



碧云天生物技术/Beyotime Biotechnology  
订货热线: 400-1683301 或 800-8283301  
订货 e-mail: order@beyotime.com  
技术咨询: info@beyotime.com  
网址: http://www.beyotime.com

## 293无血清培养液(含L-谷氨酰胺)

产品编号	产品名称	包装
C0901-500ml	293无血清培养液(含L-谷氨酰胺)	500ml
C0901-1L	293无血清培养液(含L-谷氨酰胺)	1L

### 产品简介:

- 碧云天生产的293无血清培养液(含L-谷氨酰胺), 即293 Serum-free Culture Medium (with L-Glutamine), 是一种化学成分确定的、无血清、无蛋白质或生长因子、不含任何动物源性物质(Animal origin-free, AOF)的, 专门用于各种亚型或衍生HEK293细胞的高密度悬浮培养和高效率瞬时转染表达的即用型液体培养液。本293无血清培养液可用于培养的293细胞包括293S、293F等悬浮细胞, 以及被驯化过的293H、293E、293T等[1-3]。
- 293无血清培养液也被称为CD (Chemical-defined) 293培养液、CD 293 Medium、CD 293 Cell Culture Medium、CD 293 细胞培养液、293 Expression Medium、293表达培养液等。培养液、细胞培养液、基础培养液、无血清培养液也分别称为培养基、细胞培养基、基础培养基、无血清培养基。HEK293即Human Embryonic Kidney 293, 简称293, 来源于人胚肾细胞[4]。
- 本产品经过过滤除菌处理, 可以直接用于293等细胞的无血清培养, 含L-谷氨酰胺(L-Glutamine), 浓度约为6mM, 一般无需额外添加L-谷氨酰胺, 也无须添加血清、抗生素、非离子表面活性剂物质(如F-68)以及抗结团试剂等。
- **成分说明:** 本293无血清培养液(含L-谷氨酰胺)的化学成分确定, 含D-葡萄糖、L-谷氨酰胺、碳酸氢钠等组分; 不含动物源性物质、血清、蛋白质、酚红、水解物和生长因子。超纯水配制, 红色透明液体, pH为7.0-7.4, 渗透压为270-300 mOsm/kg, 内毒素低于1EU/ml。
- **产品特点:** 293细胞常用含血清的培养液进行贴壁培养。与悬浮培养相比, 贴壁培养较为费力且成本更高, 且蛋白质和血清的存在不仅会成为实验和数据分析中的混杂因素, 影响重复性, 还可能干扰下游纯化、影响产物质量。293无血清培养液支持各种亚型和衍生的293细胞的悬浮培养, 细胞通常无需任何适应, 即可进行高密度培养, 有助于提升细胞的活性, 以最大限度地生产重组病毒或重组蛋白[1-3]。此外, 本产品化学成分明确, 不含未知组分, 不含蛋白质, 也无需额外添加血清, 尽可能地减少了外源性物质的引入, 批次间稳定性好, 有效简化了重组蛋白的下游纯化, 提高了实验或生产的重复性。
- **用途:** 293无血清培养液可以支持各种293悬浮细胞如293S、293F等的高密度培养和高效率瞬时转染表达, 广泛应用于病毒的高效包装或扩增、重组蛋白生产以及基于细胞培养的大规模抗体药物生产。293无血清培养液也可以用于被驯化过的其它293细胞、亚型或衍生的细胞系, 如驯化过的293H、293E、293T等293细胞。

### 包装清单:

产品编号	产品名称	包装
C0901-500ml	293无血清培养液(含L-谷氨酰胺)	500ml
C0901-1L	293无血清培养液(含L-谷氨酰胺)	1L
—	说明书	1份

### 保存条件:

4°C避光保存, 一年有效。

### 注意事项:

- 本产品4°C保存时应避免靠近冰箱壁, 以免局部温度过低导致沉淀析出。如果有沉淀析出, 室温摇晃片刻, 再放置在4°C冰箱过夜或更长时间, 待沉淀消失后再使用。
- 本产品一般适用于293细胞悬浮培养, 不推荐用于没有经驯化过的贴壁293细胞的培养。
- 使用本产品应注意无菌操作, 避免污染。一般不建议补充抗生素, 以免影响细胞的正常生长速度, 但如果不能再高洁净度细胞培养室内操作, 仍需加入适量的抗生素。
- 若使用过程中发现培养液浑浊、沉淀等异常现象, 则不能继续使用。
- 本产品中已添加的L-谷氨酰胺(约6mM)是细胞培养所必需的营养成分, 一般无需额外再添加, 否则可能产生细胞毒性。但L-谷氨酰胺在溶液中不太稳定、易分解, 若本培养液长期放置后再使用, 发现细胞生长变慢, 可在使用前加入适量的L-Glutamine (100X) (C0212)或可以稳定保存的L-Ala-Gln (100X) (C0211), 以维持细胞的正常生长代谢。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品, 不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

