

产品描述

Balance CD 293 培养基适用于悬浮培养条件下的HEK293细胞（如293-F,293-T, Expi-293F等）的高密度生长和瞬时转染表达。Balance CD 293 培养基含有细胞生长所需的全部营养成分，无需添加任何添加物即可使用。（注意：此培养基不包含抗生素以及血清）

产品特点

- 瞬时转染专用培养基，适用于HEK293细胞高密度悬浮培养
- 无蛋白、无动物源、化学成分限定
- 即用型完全培养基,无需添加额外成分

基础参数

外观：澄清透明红色液体
渗透压：285±15 mOsm/kg
pH:6.90-7.40
无菌检测:无菌
内毒素： <5 EU/mL
储存条件：2-8℃，避光
效期：12个月
产品用途：仅用于科学研究，不适用于人类或动物的诊断和治疗

产品使用方法

细胞驯化

1) 直接驯化

大部分情况下，培养于其他培养基中的细胞，可以直接适应Balance CD 293 medium，只要按照日常传代方式（稀释）更换培养基即可。

2) 渐进式驯化

注意：选用低代次、处于对数生长期的细胞进行驯化

①在原培养基中复苏细胞并继续使用该培养基传代2到3次至细胞生长稳定，当细胞密度达到 2×10^6 cells/ml后进行传代，传代细胞密度控制在 $(0.5-0.6) \times 10^6$ cells/mL，5-10%血清的传统培养基或其他无血清培养基与Balance CD 293培养基的比例为

75:25;

②将细胞置于37°C，5% CO₂，转速为110-175 rpm的恒温摇床中进行培养；

③当细胞密度3-4天后达到 3×10^6 cells/ml且细胞活率>90%，传代时5-10%血清的传统培养基或其他无血清培养基与Balance CD 293培养基的比例为50:50，细胞密度控制在 0.5×10^6 cells/mL。如细胞生长慢，可离心上清，留20%条件培养基，加入80%的5-10%血清的传统培养基或其他无血清培养基与Balance CD 293 培养基比例为75:25的混合培养基，继续培养；

④重复步骤③逐步增加Balance CD 293培养基所占的比例(5-10%血清的传统培养基或其他无血清培养基与Balance CD 293 培养基的比例为25:75至10:90)直到100%的Balance CD 293培养基；

⑤经过在100%的 Balance CD 293 培养基中的几次传代培养，传代后3-4天细胞的密度可以达到 $(2-3) \times 10^6$ cells/mL，细胞活率大于90%，这说明细胞已经完全适应了Balance CD 293 培养基。之后进行细胞的传代培养时，细胞的起始密度可以降到 0.3×10^6 cells/mL，一般传代2-3次后再进行转染实验。

注意：一般细胞驯化过程中，前三代细胞的状态可能不是很好，但一般从第四代开始状态会有改善

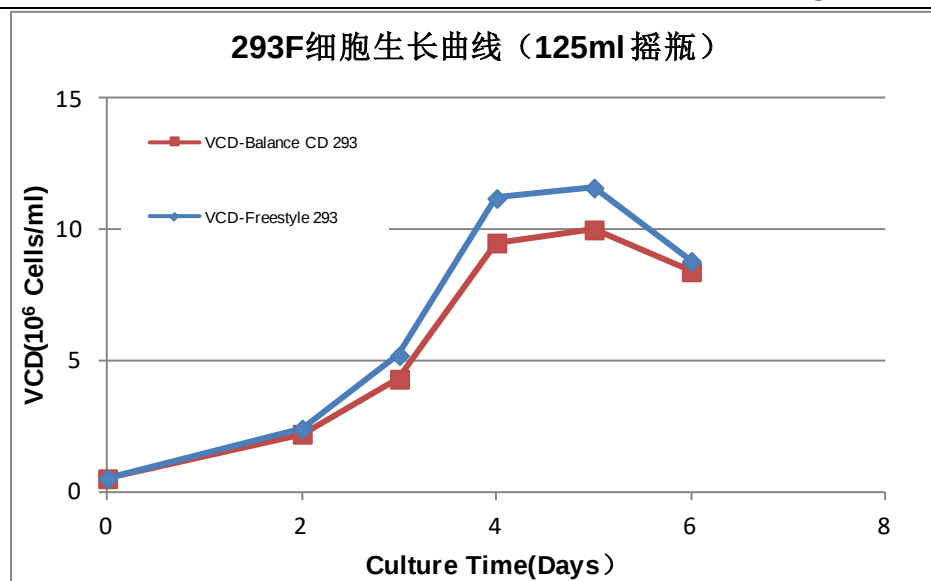
细胞传代

1) 取细胞培养样品，人工或仪器测定细胞密度以及活率；

2) 计算传代所需的细胞用量，建议起始细胞密度为 $(0.2-0.4) \times 10^6$ cells/mL。建议复苏的细胞至少培养两代后再用于其他用途。传代培养体积建议为15-20 mL（100 mL的培养瓶）或50-60 mL（250 mL 的培养瓶）；

