

产品名称:	Wayne293™ 瞬转培养基, 悬浮, 无动物源成分
货号:	A21501
规格:	1000mL
形式:	液体
储存温度:	2~8° C
有效期	12个月 (生产日期见产品包装)

## 简介

Wayne293™ 瞬转培养基是一款针对人类胚胎肾细胞293(HEK293)和其衍生细胞系瞬时表达所研发的无血清、无动物成分培养基。适用于 HEK293 系列细胞的悬浮培养以及瞬时化学转染。该培养基可以实现细胞快速增殖及高密度培养, 并可直接在培养体系中进行化学转染及蛋白表达, 全程需换液, 便于使用。此培养基配方中不含次黄嘌呤、胸苷及 L-谷氨酰胺。

## 组分

L-谷氨酰胺	4mM
葡萄糖	6.0 g/L
次黄嘌呤&胸苷	不含
酚红	不含
碳酸氢钠	1.90g/L
水解产物	含有

## 产品特点

在处理或补充培养基时使用无菌技术。本产品用于研究或进一步制造使用。

警告: 不用于人类或动物治疗用途。超出规定范围的使用可能会触犯当地法律。

## 安全信息

阅读物料安全数据表(MSDS)并依据相关的安全操作规范, 佩戴适当的护目镜, 洁净服, 口罩和手套等。

## 用前准备

- Wayne293™ 瞬转培养基的使用需要无菌。
- 含 L-谷氨酰胺, 开瓶即用。
- 不推荐使用抗生素。
- 开封后未用完的培养基应进行分装, 使用封口膜封口, 在 2~8°C 避光干燥保存。

产品外包装副标提供一组印有产品信息的不干胶便签, 可撕下使用, 便于分装标记及实验记录。

## 培养条件

培养基: Wayne293™ 瞬转培养基

细胞系: HEK293、HEK293T、HEK293F、HEK293FT

培养类型: 悬浮

培养容器: 摇瓶/TPP/反应器

温度范围: 37°C±0.5

培养箱气体要求: 5% CO<sub>2</sub> 的加湿培养

培养箱转速要求: φ26mm, 125rpm

注意: 确保适当的气体交换和最小化的曝光培养。

## 细胞驯化

少数 HEK293 细胞因长期适应原培养条件, 需要经过一个简单的顺序驯化过程来适应。

从原培养体系向 Wayne293™ 瞬转培养基驯化之前, 务必确保细胞处于对数生长期且活率 > 90%。

### 直接接种

将悬浮培养细胞转移到 Wayne293™ 瞬转培养基中, 如下:

- 1000rpm 离心细胞悬浮液 3~5 分钟。吸出并丢弃上清液;
- 以  $5 \times 10^5$  cells/mL 的活细胞密度将细胞沉淀重悬于预热的 Wayne293™ 瞬转培养基中并转移至合适的培养容器;
- 放回摇床并监测细胞生长。

注意: 如果使用直接接种方法观察到细胞生长或转染效率不理想, 则使用顺序驯化方法。

### 顺序驯化

按照以下程序进行细胞悬浮培养的步骤:

- 使用  $5 \times 10^5$  cells/mL 的接种密度;
- 逐步调整 Wayne293™ 瞬转培养基与原始培养基的细胞培养比例 (25: 75, 50: 50, 75: 25, 90: 10, 然后是 100% Wayne293™ 瞬转培养基)。每个步骤视情况可多次传代;

在 100% Wayne293™ 瞬转培养基中几次传代后, 活细胞密度应超过  $2 \times 10^6$  cells/mL, 倍增时间约 24~30h, 培养 4~6 天

内存活率≥85%。至此，细胞即已适应 Wayne293™ 瞬转培养基。请按以下步骤冻存细胞备用。

### 冷冻保存

准备好所需数量的细胞，在活率>90%的对数生长中期阶段进行冻存。

1. 以 92% Wayne293™ 瞬转培养基与 8% DMSO 的混合液作为冷冻保存培养基，并储存于 2°C 至 8°C 直至使用；
2. 确定活细胞密度，并计算出冷冻保存培养基所需的体积，使最终冻存密度为  $1 \sim 3 \times 10^7$  cells/mL；
3. 通过 1000rpm 离心 3~5 分钟收获细胞，将细胞沉淀悬浮在预定体积的 2°C 至 8°C 的冷冻保存培养基中；
4. 根据规格（即 2 mL 冷冻管可放置 1~1.5 mL 细胞液）立即将细胞悬浮液的分装到冻存管中；
5. 按照标准程序（每分钟降低 1°C），在自动或手动控制速率冷冻设备中实现冷冻保存。将冷冻细胞转移到液氮中，存储在 -200°C 至 -125°C。

