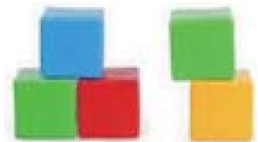


HEK293 全悬浮无血清培养基  
使用说明书



## HEK293 全悬浮无血清培养基使用说明书

### 【产品名称】

HEK293 全悬浮无血清培养基

### 【用途与描述】

该培养基用于悬浮 HEK293 细胞（如 293T、293S、293E、293F）的连续培养以及外源基因的瞬时表达，尤其在包装慢病毒过程中表现较佳。本产品不仅可以支持 HEK293 细胞的高密度扩增及连续稳定传代培养，在其中进行转染的 HEK293 细胞可以表现出出色的转染效率，高效表达外源蛋白，包装出高滴度的慢病毒。

本品中无动物血清，含有少量蛋白组分，化学成分明确。

本品不含谷氨酰胺，建议培养过程中根据需求添加（添加浓度为 2 mM）。

### 【产品主要成分及设计原理】

在诸如 RPMI-1640、DMEM/F12 等培养基的基础之上，添加重组转铁蛋白、重组人白蛋白、重组胰岛素、氨基酸、维生素、微量元素等物质，可直接培养悬浮驯化的 HEK293 细胞，培养基中添加了防剪切力物质，最大程度地减少细胞在悬浮培养过程中受到的损伤，以维持更高的活力。

### 【产品参数及性能指标】

（特别说明：由于细胞来源及细胞培养代数不同，培养基表现出的性能可能会有所差异。我们使用现有细胞株进行多次实验验证，给出以下性能指标。）

支持的细胞密度：4-7×10<sup>6</sup> cells/mL

转染效率：50-90%

包装慢病毒滴度：>1.5×10<sup>7</sup> TU/mL

外观：淡黄色澄清液体

规格：1000 mL/瓶

渗透压：260-310 mOsm/kg

pH：25℃时，6.9-7.4

保存条件：2-8℃，避光

保质期：12 个月

### 【使用说明】

注：实验操作之前将待用的培养基提前从冰箱中取出，置于无菌操作台或培养箱中预温。可将培养基分装成小份进行平衡，原瓶在 2-8℃存放。

#### 直接替换（以 125 mL 摇瓶培养体系为例）

通常情况下，在传统血清培养基中培养的 HEK293 细胞或者在其他无血清培养基中培养的 HEK293 细胞可以直接传代至友康 HEK293 全悬浮无血清培养基中进行培养（以下称为“友康 293 培养基”）。具体操作如下：

1. 为控制细胞接种密度在 0.5×10<sup>6</sup> cells/mL 左右，先对悬浮细胞计数，根据计数结果收取所需体积的细胞悬液至 15 mL 或 50 mL 离心管中。
2. 转速 170 g 离心 3 min，弃去细胞上清液。同时准备一个新细胞摇瓶，并向其中加入 25 mL 友康 293 培养基。

3. 向离心管中加入 5 mL 友康 293 培养基重悬细胞，并将细胞悬液加入新摇瓶中。
4. 细胞培养环境为 8% CO<sub>2</sub>，37°C，转速为 100 r/min。通过细胞密度和活率指标对细胞生长状态进行监测。（直接替换过程中可能会出现接种后第 1 天计数细胞密度没有增长或下降的现象，此现象正常，2-3 天后即可恢复正常生长）
5. 待细胞生长至对数生长期后，再次传代。进入正常培养程序。

#### 逐步替换（以 125 mL 摇瓶培养体系为例）

极少数情况下，直接替换为友康 293 培养基后细胞不能正常生长，具体表现为传代后细胞状态变差，死亡率逐渐变高，形态不再呈现规则的圆形。这种情况下，建议改用逐步替换的方法。具体操作如下：

1. 待细胞长至对数生长期，按照接种密度  $1 \times 10^6$  cells/mL 进行传代。离心去除细胞培养上清后，按照 25%友康 293 培养基+75%原培养基混合后对细胞进行重悬和培养。
2. 重复上一步操作，让细胞在 25%友康 293 培养基中再适应一代。
3. 待细胞长至对数生长期（大约 2 天后），再次离心传代，采用 50%友康 293 培养基+50%原培养基培养细胞。
4. 待细胞长至对数生长期（大约 2 天后），再次离心传代，采用 75%友康 293 培养基+25%原培养基培养细胞。
5. 待细胞长至对数生长期（大约 2 天后），再次离心传代，采用 90%友康 293 培养基+10%原培养基培养细胞。
6. 待细胞长至对数生长期（大约 2 天后），再次离心传代，采用 100%友康 293 培养基培养细胞，进入正常培养程序。

