

# MetaCell™ HEK293-100

## 化学成分确定培养基

### 产品简介

MetaCell™ HEK293-100 是为高效瞬时转染HEK293细胞而设计的化学成分确定培养基，不含水解物、蛋白质和任何动物源成分，可支持各种HEK293细胞特别是293F细胞的高密度生长、瞬时转染和维持，兼容各种商业化阳离子转染试剂。推荐与MetaCell™ 293 TransFeed High-Glucose 搭配使用。

MetaCell™ HEK293-100 适用于科研和基于细胞培养的大规模生物制品的生产，但不可直接用于人体或作为药物用。

MetaCell™ HEK293-100 已含有4mM谷氨酰胺衍生物。

产品名称	形态	产品编码	包装规格	储存条件	有效期	推荐使用范围
MetaCell™ HEK293-100	干粉	P2000-X010	10L	2-8°C, 密闭、避光	12个月 (暂定)	HEK293细胞瞬时转染, (蛋白或病毒表达)
		P2000-X100	100L			

### 培养条件

培养基: MetaCell™ HEK293-100

培养类型: 悬浮

细胞系: Expi293F™, FreeStyle™, 293-F, 293F, VPC2.0

培养参数设置:

摇瓶体积	125mL	250mL	500mL	1L	5L	3L
培养体积 (mL)	30-35	60-70	120-140	240-280	600-1000	1500-2000
摇床转速	125±5 rpm (振幅19mm) 120±5 rpm (振幅25mm) 95±5 rpm (振幅50mm)				105±5 rpm 95±5 rpm 80±5 rpm	
摇瓶类型	PETG或者PC材质, 透气, 无挡板					
培养环境	37±0.5 °C, 8% CO <sub>2</sub> , 湿度≥80%, 确保适当的气体交换并尽量避光培养					

### MetaCell™ HEK293-100配液方法 (以1kg为例)

- 在干净的容器中添加880-900g的超纯水或注射用水 (水温20-30°C)。
- 称取23.280-23.374g培养基干粉缓慢倒入容器培养基每升标示量: 23.327g/L。
- 添加碳酸氢钠2.096-2.104g至培养基溶液中, 搅拌至完全溶解 (碳酸氢钠每升标示量: 2.100g/L)。
- 添加5mol/L氢氧化钠溶液或5mol/L盐酸溶液调节pH至所需范围内 (建议范围为: 6.95-7.05)。
- 补水定容至溶液净重为998-1002g, 搅拌5-10分钟。如pH出现明显变化, 继续用5mol/L氢氧化钠溶液或5mol/L盐酸溶液调节pH至6.95-7.05范围内。
- 使用0.22µm除菌级滤膜过滤除菌。
- 除菌后的溶液应在2-8°C下密闭避光保存, 并于12个月内使用完毕。

## 细胞复苏

1. 干冰运输的细胞应放置在液氮环境下3-7天后再进行细胞复苏。
2. 提前取39mL MetaCell™ HEK293-100 于125mL摇瓶中 37 °C预热。
3. 从液氮罐中取出一支冻存细胞，置37 °C水浴锅中，水浴1-2分钟，注意观察冻存管里细胞冰块状态。
4. 15mL离心管里添加9mL预热的MetaCell™ HEK293-100，将复融后的细胞转移至15mL离心管中混匀。
5. 1000rpm离心4分钟后，弃上清，使用已预热的MetaCell™ HEK293-100 培养基重悬细胞，然后全部转移至125mL摇瓶中，确定最终培养体积为30mL，混匀后取样测定细胞的密度和活率，细胞密度应该在  $0.3-0.4 \times 10^6$  cells/mL。

注：通常细胞的活率会在解冻后24h内略有下降，培养3-4天后，会逐渐恢复到90%以上。

6. 建议的摇床培养参数37 °C，8% CO<sub>2</sub>，95±5 rpm（振幅50mm）。
7. 培养3-4天后，当细胞密度 $\geq 3.0 \times 10^6$  cells/mL且活率 $\geq 90\%$ 时传代。

注：若细胞复苏2-3代后，细胞生长状态正常，活率 $\geq 95\%$ ，应尽快安排冻存。

## 细胞传代

1. 提前将MetaCell™ HEK293-100 放入37 °C条件下预热20-30分钟。
2. 当细胞密度达到 $3.0-4.0 \times 10^6$  cells/mL且细胞活率 $\geq 95\%$ （2-4天）时，即可进行传代培养。

注：不同类型的HEK293细胞可能具有不同的对数生长期范围，需根据实际情况确定传代时间，以保持细胞传代培养时处于对数生长期的早期。

3. 推荐的细胞接种密度 $0.4-0.6 \times 10^6$  cells/mL。
4. 无菌转移所需的种子液至摇瓶中，并添加适量已预热的MetaCell™ HEK293-100 培养基，参考培养条件设置摇床参数，每2-4天用新鲜培养基按上述步骤进行传代培养。
5. 细胞解冻复苏后至少传代三次以上，待细胞生长状态稳定后方可进行后续转染或冻存等实验。

