

血清替代物说明书

【产品描述】

血清替代物是一种化学组分确定的细胞培养基添加物，是人和其它动物细胞无血清培养重要组分，其不含动物血清中的激素与细胞生长因子，所有组分制备过程中不涉及动物来源物料使细胞培养条件更稳定，细胞产品安全性更高。细胞培养从含血清培养过渡到含血替培养可能需要一个驯化过程。一般需要经过多次传代，使细胞逐步适应无血清培养条件。已成功驯化的细胞有：肝上皮细胞，人原代肝实质细胞，VERO，CHO，HeLa，人角质细胞，HaCaT，杂交瘤细胞，HEK293，HEP G2等。

【细胞的驯化方法】（仅供参考）

贴壁细胞：

- 一步适应法：将细胞直接从含血清培养基中转移到血替培养基中进行。
- 阶梯适应法：将细胞从最初的含血清培养基中逐步经过几个阶段，每个阶段将含血清培养基减半，从而增加无血清培养基的比例。

第一阶段：50% 血清替代物补充培养基+50% 血清补充培养基；

第二阶段：75%血清替代物补充培养基+25% 血清补充培养基；

第三阶段：87.5%血清替代物补充培养基+12.5% 血清补充培养基；

第四阶段：93.75%血清替代物补充培养基+6.25% 血清补充培养基；

第五阶段：96.88%血清替代物补充培养基+3.12% 血清补充培养基；

第六阶段：98.44%血清替代物补充培养基+1.56% 血清补充培养基；

第七阶段：100%血清替代物补充培养基。

注：如果生长过于减缓，回退一步，等生长速度恢复后再进入下一步。

贴壁细胞驯化的关键因素：对细胞培养容器等表面进行涂层，以优化细胞附着；最小化胰蛋白酶的作用；选择适当的抗生素

1. 适当的细胞粘附因子涂覆细胞培养容器表面，方法是：

- 使用商业化涂层试剂盒，如Pronectin™ F、MapTRIX™或类似产品。
- 使用纤维连接蛋白或L-多聚赖氨酸涂层
- 胎牛血清（例如，T25瓶为500u1），在37℃下孵育过夜，然后用PBS或新鲜培养基洗两次
- 使用其他可提高细胞附着的塑料材料培养容器。

2. 消化细胞

在血清条件下使用胰蛋白酶解离细胞可能会有一些问题，因为它不含胰蛋白酶抑制剂。因此，终止胰酶活性需要使用胰蛋白酶抑制剂（例如大豆源），为了降低胰酶消化对细胞表面不可逆损伤，建议使用Accutase。

3. 把细胞以每平方厘米为20000个接种密度接种在之前准备好的完全培养基中。

在适应过程的最初阶段，保持较高密度的生长条件很重要。细胞通常会分泌一系列因子到胞外，这些因子控制细胞的附着、生长和增殖。而细胞密度对于这些因子在培养基中有效浓度至关重要。

4. 将细胞孵育并保持在37° C下，直到它们达到80-90%的融合度。在此期间，每2-3天更换75%的培养基。已孵育过的细胞的培养基（专称条件培养基），无菌过滤后，放置在4° C冰箱保存，后续会用到。如果细胞在任何时候生长停滞不前，允许它们有更多的时间适应新的无血清环境。

5. 当细胞接近融合时，以1:2或1:3的比例传代。

对于在血清替代物中的第二次传代，不需要涂层，但强烈建议使用条件培养基（孵育过细胞的培养基）-这种培养基含有调节附着、扩散、生长和增殖的细胞因子。使用由上一次传代收集的75%新鲜培养基+25%条件培养基的混合物接种细胞。继续每2-3天供应细胞75%的新鲜培养基，并按照上述的方法收集条件培养基。

6. 重复步骤5直到细胞表现出与其在血清补充培养基中相似的生长动力学。在此时，细胞系可以被认为完全适应。这可能需要总共4-6次传代。

7. 从此时开始，可以向培养基中添加抗生素。我们建议使用广谱抗生素庆大霉素；与标准的青霉素/链霉素混合物相比，该抗生素的细胞毒性明显降低。建议使用庆大霉素的浓度为50毫克/升。一旦适应，可以采用血清培养条件的传代比例。

悬浮细胞：

1. 当细胞密度达到3-5*10⁶个细胞/毫升时（根据细胞系的不同），开始切换至血清替代物补充培养基。收集细胞悬浮液，取出少量用于细胞计数，将整个悬浮液以200g离心5分钟。

2. 以106个细胞/毫升的密度重新悬浮细胞，使用血清替代物补充培养基。在适应过程的最初步骤中，保持较高的接种密度非常重要。细胞通常会分泌许多因子到胞外来控制细胞的生长和增殖。细胞密度对于这些因子在培养基中有效浓度至关重要。
3. 细胞孵育保持在37° C，直到细胞密度达到约3-5*106个细胞/毫升。
4. 将悬浮细胞按1:3或1:4的比例传代，通过添加适量的新鲜培养基（例如，25毫升细胞悬浮液 + 75毫升血清替代物补充培养基，分配到4个独立的培养器中）。
5. 重复步骤4，直到细胞在无血清培养基中表现出与原始血清补充培养基中相似的生长动力学。从那时开始，可以认为细胞系已完全适应，一旦适应，可以采用血清培养条件下传代比例。
6. 从这个节点开始，可以向培养基中添加抗生素。我们建议使用庆大霉素（Gentamycin）浓度为50毫克/升；与标准的青霉素/链霉素混合物相比，该抗生素的细胞毒性较低。

【注意事项】

1. 在取用之前要轻轻摇匀，避免起泡；
2. 按与血清相同的用量（例如10%）加入到基础培养基中；
3. 此阶段不要添加任何抗生素。因抗生素和许多化合物一样，会结合到血清中的结合蛋白，如白蛋白。在无血清条件下，相同浓度的抗生素会表现出更高的生物活性，而这种增加的活性可能对细胞生长产生毒性；
4. 如果需要添加抗生素，建议使用庆大霉素（gentamycin），浓度为50 mg/l；
5. 如果细胞生长和表现需要胰岛素，我们建议添加重组胰岛素，浓度为1.25mg/L。

警告:如果处理不当，本产品的某些成分可能会对健康造成危害。处理本产品时应采取适当的预防措施，包括穿戴防护服和眼镜。妥善处置。