#### 细胞复苏（以 1 mL 冻存体积、 $1 \times 10^7$ cells/mL 冻存密度为例）

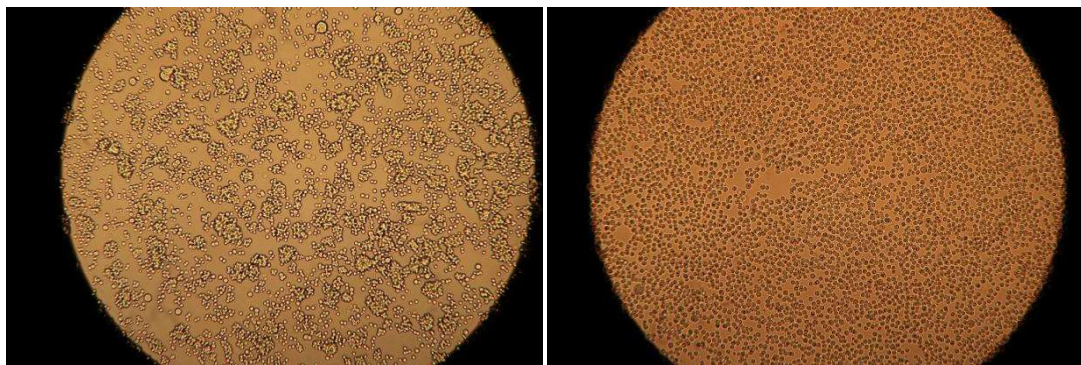
1. 复苏细胞前 15 min 取友康 293 培养基 20 mL 于 125 mL 摇瓶中，放入 37 °C 培养箱 预温备用；
2. 取 10 mL 提前准备好室温平衡的 PBS 于 15 mL 离心管中，备用。
3. 从液氮中取出冻存的细胞，迅速放入 37 °C 水浴中，镊子夹住冻存管在水浴锅中不停晃动，直至细胞即将全部融化（1 min 内），快速将其转移至无菌操作台。
4. 溶解的细胞悬液加入室温平衡好的 PBS 中。
5. 170 g 离心 3 min，除尽上清，用上述预温好的友康 293 培养基重悬细胞。
6. 37 °C、8%CO<sub>2</sub> 摇床中培养，摇床转速 100 rpm。

## 细胞计数

由于悬浮 HEK293 细胞特有的结团生长现象，采用正常的计数程序往往得不到准确的计数结果，因此我们采用加入分散液的形式对细胞计数过程进行了优化。具体操作过程如下：

1. 将摇瓶中细胞培养液摇匀，取出 100  $\mu\text{L}$  于 1.5 mL EP 管中。
2. 加入等体积 100  $\mu\text{L}$  友康 HEK293 细胞分散液（货号 NC1006），37  $^{\circ}\text{C}$  摇床培养箱中放置 5-10 min，若细胞结团严重，细胞团紧密，可再适当延长时间。
3. 混合液吹打均匀，取适量体积使用台盼蓝染色计数或使用流式细胞仪计数。