## 细胞冻存

1. 准备好足量的处于对数生长早期且细胞活率 $\geq 95\%$ 的细胞作为冻存用细胞。
2. 最终的细胞冻存密度控制在 $10.0-15.0 \times 10^6$  cells/mL。
3. 提前配制冻存液（90% MetaCell™ HEK293-100+10% DMSO），2-8 °C预冷30分钟备用。
4. 取适量细胞悬液，1000rpm离心4分钟，弃上清，用2-8 °C预冷的冻存液重悬后，按照冻存规格，立即将细胞悬液分装至冻存管中。
5. 通过程序降温或人工控制等方式将细胞逐步降温至-80°C冷冻状态（降温速率为1°C/分钟）。
6. 24小时后将完成冷冻的细胞转移至液氮储罐气相中（储存温度范围：-200°C至-125°C）储藏。

## 细胞驯化

大多数情况下，无血清培养的HEK293细胞可以直接适应MetaCell™ HEK293-100，如果直接更换培养基（直接驯化）失败，则推荐采用梯度替换（间接驯化）的方法使HEK293细胞适应MetaCell™ HEK293-100。

注：用于驯化的HEK293细胞需要处于对数生长期的早期，且活率 $\geq 95\%$ 。

### • 直接驯化法

1. 对于可以直接驯化的细胞，当细胞活率 $\geq 95\%$ 且处于对数生长早期时，可尝试直接从无血清培养基接种到MetaCell™ HEK293-100 中。
2. 以 $0.4-0.6 \times 10^6$  cells/mL的接种密度将HEK293细胞接种至新鲜的MetaCell™ HEK293-100 中（参看细胞传代步骤）。
3. 培养3-4天后，检测细胞密度以及活率，此时细胞活率应 $\geq 95\%$ ，如果活率较低，则需要更换驯化的细胞或采用间接驯化法。
4. 继续传代3-4次，当细胞密度在接种的3-4天内达到 $3.0-4.0 \times 10^6$  cells/mL且细胞活率 $\geq 95\%$ 时，可认为驯化完成，后续可进行正常的细胞传代、转染和冻存。

### • 间接驯化法

1. 用原培养基调整待驯化细胞的密度至 $0.5-0.8 \times 10^6$  cells/mL，加入25%体积的MetaCell™ HEK293-100，使得最终细胞密度为 $0.4-0.6 \times 10^6$  cells/mL。
2. 培养3-4天后传代，传代的起始密度仍为 $0.4-0.6 \times 10^6$  cells/mL，

- (1) 如细胞生长状态良好，且活率 $\geq 90\%$ ，则传代时调整原培养基与MetaCell™ HEK293-100 的比例为 50:50;
- (2) 如细胞生长缓慢，可对细胞进行离心换液，离心条件为1000rpm，4分钟。此时的混合培养基依旧为原培养基和MetaCell™ HEK293-100 以75:25比例混合。
3. 重复步骤2并逐渐增加MetaCell™ HEK293-100 所占的比例（推荐比例 50:50, 25:75），直到使用100%的MetaCell™ HEK293-100 进行细胞培养。
4. 在100%的MetaCell™ HEK293-100 中继续培养3-5代，当细胞密度在接种的3-4天内达到 $3.0-4.0 \times 10^6$  cells/mL且细胞活率 $\geq 95\%$ 时，可认为驯化完成。
5. 驯化完成后至少传代三次以上，待细胞生长状态稳定后，方可进行后续转染或冻存实验。

### 细胞转染

在细胞转染测试开始前，细胞应完全适应MetaCell™ HEK293-100，并且以常用的接种密度传代培养。

1. 于转染前3天接种 $5.0 \times 10^5$  cells/mL活细胞密度，或可于转染前18-24小时以 $2.0-2.5 \times 10^6$  cells/mL的活细胞密度接种细胞。
2. 转染当天，活细胞密度应达到 $4.0-6.0 \times 10^6$  cells/mL，活率 $\geq 95\%$ 方可进行转染。
3. 具体转染操作请参考思鹏生物HEK293瞬时表达系统操作指南。

### 相关产品订购信息：

产品	类别	形态	目录号	包装规格
MetaCell™ HEK293-100	培养基	干粉	P2000-X010	10L
		干粉	P2000-X100	100L
		液体	L2000-1000	1000mL
MetaCell™ 293 TransFeed High-Glucose	补料	液体	L2009-0100	100mL
			L2009-1000	1000mL
MetaCell™ Titer Enhancer	添加剂	液体	L1009-0010	10mL
			L1009-0100	100mL