

Eden B601S 基础培养基

产品型号：B601S

用户手册

目录

产品描述	2
应用范围	2
产品配方	2
产品保存	2
液体培养基配制	2
细胞冻存	3
细胞复苏	4
细胞传代	4
细胞驯化	4
流加培养	5
灌流培养	5
相关产品	6

产品描述

Eden B601S 基础培养基是上海倍谙基生物科技有限公司自主开发、研制和生产的化学成分明确、无蛋白、无动物源的基础培养基。该基础培养基适用于不同亚型中国仓鼠卵巢细胞 (Chinese Hamster Ovary cells, CHO) 的冻存、复苏、传代、流加培养以及灌流培养过程。与 Eden 系列流加培养基 (详见“相关产品”) 联用, 可支持细胞高密度生长及维持, 实现更高水平的蛋白表达和质量。

应用范围

本产品可适用于 CHO-K1、CHOS、CHO DG44、CHO DUX11 等细胞的培养。

本产品可用于科学研究及生物药的大规模生产过程, 但不能直接用于人体或医疗用途。

产品配方

Eden B601S 基础培养基配方知识产权为上海倍谙基生物科技有限公司所有。

产品成分声明

本品包含:

☑ 碳水化合物、氨基酸、维生素、金属离子、核苷类物质等营养成分。

☑ 6.30 g/L 的葡萄糖, 1.00 g/L 的 P188。

本品不包含:

☒ 水解物、细胞因子、谷氨酰胺、抗生素、HEPES、酚红等营养成分。

☒ 动物来源的原材料。

产品保存

- 保存于 2-8°C、干燥避光的环境中。
- 本产品极易吸潮, 开封后应立即使用, 如需继续保存使用, 建议将袋中空气尽可能排尽后, 采用热封、密封夹等手段严格密封开启处, 以防产品受潮失效。
- 当本产品严重受潮结块或保存时间超过保质期, 建议弃用。

液体培养基配制

定容配制

根据表 1 所示配方配制 Eden B601S 基础培养基^[1]。

组分	浓度
Eden B601S 基础培养基干粉	22.80 g/L ^[2]
碳酸氢钠	2.20 g/L

表 1. Eden B601S 基础培养基配制表

- 1) 按最终培养基配制体积的 90 % 取相应体积的水至培养基配制容器。配液用水应使用纯化水、超纯水或注射用水, 配制过程中水温应控制在 20-30 °C。开启培养基配制容器的混合系统 (建议混合系统单位体积输入功率大于 10 W/m³), 充分搅拌, 搅拌时应避免气泡的产生。
- 2) 按 22.80 g/L 浓度比例准确称取相应质量的 Eden B601S 基础培养基干粉, 加入步骤 1) 配制容器中, 充分搅拌 15 min 以上。
- 3) 使用 5-10 mol/L 氢氧化钠溶液将 pH 缓慢调节至 6.0-6.5, 充分搅拌 15 min 以上, 此时溶液应为澄清透明。

- 4) 称取 2.20 g/L 的碳酸氢钠粉末，靠近液面缓慢加入配制容器中，搅拌 10 min 以上，使用配液用水定容至 100%配液体积，继续搅拌 10 min。
- 5) 若此时培养基溶液的 pH 值不在 7.0-7.4 的范围内，使用稀盐酸或稀碱液将 pH 调节至 7.0-7.4 的范围内。
- 6) 建议使用脉冲泵或压缩空气 (3-15 psi) 经 0.22 μ m 或 0.2 μ m 孔径的聚醚砜(PES)无菌滤膜对 Eden B601S 基础培养基溶液进行无菌过滤。
- 7) 过滤后的培养基液体应立即使用或存放于玻璃瓶、培养基瓶 (PET) 或具有隔氧涂层的一次性储液袋中，2-8 $^{\circ}$ C 的避光环境中，有效期为 6 个月。