### 使用说明:

### 1. 293悬浮细胞的复苏。

- 将细胞冻存管从液氮或超低温冰箱中取出，并在37°C水浴锅中迅速完全融化(保持冻存管的盖子在液面以上以防止污染)，并适当轻轻摇晃促融，切勿vortex。快速、完全融化可以提高细胞的复苏效果。
- 打开冻存管前用70%酒精擦拭细胞冻存管外壁，注意某些记号笔不耐酒精，小心标注的记号被擦拭掉。
- 将完全融化的细胞直接离心，或者转移至无菌1.5ml或其它合适无菌离心管中，200×g室温离心5分钟，吸除上清，注意不要吸走细胞沉淀。
- 用新鲜、预热至37°C的293无血清培养液重悬后转移至培养容器中(如锥形摇瓶、三角细胞摇瓶等，PC或PETG材质均可)，混匀，置于37°C、5-8% CO<sub>2</sub>、湿度80%的细胞培养摇床中培养，设置转速为130rpm (振幅26mm)。注：如摇床振幅为50mm，设置转速为120rpm。

### 2. 293悬浮细胞的传代。

- 取处于对数生长期、细胞存活率大于95%、活细胞密度达到2-4×10<sup>6</sup>个/ml以上的293细胞进行传代。  
注1：不同类型的293细胞可能具有不同的对数生长期范围。  
注2：在细胞传代30次或者持续3个月以上时，推荐复苏新的冻存细胞进行传代。  
注3：推荐使用碧云天生产的台盼蓝染色细胞存活率检测试剂盒(C0011)或细胞计数仪进行细胞存活率检测。
- 将适量细胞悬液转移到无菌离心管内，200×g室温离心5分钟，弃去上清，加入适量预热的293无血清培养液，用吸管小心吹散沉淀细胞，获取细胞悬液。
- 将细胞悬液以3×10<sup>5</sup>-6×10<sup>5</sup>个/ml的密度接种到新的培养容器中，培养条件与细胞复苏培养条件保持一致。  
注1：每2-3天用293无血清培养液按上述步骤进行传代。  
注2：为减少液体摇动产生的机械剪切力对细胞的损伤，装载大体积三角细胞摇瓶的摇床转速应适当调低。  
注3：293悬浮细胞可能形成由2-10个细胞组成的细胞团，传代时可能需要剧烈涡旋细胞悬液40秒或适当时间，直到细胞团分散为单细胞悬液。  
注4：请勿使用过高密度的细胞进行常规传代培养。

### 3. 293悬浮细胞的驯化。

- 直接驯化法：**  
大部分情况下，培养于其它品牌无血清培养液中的293细胞，可以直接适应本293无血清培养液的培养，只需参照步骤2进行细胞传代即可。
- 梯度驯化法：**  
梯度驯化法又称渐进式驯化或适应性驯化。由于293无血清培养液为化学成分限定培养液，有些293细胞需要进行梯度驯化，即在一段时间内用本293无血清培养液和原培养液的混合液培养细胞，培养过程中需逐渐降低原培养液占比、提升293无血清培养液占比。  
(a) 用原培养液复苏293细胞，并使用该培养液继续培养2-3代直至293悬浮细胞稳定生长。  
注：应选用低代数、处于对数生长期的细胞进行驯化。

(b) 参照下表对细胞进行梯度驯化。

293无血清培养液占比(%)	原培养液占比(%)	细胞接种密度(个/ml)	细胞生长状态检测指标	进行下一阶段的标准
0	100%	-	VCD* & Cell viability	VCD ≥ 3×10 <sup>6</sup> cells/ml; Cell viability ≥ 95%
30%	70%	0.6×10 <sup>6</sup>	VCD & Cell viability	VCD ≥ 2×10 <sup>6</sup> cells/ml; Cell viability ≥ 90%
70%	30%	0.5×10 <sup>6</sup>	VCD & Cell viability	VCD ≥ 2×10 <sup>6</sup> cells/ml; Cell viability ≥ 90%
100%	0%	0.4×10 <sup>6</sup>	VCD & Cell viability	VCD ≥ 2×10 <sup>6</sup> cells/ml; Cell viability ≥ 90%

\* VCD, Viable cell density.