3) 将细胞置于37°C，5%CO₂，转速为110-175 rpm的恒温摇床中进行培养，3-4天传代一次。

细胞转染在Balance CD 293培养基中，采用商业化转染试剂（例如 Gibco 293Fectin™ ExpiFectamine™ 293 Transfection Kit ）或 PEI 可以实现对 HEK293 细胞的高效转染。



细胞复苏

- 1) 迅速取出冻存的细胞，在37°C水浴条件下进行解冻（可以在水中轻轻晃动，时间控制在60s以内）；
- 2) 轻轻地混匀细胞并将融化的细胞全部移至15mL无菌离心管中，逐滴加入10 mL 预热到37°C的培养基，离心换液（100 g，5 min）去除全部上清，加入新鲜培养基重悬，使得细胞密度达到 $(0.4-0.6) \times 10^6$ cells/mL；
- 3) 将细胞置于37°C，5%CO₂，转速为110-175 rpm的恒温摇床中进行培养；
- 4) 2-4天后通过人工或仪器测定细胞的密度以及活率，如果细胞密度达到 1.0×10^6 cells/mL，活率达到85%以上则可进行传代培养；
- 5) 如果细胞密度低于 1.0×10^6 cells/mL，则建议对细胞进行离心（100 g，5 min），然后重悬于20-30 mL 的新鲜培养基中使得细胞密度为 $(0.4-0.6) \times 10^6$ cells/mL 左右，并继续培养至细胞正常生长则可进行传代培养。

细胞冻存

- 1) 冻存细胞时，要选择处于对数生长期同时细胞活率在90%以上的 HEK293 cells ；
- 2) 事先计算好冻存的细胞管数和所用的培养基的体积；
- 3) 制备细胞冻存液：46.25% 的新鲜Balance CD 293培养基+46.25% 条件Balance CD 293 培养基，混合之后再加入7.5% DMSO，存放在4°C，一般为当天用当天制备；

- 4) 对细胞样品进行计数;
- 5) 取样计数, 以100 g, 3-5 min的条件离心收集细胞, 然后用冻存培养基 (4°C) 重悬细胞, 使得细胞密度为 $(5-10) \times 10^6$ cells/mL;
- 6) 取样计数, 调整细胞密度; 迅速分装细胞到无菌的冻存管中, 一般2 mL 的冻存管放1-1.5 mL, 贴好标签, 密封;
- 7) 将细胞冻存管放到程序降温冻存盒 (注意填充异丙醇, 4°C预冷) 中, 置于-80°C 冰箱(每分钟下降1°C), 过夜存放后将细胞转入液氮罐中进行保存。

转染和瞬时表达的推荐方案

- 1) 建议转染活细胞密度控制在 $(2-4) \times 10^6$ cells/mL.
- 2) 建议转染DNA使用量在 (1-2) ug/mL (可根据细胞密度调整)。
- 3) DNA:PEI比例一般在 1:2 – 1:6 之间, 首次使用建议1: 3, 后面可优比例。
- 4) 也可自行在6孔板/摇管上优化转染密度, PEI/DNA比例.

转染过程

1. 转染前传代: HEK293细胞以2-3天周期传代, 传代密度 $(0.3-0.5) \times 10^6$ cells/ml, 传代时将密度控制在 $(2-4) \times 10^6$ cells/ml。
2. 转染: 转染密度为 $(2-4) \times 10^6$ cells/ml, 可在转染前一天高密度传代, 无需换液; 使用Balance CD 293分别稀释PEI与DNA, 混匀后将PEI加入到DNA稀释液中, 室温下孵育20min, 然后将混合液加入待转染的细胞中。
3. 补料: 在转染后22-24小时添加293 Feed, 为初始体积的10%, 后面可根据生长情况补料。
4. 每天取样监测细胞密度、活率、葡萄糖、乳酸, 并维持葡萄糖在4g/L以上。
5. 活率低于60%收获, 也可每天留样用于检测以确认最佳收获时间。