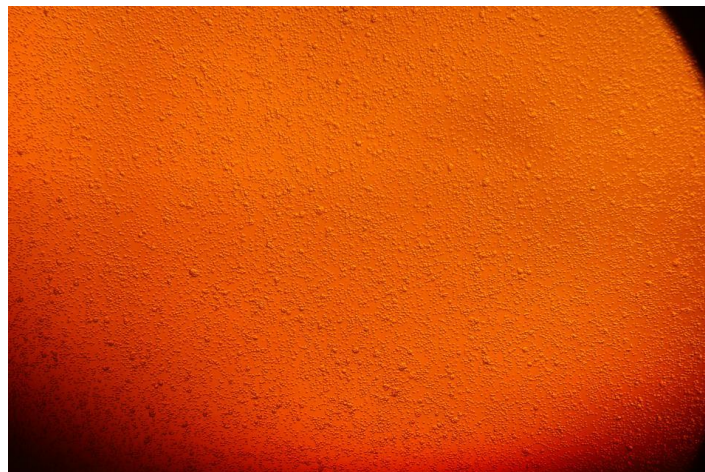
4、培养数据及细胞形态

4.1 125 mL 摇瓶 30 mL 培养体系

125 mL 摇瓶 30 mL 培养体系密度监测		
培养时间	细胞密度 (cells/mL)	流式检测细胞圈门
d0(接种)	3.50E+05	80.00%
d1	8.30E+05	85.00%
d2	1.80E+06	81.00%
d3	3.61E+06	78.00%
d4	5.54E+06	60.00%
d5	7.13E+06	56.00%
d6	6.00E+06	40.00%

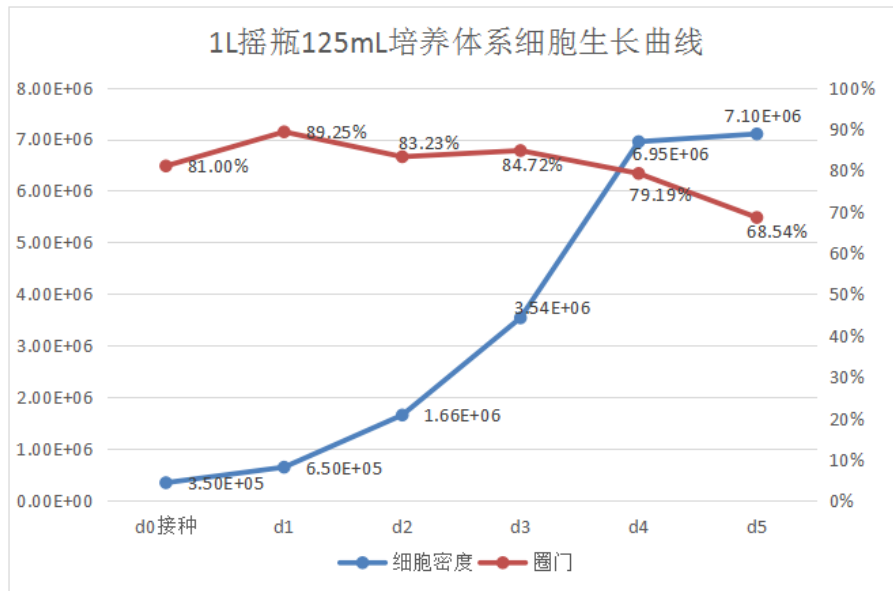


125 mL 摇瓶 30 mL 培养体系中细胞形态:

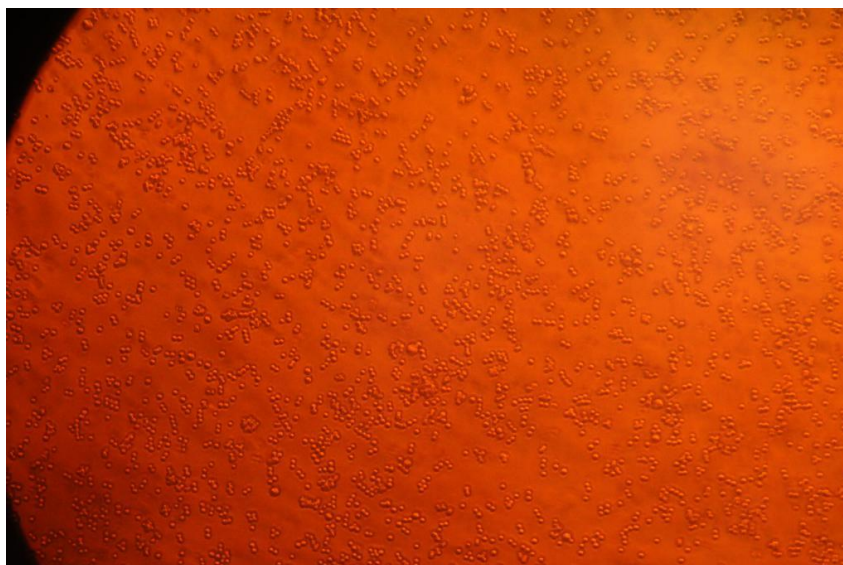


4.2 1 L 摇瓶 125 mL 培养体系

1 L 摇瓶 125 mL 培养体系密度监测		
培养时间	细胞密度 (cells/mL)	流式检测细胞圈门
d0(接种)	3.50E+05	81.00%
d1	6.50E+05	89.25%
d2	1.66E+06	83.23%
d3	3.54E+06	84.72%
d4	6.95E+06	79.19%
d5	7.10E+06	68.54%