注：

^[1] 以上配液参数 (如搅拌时间等) 供研发小规模配液参考。大规模生产配液时，请根据配制容器的搅拌能力设置适当的配液参数，以便培养基干粉充分溶解。

^[2] 上述“g/L”单位均为体积浓度 (溶质质量/溶液体积)。

定量配制

根据表 2 所示配方配制 Eden B601S 基础培养基^[3]。

组分	浓度
Eden B601S 基础培养基干粉	21.99 g/kg ^[4]
碳酸氢钠	2.12 g/kg

表 2. Eden B601S 基础培养基配制表

- 1) 按最终培养基配制重量的 90 %取相应重量的水至培养基配制容器。配液用水应使用纯化水、超纯水或注射用水，配制过程水温应控制在 20-30 $^{\circ}$ C。开启培养基配制容器的混合系统 (建议混合系统单位体积输入功率大于 10 W/m³)，充分搅拌，搅拌时应避免气泡的产生。
- 2) 按 21.99 g/kg 浓度准确称取相应质量的 Eden B601S 基础培养基干粉，加入步骤 1) 的配制容器中，充分搅拌 15 min 以上。
- 3) 使用 5-10 mol/L 氢氧化钠溶液将 pH 缓慢调节至 6.0-6.5，充分搅拌 15 min 以上，此时溶液应为澄清透明。

- 4) 称取 2.12 g/kg 的碳酸氢钠粉末，靠近液面缓慢加入至配制容器中，搅拌 10 min 以上，使用配液用水量至 100%配液质量，继续搅拌 10 min。
- 5) 若此时培养基溶液的 pH 值不在 7.0-7.4 的范围内，使用稀盐酸或稀碱液将 pH 调节至 7.0-7.4 的范围内。
- 6) 建议使用脉冲泵或压缩空气 (3-15 psi) 经 0.22 μ m 或 0.2 μ m 孔径的聚醚砜(PES)无菌滤膜对 Eden B601S 基础培养基溶液进行无菌过滤。
- 7) 过滤后的培养基液体应立即使用或存放于玻璃瓶、培养基瓶 (PET) 或具有隔氧涂层的一次性储液袋中，2-8 $^{\circ}$ C 的避光环境中，有效期为 6 个月。

注：

^[3] 以上配液参数 (如搅拌时间等) 供研发小规模配液参考。大规模生产配液时，请根据配制容器的搅拌能力设置适当的配液参数，以便培养基干粉充分溶解。

^[4] 上述“g/kg”单位均为质量浓度 (溶质质量/溶液质量)。

液体培养基理化指标参考标准

指标	单位	参考标准
pH 值		7.0 – 7.4 ^[5]
渗透压	mOsm/kg	280 – 320
浊度	NTU	< 4.00

表 3. 液体培养基理化指标参考标准

注：

^[5] 本品为二氧化碳/碳酸氢钠缓冲体系，应严格控制使用过程中液体培养基的 pH 值在参考标准范围内。以下操作会导致出现 pH 值缓慢上升的情况，如在配液过程中搅拌时间过长或在生物反应器未进行 pH 控制的条件下进行长时间的通气。如 pH 值高于参考标准上限，存在金属离子析出风险，进而影响产品表现。

细胞冻存

- 1) 取处于指数生长期中期，活率大于 90%，镜检无菌的细胞，100 \times g 离心 5-10 min。

- 2) 将步骤 1) 离心获得的上清液、新鲜 Eden B601S 基础培养基以及 DMSO 以 41:41:8 比例无菌混合, 配制冻存培养基。
 - 3) 将步骤 1) 离心获得的细胞使用冻存培养基重悬, 重悬后控制活细胞密度大于 1×10^7 cells/mL。
 - 4) 根据项目具体需求, 将步骤 3) 重悬液保存于适宜规格的冻存管中。
 - 5) 使用程序降温仪或冻存盒等方式进行降温冻存处理, 建议降温速率为 $0.5-1^\circ\text{C}/\text{min}$ 。
 - 6) 将降温冻存处理后的细胞及时转移至液氮罐中保存。
- 3) 将摇瓶放置于 37°C , 5-8% CO_2 , 饱和湿度, 转速为 115-135 rpm, 振幅为 50 mm 的细胞培养摇床中培养。
 - 4) 每 2-4 天按照上述步骤进行传代培养, 也可参考现有实验室细胞传代流程。