*注：细胞密度较大时，加入 HEK293 细胞分散液后会出现白色絮状物，这是正常现象，用移液器吹打数次使其分散即可，不影响计数结果。*



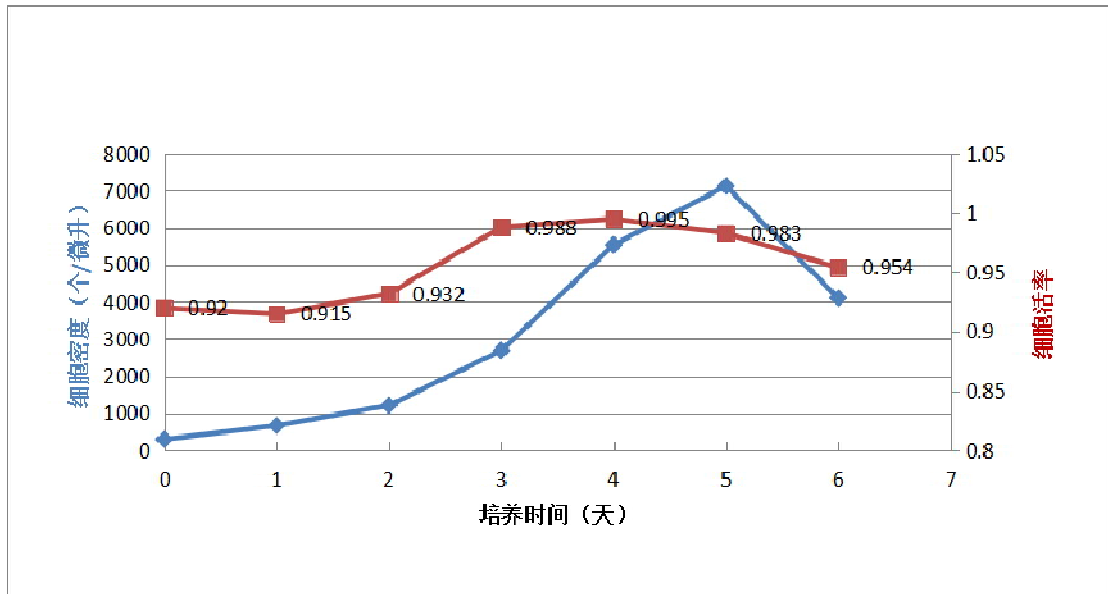
分散液处理前

分散液处理后

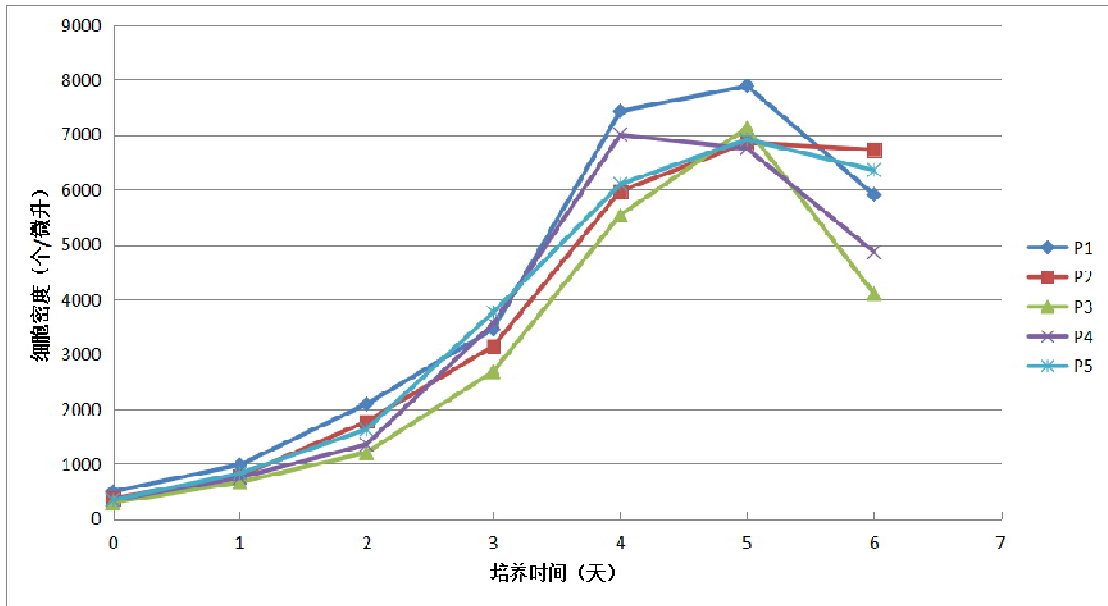
## 细胞生长及连续传代

以 125 mL 摇瓶 30 mL 培养体系为例：

1. 连续监测细胞密度，获取细胞生长曲线。
2. 取样计数确认细胞密度，细胞处于对数期时进行传代，密度过高会影响细胞状态。
3. 取所需友康 293 培养基于 125 mL 摇瓶，培养箱中预温至室温。
4. 取需传代的细胞培养液适量（或离心去除上清）加入预温好的友康 293 培养基中，密度调整至  $0.3-0.5 \times 10^6$  cells/mL。
5. 以  $0.3 \times 10^6$  cells/mL 密度接种，接种后第 3 天细胞密度可达  $2-3 \times 10^6$  cells/mL，若细胞状态不佳、密度仍未达  $2 \times 10^6$  cells/mL，可离心全量换液、继续培养。
6. 若需扩大培养，可直接逐级放大至 3 L 摇瓶 1 L 培养体系。



