

ExCell Bio

OptiVitro[®] CHO CD03 无血清基础培养基说明书

Catalog Number CE000-N011

CE000-N012




产品概述

OptiVibro® CHO CD03 是一款不含有任何动物性来源成分的、无蛋白的，适用于中国仓鼠卵巢细胞(CHO)进行重组蛋白表达的化学成分明确的基础培养基。培养基不含谷氨酰胺，可用于谷氨酰胺合成酶(GS)系统；不含次黄嘌呤和胸腺嘧啶，可用于二氢叶酸还原酶(DHFR)扩增系统；不含酚红，以降低雌激素样作用；不含谷氨酰胺，以延长产品效期，谷氨酰胺建议添加浓度为 4~8mM。

本产品不含抗生素或抗真菌成分。


产品规格及储存条件

货号	规格	保存条件	有效期(暂定)
CE000-N011	500 mL	2~8°C 避光保存	12个月
CE000-N012	1000mL	2~8°C 避光保存	12个月


产品使用方法

一. 培养基准备

OptiVibro® CHO CD03 培养基中已含有保护细胞不受剪切力损伤的表面活性物质，无需额外添加。对于大部分 CHO 细胞及克隆株，使用 OptiVibro® CHO CD03 培养基前，需额外添加终浓度 4~8mM/L 的谷氨酰胺，但是对于谷氨酰胺合成酶(GS)系统的细胞和克隆，无需额外添加谷氨酰胺。如果原细胞株适应的培养基中需添加其它添加剂，在测试培养基时可按照原方案添加。

二. 细胞复苏

1. 取出冻存的细胞，在 37°C 水浴条件下快速解冻；
2. 将冻存管内的细胞转移至含有 30mL 预热的 OptiVibro® CHO CD03 培养基的 125mL 摇瓶中；
3. 将摇瓶放入二氧化碳摇床中，培养参数设置为温度 37°C，二氧化碳浓度 5~8%，转速 120~140rpm，开始培养；

4. 在前两个代次的传代培养过程中，保持细胞传代密度 $0.6\sim 1.0\times 10^6\text{cells/mL}$ ；此后，恢复至原传代培养方法或者工艺。

三. 传代培养

1. 开始进行细胞传代前，使用 CountStar 细胞分析仪测定活细胞密度（也可以使用其他自动或手动的计数方法）；
2. 传代前的细胞应处于对数生长中期，活细胞密度 $\geq 1.0\times 10^6\text{cells/mL}$ ，细胞活率 $\geq 90\%$ ；
3. 以 $0.3\sim 0.6\times 10^6\text{cells/mL}$ 接种密度，将细胞接种于含有新鲜 OptiVibro® CHO CD03 培养基的 125mL 摇瓶中，培养总体积 30mL；

注：若细胞接种培养 4~5 天后，活细胞密度始终未能达到 $1.0\times 10^6\text{cells/mL}$ ，则以 100~300g 离心细胞 5 分钟，并以 20~30mL 新鲜 OptiVibro® CHO CD03 培养基重悬后继续培养。

4. 二氧化碳摇床的培养参数设置为温度 37°C ，二氧化碳浓度 5~8%，转速 120~140rpm，并开始培养；
5. 为了获得最佳的细胞生长状态，建议每次传代培养的接种密度维持在 $0.3\sim 0.6\times 10^6\text{cells/mL}$ （也可以根据已有工艺或者经验进行调整）。

四. 细胞驯化

正式开始培养或者实验之前，建议预先将 CHO 细胞驯化（适应）到 OptiVibro® CHO CD03 培养基中。在启动细胞驯化（适应）时，CHO 细胞应处于对数生长中期，且活率 $\geq 90\%$ ，尽可能使用低代次的细胞进行驯化，这点至关重要。

直接驯化（适应）法

1. 将正常培养于其他无血清培养基中的 CHO 细胞，以 $3\sim 4\times 10^5\text{cells/mL}$ 密度接种于 100%的 OptiVibro® CHO CD03 培养基中，接种前的细胞应处于对数生长中期，且活率 $\geq 90\%$ 。
2. 以温度 37°C ，二氧化碳 5%，转速 120~140 rpm 培养条件，培养至活细胞密度不低于 $2\times 10^6\text{cells/mL}$ 。
3. 继续以 $3\sim 4\times 10^5\text{cells/mL}$ 密度接种于 100%的 OptiVibro® CHO CD03 培养基，连续培养多个代次，

每周传代两次，以便细胞完全适应培养基。

渐进式驯化（适应）法

1. 将正常培养于 5~10%血清培养基或其他无血清培养基的 CHO 细胞驯化至 OptiVibro® CHO CD03 培养基时，细胞的接种密度为 $3\sim 4\times 10^5$ cells/mL，接种前的细胞应处于对数生长中期，且活率 $\geq 90\%$ 。
2. 本培养基推荐如下渐进式驯化（适应）方法：利用新旧培养基混合液进行细胞传代，原培养基与 OptiVibro® CHO CD03 培养基的比例可按 50%/50%，25%/75%，10%/90%，5%/95%，0%/100% 的顺序递变。大部分细胞株的渐进式适应可直接从 25%/75%或 10%/90%开始，根据细胞适应难易程度，可适当跳过某些比例或增加某些比例，例如 5%/95%后增加 2%/98%，1%/99%。如已有成熟的细胞适应培养基的驯化方法，可做适当调整后直接实施。
3. 当细胞完全适应 OptiVibro® CHO CD03 培养基，且连续传代培养过程中，细胞以 $3\sim 4\times 10^5$ cells/mL 密度接种后，能够在 3~4 天内稳定的生长到不低于 2.0×10^6 cells/mL，活率 $\geq 90\%$ 时，可以认为细胞已经适应 OptiVibro® CHO CD03 培养基。

五. 细胞冻存

1. 准备用于冻存的细胞应处于对数生长中期，且活率 $\geq 90\%$ ，CountStar 细胞分析仪测定活细胞密度（也可以使用其他自动或手动的计数方法）。
2. 细胞以 200g 离心 5min，弃去上清后，用 2~8℃提前预冷的，由 90% OptiVibro® CHO CD03 培养基 +10%DMSO 的组成的冻存液重悬细胞，重悬密度为 1.0×10^7 cells/mL。
3. 重悬后的细胞悬液，分装到无菌冻存管中，分装体积为 1mL/支，或根据实际需求确定分装体积。
4. 分装好的冻存管直接转移至程序性降温盒后，直接放置于-80℃超低温冰箱过夜。
5. 将程序性降温后的冻存管转移至液氮中，长期保存。