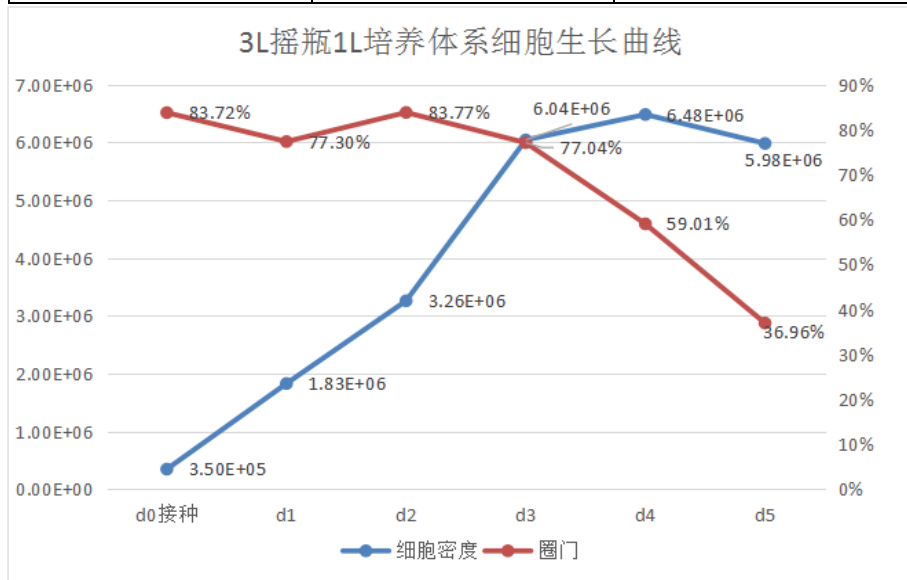


1 L 摇瓶 125 mL 培养体系中细胞形态图:

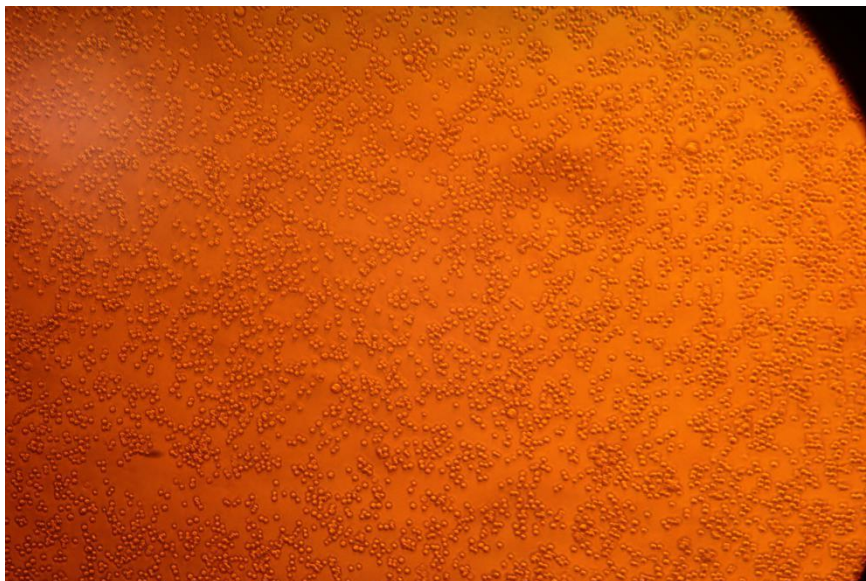


4.3 3 L 摇瓶 1 L 培养体系

3 L 摇瓶中 1 L 培养体系密度监测		
培养时间	细胞密度 (cells/mL)	流式检测细胞圈门
d0(接种)	3.5E+05	83.72%
d3	1.83E+06	88.30%
d2	3.26E+06	83.77%
d3	6.04E+06	77.04%
d4	6.48E+06	59.01%
d5	5.98E+06	36.96%