摇瓶中友康 293 培养基培养 293T 细胞的生长及细胞活率



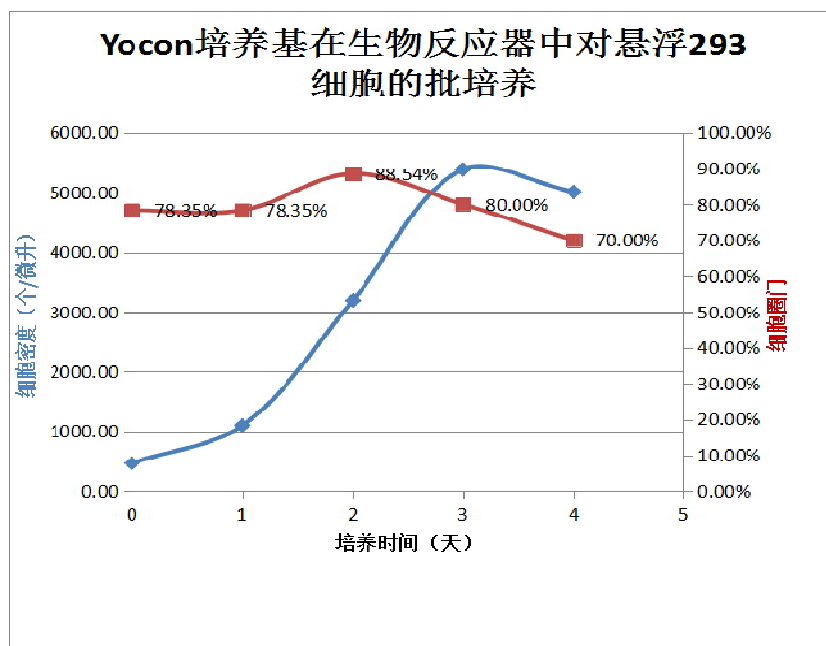
摇瓶中友康 293 培养基连续培养 293T 细胞的生长稳定性检测



**摇瓶中友康 293 培养基培养的 293T 细胞均匀分散**

以 5 L 搅拌式反应器 1 L 培养体系为例：

- 1、根据反应器操作 SOP 备好反应器，接种前一天进行无菌检测。
- 2、接种前将 1 L 新鲜培养基加入反应器中，设置相关参数（温度 37°C，PH=7.2，溶氧 40-50%，搅拌转速 80-110 rpm），待各参数稳定后准备接种。
- 3、种子细胞计数，细胞处于对数期时可用于接种。
- 4、若种子细胞密度为  $3 \times 10^6$  cells/mL，接种密度为  $0.5 \times 10^6$  cells/mL，则需种子细胞 200 mL。
- 5、接种后每天监测细胞密度，获取细胞生长曲线。