**注意：**在液氮中储存 24 小时后取出一只检查冷冻保存细胞的活率及其它指标。请参阅“细胞复苏”。

### 细胞复苏

1. 在 37°C 水中快速解冻 (<2 分钟) 冻存管中的细胞液；
2. 将细胞液转移至 15 mL 离心管中，加入 10mL 预热的 Wayne293™ 瞬转培养基，1000rpm 离心 3 分钟，丢弃上清液，使用 5 mL Wayne293™ 瞬转培养基重悬，计数；
3. 将冷冻管的全部细胞液转移到装有 15 mL 预热的完全 Wayne293™ 瞬转培养基的 125 mL 摇瓶中，稀释至所需细胞密度；
4. 在含有 5% CO<sub>2</sub>，37°C，加湿的培养箱或摇床进行培养。（培养时拧松瓶盖（或使用通气盖）以进行气体交换）；
5. 细胞复苏后培养 2~3 天处于对数生长中期时传代。在进行其它实验之前，复苏的细胞至少应进行三次传代。

### 细胞增殖

1. 使用自动细胞计数仪或其它计数仪器进行细胞计数，根据需要的接种密度或者按比例接种传代；
2. 种子瓶接种密度为  $5 \times 10^5$  cells/mL；
3. 继续置于 37°C、5% CO<sub>2</sub> 的培养摇床中培养，通常 2~3 天后可进行下一次传代。

### 转染前细胞准备

1. 按上述步骤，使用 Wayne293™ 瞬转培养基复苏及增殖

细胞，至细胞密度为  $1 \sim 2 \times 10^6$  cells/ml。

2. 计数，用 Wayne293™ 瞬转培养基将细胞稀释至  $1 \times 10^6$  cells/ml，得细胞悬液备用。

### 瞬时化学转染

按以下比例准备试剂，每 100ml 细胞悬液中应加入：

转染混合液	6ml
A 组分	
PBS	3ml
DNA	100ug
B 组分	
PBS	3ml
PEI	400ug

1. 向两份 3ml 的磷酸盐缓冲液 (PBS, pH 7.4) 中分别加入待转染 DNA 100ug (总量) 和 PEI 转染试剂 400ug (总量)，充分混匀，静置 5min，即为 A、B 组分；
2. 将 A、B 组分混合，充分混匀，静置 10min，即为转染混合液；
3. 将转染混合液 6mL 逐滴全部加入到 100ml 细胞悬液中，边加入边摇匀。

### 蛋白表达及收获

请参阅“培养条件”及“细胞增殖”步骤，将转染后的细胞继续培养 5~7 天（延长培养时间需考虑补料策略）。收集上清，检测及纯化表达产物。

### 相关产品

货号	中文品名
A21001	QuaCell® HEK293 CD 培养基，液体
A22001	QuaCell® HEK293 CD 培养基，干粉

### 标签图例

		
过滤除菌	有效期至	储存温度
		
批号	干燥保存	避光保存
		
研究及制造用	体外诊断用	不干胶便签

**问题解决**

可能出现的问题	原因	解决方法
细胞复苏后活率低	储存不当	重新建库并保存在液氮中
		以 $1 \times 10^7$ 细胞密度冻存细胞
	细胞建库质量不佳	使用 92% Wayne293™ 瞬转培养基+8%DMSO 冻存细胞
		使用传代次数较低的细胞进行建库
细胞生长缓慢	培养基转换	使用 Wayne293™ 瞬转培养基驯化传代二至三代
	摇床设定	在 37°C, CO <sub>2</sub> 含量为 5% 的条件下培养
	摇瓶选择	使用总容量为培养基体积 2.5 倍的摇瓶
	细胞过老	使用传代次数不超过 30 代的细胞避免细胞状态发生变化
	细胞结团	使用 Wayne293™ 驯化传代细胞, 注意传代前细胞密度不要超过 $2 \times 10^6$
转染效率/蛋白收率低	细胞传代次数过高	使用传代次数不超过 30 代的细胞
	培养基中加入抗生素	请勿在培养基中加入抗生素
	转染试剂储存不当	请将转染试剂储存在 4°C, 不要冷冻
	混匀不当	轻柔搅拌均匀, 请勿震荡
	质粒回收质量不高	请注意回收质粒的质量, 尽量采用低内毒素的质粒
	DNA 未除菌	使用除菌后的 DNA
	DNA 回收溶液	使用超纯水溶解回收 DNA
	外源基因的毒性	考虑外源基因表达蛋白的细胞毒性
	太早或太晚收获蛋白	过早或过晚收获蛋白都会造成收率偏低