

<b>产品名称:</b>	<b>Wayne293® Transfection Medium(GMP)</b>
<b>货号:</b>	<b>XL1101</b>
<b>规格:</b>	<b>1000mL、20L</b>
<b>形式:</b>	<b>液体</b>
<b>储存温度:</b>	<b>2°C ~ 8°C</b>
<b>有效期:</b>	<b>12个月 (有效期见产品包装)</b>

## 简介

Wayne293® Transfection Medium(GMP)是一款针对人类胚胎肾细胞 293(HEK293)和其衍生细胞系瞬时表达所研发的无血清、无动物成分培养基。适用于 HEK293 系列细胞的悬浮培养以及瞬时化学转染。该培养基可以实现细胞快速增殖及高密度培养, 并可直接在培养体系中进行化学转染及蛋白表达, 全程无需换液, 便于使用。此培养基配方中不含次黄嘌呤及胸苷。

## 组分

L-谷氨酰胺	4 mM
葡萄糖	6.0 g/L
次黄嘌呤&胸苷	不含
酚红	不含
碳酸氢钠	1.9 g/L
水解产物	含有

## 产品特点

在处理或补充培养基时使用无菌技术。本产品用于研究或进一步制造使用。

警告: 不用于人类或动物治疗用途。超出规定范围的使用可能会触犯当地法律。

## 安全信息

阅读物料安全数据表 (MSDS) 并依据相关的安全操作规范, 佩戴适当的护目镜, 洁净服, 口罩和手套等。

## 用前准备

- Wayne293® Transfection Medium(GMP)的使用需要无菌;
- 含 L-谷氨酰胺, 开瓶即用;
- 不推荐使用抗生素;
- 开封后未用完的培养基应进行分装, 使用封口膜封口, 在 2~8°C 避光保存。

## 培养条件

培养基: Wayne293® Transfection Medium(GMP)

细胞系: HEK293、HEK293T、HEK293F、HEK293FT

培养类型: 悬浮

培养容器: 摇瓶/TPP/反应器

温度范围: 37°C±0.5°C

培养箱气体要求: 5% CO<sub>2</sub>的加湿培养

培养箱转速要求: φ26 mm, 125 rpm

注意: 确保适当的气体交换和最小化的曝光培养。

## 细胞驯化

少数 HEK293 细胞因长期适应原培养条件, 需要经过一个简单的顺序驯化过程来适应。

从原培养体系向 Wayne293® Transfection Medium(GMP)驯化之前, 务必确保细胞处于对数生长期且活率 > 90%。

## 直接接种

将悬浮培养细胞转移到 Wayne293® Transfection Medium(GMP)中, 如下:

- 1000 rpm 离心细胞悬浮液 3~5 分钟。吸出并丢弃上清液;
- 以 5×10<sup>5</sup> cells/mL 的活细胞密度将细胞沉淀重悬于预热的 Wayne293® Transfection Medium(GMP)中并转移至合适的培养容器;
- 放回摇床并监测细胞生长。

注意: 如果使用直接接种方法观察到细胞生长或转染效率不理想, 则使用顺序驯化方法。

## 顺序驯化

按照以下程序进行细胞悬浮培养的步骤;

- 使用 5×10<sup>5</sup> cells/mL 的接种密度;
- 逐步调整 Wayne293® Transfection Medium(GMP) 与原始培养基的细胞培养比例 (25:75, 50:50, 75:25, 90:10, 然后是 100% Wayne293® Transfection Medium(GMP))。每个步骤视情况可多次传代;
- 在 100% Wayne293® Transfection Medium(GMP) 中几次传代后, 活细胞密度应超过 2×10<sup>6</sup> cells/mL, 倍增时间约 24~30h, 培养 4~6 天内存活率≥85%。至

此，细胞即已适应 Wayne293® Transfection Medium(GMP)。请按以下步骤冻存细胞备用。

## 冷冻保存

1. 准备好所需数量的细胞，且细胞状态较好；以 92% Wayne293® Transfection Medium(GMP) 与 8% DMSO 的混合液作为冷冻保存培养基，并储存于 2°C 至 8°C 直至使用；
2. 使用自动细胞计数仪或其它计数仪器进行细胞计数，根据最终冻存密度计算出冷冻保存培养基所需的体积，建议冻存密度为  $(1 \sim 1.5) \times 10^7$  cells/mL；
3. 通过 1000 rpm 离心 5 分钟收获细胞，丢弃上清液，用适量冷冻保存培养基重悬细胞至冻存密度；
4. 根据规格立即将细胞悬浮液的分装到冻存管中；
5. 按照标准程序，在自动或手动控制速率冷冻设备中实现冷冻保存。将冷冻细胞转移到液氮或 -130°C 以下保存；