### 反应器中 YOCON 培养基培养 293 细胞的生长及细胞活率



反应器中友康 293 培养基培养的 293T 细胞状态良好

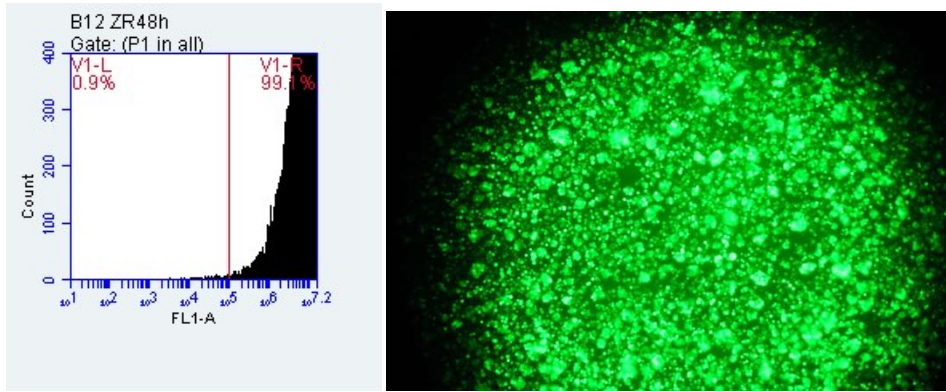
#### 慢病毒包装

可使用阳离子脂质体、PEI 等转染试剂进行慢病毒包装。

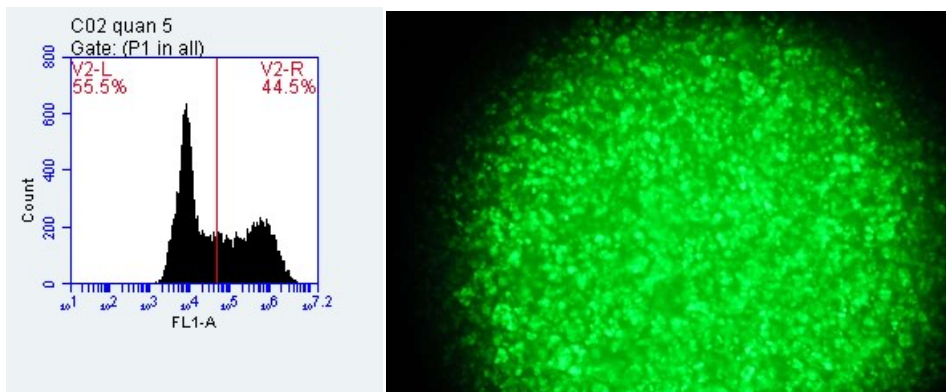
可在摇瓶、搅拌式反应器等培养方式下进行慢病毒包装。

以 PEI 转染试剂、三质粒包装系统、125 mL 摇瓶 30 mL 转染体系为例：

- 1、细胞计数，密度在  $2-4 \times 10^6$  cells/mL 左右时可用于慢病毒包装。
- 2、125 mL 摇瓶中加入 27 mL 新鲜友康 293 培养基，预温 15 min。
- 3、取用于转染的种子细胞 30 mL，离心去除上清，用上述预温好的友康 293 培养基重悬，继续培养、开始计时。
- 4、细胞换液 2 h 后准备 DNA-PEI 复合物，15 mL 离心管中加入 3 mL 新鲜友康 293 培养基作为孵育培养基，加入 30 ug DNA，简单涡旋 10 s（或吹打 15 下），再加入 90 ug PEI，简单涡旋 10 s（或吹打 15 下），开始计时，室温静置孵育 15 min。
- 5、孵育好的 DNA-PEI 复合物 3mL 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。
- 6、迅速将细胞置于 37 °C、8%CO<sub>2</sub> 摇床中培养，摇床转速 100 rpm（振幅 50 mm）。
- 7、无需换液、补液，转染后 48 h 可 700 g 离心 10 min 收集含慢病毒的上清液。
- 8、含慢病毒的上清液置于 -80 °C 低温环境中进行冻存。



125mL 摇瓶 30mL 转染体系：转染后 24h 荧光率 35.6%，48h 荧光率 99.1%。

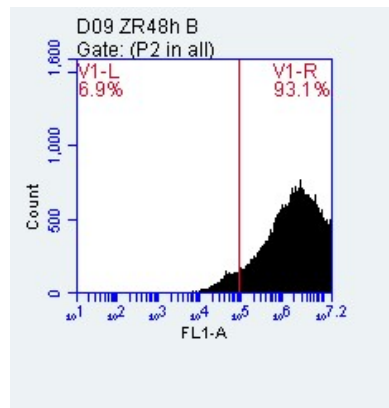
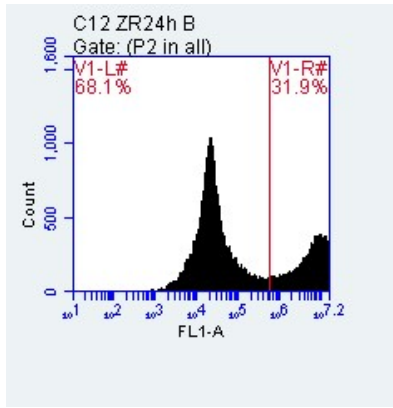


125mL 摇瓶 30mL 转染体系：5ul 未浓缩病毒原液感染 5mL 悬浮 293T ( $2.5 \times 10^5$  cells/mL)

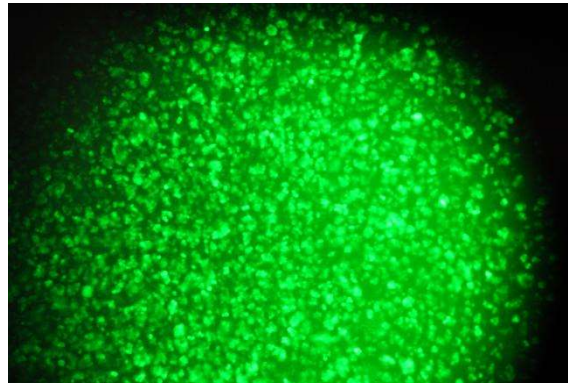
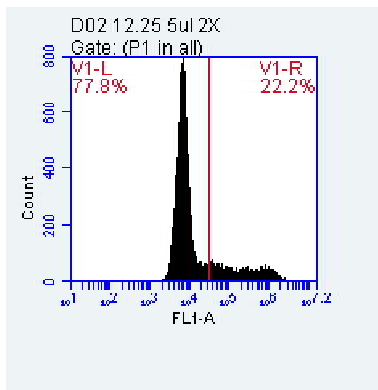
以 PEI 转染试剂、三质粒包装系统、5 L 搅拌反应器 1 L 转染体系为例：

