

MDCK细胞无血清培养基使用说明书

产品简介

MDCK细胞无血清培养基是一款专门用于培养MDCK细胞的无血清培养基。培养基中不含胎牛血清成分，细胞培养过程中也不需要添加任何血清，MDCK细胞无血清培养基培养的MDCK细胞可达到完全培养基（DMEM+10%FBS）培养的状态；连续传代后，无血清培养基培养的细胞状态和生长速率优于完全培养基。

MDCK细胞无血清培养基化学成分限定，在流感病毒分离中能排除血清中类淀粉蛋白P等物质对病毒吸附的影响，同时，细胞可以直接转入无血清培养基中培养，不需要经过血清浓度逐步降低的驯化过程，能极大的帮助疾控、高校和科研院所的工作人员提高实验进度。

产品保存条件

2-8℃保存，有效期12个月。

产品特性

- 1. MDCK细胞无血清培养基化学成分限定，不含胎牛血清。
- 2. MDCK细胞无血清培养基培养MDCK细胞，连续传代50代，细胞特性无改变。
- 3. MDCK细胞无血清培养基培养MDCK细胞的倍增时间小于20小时。

使用说明

MDCK细胞无血清培养基的使用方法跟完全培养基（DMEM+10%FBS）的相同。未经过血清驯化的MDCK细胞，前5代左右（与MDCK细胞的初始状态有关）细胞状态可能会稍差，但不影响流感病毒的侵染效果，之后细胞状态恢复正常。

MDCK细胞复苏

- 1. 从液氮罐中取出冻存管直接置于37℃温水中，并不断地轻轻摇动，使管中的液体迅速融化。
- 2. 在超净工作台中用无菌吸管吸取10 mL 预温的MDCK无血清培养基到15 mL离心管中，冻存管用75%酒精擦拭表面后，将细胞悬液吸到15 mL离心管中，混匀。
- 3. 800 rpm离心3min，去除上清液，用6mL预温的无血清培养基重悬细胞，接种于T25细胞培养瓶中，接种细胞密度以 5x10⁵ cells/mL。
- 4. 37℃，5%CO₂培养箱中培养，培养1-2天至细胞铺满瓶底的80%-90%进行传代。

MDCK细胞传代（以T25瓶为例）

- 1. 当MDCK细胞融合度达到80%-90%时，弃去培养液，用PBS或不含钙镁的Hank's 液清洗细胞3遍。
- 2. 加入1mL 0.25%的EDTA-胰酶，37℃，5%CO₂培养箱中孵育至细胞收缩变圆（约10min），弃去胰酶，轻拍培养瓶，可见细胞移动即可。
- 3. 加入MDCK细胞无血清培养基终止消化，用吸管轻轻吹打，使细胞分散。（如1:6传代，加入35mL培养基，每瓶6mL）
- 4. 置于37℃，5%CO₂培养箱中培养，当细胞融合度达到80%-90%时，进行下一次传代。（一般1-2天传代一次）。

MDCK细胞冻存

- 1. 选取融合度达80%-90%的MDCK细胞用于冻存。
- 2. 依据传代方法把消化好的细胞收集于离心管并计数，800 rpm离心3min。
- 3. 去除上清液，加入商品化的细胞冻存液（冻存液需要提前预冷），冻存液中细胞的最终密度为3x10⁶ cells /mL。用吸管轻轻吹打使细胞混匀，然后分装至无菌冻存管中，每支冻存管加预冷的冻存液1mL。
- 4. 细胞经过程序降温后置于液氮中保存。（如用yocon无血清冻存液，无需程序降温，直接-80℃冻存，12h后存入液氮，长期保存。）

流感病毒的分离与培养

- 1. 选取融合度达到90%-100%的MDCK细胞，弃去培养液，PBS或不含钙镁的Hank's液清洗细胞2-3遍。
- 2. 加入200uL的流感病毒样本，温和摇动数次。
- 3. 置于37℃，5% CO₂培养箱中吸附1-2小时。
- 4. 加入6mL流感病毒分离无血清培养基（使用前需要添加终浓度为2ug/mL的TPCK-胰酶）于培养瓶中，放置于33℃-35℃，5%CO₂培养箱中培养。
- 5. 每日观察细胞病变情况。

注意事项

- 1. 无血清培养基培养的MDCK细胞，病毒侵染和释放都较快，病变进程迅速，请及时根据病变程度收获病毒。
- 2. 流感病毒分离无血清培养基在使用过程中需要添加TPCK-胰酶。
MDCK细胞无血清培养基、流感病毒分离无血清培养基无需额外添加抗生素。

3. MDCK细胞无血清培养基培养的MDCK细胞扩瓶比例不宜过高，建议不超过1:6，否则可能会出现细胞生长缓慢的情况。使用的MDCK细胞代数不宜超过25代，代数过高会出现细胞生长快，对病毒不敏感等情况，建议更换细胞株。
4. MDCK细胞无血清培养基培养的MDCK细胞融合度达100%时，因其他原因推迟1-2天传代，培养的细胞需要换液一次，并放入37℃，5% CO₂的培养箱中继续培养，严禁将细胞拿出培养箱，放在室温培养或置于4℃冰箱内存放。
5. MDCK细胞无血清培养基应避免反复或长时间37℃预温，否则会影响到培养基的性能。
6. MDCK细胞无血清培养基、流感病毒分离无血清培养基开瓶即能使用，不需要额外添加L-谷氨酰胺和调节pH值。
7. 无血清培养基培养的MDCK细胞在传代时，终止消化后建议通过离心去除EDTA-胰酶，防止EDTA-胰酶使细胞出现空泡化或其他生长衰退的情况。
8. 为了获得更高的病毒滴度，用MDCK细胞无血清培养基培养的细胞分离流感病毒时，需要使接种病毒前的细胞融合度达到90%及以上（融合度要比用DMEM+10%FBS培养的细胞高）。
9. MDCK细胞无血清培养基中的缓冲体系与DMEM培养基不同，在细胞培养过程中，培养基颜色会更容易变黄，但培养基pH仍在细胞适宜生长范围内。
10. MDCK细胞无血清培养时，禁止消化过度，过度消化会对细胞膜造成损伤，导致后期传代细胞状态变差，细胞边缘不清晰，胞间黑点增多，甚至有可能随着传代次数增多，细胞贴壁不紧，甚至细胞飘起，后期无法继续培养。