

# MetaCell<sup>®</sup> CHO-500

## 化学成分确定培养基

### 产品简介

MetaCell<sup>®</sup> CHO-500是为CHO细胞系而设计的用于提高重组蛋白产量的化学成分确定培养基，不含水解物、蛋白质、生长因子和任何动物源成分，适用于多种CHO细胞流加工工艺（Feed-Batch）的高产量蛋白表达和生产。本产品推荐和MetaCell<sup>®</sup> Feed-500A、MetaCell<sup>®</sup> Feed-500B搭配使用。

MetaCell<sup>®</sup> CHO-500不含谷氨酰胺及衍生物，如有需要可另行添加。

MetaCell<sup>®</sup> CHO-500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。

产品名称	产品编码	包装规格	储存条件	有效期	推荐使用范围
MetaCell <sup>®</sup> CHO-500	P1010-X010	10L	2-8°C, 密闭、避光	12个月 (暂定)	适用于CHOK1, DG44, CHO-S等细胞系的高密度培养和稳定表达
	P1010-X100	100L			
	P1010-X500	500L			

### 培养条件

培养基: MetaCell<sup>®</sup> CHO-500

细胞系: CHO-GS、CHO-K1、CHO-DG44、CHO-S

培养类型: 悬浮

培养参数设置:

摇瓶体积	125mL	250mL	500mL	1L
培养体积 (mL)	25-35	60-80	120-160	240-300
摇床转速	140 ± 5 rpm (振幅 19mm) 135 ± 5 rpm (振幅 25mm) 105 ± 5 rpm (振幅 50mm)			
摇瓶类型	PETG 或者 PC 材质, 透气, 无挡板			
培养环境	36.5 ± 0.5 °C, 5%-8% CO <sub>2</sub> , 湿度≥80%, 确保适当的气体交换并尽量避光培养			

注: 不同品牌的摇瓶, 可能有不同的培养体积范围。

### MetaCell<sup>®</sup> CHO-500配液方法 (重量配液法, 以溶液最终净重1kg为例)

1. 在干净的容器中添加900-920g的超纯水或注射用水 (水温20-30°C)。
2. 称取20.996-21.081g培养基干粉缓慢倒入培养基容器 (培养基每升标示量: 21.039g/L), 搅拌至无块状悬浮物。
3. 添加5mol/L氢氧化钠溶液8.0mL, 搅拌5分钟, 溶液应澄清。
4. 添加碳酸氢钠1.796-1.804g至培养基溶液中, 搅拌20-25分钟至完全溶解。碳酸氢钠每升标示量: 1.800g/L。
5. 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)。
6. 补加超纯水或注射用水, 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。

7. 使用0.22 $\mu$ m除菌级滤膜除菌过滤至合适容器，2-8 $^{\circ}$ C避光保存。

### 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. 从液氮罐中取出一支冻存细胞，置37 $^{\circ}$ 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，当仅剩较小冰晶后取出，冰晶在一次吹打后即会消失。
3. 15mL离心管里添加9mL提前预热的MetaCell<sup>®</sup> CHO-500，将复融后的细胞转移至15mL离心管中混匀。
4. 1000rpm离心4分钟后，弃上清液，使用已预热的新鲜MetaCell<sup>®</sup> CHO-500重悬细胞，然后全部转移至125mL摇瓶中。

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。

5. 培养3-5天，待细胞状态进入对数生长中期后，以0.4-0.6 $\times 10^6$  Cells/mL细胞密度进行传代培养。

注：若细胞复苏3-4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<sup>®</sup> CHO-500在原有细胞培养条件下预热20-30分钟。
2. 当细胞密度达到3.0-5.0 $\times 10^6$  Cells/mL且细胞活率 $\geq 95\%$ 时，即可进行传代培养。
3. 推荐的细胞接种密度为0.4-0.6 $\times 10^6$  Cells/mL。
4. 无菌转移所需的种子液至摇瓶中，并添加适量的已预热培养基，参考培养条件设置摇床参数，每3-4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，待细胞生长状稳定后方可进行后续冻存等实验。