细胞驯化

直接驯化

- 1) 对于已生长在无血清培养基中的细胞, 可以直接接种到 Eden B601S 基础培养基中, 接种密度为 $0.4-0.6 \times 10^6$ cells/mL 的活细胞密度。
- 2) 按照“细胞传代”方案传代细胞, 直至细胞比生长速率 (或细胞倍增时间) 稳定且接近或大于原培养体系相关参数值, 细胞活率 $>90\%$, 可以认为细胞已适应 Eden B601S 基础培养基。

梯度驯化

- 1) 对于生长在低血清/有血清或部分无血清的细胞, 采用梯度驯化法, 接种密度应控制在 $0.4-0.6 \times 10^6$ cells/mL 的活细胞密度^[6]。
- 2) 用 Eden B601S 基础培养基:原始培养基=25:75 的比例配制而成的培养基传代细胞, 每 2-4 天传代一次, 直至在该比例的培养基中细胞生长良好。
- 3) 依次在 Eden B601S 基础培养基:原始培养基=50:50、75:25、90:10 以及 100:0 的比例配制而成的培养基中, 每 2-4 天传代驯化细胞, 待在该比例的培养基中细胞生长良好转至下一个比例的培养基中。
- 4) 在完全使用 Eden B601S 基础培养基后, 细胞比生长速率 (或细胞倍增时间) 稳定且接近或大于原培养体系相关参数值, 细胞活率 $>90\%$ 时, 可以认为细胞已适应 Eden B601S 基础培养基。

注:

^[6] 如多次传代后, 细胞生长仍未恢复, 可采用离心或沉降接种方式提高接种密度至 $1.0-1.5 \times 10^6$ cells/mL 的活细胞密度, 有利于细胞的梯度驯化过程。

细胞复苏

- 1) 将冻存管快速置于 37°C 水浴中, 融化冷冻的细胞。
- 2) 将细胞悬液转入到 50mL 含有 10-15 mL 预热过的 Eden B601S 基础培养基的离心管中, $100 \times g$ 离心 5-10 min, 丢弃上清。
- 3) 使用预热过的 Eden B601S 基础培养基重悬细胞, 并转移至 125 mL 摇瓶或 50 mL 摇管中, 活细胞密度应控制在 $0.5-1 \times 10^6$ cells/mL。
- 4) 将 125 mL 摇瓶或 50 mL 摇管放置于 37°C , 5-8% CO_2 , 饱和湿度, 转速为 115-135 rpm (摇瓶) 或 215-225 rpm (摇管), 振幅为 50 mm 的细胞培养摇床中培养。
- 5) 细胞至少传代适应 2 次, 待细胞比生长速率 (或细胞倍增时间) 达到稳定后, 可进行后续操作。

细胞传代

- 1) 取处于指数生长期中期, 活率大于 90%, 镜检无菌的细胞进行传代。
- 2) 按接种密度为 $0.4-0.6 \times 10^6$ cells/mL 的活细胞密度, 将种子液与已预热的 Eden B601S 基础培养基按适当比例混合, 并转移至适宜规格的摇瓶中。

流加培养

培养体系

摇瓶或摇管。

培养摇床的参数设置

培养温度为 37°C, 5-8% CO₂, 饱和湿度, 摇瓶转速为 115-135 rpm, 摇管转速为 215-225 rpm, 细胞培养摇床的振幅为 50 mm。

流加策略

- 1) 将稳定传代的细胞以稀释方式直接接种于 Eden B601S 基础培养基中, 活细胞密度控制在 $0.5-0.7 \times 10^6$ cells/mL。
- 2) 建议的流加策略^[7]如表 4 所示。通过流加培养基 a 和葡萄糖浓缩液的方式将整个培养过程中残糖浓度控制在 2 g/L 以上。
- 3) 培养 14 天或者活性低于 50%时结束培养过程。

