

HEK293 Suspension Serum - free  
Medium

# HEK293 全悬浮无血清培养基

## | 使用说明文件 |

— Instruction manual —



YOCON

使用前请仔细阅读本操作说明

友康厚德生物制品（北京）有限公司

**YOCON 友康<sup>®</sup>**

# HEK293 全悬浮无血清培养基使用说明书

## 【产品名称】

HEK293 全悬浮无血清培养基

## 【用途与描述】

该培养基用于悬浮 HEK293 细胞 (如 293T、293S、293E、293F) 的连续培养以及外源基因的瞬时表达。本产品不仅可以支持 HEK293 细胞的高密度扩增及连续稳定传代培养, 在其中进行转染的 HEK293 细胞可以表现出出色的转染效率, 高效表达外源蛋白以及进行病毒的包装。

本品中无动物血清, 含有少量蛋白组分, 化学成分明确。

## 【产品主要成分及设计原理】

在诸如 RPMI-1640、DMEM/F12 等培养基的基础之上, 添加重组转铁蛋白、重组人白蛋白、重组胰岛素、氨基酸、维生素、微量元素等物质, 可直接培养悬浮驯化的 HEK293 细胞, 培养基中添加了防剪切力物质, 最大程度地减少细胞在悬浮培养过程中受到的损伤, 以维持更高的活力。

## 【产品参数及性能指标】

(特别说明: 由于细胞来源及细胞培养代数不同, 培养基表现出的性能可能会有所差异。我们使用现有细胞株进行多次实验验证, 给出以下性能指标。)

支持的细胞密度: $1.0-1.2 \times 10^7$ cells/mL	转染效率: 70-95%
外观: 淡黄色澄清液体	规格: 1000 mL/ 瓶
渗透压: 270-310 mOsm/kg	pH: 25 °C时, 6.9-7.4
保质期: 12 个月	保存条件: 2-8°C, 避光

## 【使用说明】

注: 实验操作之前将待用的培养基提前从冰箱中取出, 置于无菌操作台或培养箱中预温。

可将培养基分装成小份进行平衡, 原瓶在 2-8°C 存放。

### 直接替换 (以 125 mL 摇瓶培养体系为例)

通常情况下, 在传统血清培养基中培养的 HEK293 细胞或者在其他无血清培养基中培养的 HEK293 细胞可以直接传代至友康 HEK293 全悬浮无血清培养基 (以下称为“友康 293 培养基”) 中进行培养。具体操作如下:

1. 为控制细胞接种密度在  $0.5 \times 10^6$  cells/mL 左右, 先对悬浮细胞计数, 根据计数结果收取所需体积的细胞悬液至 15 mL 或 50 mL 离心管中。
2. 转速 170g 离心 3min, 弃去细胞上清液。同时准备一个新细胞摇瓶, 并向其中加入 25 mL 友康 293 培养基。

3. 向离心管中加入 5 mL 友康 293 培养基重悬细胞，并将细胞悬液加入新摇瓶中。

4. 细胞培养环境为 8%CO<sub>2</sub>，37°C，转速为 100rpm( 振幅 50mm)。通过细胞密度和活率指标对细胞生长状态进行监测。(直接替换过程中可能会出现接种后第 1 天计数细胞密度没有增长或下降的现象，此现象正常，2-3 天后即可恢复正常生长。)

5. 待细胞生长至对数生长期后，再次传代。进入正常培养程序。

### 逐步替换 (以 125 mL 摇瓶培养体系为例)

极少数情况下，直接替换为友康 293 培养基后细胞不能正常生长，具体表现为传代后细胞状态变差，死亡率逐渐变高，形态不再呈现规则的圆形。这种情况下，建议改用逐步替换的方法。具体操作如下：

1. 待细胞长至对数生长期，按照接种密度  $1 \times 10^6$  cells/mL 进行传代。离心去除细胞培养上清后，按照 25% 友康 293 培养基 +75% 原培养基混合后对细胞进行重悬和培养。

