

产品名称:	Wayne293™ Transfection Medium
货号:	A22501
规格:	100L (含A、B两个组分)
形式:	干粉
储存温度:	2~8°C
有效期	24个月 (生产日期见产品包装)

简介

Wayne293™ Transfection Medium 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	3.0 g/L
次黄嘌呤&胸苷	不含
酚红	不含
碳酸氢钠	不含
水解产物	含有植物蛋白水解物

产品包含两种组分：

#AB2201-100	Wayne293™ Transfection Medium Part A, low glucose (3g/L)	1686g/桶
#A22501B	Wayne293™ Transfection Medium Part B	500g/桶

请按照说明书配合使用。

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

• 配制方法

1. 将终体积 90%的注射用水加入到合适干净的容器中，

调节水温至 25~35°C；

2. 缓慢加入 16.86g/L 的 Wayne293™ Transfection Medium Part A, low glucose (3g/L)，搅拌混合 10 分钟；
 3. 缓慢加入 5mol/L NaOH 调整 pH 到 7.00±0.10，搅拌 30 分钟直到完全溶解；
 4. 缓慢加入 5.00 g/L 的 Wayne293™ Transfection Medium B 组分干粉，搅拌 20 分钟直至完全溶解；
 5. 缓慢加入 1.90 g /L 的 NaHCO₃，搅拌 10 分钟直到溶解；
 6. 使用 6 mol/L 的 HCl 或者 5 mol/L 的 NaOH 将 pH 最终调整到 7.35±0.10；
 7. 加入注射用水定容至所需的最终体积，搅拌混合均匀；
 8. 通过 0.2 μm 孔径滤膜过滤除菌。
- Wayne293™ Transfection Medium 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

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

培养箱气体要求：5% CO₂ 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 驯化之前,务必确保细胞处于对数生长中期且活率>90%。

直接接种

将悬浮培养细胞转移到Wayne293™ Transfection Medium 中,如下:

1. 1000 rpm 离心细胞悬浮液 3~5 分钟。吸出并丢弃上清液;
2. 以 5×10^5 cells/mL 的活细胞密度将细胞沉淀重悬于预热的Wayne293™ Transfection Medium中并转移至合适的培养容器;
3. 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;

1. 使用 5×10^5 cells/mL 的接种密度;
2. 逐步调整Wayne293™ Transfection Medium 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)。每个步骤视情况可多次传代;
3. 在100% Wayne293™ Transfection Medium中几次传代后,活细胞密度应超过 2×10^6 cells/mL, 倍增时间约24~30h, 培养4~6天内存活率 $\geq 85\%$ 。至此, 细胞即已适应Wayne293™ Transfection Medium。请按以下步骤冻存细胞备用。

冷冻保存

准备好所需数量的细胞, 在活率>90%的对数生长中期阶段进行冻存。

1. 以92% Wayne293™ Transfection Medium 与8%DMSO的混合液作为冻存液, 并储存于2°C至8°C直至使用;
2. 确定活细胞密度, 并计算出所需冻存液的体积, 使最终冻存密度为 $1\sim 3 \times 10^7$ cells/mL;
3. 通过 1000 rpm 离心 3~5 分钟收获细胞, 将细胞沉淀重悬在预定体积的冻存液中;
4. 根据规格 (即 2 mL 冷冻管可放置 1~1.5 mL 细胞液) 立即将细胞悬液分装到冻存管中;
5. 按照标准程序 (每分钟降低 1°C), 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中, 存储在-200°C至-125°C。

注意:在液氮中储存 24 小时后取出一只检查冷冻保存细胞的活率及其它指标。请参阅“细胞复苏”。

细胞复苏

1. 在 37°C水中快速解冻 (<2 分钟) 冻存管中的细胞液;
2. 将细胞液转移至10mL 预热的 Wayne293™ Transfection Medium 的离心管中, 1000 rpm 离心3分钟, 丢弃上清液, 使用5mL Wayne293™ Transfection Medium重悬, 计数;
3. 将冷冻管的全部细胞液转移到125 hL摇瓶中, 用Wayne293™ Transfection Medium稀释至所需细胞密度;
4. 在含有 5% CO₂, 37°C, 加湿的培养箱或摇床进行培养。(培养时拧松瓶盖(或使用通气盖)以进行气体交换);
5. 细胞复苏后培养 2~3 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或者按比例接种传代;
2. 种子瓶接种密度为 5×10^5 cells/mL;
3. 继续置于 37°C、5% CO₂ 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™ 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 将细胞稀释至 1×10^6 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 100 ml 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 3 ml 的磷酸盐缓冲液 (PBS, pH 7.4) 中分别加入待转染 DNA 100 ug (总量) 和 PEI 转染试剂 400 ug (总量), 充分混匀, 静置 5 min, 即为 A、B 组分;
2. 将 A、B 组分混合, 充分混匀, 静置 10 min, 即为转染混合液;
3. 将转染混合液 6 mL 逐滴全部加入到 100 ml 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。

相关产品

货号	名称
A21501	Wayne293™ Transfection Medium
A21001	QuaCell® HEK293CD Medium
A22001	QuaCell® HEK293CD Medium

标签图例

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

问题解决

可能出现的问题	原因	解决方法
	储存不当	重新建库并保存在液氮中
细胞复苏后活率低	细胞建库质量不佳	以 1×10^7 细胞密度冻存细胞 使用 92% Wayne293™ Transfection Medium +8%DMSO 冻存细胞 使用传代次数较低的细胞进行建库
	培养基转换	使用 Wayne293™ Transfection Medium 驯化传代二至三代
	摇床设定	在 37°C, CO ₂ 含量为 5% 的条件下培养
细胞生长缓慢	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
	细胞结团	使用 Wayne293™ 驯化传代细胞，注意传代前细胞密度不要超过 2×10^6
	细胞传代次数过高	使用传代次数不超过 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	轻柔搅拌均匀，请勿震荡
转染效率/蛋白收率低	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
	太早或太晚收获蛋白	过早或过晚收获蛋白都会造成收率偏低