**ACE CHO SFM使用说明书**



【产品名称】：ACE CHO SFM

【产品货号】：ACE06101

【包装规格】：1000ml

【主要成分】：该产品为无血清细胞培养基，主要含糖类、

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、适用CHO及其它CHO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

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

【使用方法】：

# 细胞的换液与传代

1. 新收到的常温细胞应立即转移至合适的摇瓶中（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. 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，一般每4天需传代1次；或传代密度为0.6×106 cells/ml，每隔3天传代1次。本培养液可支撑的最高细胞密度约为1×107 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数过多的状况，可接种低细胞密度进行静置培养，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；
2. 将细胞培养至对数生长期（密度约为6×106 cells/ml），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；
4. 用新鲜的ACE CHO SFM培养液重悬细胞，使其密度为0.6-1.0×106 cells/ml，接种于摇瓶中震荡培养。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；
5. 使用珠海恺瑞无血清细胞冻存液（KD-Freeze）冻存的细胞，可直接复苏融化后转移至已添加AC 293 SFM培养液的摇瓶中重悬即可，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。
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，再置于培养箱摇床中震荡培养。

|  |
| --- |
| **操作要点及注意事项：**1.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.如细胞此前在其它品牌培养基培养，建议逐步过渡到AC CHO SFM，让细胞持续传代数周时间，等细胞恢复正常生长状态再做下一步实验。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 CHO 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2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后，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，此时接种密度应不少于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.细胞结团检查是否往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细胞成活率较低。 |