2. 重复上一步操作，让细胞在 25% 友康 293 培养基中再适应一代。

3. 待细胞长至对数生长期 (大约 2 天后)，再次离心传代，采用 50% 友康 293 培养基 +50% 原培养基培养细胞。

4. 待细胞长至对数生长期 (大约 2 天后)，再次离心传代，采用 75% 友康 293 培养基 +25% 原培养基培养细胞。

5. 待细胞长至对数生长期 (大约 2 天后)，再次离心传代，采用 90% 友康 293 培养基 +10% 原培养基培养细胞。

6. 待细胞长至对数生长期 (大约 2 天后)，再次离心传代，采用 100% 友康 293 培养基培养细胞，进入正常培养程序。

### 细胞复苏 (以 1mL 冻存体积、 $1 \times 10^7$ cells/mL 冻存密度为例)

1. 复苏细胞前 15 min 取友康 293 培养基 20 mL 于 125 mL 摇瓶中，放入 37°C 培养箱预温备用。

2. 取 10 ml 提前准备好室温平衡的 PBS 于 15 ml 离心管中，备用。

3. 从液氮中取出冻存的细胞，迅速放入 37°C 水浴中，镊子夹住冻存管在水浴锅中不停晃动，直至细胞即将全部融化 (1min 内)，快速将其转移至无菌操作台。

4. 溶解的细胞悬液加入室温平衡好的 PBS 中。

5. 170g 离心 3 min，除尽上清，用上述预温好的友康 293 培养基重悬细胞。

6. 37°C、8%CO<sub>2</sub> 摇床中培养，摇床转速 100rpm( 振幅 50mm)。

### 细胞计数

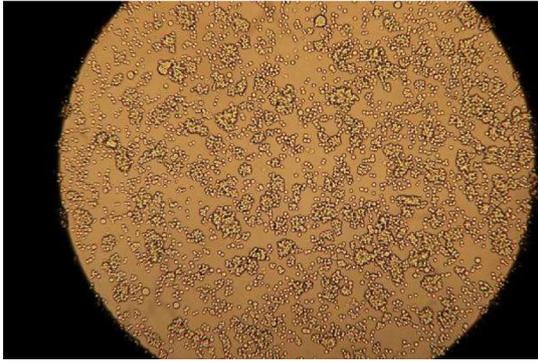
由于悬浮 HEK293 细胞特有的结团生长现象，采用正常的计数程序往往得不到准确的计数结果，因此我们采用加入分散液的形式对细胞计数过程进行了优化。具体操作过程如下：

1. 将摇瓶中细胞培养液摇匀，取出 100  $\mu$ L 于 1.5 mL EP 管中。

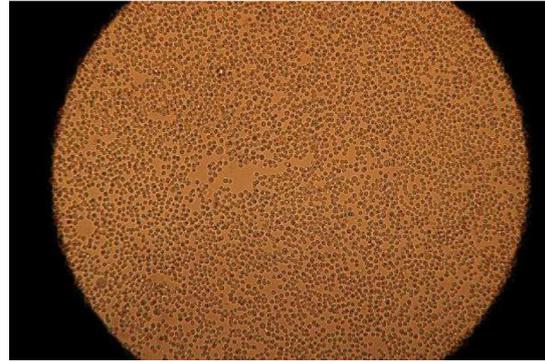
2. 加入等体积 100  $\mu$ L 友康 HEK293 细胞分散液 (货号 NC1006)，37°C 摇床培养箱中放置 5-10 min，若细胞结团严重，细胞团紧密，可再适当延长时间。