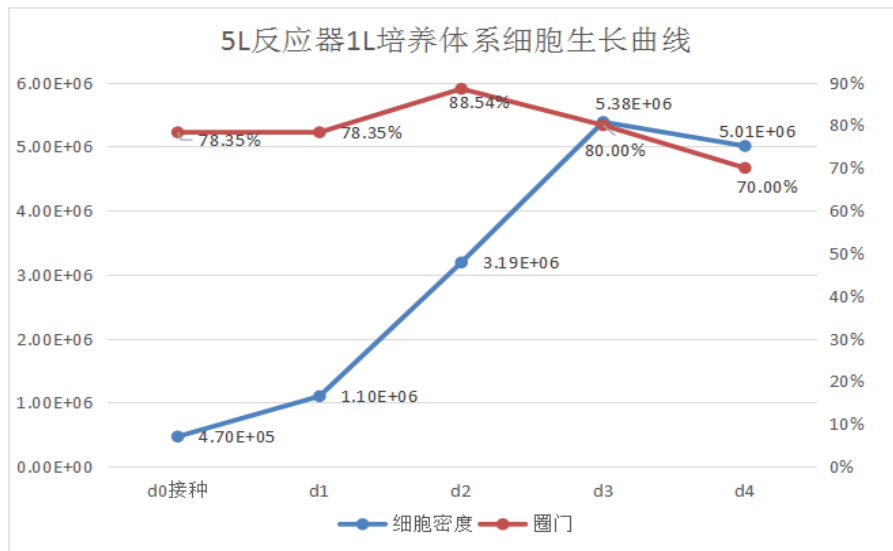


3 L 摇瓶 1 L 培养体系中细胞形态:

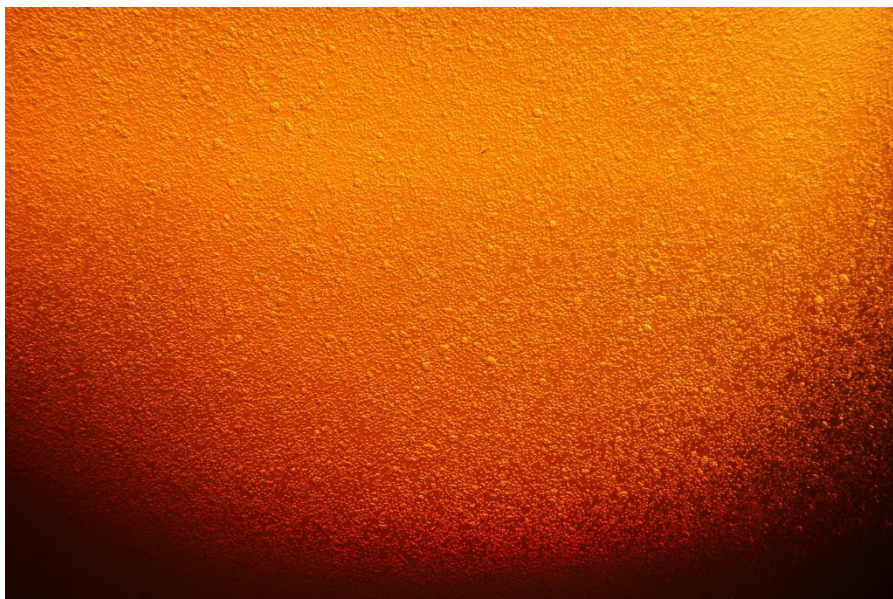


4.4 5L 反应器 1L 培养体系

5L 摇瓶中 1L 培养体系密度监测		
培养时间	细胞密度 (cells/mL)	流式检测细胞圈门
d0(接种)	3.5E+05	83.72%
d1	1.83E+06	88.30%
d2	3.26E+06	83.77%
d3	6.04E+06	77.04%
d4	6.48E+06	59.01%
d5	5.98E+06	36.96%



5L 反应器 1L 培养体系中细胞形态图:



5、慢病毒包装

5.1 125 mL 摇瓶 30 mL 转染体系

5.1.1 换液转染

- (1) 复苏细胞后连续培养 3 代，使细胞状态逐渐恢复稳定；
- (2) 细胞计数（详见 3.2 部分内容），密度在 $2-4 \times 10^6$ cells/mL 时可用于慢病毒包装；
- (3) 125 mL 摇瓶中加入 27 mL 新鲜完全培养基，置于 37 °C 培养箱中预温 15 min；
- (4) 取用于转染的种子细胞 30 mL，离心去除上清，用上述预温好的完全培养基重悬，继续培养、开始计时；
- (5) 细胞换液 2 h 后准备 DNA-PEI 复合物，DNA、PEI 用量见表 5.1；
- (6) 15 mL 离心管中加入 3 mL 新鲜完全培养基作为孵育培养基，加入 30 ug DNA，涡旋 10 s（或吹打 15 下），再加入 90 ug PEI，涡旋 10 s（或吹打 15 下），开始计时，室温静置孵育 15 min；
- (7) 孵育好的 DNA-PEI 复合物 3 mL 加入上述准备好的细胞中，一边滴加一边晃动细胞摇瓶进行混匀；
- (8) 迅速将细胞置于 37 °C、8% CO₂ 摇床中培养，摇床转速 100 rpm（振幅 50 mm）；
- (9) 转染后无需换液、补液，48 h 后可 700 g 离心 10 min 收集含慢病毒的上清液；
- (10) 含慢病毒的上清液置于 - 80 °C 低温环境中冷冻保存。

表 5.1

125 mL 摇瓶 30 mL 转染体系（换液转染）					
新鲜培养基	种子细胞	孵育培养基	DNA	PEI	孵育时间
27 mL	30 mL	3 mL	30 ug	90 ug	15 min

5.1.2 补液转染

- (1) 复苏后连续培养 3 代，让细胞状态恢复；
- (2) 细胞计数（详见 3.2 部分内容），密度在 $3-4 \times 10^6$ cells/mL 左右时可用于慢病毒包装；
- (3) 125 mL 摇瓶中加入 12 mL 新鲜完全培养基，预温 15 min；
- (4) 取用于转染的种子细胞 15 mL 加入预温好的完全培养基中，继续培养、开始计时；
- (5) 细胞补液 2 h 后准备 DNA-PEI 复合物，DNA、PEI 用量见表 5.2；
- (6) 15 mL 离心管中加入 3 mL 新鲜完全培养基作为孵育培养基，加入 30 ug DNA，涡旋 10 s（或吹打 15 下），再加入 90 ug PEI，涡旋 10 s（或吹打 15 下），开始计时，室温静置孵育 15 min；
- (7) 孵育好的 DNA-PEI 复合物 3 mL 加入上述准备好的细胞中，一边滴加一边晃动细胞摇瓶进行混匀；
- (8) 迅速将细胞置于 37 °C、8% CO₂ 摇床中培养，摇床转速 100 rpm（振幅 50 mm）；
- (9) 转染后无需换液、补液，48 h 后可 700 g 离心 10 min 收集含慢病毒的上清液；
- (10) 含慢病毒的上清液置于 - 80 °C 低温环境中进行冷冻保存。

表 5.2

125 mL 摇瓶 30 mL 转染体系（补液转染）					
新鲜培养基	种子细胞	孵育培养基	DNA	PEI	孵育时间
12 mL	15 mL	3 mL	30 ug	90 ug	15 min