- 1、反应器中以  $4-5 \times 10^6$  cells/mL 密度接种，培养 48 h 左右细胞密度大约达  $3-4 \times 10^6$  cells/mL 时可用于转染。
- 2、将反应器内多余的细胞培养液排出，仅留 500 mL，补加 500 mL 新鲜友康 293 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，500 mL 接种瓶中加入 100 mL 新鲜友康 293 培养基作为孵育培养基，加入 1100  $\mu$ g DNA，简单涡旋 10 s，再加入 3300  $\mu$ g PEI，简单涡旋 10 s，开始计时，室温静置孵育 15 min。
- 4、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。
- 5、无需换液、补液，转染后 48 h 可 700 g 离心 10 min 收集含慢病毒的上清液。
- 6、含慢病毒的上清液置于  $-80^\circ\text{C}$  低温环境中进行冻存。

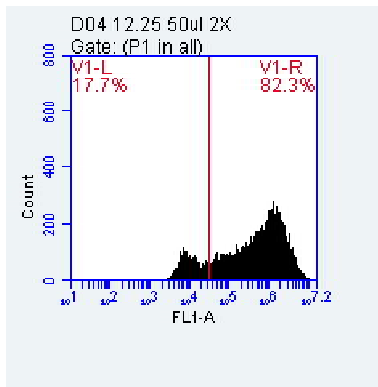




5L 反应器 1L 转染体系：转染后 24h 荧光率 31.9%，48h 荧光率 93.1%。



5L 反应器 1L 转染体系：5ul 未浓缩病毒原液感染 5mL 悬浮 293T ( $2e^5$  cells/mL)



5L 反应器 1L 转染体系：50ul 未浓缩病毒原液感染 5mL 悬浮 293T ( $2e^5$  cells/mL)

## 细胞冻存

1. 取样计数确认细胞密度，宜冻存对数期、细胞活率大于 90% 的细胞。
2. 细胞培养液 170 g 室温离心 3 min，除尽上清。
3. 友康无血清冻存液（货号 NC1001.1）重悬细胞，根据需求调整冻存密度至  $1 \times 10^7$  cells/mL，冰袋上快速分装。
4. 分装好的细胞立即放入  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱中，24 h 后移入液氮长期保存。

## 【注意事项】

- 1、本品中含有丰富的营养物质，低温下可能有少量析出，不影响使用。
- 2、不同细胞株在本培养基中的生长趋势有一定的差异，建议连续监测细胞密度获取细胞生长曲线，方便后期选用对数期细胞。
- 3、使用本培养基包装慢病毒时，转染效率可达 50–90%，但实际慢病毒收获量受细胞代数、细胞状态的影响，应选取代数靠前、对数期的细胞用于慢病毒包装。
- 4、使用本培养基包装慢病毒时，摇床中  $\text{CO}_2$  含量须调至 8%。
- 5、若种子细胞密度大于  $4.5 \times 10^6$  cells/mL，继续传代的细胞状态较差，建议重新复苏细胞。
- 6、如何提高慢病毒滴度：
  - 1) 选用传代次数不超过 20 代的细胞；
  - 2) 连续传 5 代，均能达到相近的最大密度，确认细胞在本培养基中可连续、稳定传代；
  - 3) 根据生长曲线选取对数期细胞；
  - 4) 镜下观察，细胞均匀分散，无 20 个细胞以上的细胞团，细胞圆润饱满，折光性强；
  - 5) 复苏后连续传 3 代，细胞状态恢复后才可用于慢病毒包装，保持细胞活率大于 90%。



生产企业：

友康生物科技（北京）股份有限公司

地址：北京市海淀区丰贤中路7号A座三层、B座一层

电话：010-5871165

网址：[www.Yocon.com.cn](http://www.Yocon.com.cn)

ISO9001、ISO13485质量体系认证企业

国家高新技术企业

文件版本号：2021-V-1.0



友康生物微信公众号