### 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. 确定活细胞密度并计算所需冷冻保存培养基的体积，以获得最终的细胞密度 $\geq 1.0 \times 10^7$  cells/mL。
3. 准备冻存培养基（90% MetaCell<sup>®</sup> CHO-500和10% DMSO）于2-8 $^{\circ}$ C下预冷30分钟以上备用。
4. 取适量细胞悬液，1000 rpm离心4分钟，弃上清，用2-8 $^{\circ}$ C预冷的冻存液重悬。
5. 按照冻存规格，立即将细胞悬液分装至冻存管中。
6. 通过程序降温或人工控制等方式将细胞逐步降温至-80 $^{\circ}$ C冷冻状态（降温速率为1 $^{\circ}$ C/分钟）。
7. 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 $^{\circ}$ C至125 $^{\circ}$ C）储藏。

注：在液氮中储存24小时后，应抽样测试冻存管中复苏后的细胞活率。

### 细胞驯化

多数情况下，无血清培养的CHO细胞可以直接适应MetaCell<sup>®</sup> CHO-500，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CHO细胞适应MetaCell<sup>®</sup> CHO-500。

注：在开始适应过程前，细胞活率必须 $\geq 95\%$ ，且细胞处于对数生长早期。

### • 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<sup>®</sup> CHO-500中。
2. 将细胞以 $0.4-0.6 \times 10^6$  cells/mL密度从原始培养液中直接转移接种到100% MetaCell<sup>®</sup> CHO-500中（转移过程无需完全去除原培养基）。
3. 每2-3天进行传代培养，连续传代至少3-5次，如细胞增殖速率恢复到适应前水平且细胞活率高于95%，可认为细胞已经完全适应了MetaCell<sup>®</sup> CHO-500，后续可进行正常的细胞传代、转染和冻存。
4. 如直接适应方法无效，请尝试间接驯化方法。

### • 间接驯化法

1. 将细胞以 $0.4-0.6 \times 10^6$  cells/mL的活细胞密度接种。
2. 培养3-4天后传代，
  - (1) 如细胞生长状态良好，且活率 $\geq 90\%$ ，则传代时调整MetaCell<sup>®</sup> CHO-500与原培养基的比例为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MetaCell<sup>®</sup> CHO-500与原培养基以25:75比例混合。
3. 重复步骤2并逐渐增加MetaCell<sup>®</sup> CHO-500所占的比例（50:50，75:25），直到使用100%的MetaCell<sup>®</sup> CHO-500进行细胞培养。
4. 在100% MetaCell<sup>®</sup> CHO-500中继续培养2-3代，当细胞密度在接种的3-4天内达到 $3.0-5.0 \times 10^6$  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和冻存。

### 批培养测试

批培养测试开始前，细胞应完全适应MetaCell<sup>®</sup> CHO-500，并且以常用的接种密度传代培养。在整个培养过程中，应密切注意细胞活率、活细胞密度和蛋白的产量。

步骤如下：

1. 第0天，细胞接种密度 $0.4-0.6 \times 10^6$  cells/mL，125mL摇瓶装30mL培养基。
2. 置于 $36.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$ ，5%-8%  $\text{CO}_2$ ，100-110 rpm (轴距：50mm)摇床中培养。
3. 每隔一天取样作细胞计数和培养基生化检测，培养后期留样进行表达量检测。
4. 批培养过程中，应保持葡萄糖含量不低于2g/L，如果葡萄糖含量低于2g/L，补加至4g/L。（注意：本产品含6g/L葡萄糖）
5. 当细胞活率低于90%或累计培养10天，批培养结束。

产品订购信息:

产品	类别	形态	目录号	包装规格
MetaCell® CHO-500	培养基	液体	L1010-0500	500mL
			L1010-1000	1000mL
		干粉	P1010-X010	10L
			P1010-X100	100L
			P1010-X500	500L
MetaCell® Feed-500A	补料	液体	L1011-0100	100mL
			L1011-0500	500mL
		干粉	P1011-X001	1L
			P1011-X020	20L
			P1011-X100	100L
MetaCell® Feed-500B	补料	液体	L1012-0100	100mL
		干粉	P1012-X001	1L
			P1012-X010	10L
			P1012-X025	25L
			P1012-X100	100L
MetaCell® Feed-500A High Glucose	补料	液体	L1017-0100	100mL
			L1017-0500	500mL
		干粉	P1017-X001	1L
			P1017-X010	10L
			P1017-X050	50L



www.cellplusbio.com

地址：江苏省苏州市高新区大同路20号A3幢

电话：0512-67332699

邮箱：Service@cellplusbio.com