5.2 1 L 玻璃摇瓶 220 mL 转染体系

- (1) 复苏后连续培养 3 代，让细胞状态恢复稳定；
- (2) 细胞计数（详见 3.2 部分内容），密度在 $3-4 \times 10^6$ cells/mL 左右时可用于慢病毒包装；
- (3) 1L 玻璃摇瓶中加入 100 mL 新鲜完全培养基，37 °C 箱中预温 30 min；
- (4) 取用于转染的种子细胞 100 mL 加入预温好的完全培养基中，继续培养、开始计时；
- (5) 细胞补液 2 h 后开始准备 DNA-PEI 复合物，DNA、PEI 用量见表 5.3；
- (6) 50 mL 离心管中加入 20 mL 新鲜完全培养基作为孵育培养基，加入 220 ug DNA，涡旋 10 s，再加入 660 ug PEI，涡旋 10 s，开始计时，室温静置孵育 15 min；
- (7) 孵育好的 DNA-PEI 复合物 20 mL 加入上述准备好的细胞中，一边滴加一边晃动细胞摇瓶进行混匀；
- (8) 迅速将细胞置于 37 °C、8% CO₂ 摇床中培养，摇床转速 100 rpm（振幅 50 mm）；
- (9) 转染后无需换液、补液，48 h 后可 700 g 离心 10 min 收集含慢病毒的上清液；
- (10) 含慢病毒的上清液置于 - 80 °C 低温环境中进行冻存。

表 5.3

1 L 摇瓶 220 mL 体系					
新鲜培养基	种子细胞	孵育培养基	DNA	PEI	孵育时间
100 mL	100 mL	20 mL	220 ug	660 ug	15 min

5.3 5 L 反应器 1.1 L 转染体系

- (1) 反应器中以 $4-5 \times 10^5$ cells/mL 密度接种，培养 48 h 左右细胞密度达 $3-4 \times 10^6$ cells/mL 时可用于转染；
- (2) 将反应器内多余的细胞培养液排出，罐内留取 500 mL，再向罐中补加 500 mL 新鲜完全培养基，继续培养、开始计时；
- (3) 细胞补液 2 h 后准备 DNA-PEI 复合物，DNA、PEI 用量见表 5.4；
- (4) 500 mL 接种瓶中加入 100 mL 新鲜完全培养基作为孵育培养基，加入 1100 μ g DNA，涡旋 10 s，再加入 3300 μ g PEI，涡旋 10 s，开始计时，室温静置孵育 15 min；
- (5) 孵育好的 DNA-PEI 复合物 100 mL 加入上述反应器内准备好的细胞中；
- (6) 转染后无需换液、补液，48 h 后可 700 g 离心 10 min 收集含慢病毒的上清液；
- (7) 含慢病毒的上清液置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温环境中进行冷冻保存。

表 5.4

5 L 反应器 1.1 L 转染体系					
新鲜培养基	种子细胞	孵育培养基	DNA	PEI	孵育时间
500 mL	500 mL	100 mL	1100 μ g	3300 μ g	15 min

6、慢病毒滴度检测

6.1 慢病毒滴度检测方法（带荧光标记）

- (1) 50 mL 离心管中加入新鲜的完全培养基 30 mL，37 °C 培养箱中预温 10 min；
- (2) 种子细胞计数，取对数期的细胞用于慢病毒滴度检测；
- (3) 细胞密度稀释为 $2e^5$ cells/mL（例如，若种子细胞密度 $3e^6$ cells/mL，取 2.15 mL 种子细胞加入上述预温好的完全培养基中，此时细胞密度为： $3e^6$ cells/mL * 2.15 mL / 32.155mL = $2e^5$ cells/mL）；
- (4) 细胞混匀后各取 5 mL 加入 6 孔板的 6 个孔中，开始计时；
- (5) 37 °C、8% CO₂ 摇床中培养，摇床转速 100 rpm（振幅 50 mm）；
- (6) 细胞培养 3-5 h 后加入病毒原液，病毒原液添加量见表 6.1，开始计时；
- (7) 病毒原液加入 48 h 后取样计荧光比例，尽量取荧光比例为 10%-30%的孔计算病毒滴度（荧光比例低于 10%可能导致检测结果误差更大，荧光比例高出 30%可能导致计算的滴度结果低于实际滴度），病毒滴度计数公式如下：

$$\text{病毒滴度 (TU/uL)} = \text{发荧光的细胞数} / \text{病毒原液量}$$

例如，孔②中荧光率为 30%，则病毒滴度为：

$$\begin{aligned} \text{病毒滴度 (TU/uL)} &= (2e^5 \text{ cells/mL} * 5\text{mL} * \text{荧光比例}) / \text{病毒原液量} \\ &= (2e^5 \text{ cells/mL} * 5\text{mL} * 30\%) / 10 \text{ uL} \\ &= 3e^7 \text{ TU/mL} \end{aligned}$$

表 6.1 直接感染法病毒原液添加量

① 5 uL	② 10 uL	③ 25 uL
④ 50 uL	⑤ 100 uL	⑥ 0 uL（阴性对照）

6.2 慢病毒滴度测试结果

编号	慢病毒包装体系	转染试剂	转染方式	滴度
6.2.1.1	125 mL 摇瓶 30 mL 体系	脂质体	补液（三质粒）	1.72e ⁷ TU/mL
6.2.1.2	125 mL 摇瓶 30 mL 体系	PEI	换液（三质粒）	1.1e ⁸ TU/mL
6.2.1.3	125 mL 摇瓶 30 mL 体系	PEI	补液（三质粒）	3.35 e ⁷ TU/mL
6.2.1.4	125 mL 摇瓶 30 mL 体系	PEI	补液（四质粒）	1.51e ⁷ TU/m
6.2.2	1 L 摇瓶 220 mL 体系	PEI	补液（三质粒）	1.12e ⁷ TU/mL
6.2.3	5 L 反应器 1 L 体系	PEI	补液（三质粒）	4.44e ⁷ TU/mL