3. 混合液吹打均匀，取适量体积使用台盼蓝染色计数或使用流式细胞仪计数。

**注：**细胞密度较大时，加入 HEK293 细胞分散液后会出现白色絮状物，这是正常现象。用移液器吹打数次使其分散即可，不影响计数结果。



分散液处理前

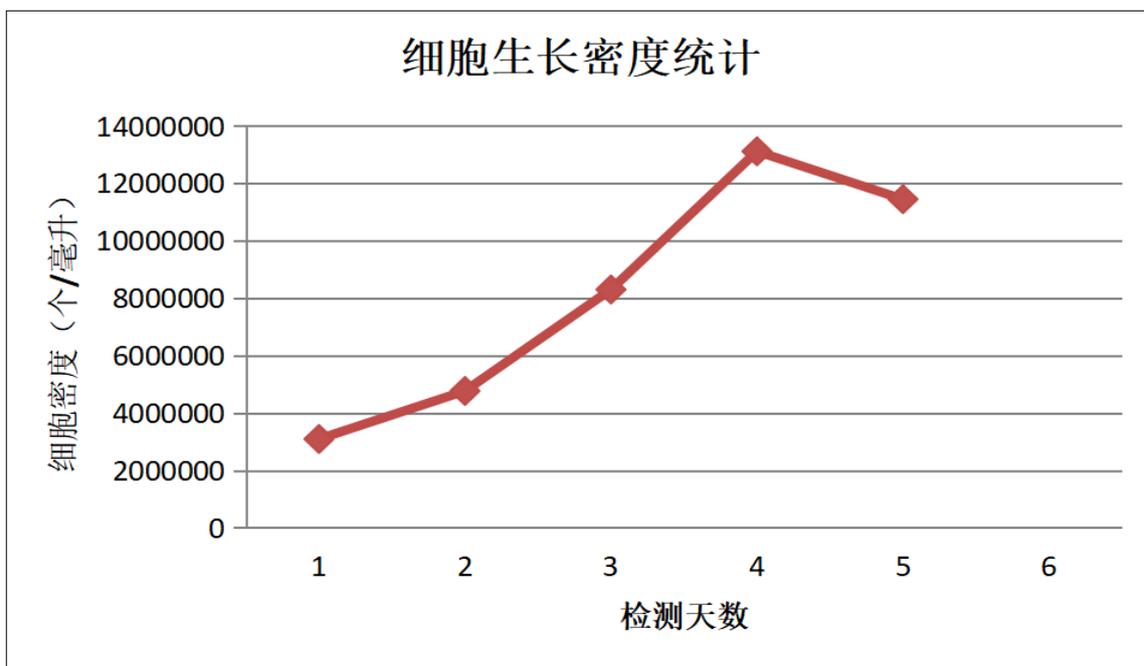


分散液处理后

### 细胞生长及连续传代

以 125mL 摇瓶 30mL 培养体系为例：

1. 连续监测细胞密度，获取细胞生长曲线。
2. 取样计数确认细胞密度，细胞处于对数期时进行传代，密度过高会影响细胞状态。
3. 取所需友康 293 培养基于 125 mL 摇瓶，培养箱中预温至室温。
4. 取需传代的细胞培养液适量（或离心去除上清）加入预温好的友康 293 培养基中，密度调整至  $0.5-0.8 \times 10^6$  cells/mL。
5. 以  $0.5 \times 10^6$  cells/mL 密度接种，接种后第 3 天细胞密度可达  $2-5 \times 10^6$  cells/mL，若细胞状态不佳、密度仍未达  $2 \times 10^6$  cells/mL，可离心全量换液、继续培养。
6. 若需扩大培养，可直接逐级放大至 3L 摇瓶 1L 培养体系。