注:

^[7] 流加策略: a、可参考原工艺维持阶段最大活密度以及对细胞生长情况的了解选择表 4 中推荐的流加方案; b、过程中存在降温操作, 则应当降低表 4 中推荐流加方案中的流加量; c、如选择提高接种密度, 应当适当提前第一次流加的时间; d、如已有优化的流加策略(含温度控制, pH 控制, 流加策略等), 可按照已优化的细胞培养工艺使用 Eden 系列培养基。

^[8] 流加培养基搭配详见“相关产品”或咨询倍谱基技术部门, 流加培养基的流加量均以初始接种体积的百分比计算。

条件	流加培养基 ^[8]	D3	D5	D7	D9	D10	D11	D12	D13
维持最大活细胞密度	流加 a (%)	4	4	4-5	4-5	/	4-5	/	3-4
	流加 b (%)	按照流加 a:流加 b=10:1 的比例流加							
2~3×10 ⁷ cells/mL	流加 a (%)	4	4	5-6	5-6	/	4-5	/	4
	流加 b (%)	按照流加 a:流加 b=10:1 的比例流加							
大于 3×10 ⁷ cells/mL	流加 a (%)	4	4-5	6	3-4	3-5	3-5	3-5	3-4
	流加 b (%)	按照流加 a:流加 b=10:1 的比例流加							

表 4. 推荐流加策略

灌流培养

培养体系

摇管。

培养摇床的参数设置

培养温度为 37°C, 5-8% CO₂, 饱和湿度, 摇管转速为 250-300 rpm, 细胞培养摇床的振幅为 50 mm, 培养体积 10-15 mL/摇管。

灌流培养基配制

将 Eden B601S 基础培养基和流加培养基 a (详见“相关产品”)以 95:5 的体积比进行混合。

灌流策略

- 1) 将稳定传代的种子细胞以稀释接种的方式接种于 Eden B601S 基础培养基中, 活细胞接种密度为 $0.4-0.6 \times 10^6$ cells/mL。待活细胞密度长至 $3-5 \times 10^6$ cells/mL 后, 开启灌流。
- 2) 具体灌流操作方法: 每天通过离心的方式弃掉上清, 并用与初始工作体积等量的灌流培养基重悬细胞, 然后加入 0.5%(v/v)的流加培养基 b(详见“相关产品”)。
- 3) 当活细胞密度达到 $10-20 \times 10^6$ cells/mL 以及 $50-60 \times 10^6$ cells/mL, 可适当提高灌流培养基中流加培养基 a 比例以及提高流加培养基 b 的添加量。
- 4) 灌流培养过程中应控制残糖浓度大于 2 g/L。

相关产品

产品名称	产品类别	产品货号	形态	体积	包装	备注
Eden B601S	基础培养基	FG0115601	粉体	200 L	袋	适用于 CHO-K1、CHOS、CHO DG44、CHO DUX11 等细胞的冻存、复苏、传代、流加培养以及灌流培养过程。
		FG0115603	粉体	10 L	袋	
Eden F602aS	流加培养基 a	FG0115701	粉体	20 L	袋	培养非 GS 系统细胞建议在基础培养基中添加 4-8mM 的 L-谷氨酰胺。
		FG0115702	粉体	1 L	袋	
Eden F600bS	流加培养基 b	FG0108801	粉体	10 L	袋	培养细胞因子依赖细胞建议在基础/流加培养基 a 中额外添加细胞因子。
		FG0108802	粉体	1 L	袋	



扫码了解 Eden 系列产品详情

如需了解更多产品和技术信息，就近联系倍谙基。

欢迎拨打 86-21-68582660

或登录 www.bio-engine.com.cn

上海倍谙基生物科技有限公司

上海市闵行区绿洲环路 396 弄 3 号楼 4 层

Tel: 021-68582660

www.bio-engine.com.cn