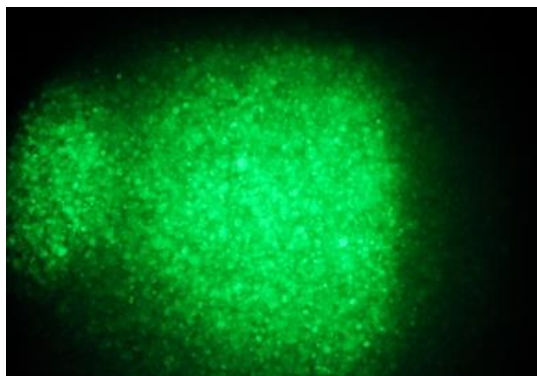
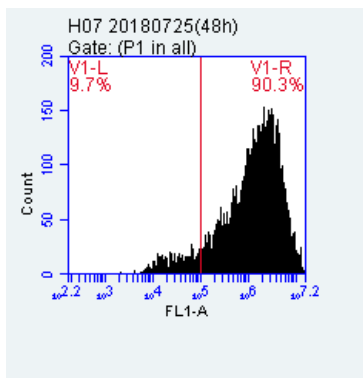
备注：

- (1) 验证了两种转染试剂（阳离子脂质体和 PEI）的可行性，后期大规模转染使用性价比更高的 PEI 作为转染试剂。
- (2) 验证了两种质粒系统（三质粒系统和四质粒系统）的可行性，后期大规模转染使用性价比更高的三质粒系统。
- (3) 验证了两种转染工艺（转染前全量换液和等体积补液）的可行性，小规模转染建议全量换液，大规模转染不方便换液可采取等体积补液的转染工艺。

6.2.1 125 mL 摇瓶 30 mL 体系

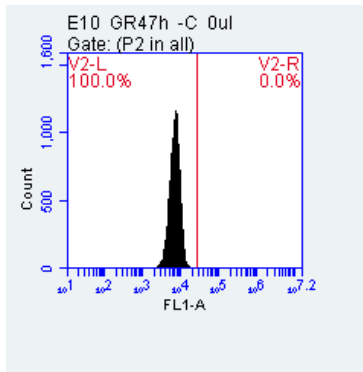
6.2.1.1 阳离子脂质体

转染条件	阳离子脂质体、补液、三质粒		
分组	圈门	细胞密度	荧光率
转染 48 h	46.35%	4.21E+06	90.3%
取以上病毒原液 50 uL 感染 6 孔板中 5 mL 悬浮 293T 细胞 (2e ⁵ cells/mL)			
感染 48 h	66.46%	1.33E+06	43.0%
计算滴度	1.72 e ⁷ TU/m		



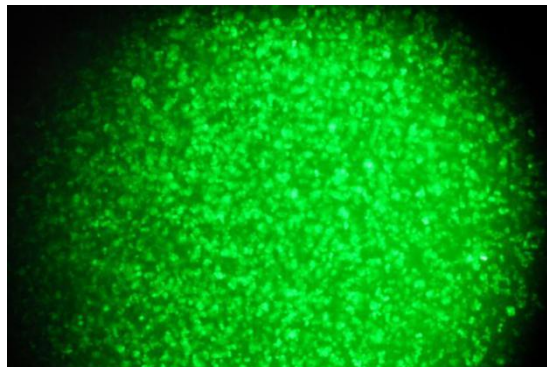
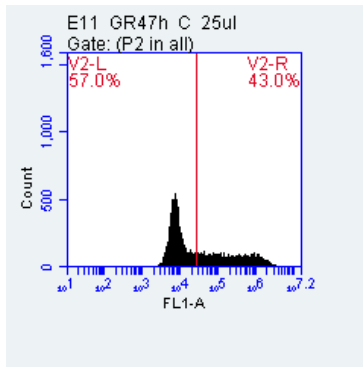
转染 48h 流式计荧光比例

转染 48h 镜下荧光图



感染 48h 流式计荧光比例 (阴性对照)

感染 48h 镜下荧光图 (阴性对照)

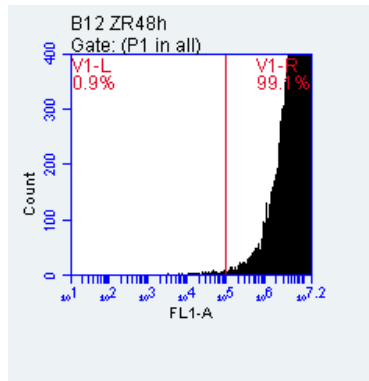


感染 48h 流式计荧光比例

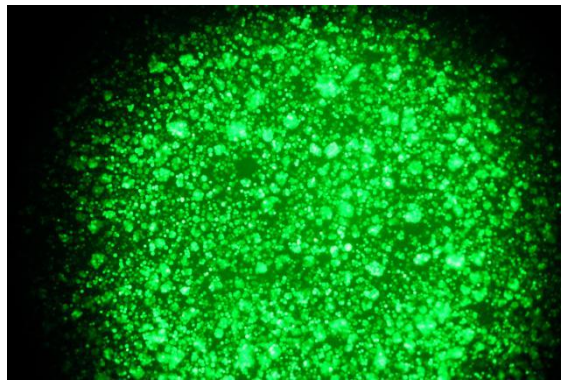
感染 48h 镜下荧光图

6.2.1.2 换液转染

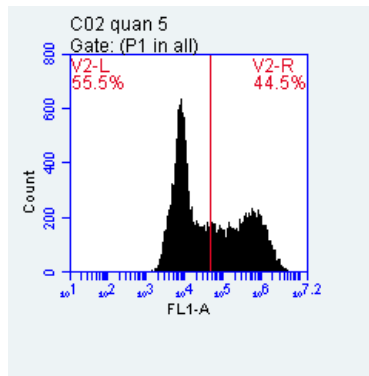
转染条件	PEI、换液、三质粒		
分组	圈门	细胞密度	荧光率
转染 48 h	32.81%	3.52E+06	99.28%
取以上病毒原液 50 uL 感染 6 孔板中 5 mL 悬浮 293T 细胞 (2.5e ⁵ cells/mL)			
感染 48 h	73.03%	1.72E+06	44.45%
计算滴度	1.18 e⁸ TU/m		