注意：在液氮或 -130°C 以下储存 24 小时后，取出一只冷冻保存细胞进行复苏，检查活率及其它指标。请参阅“细胞复苏”。

## 细胞复苏

1. 细胞从液氮罐中取出，迅速在 37°C 水浴中快速解冻至细胞融化，过程约 1~2 分钟；
2. 将细胞液转移至 5 mL 预热的 Wayne293® Transfection Medium(GMP)，吹打均匀；1000 rpm 离心 5 分钟，丢弃上清液；使用 5 mL Wayne293® Transfection Medium(GMP) 重悬；
3. 使用自动细胞计数仪或其它计数仪器进行细胞计数，根据需要的细胞密度吸取细胞液至 125 mL 摇瓶，加入适量 Wayne293® Transfection Medium(GMP)，使细胞达到所需复苏密度；建议复苏密度为  $(3 \sim 5) \times 10^5$  cells/mL；
4. 在含有 5% CO<sub>2</sub>，37°C 的培养箱或摇床进行培养；
5. 细胞复苏后培养 2~5 天处于对数生长中期时传代。在进行其它实验之前，复苏的细胞至少应进行三次传代。

## 细胞增殖

1. 使用自动细胞计数仪或其它计数仪器进行细胞计数，根据需要的接种密度计算所需细胞原液体积，建议接种密度为  $(3 \sim 5) \times 10^5$  cells/mL；
2. 将所需量细胞原液加入到含有 Wayne293® Transfection Medium(GMP) 的摇瓶中，使细胞达到所需接种密度；
3. 继续置于 5% CO<sub>2</sub>，37°C 的培养摇床中培养，通常 2~

3 天后可进行下一次传代。

## 转染前细胞准备

1. 按上述步骤，使用 Wayne293® Transfection Medium(GMP) 复苏及增殖细胞，至细胞密度为  $(1 \sim 2) \times 10^6$  cells/mL。
2. 计数，用 Wayne293® Transfection Medium(GMP) 将细胞稀释至  $1 \times 10^6$  cells/mL，得细胞悬液备用。

## 瞬时化学转染

按以下比例准备试剂，每 100ml 细胞悬液中应加入：

转染混合液	6mL
A 组分	
PBS	3mL
DNA	100ug
B 组分	
PBS	3mL
PEI	400ug

1. 向两份 3ml 的磷酸盐缓冲液 (PBS, pH 7.4) 中分别加入待转染 DNA 100ug (总量) 和 PEI 转染试剂 400ug (总量)，充分混匀，静置 5min，即为 A、B 组分；
2. 将 A、B 组分混合，充分混匀，静置 10min，即为转染混合液；
3. 将转染混合液 6mL 逐滴全部加入到 100mL 细胞悬液中，边加入边摇匀。

## 蛋白表达及收获

请参阅“培养条件”及“细胞增殖”步骤，将转染后的细胞继续培养 5~7 天 (延长培养时间需考虑补料策略)。收集上清，检测及纯化表达产物。

## 标签图例

 STERILE A	 有效期至	 储存温度
 过滤除菌	 干燥保存	 避光保存
 LOT	 GMP	 不干胶便签
批号	仅供研究	供 GMP 制造

## 问题解决

可能出现的问题	原因	解决
细胞复苏活率低	储存不当	重新建库并保存在液氮中
	细胞建库质量不佳	以 $1 \times 10^7$ cells/mL 细胞密度冻存细胞
		使用 92% Wayne293® Transfection Medium(GMP)+8% DMSO 冻存细胞 使用传代次数较低的细胞进行建库
细胞生长缓慢	培养基转换	使用 Wayne293® Transfection Medium(GMP)驯化传代二至三代
	摇床设定	在 37°C 5% CO <sub>2</sub> 的条件下培养
	摇瓶选择	使用总容量为培养基体积 2.5 倍的摇瓶
	细胞过老	使用传代次数不超过 30 代的细胞, 避免细胞状态发生变化
转染效率/蛋白收率低	细胞结团	使用 Wayne293® Transfection Medium(GMP)驯化传代细胞, 注意传代前细胞密度不超过 $3 \times 10^6$ cells/mL
	细胞传代次数过高	传代次数不超过 30 代的细胞
	培养基中加入抗生素	请勿在培养基中加入抗生素
	转染试剂储存不当	请将转染试剂储存在 4°C, 不要冷冻
	混匀不当	轻柔搅拌混匀, 请勿震荡
	质粒回收质量不高	请注意回收质粒的质量, 尽量采用低内毒素的质粒
	DNA 未除菌	使用除菌后的 DNA
	DNA 回收溶液	使用超纯水溶解和回收 DNA
	外源基因的毒性	考虑外源基因表达蛋白的细胞毒性
太早或太晚收货蛋白	过早或过晚收货蛋白会造成收率偏低	