注1：每阶段应至少传代2次。

注2：在完全使用293无血清培养液接种3-4天之后，若VCD ≥ 3×10<sup>6</sup> cells/ml，Cell viability ≥ 95%，则表明细胞生长、状态良好，该细胞已经完全驯化至适应293无血清培养液。

### 4. 293悬浮细胞的冻存。

- 细胞的准备：使用对数生长期且细胞活率大于90%的细胞用于冻存。  
注：须保存适量的已经培养过的培养液上清即条件培养液(Conditioned media)用于细胞冻存液的配制。
- 进行细胞计数，确定活细胞密度，并计算活细胞密度为0.5-1×10<sup>7</sup>个/ml时所需细胞冻存液的体积。
- 细胞冻存液的配制：45%新鲜的293无血清培养液+45%条件培养液+10% DMSO，并在4°C避光条件下预冷。配制的细胞冻存液须当天使用。为方便起见，推荐使用碧云天的BeyoAOF™无血清细胞冻存液(C0210B)，可以直接使用无须进行配制。

- d. 将细胞室温 $200\times g$ 离心5分钟，除去上清，用预冷的细胞冻存液将离心收集的细胞重悬。
- e. 后续操作和普通细胞冻存一致，具体参考BeyoAOF™无血清细胞冻存液(C0210B)中的使用说明。
- 注：建议细胞冻存24小时之后，或者长期冻存(例如半年或一年后)，进行细胞复苏，检测细胞复苏的效果。

#### 5. 293悬浮细胞的瞬时转染。

- a. 下表转染条件仅供参考，用户可根据实验的具体情况进行优化。此处以瞬时转染1L 293悬浮细胞为例：

Items	Value
VCD	$2-4\times 10^6$ cells/ml
DNA	0.7-2 $\mu$ g/ml
DNA/PEI ratio	1:2~1:6

注：推荐使用碧云天专门适用于悬浮293细胞转染的Lipo293F™转染试剂(C0518)或线性聚乙烯亚胺(Polyethylenimine, Linear) (C0537)，使用方法也同样可以参考。

- b. 取处于对数生长期、细胞存活率>95%、活细胞密度为 $2-4\times 10^6$ 个/ml的293悬浮细胞进行转染。
- c. 用10ml 293无血清培养液稀释0.7-2mg质粒DNA，轻轻混匀。
- d. 用10ml 293无血清培养液稀释适量PEI，轻轻混匀。
- e. 将PEI稀释液加到质粒DNA稀释液中，轻轻颠倒4-5次以充分混匀，室温孵育15-20分钟。
- 注：PEI稀释液与质粒DNA稀释液的混合顺序不可颠倒。
- f. 将混合物逐滴加入细胞中，在加入过程中轻轻摇动三角细胞摇瓶。
- g. 将细胞置于细胞培养摇床中培养，培养条件与细胞正常培养条件保持一致。
- g. 一般本293无血清培养液可维持48小时的培养时间，无须添加补料；也可以在转染后每隔24小时向细胞中添加一定量的补料，在加入过程中轻轻摇动培养容器。随后将细胞放回细胞培养摇床中继续培养。
- h. 当细胞存活率<60%时收集细胞上清液或细胞进行后续纯化。

#### 参考文献：

- Schneider MD, French BA. Circulation. 1993. 88(4 Pt 1):1937-42.
- Fisher KJ, Jooss K, Alston J, Yang Y, Haecker SE, et al. Nat Med. 1997. 3(3):306-12.
- Yan SB, Chao YB, van Halbeek H. Glycobiology. 1993. 3(6):597-608.
- Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. J Gen Virol. 1977. 36(1):59-74.

#### 相关产品：

产品编号	产品名称	包装
C0212	L-Glutamine (100X)	100ml
C0211-100ml	L-Ala-Gln (100X)	100ml
C0901-500ml	293无血清培养液(含L-谷氨酰胺)	500ml
C0901-1L	293无血清培养液(含L-谷氨酰胺)	1L
C0537-20mg	线性聚乙烯亚胺(Polyethylenimine, Linear)	20mg
C0537-100mg	线性聚乙烯亚胺(Polyethylenimine, Linear)	100mg
C0518-1ml	Lipo293F™转染试剂	1ml
C0518-10ml	Lipo293F™转染试剂	10ml
C0518-100ml	Lipo293F™转染试剂	100ml

Version 2023.05.02