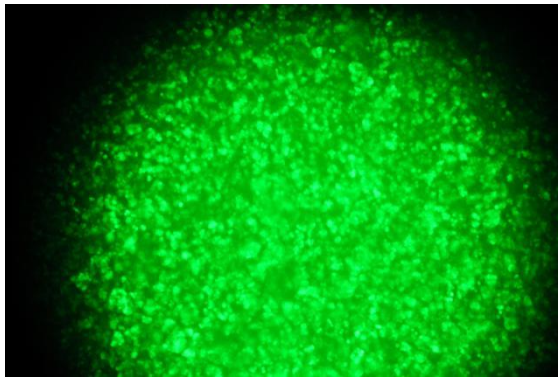
转染 48h 流式计荧光比例



转染 48h 镜下荧光图



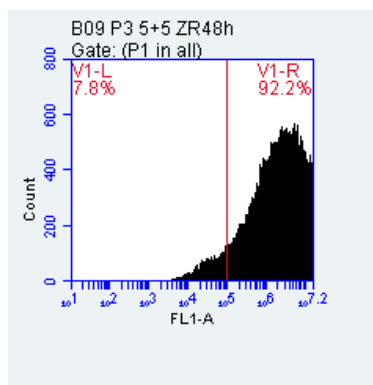
感染 48h 流式计荧光比例



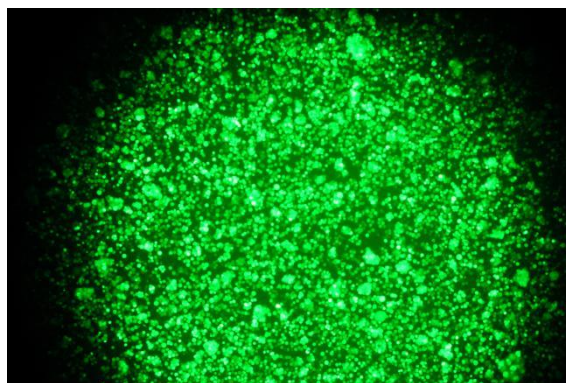
感染 48h 镜下荧光图

6.2.1.3 补液转染

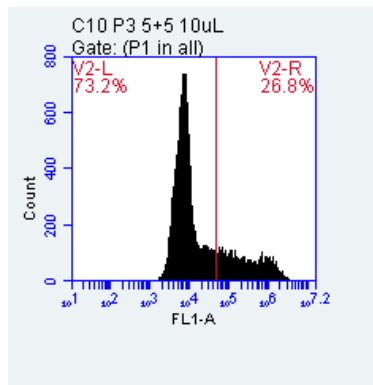
转染条件	PEI、补液、三质粒		
分组	圈门	细胞密度	荧光率
转染 48 h	49.01%	4.89E+06	92.2%
取以上病毒原液 10 uL 感染 6 孔板中 5 mL 悬浮 293T 细胞 (2e ⁵ cells/mL)			
感染 48 h	75.95%	1.36E+06	26.80%
计算滴度	3.35e ⁷ TU/mL		



