

# ExCell Bio

## OptiViro® 293 无血清病毒包装培养基 HE03 说明书

本品仅用于科学研究及商业化生产，不适用于临床诊断和治疗

货 号

HE000-N071

HE000-N072

HE000-N081

HE000-N082

HE000-N083

HE000-N084



## 产品概述

OptiViro® 293 无血清病毒包装培养基 HE03 是专为 AAV 病毒包装设计的无血清、无动物源成分、化学成分明确的基础培养基，支持悬浮的 HEK 293 衍生细胞（293T、293F 等）快速扩增、高密度生长以及质粒转染，搭配 OptiViro® 293 无血清补料培养基 HA03 可显著提高 AAV 滴度。

## 产品规格及储存、运输要求

产品名称	货号	规格	存储条件	运输条件	有效期
OptiViro® 293无血清病毒 包装培养基HE03	HE000-N071	500 mL 液体	2-8 °C 遮光	< 25°C 遮光	12个月
	HE000-N072	1000 mL 液体	2-8 °C 遮光	< 25°C 遮光	12个月
OptiViro® 293无血清病毒 包装培养基HE03（粉体）	HE000-N081	1 L 粉体	2-8 °C 干燥、避光	< 10°C 避光	24个月
	HE000-N082	10 L 粉体	2-8 °C 干燥、避光	< 10°C 避光	24个月
	HE000-N083	100 L 粉体	2-8 °C 干燥、避光	< 10°C 避光	24个月
	HE000-N084	500 L 粉体	2-8 °C 干燥、避光	< 10°C 避光	24个月

## 产品特点、应用与使用限制

- 产品存储过程中需要遮光，避免日光灯或其他灯光照射，在冰箱或仓库储存需要使用有色包装袋。
- 产品运输过程中需要遮光运输，避免日光灯或其他灯光照射对产品的外观产生影响导致外观变色。

3. 产品在使用过程中，需要进行转运至洁净区内时，转移过程需要进行清洁灭菌，灭菌方式只能采用消毒剂擦拭灭菌，不能使用紫外辐照灭菌。
4. 注意：在经过带有紫外辐照灭菌的传递窗时，需要主动关闭传递窗内的紫外灯。

## I 操作方法:

### 细胞培养

细胞培养需要使用 293 无血清病毒包装培养基 HE03 (ExCell Bio, HE000-N07#), 具体培养方法如下:

1. 建议摇床培养条件, 温度: 37°C; 相对湿度: 80%, CO<sub>2</sub> 浓度: 5% , 摇床转速: 90-120 rpm。  
根据细胞生长情况, 每 2-3 天传一次代, 活细胞密度达到  $4.0-6.0 \times 10^6$  cells/mL 时即可进行传代, 传代密度为  $0.6-1.0 \times 10^6$  cells/mL。
2. 若 293 细胞原来使用的培养基为其他品牌, 可直接或逐步转入本培养基进行传代培养, 传代 3 次 (9-10 天) 后细胞可适应本培养基, 细胞扩增速度及细胞活率达到稳定状态, 可进行后续实验。
3. 若 293 细胞是用其他品牌培养基培养后冻存的, 推荐用细胞冻存前使用的培养基来复苏细胞, 传一代后换成 HE03 培养基, 再传代 3 次, 细胞扩增速度及细胞活率达到稳定状态, 可进行后续实验。使用 HE03 培养基产品培养后冻存的细胞, 则可以使用 HE03 培养基产品复苏。
4. 培养过程无需额外添加谷氨酰胺。

### 粉体配制方法

以下介绍粉体配制液体的方法, 粉体为 293 无血清病毒包装培养基 HE03 (粉体) (ExCell Bio, HE000-N08#)。

1. 以配制 1L 液体培养基为例, 取洁净的配制容器, 加入最终配制体积 80% 的注射用水或细胞培养级用水;

2. 称量干粉培养基 24.032 g/L, 缓慢加入水中, 搅拌 30-40 分钟左右;
3. 缓慢加入 5 M NaOH 溶液约 4.5 mL/L, 调节 pH 至 8.5-8.8 后, 搅拌 10 分钟左右;
4. 加入碳酸氢钠 2.317 g/L, 搅拌 10 分钟左右;
5. 缓慢加入 6 N HCl 溶液, 约 3.5 mL/L, 调节 pH 至 7.0-7.2 后, 搅拌 10 分钟;
6. 加入注射用水或细胞培养级用水并定容至 1L, 继续搅拌 5 分钟;
7. 0.22  $\mu$ m 滤膜除菌过滤后, 2-8°C 遮光保存。

