**ACE 293 SFM使用说明书**

【产品名称】：ACE 293 SFM

【产品货号】：ACE04101

【包装规格】：1000ml

【主要成分】：该产品为无血清培养基，化学成分明确，

主要含葡萄糖、丙谷二肽、氨基酸、无机盐及微量元素等。

**【适用范围】：仅限于科研使用，不适于临床诊断和治疗。**

【预期用途】：本产品为化学成分明确无血清细胞培养液，适用HEK293及其它293细胞的中、高密度悬浮培养及重组蛋白质表达。

【运输要求】：湿冰运输

【存储条件及有效期】：2~8℃避光保存，有效期9个月

【使用方法】

|  |
| --- |
| **温馨提醒：****（1）产品切勿紫外照射；****（2）使用前无需预热处理；****（3）储存培养基请使用医用冰箱，切勿冷冻。** |

# 细胞的换液与传代

1. 新收到的常温细胞应马上转移至合适的无菌摇瓶中（培养液体积应控制在摇瓶容量规格的五分之一以内），置于摇床中震荡培养。待细胞密度恢复至3-6×106 cells/ml时，可进行传代培养或细胞冻存；
2. 从液氮罐中取出的冻存细胞或用干冰运输的细胞请依照下述**（2.细胞的冻存与复苏）**方法进行细胞复苏和培养；
3. 细胞传代时，需先做细胞计数，确认密度后无需离心细胞，可直接将细胞悬液依照所需比例兑入培养液中。传代后的细胞密度应控制在在0.3×106 cells/ml左右，一般每4天需传代1次，或传代密度为0.6×106 cells/ml，一般每隔3天需传代1次。本培养液可支撑的最高细胞密度约为13×106 cells/ml，细胞在达到此密度时存活率一般仍可保持在95%以上；
4. 若在震荡培养过程中出现死细胞过多的状况，可接种低细胞密度（5×105cells/ml以下）进行静置培养，待细胞恢复到正常活率后再进行震荡培养。

# 细胞的冻存与复苏

## 2.1冻存

1. 用细胞培养液制备7.5% 二甲基亚砜（DMSO）细胞冻存液，或使用珠海恺瑞即用型无血清细胞冻存液KD-Freeze（货号K60001）；
2. 将细胞培养至对数生长期（密度约为6×106 cells/ml左右），计数并离心收集细胞；
3. 用细胞冻存液将离心的细胞以5-20×106 cells/ml的浓度重悬；
4. 将细胞悬液分装到标记好的冻存管内，确保拧紧管盖使其完全密封；
5. 将冻存管放置于-80℃冰箱中缓慢降温；
6. 次日将冻存管转移至液氮内长期保存。此细胞转移过程需尽可能快速完成（建议在2min内），如果在此过程中冻存管温度升至-50℃以上，细胞则可能会迅速受损。

## 2.2复苏

1. 从液氮罐、干冰或超低温冰箱中取出细胞冻存管，立刻放置于37℃的温水中，直至管内冰晶完全融化；
2. 解冻后用75%乙醇彻底擦拭冻存管，用移液枪将管内细胞悬液全部转移至一个50ml的无菌离心管中，缓慢加入细胞培养液，至其终体积为20ml；
3. 1000rpm离心5min，弃去含有冻存液的上清液。如使用珠海恺瑞无血清细胞冻存液，可直接将复苏后的细胞转移至已添加AC 293 SFM培养液的摇瓶中重悬即可；
4. 细胞中加入一定量的新鲜培养液，使细胞密度为0.6-1.0×106 cells/ml，接种于摇瓶中震荡培养；
5. 培养3-6天后对细胞进行计数，观察细胞密度和存活率是否上升。若细胞密度达到3-6×106 cells/ml，可对细胞进行传代，一般细胞传代1-2次后即可恢复正常的生长状态；
6. 若化冻后细胞密度过低，可先接种于培养瓶中静置培养，待其密度恢复至0.6-1.0×106 cells/ml时，再转移至培养箱摇床中震荡培养。

|  |
| --- |
| **操作要点及注意事项：**1.培养箱摇床参数设置建议：温度36-37℃，CO2浓度为5%，转速≤120rpm（振幅26）；不同振幅摇床计算公式如下：如振幅是50，按照公式计算：m×ω12×$\frac{26}{2}$=m×ω22×$\frac{50}{2}$ ，所以ω1和ω2的关系是：ω1≈1.4ω2，就是86rpm左右。2.如使用其它品牌培养基，建议逐步过渡到AC 293 SFM，让细胞持续传代数周时间，观察细胞活率及扩增速度，等细胞恢复正常生长状态后，再做下一步实验。3.细胞密度及活率降低（1）当细胞存活率为80%-95%时：将细胞离心去上清，用新鲜培养液重悬，使其密度为3×106 cells/ml，接种于摇瓶中振荡培养。每天观察细胞是否增殖，若有增殖，继续培养，直至细胞密度为9×106 cells/ml时方可传代。传代密度继续使用3×106 cells/ml，直至细胞存活率恢复至95%以上时，可将传代密度恢复至0.3-0.6×106 cells/ml。（2）当细胞存活率为60%-80%时：将细胞离心去上清，用新鲜AC 293 SFM重悬，使其密度为0.5×106 cells/ml，接种于培养瓶中静置培养。每两天观察一次细胞是否生长，若细胞有生长，继续培养至细胞密度为2.0×106 cells/ml，传代至0.5×106 cells/ml于培养瓶中静置培养。重复上述过程，直至细胞活率大于90%时，可转移至摇瓶中培养，此时接种密度应不低于2.0×106 cells/ml。在静置培养过程中若发现有细胞贴壁，可继续培养。当细胞密度达到一定程度时，部分细胞会自然脱落，继续贴壁的细胞则可以借助移液管的轻微吹打脱离培养瓶。（3）细胞存活率小于60%时：丢弃细胞，重新获取细胞。4.细胞结团：检查是否在培养液中添加了其它物质，若使用可重复使用的玻璃摇瓶，需检查瓶子是否清洗干净。如果结团细胞成球状，可能是因为添加了其它外源物质或洗涤剂；如果结团细胞成片状或不规则的松散结构，可能是因为摇瓶有上一次培养时没洗干净的残留物粘附于瓶身，或因细胞成活率较低所致。 |