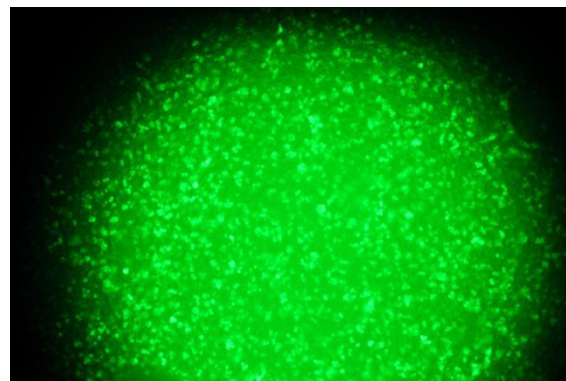
转染 48h 流式计荧光比例



转染 48h 镜下荧光图



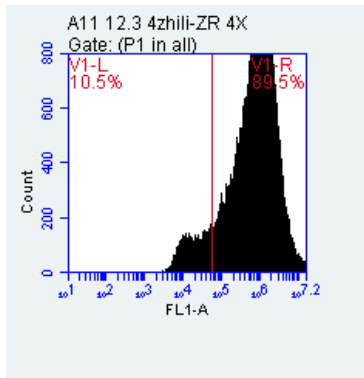
感染 48h 流式计荧光比例



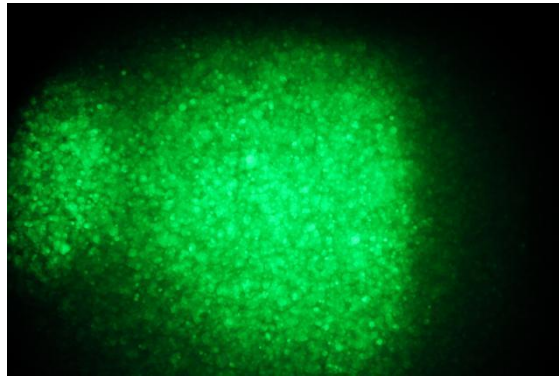
感染 48h 镜下荧光图

6.2.1.4 四质粒

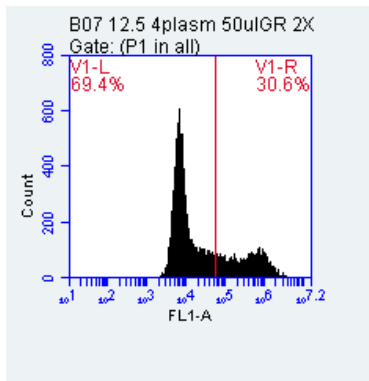
转染条件	PEI、补液、四质粒		
分组	圈门	细胞密度	荧光率
转染 48 h	60.16%	4.5E+06	89.55%
取以上病毒原液 20 uL 感染 6 孔板中 5 mL 悬浮 293T 细胞 (2e ⁵ cells/mL)			
感染 48 h	79.42%	1.4E+06	30.58%
计算滴度	1.51e ⁷ TU/mL		



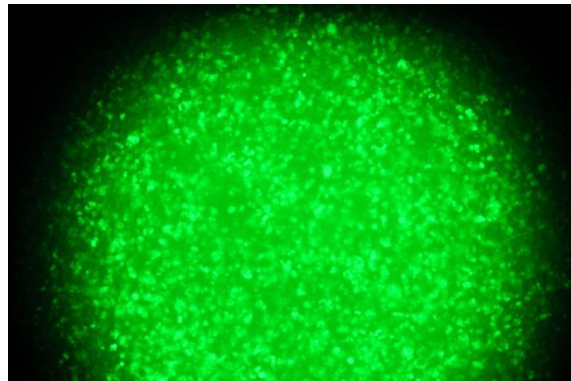
转染 48h 流式计荧光比例



转染 48h 镜下荧光图



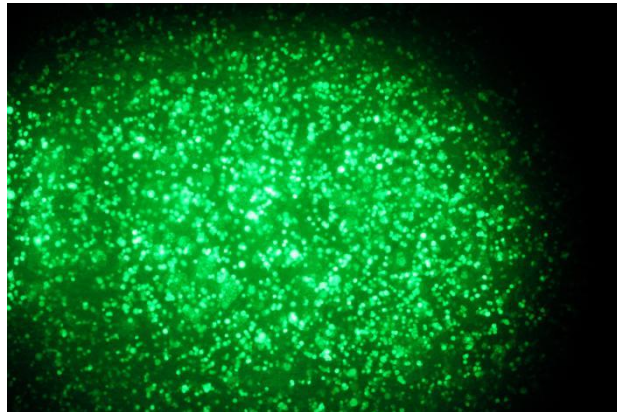
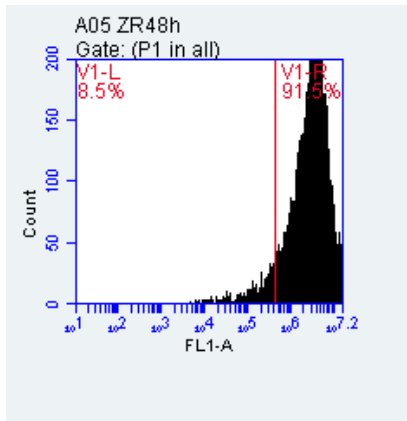
感染 48h 流式计荧光比例



感染 48h 镜下荧光图

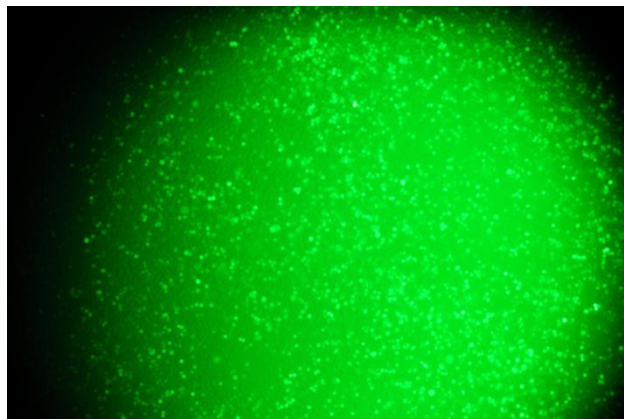
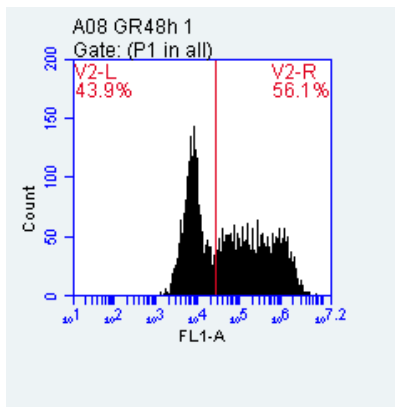
6.2.2 1 L 摇瓶 220 mL 体系

转染条件	PEI、补液、三质粒		
分组	圈门	细胞密度	荧光率
感染 48 h	55.21%	6.16E+06	91.86%
取以上病毒原液 50 uL 感染 6 孔板中 5 mL 悬浮 293T 细胞 (2e ⁵ cells/mL)			
感染 48 h	56%	4.60E+05	56%
计算滴度	1.12e ⁷ TU/mL		



