

HEK293 化学成分确定培养基, 无血清, 含 L-GlutamineMax

货号: RPM0108

规格: 1000 mL

◆ 产品信息

ABclonal HEK293 瞬转表达基础培养基 (Basal Medium) 是完全化学成分限定 (Chemically Defined), 不含血清、水解物及任何动物来源的成分, 适合于 293 细胞高密度悬浮培养, 可实现重组蛋白和抗体的高水平表达: 培养 7 天表达量在 500mg/L 左右, 部分可达 2g/L 以上。本产品具有高转染效率, 高表达量等优势, 适用于多种 293 细胞, 使用方便。

◆ 运输保存条件

冰袋运输, 2°C-8°C 避光保存, 保质期 1 年。

◆ 推荐工艺指南

一、细胞驯化

1、直接驯化法:

- ① 对于可以直接驯化的细胞, 可以从无血清培养基直接接种到 ABclonal HEK293 化学成分确定培养基 (RPM0108) 中, 接种密度推荐 $0.4 \times 10^6 \sim 0.6 \times 10^6$ cells/mL。
- ② 连续传代细胞, 直至细胞活率稳定 $\geq 95\%$, 倍增速率正常 22-24h。
- ③ 传代 2-3 代后, 细胞密度在接种后的 3~4 天内, 达到 3×10^6 cells/mL、细胞活率 $\geq 95\%$, 此时可以认为细胞已经驯化成功。

2、梯度驯化法:

- ① 如果直接驯化效果不佳, 请尝试按照以下梯度驯化表格进行操作。
- ② 选择低代次的细胞, 并确保细胞处于对数期。
- ③ 使用原始培养基培养细胞 (最好是新复苏、稳定生长的细胞, 一般 2-4 代左右), 并继续使用原始培养

基传代 2~3 代, 以实现稳定的细胞生长。

④ 在完全使用 RPM0108 培养基接种 3~4 天之后, 活细胞密度 (VCD) 应该稳定达到 3×10^6 cells/ml, 细胞活率 (Viability) $\geq 95\%$ 。此时, 细胞已经驯化到 RPM0108 培养基中。

⑤ 驯化成功后, 及时冻存细胞以备后用。

驯化计划如下表:

RPM0108%: 原始培养基%	接种细胞密度 ($\times 10^6$ cells/mL)	细胞生长状态评估	进行下一步前的合格标准
0: 100	As usual	活细胞密度&活率	活细胞密度 $\geq 3 \times 10^6$ /mL 活率连续 2 代 $\geq 95\%$
50: 50	0.6	活细胞密度&活率	活细胞密度 $\geq 2 \times 10^6$ /mL 活率连续 2 代 $\geq 90\%$
100: 0	0.4	活细胞密度&活率	活细胞密度 $\geq 3 \times 10^6$ /mL 活率连续 2 代 $\geq 95\%$
.....后续转染			

若驯化结束后, 进行转染和表达量的对比, 建议使用相同的表达代次的不同培养基培养细胞做平行对照。同时使用相同批次的质粒和转染工艺。

二、细胞扩培或适应性传代

- 1、将基础培养基 (RPM0108) 放入 $36.5 \sim 37.0^\circ\text{C}$ 条件下预热 20 min;
- 2、检测活细胞密度, 按接种密度为 0.4×10^6 cells/mL 的最终传代体积, 计算所需种子液量;
- 3、无菌转移所需量的种子液, 添加至含所需体积的已预热的基础培养基的摇瓶中;
- 4、将摇瓶放入温度 $36.5 \sim 37.0^\circ\text{C}$, 120 rpm (振幅 50 mm), (摇瓶底面积增大, 需减小摇床转速), $5\% \sim 8\%$ CO_2 的细胞培养摇床中进行培养;
- 5、每 3 天用新鲜的培养基按上述步骤进行传代培养;
- 6、若细胞从其他培养基转移至该培养基 (RPM0108) 中, 细胞倍增时间与原培养基一致, 方可进入下一步

骤。

三、细胞转染

转染前一天准备 (Day -1) :

将细胞密度调整至 2.0×10^6 cells/mL (此步可以提高工艺稳定性和表达量), 转染当天细胞密度可达到 4×10^6 左右。

细胞转染 (Day0) : 以 20mL 转染体系为例

1、取细胞培养液并检测细胞密度, 当细胞密度超过 4.5×10^6 cells/mL 时, 用新鲜培养基将细胞稀释至 4.0×10^6 cells/mL (密度范围 $3.5-4.5 \times 10^6$ cells/mL) ;

2、将 30 μ g 质粒 (即终总用量为 1.5 μ g/mL) 用 2 mL 的基础培养基 (RPM0108) (培养体积的 10 %) 稀释并混匀, 然后加入 105 μ L 293PEI (即终用量为 5.25 μ L/mL, DNA : 293PEI=1 : 3.5), 吹打混合均匀, 然后静置 5~15 min;

质粒用量	推荐转染试剂用量	DNA:PEI
1 μ g/mL	4.0 μ L/mL	1 : 4
1.2 μ g/mL	4.2 μ L/mL	1 : 3.5
1.5 μ g/mL	5.25 μ L/mL	1 : 3.5

3、缓慢滴加上述混合物, 边滴加混合, 使混合物能均匀扩展;

4、将转染结束的摇瓶放置于 $36.5^{\circ}\text{C} \sim 37.0^{\circ}\text{C}$, 120 rpm (50 mm 振幅) (若 25mm 振幅可提高至 130rpm) ,

~5% CO_2 的细胞培养摇床中进行培养;

推荐工艺: 最简化

5、**Day 1 (培养 24h 左右)** : 根据转染细胞体积, 补加 8 %的补料培养基 和 1 μ L/mL 的表达增强剂; 不降温。Day 5-7 之间收获 (根据实际需求选择 Day 5-7 中任何一天, 培养时间越长表达量越高, 如只培养 5 天, 补料量可以降低到 6%) ;

四、细胞冻存指南

1、准备处于对数生长期的细胞, 且细胞活率在 95%以上;

- 2、检测活细胞密度，计算所需的冻存培养基体积，计算最终细胞密度 $1\sim 1.5\times 10^7$ cells/mL;
- 3、准备好所需的冻存培养基：90%基础培养基+10% DMSO，2~8℃冷藏保存;
- 4、设置离心力 $200\times g$ ，离心 5 min，用冻存培养基重新悬浮细胞至冻存体积;
- 5、将悬浮细胞等分保存至适宜规格的细胞冻存管中;
- 6、将细胞冻存管置于程序降温盒中，按照降温标准进行降温;
- 7、将细胞转移到液氮罐中保存。

五、细胞复苏指南

- 1、提前打开水浴锅，并设置温度至 $36.5^{\circ}\text{C}\sim 37.0^{\circ}\text{C}$;
- 2、将细胞从液氮罐中移出后，快速在水浴锅中融化冷冻的细胞（<3min）;
- 3、将冷冻管中的细胞液全部转移到 125 mL 含有 30 mL 预温过的基础培养基的摇瓶中;
- 4、置于 $36.5^{\circ}\text{C}\sim 37.0^{\circ}\text{C}$ ，5~8% CO_2 ，转速 120 rpm（轨道振幅 50 mm）的摇床中培养;
- 5、细胞至少传代 2 次，待细胞完全复苏且活率在 90%以上，可按计划进行后续操作，首次传代接种密度，建议 $0.4\sim 0.6\times 10^6$ cells/mL。

六、案例分享

案例 1：48h 瞬转效率超过 90%