### 转染方法建议

以下介绍 293 无血清病毒包装培养基 HE03 和 293 无血清补料培养基 HA03 的使用方法, 为提高病毒产量需要两者搭配使用

1. 细胞复苏后, 稳定传代 3 次后用于转染实验, 保证细胞活率大于 90%。
2. 转染前一天, 注意将种子细胞全部离心更换至新鲜的 OptiViro® 293 无血清病毒包装培养基 HE03 中, 按照  $1.1 \times 10^6$  cells/mL 接种。
3. 转染当天, 按照 20 mL/125 mL 摇瓶培养体系, 将细胞用新鲜的 OptiViro® 293 无血清病毒包装培养基 HE03 调整至 18 mL, 细胞总量  $4 \times 10^7$  cells, 转染时细胞密度为  $2.2 \times 10^6$  cells/mL 左右。
4. 制备 PEI/DNA 复合物:

本方案中, 转染体系为 20 mL, 细胞终密度为  $2 \times 10^6$  cells/mL, DNA 终浓度 1.5  $\mu$ g/mL, DNA: PEI=1.5 :

4.5, 具体操作如下:

- 1) PEI Max: 将 90  $\mu$ g PEI Max 用 OptiViro® 293 无血清病毒包装培养基 HE03 稀释至 1 mL 体系, 室温孵育 5 min;
- 2) DNA: 将 30  $\mu$ g DNA 用 OptiViro® 293 无血清病毒包装培养基 HE03 稀释至 1 mL 体系;
- 3) 将 PEI Max 加入到 DNA 中, 形成 PEI/DNA 复合物, 混匀, 室温孵育 10 min;
5. 将制备好的 2 mL PEI/DNA 复合物缓慢添加到培养体系中, 随后转移到培养箱继续培养。

6. 转染后 24 小时左右, 添加 5% 体积的 OptiVibro® 293 无血清补料培养基 HA03 (20 mL 体系补充 1 mL 补料)。
7. 转染后 48 小时, 可进行病毒收获。
8. 若培养体系扩大, 可按比例增加相应物质的添加量, 不同规格条件的添加量可参考表 1。

表 1 不同转染规格推荐添加量

细胞培养容器	125 mL	500 mL	1 L	备注
细胞数量( $\times 10^6$ cells)	40	200	400	密度 $2.2 \times 10^6$ cells/mL 左右
基础培养基 HE03 (mL)	18	90	180	初始转染体积
DNA 稀释液 (mL)	1	5	10	
PEI 稀释液 (mL)	1	5	10	
DNA ( $\mu$ g)	30	150	300	DNA : PEI=1 : 3
PEI 试剂 ( $\mu$ g)	90	450	900	
补料培养基 HA03 (mL)	1	5	10	初始转染体积的 5%
最终培养体积 (mL)	~21	~105	~210	

9. 293 无血清病毒包装培养基 HE03 培养需要搭配 293 无血清补料培养基 HA03 使用, HA03 相关货号见表 2。

表 2 相关产品货号

产品	货号	规格
OptiVibro® 293 无血清补料培养基 HA03	HA000-N011	100 mL 液体
	HA000-N012	1000 mL 液体
	HA000-N021	1 L 粉体

	HA000-N022	10 L 粉体
	HA000-N023	50 L 粉体

**【注意事项】**

- 1 该接种密度是为了转染密度能够达到  $2.2 \times 10^6$  cells/mL 左右，客户可根据自己的细胞扩增速度对转染前一天的接种密度稍做调整。
- 2 以上转染方法仅供参考，为获得 293 细胞最优转染条件，可进行 DoE 设计（细胞密度、DNA 浓度、DNA 与 PEI 比例、补料及病毒收获时间等），确定最佳实验方案。
- 3 不同项目的补料或收获时间可能不一样，实验人员可对此进行优化。

**| 免责声明**

1. 产品应按照说明书指导使用，实验者未按说明书指导操作，本公司不对由此导致的产品性能偏离承担责任；
2. 产品仅用于科学研究及商业化生产，不适用于临床诊断和治疗，否则所产生的一切后果，由实验者承担，本公司概不负责。