转染 48h 流式计荧光比例

转染 48h 镜下荧光图

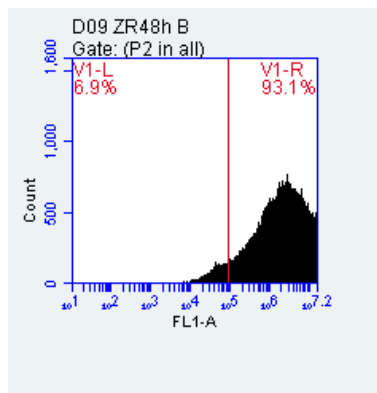


感染 48h 流式计荧光比例

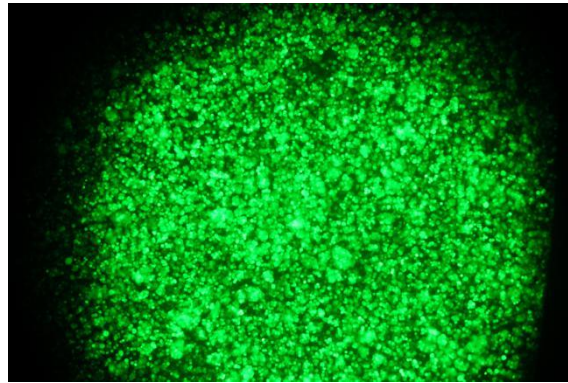
感染 48h 镜下荧光图

6.2.3 5 L 反应器 1 L 体系

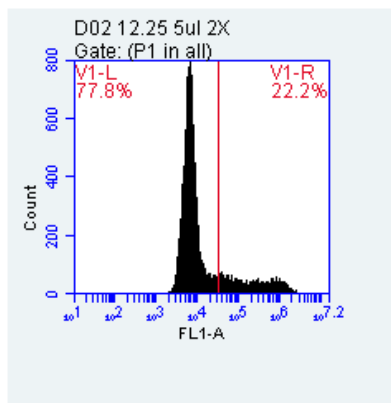
转染条件	PEI、补液、三质粒		
分组	圈门	细胞密度	荧光率
感染 48 h	39.75%	3.23E+06	93.1%
取以上病毒原液 5 uL 感染 6 孔板中 5 mL 悬浮 293T 细胞 (2e ⁵ cells/mL)			
感染 48 h	64.60%	1.23E+06	22.2%
计算滴度	4.44e ⁷ TU/mL		



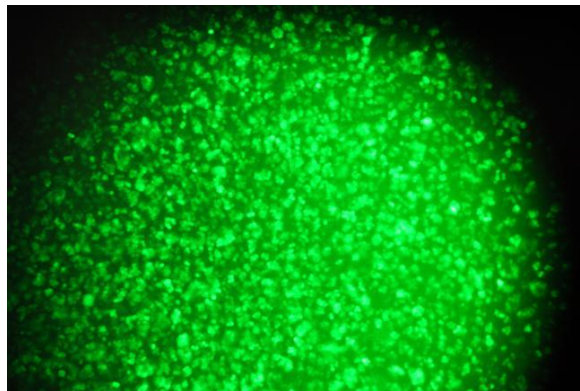
转染 48h 流式计荧光比例



转染 48h 流镜下荧光图



感染 48h 流式计荧光比例



感染 48h 镜下荧光图

7、常见问题解析

7.1 其他培养基培养的细胞转入本培养基后细胞生长缓慢，后期逐步衰亡。

友康 HEK293 全悬浮无血清培养基也可用于对其他 HEK293 细胞株的培养，若出现细胞生长缓慢、逐步衰亡的情况，需对细胞进行驯化，使细胞株适应新的培养环境，一般每 48 h 以 $7e^5$ cells/mL 的高密度进行传代，连续培养 20 代后细胞状态可恢复正常。

7.2 细胞团影响计数。

因为 HEK293 细胞成团生长的特性，细胞培养过程中不可避免的会出现细胞团，细胞传代及转染包毒等需要精确计数的过程中，需消除细胞团对计数的影响，友康 HEK293 细胞分散液（货号 NC1006）可将细胞团完全分散为单个细胞，大大提高计数精确数。

7.3 细胞复苏后生长缓慢，后期逐步衰亡。

首先要排除操作失误、冻存的细胞状态差等导致细胞无法正常生长的原因，其次复苏的细胞较脆弱，可将接种密度提高至 $7e^5$ cells/mL，复苏后切忌频繁计数、观察，复苏 72h 后（第三天）进行传代时计数即可。

7.4 传代后细胞状态差、活率低。

细胞传代时种子细胞应处于对数期，建议连续监测密度获取细胞生长曲线，根据生长曲线判断细胞的对数期。友康 HEK293 全悬浮无血清培养基培养的友康 HEK293T 全悬浮高产细胞株若密度大于 $4.5e^6$ cells/mL，继续传代的细胞状态较差，建议重新复苏种子细胞。

7.5 反应器中细胞接种后短时间内大量死亡。

友康 HEK293 全悬浮无血清培养基培养的友康 HEK293T 全悬浮高产细胞株在 5 L 搅拌式反应器中可正常生长，最大密度达 $5.3e^6$ cells/mL，若出现细胞大量死亡的情况，应及时调整培养参数，如温度、PH、溶氧、搅拌转速等。

7.6 包装慢病毒时转染效率低。

友康 HEK293 全悬浮无血清培养基针对慢病毒包装做过专门的组分筛选，合适的条件下最高慢病毒滴度可达 $1.1e^8$ TU/mL，若使用过程中出现转染效率低的情况，可以从选用合适的细胞株、提高细胞状态、使用无内毒素质粒、优化质粒与转染试剂比例、优化转

染时的细胞密度等来提高转染效率。

7.7 包装慢病毒时转染效率高，但实际慢病毒滴度低。

因为转染时效率较高，所以这种问题一般可以排除转染工艺的影响。一般从两个方面进行优化：1、选择正确的培养基缓冲体系，友康 HEK293 全悬浮无血清培养基要求在 8% CO₂ 条件下进行培养，过高或过低的 CO₂ 浓度会致使此培养基缓冲体系偏离预定值，进而可能会影响慢病毒的稳定性。2、转染的包装质粒与表达质粒配比的优化。