摇瓶中友康 293 培养基培养 293T 细胞的生长



摇瓶中友康 293 培养基培养的 293T 细胞均匀分散

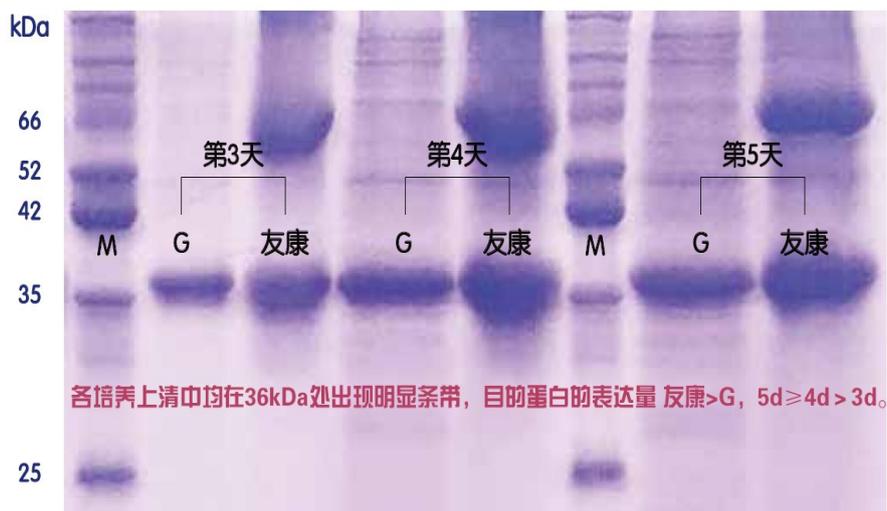
### 蛋白表达及病毒包装

可使用阳离子脂质体、PEI 等转染试剂进行蛋白表达及病毒包装。

可在摇瓶、搅拌式反应器等培养方式下进行蛋白表达及病毒包装。

以 PEI 转染试剂、125mL 摇瓶 30mL 转染体系、表达 FC 蛋白为例：

1. 细胞计数，密度在  $3-6 \times 10^6$  cells/mL 左右时可用于蛋白表达。
2. 125mL 摇瓶中加入 27mL 新鲜友康 293 培养基，培养箱中预温 15min。
3. 取用于转染的种子细胞 30mL，离心去除上清，用上述预温好的友康 293 培养基重悬，继续培养、开始计时。
4. 细胞换液 2h 后准备 DNA-PEI 复合物，15mL 离心管中加入 3mL 友康 293 培养基作为孵育培养基，加入 60ug DNA，简单涡旋 10s（或吹打 15 下），再加入 120ug PEI，简单涡旋 10s（或吹打 15 下），开始计时，室温静置孵育 15min。
5. 孵育好的 DNA-PEI 复合物 3mL 加入上述准备好的细胞中，一边滴加一边晃动细胞摇瓶进行混匀。
6. 迅速将细胞置于 37 °C、8%CO<sub>2</sub> 摇床中培养，摇床转速 100 rpm（振幅 50mm）。
7. 无需换液、补液，转染后 d3-d6 可 700 g 离心 10 min 收集含目的蛋白的上清液。



G (某国外品牌) 和友康无血清培养基中蛋白表达效果对比

### 细胞冻存

1. 取样计数确认细胞密度，宜冻存对数期、细胞活率大于 90% 的细胞。
2. 细胞培养液 170 g 室温离心 3 min，除尽上清。
3. 友康无血清冻存液（货号 NC1001.1）重悬细胞，根据需求调整冻存密度至  $1 \times 10^7$  cells/mL，冰袋上快速分装。
4. 分装好的细胞立即放入  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱中，24h 后移入液氮长期保存。

### 【注意事项】

1. 本品中含有丰富的营养物质，低温下可能有少量析出，不影响使用。
2. 不同细胞株在本培养基中的生长趋势有一定的差异，建议连续监测细胞密度获取细胞生长曲线，方便后期选用对数期细胞。
3. 使用本培养基瞬转表达蛋白或包装病毒时，转染效率可达 70-95%，但实际转染效率受细胞代数、细胞状态的影响，应选取代数靠前、对数期的细胞用于表达。
4. 使用本培养基培养细胞时，摇床中  $\text{CO}_2$  含量必须调至 8%。
5. 若种子细胞密度大于  $1.0 \times 10^7$  cells/mL，继续传代的细胞状态较差，建议重新复苏细胞。
6. 如何提高蛋白表达量：
  - (1) 选用传代次数不超过 20 代的细胞。
  - (2) 连续传 5 代，均能达到相近的最大密度，确认细胞在本培养基中可连续、稳定传代。
  - (3) 根据生长曲线选取对数期细胞。
  - (4) 镜下观察，细胞均匀分散，无 20 个细胞以上的细胞团，细胞圆润饱满，折光性强。
  - (5) 复苏后连续传 3 代，细胞状态恢复后才可用于转染表达，保持细胞活率大于 90%。

**YOCON 友康<sup>®</sup>**

文件版本号：2025 -V1.0.0

ISO9001、ISO13485质量体系认证企业

国家高新技术企业

生产企业：友康厚德生物制品（北京）有限公司

生产地址：北京市密云区科技路6号

联系电话：400-001-1266 010-58711655

公司网址：[www.yocon.cn](http://www.yocon.cn)

