

悬浮 293 细胞

一、培养条件

培养基：SMM 293-TII 培养

细胞株：HEK293 (293F , 293E , 293H , 293FT , 293S)

培养方式：悬浮培养

培养体系：摇瓶、反应器

培养温度范围：36.5°C -37°C

其他条件：5-10% CO₂ , 确保气体交换 , 尽量减少光照。

二、准备工作

1. 复苏前 15min,取 25ml 无血清培养基到 125ml 摇瓶中 , 并放 37 度预温备用 ;
2. 水浴锅开 37 度 ;

三、细胞复苏

根据冻存的 HEK293 细胞密度选择适当的复苏体系 , 使复苏培养的起始细胞密度控制在 $0.3-0.4 \times 10^6$ cells/mL。

以 125 mL 培养瓶(25 mL 体系 , 冻存管中细胞数量为 1×10^7 cells)举例说明如下 :

1. 迅速取出冻存的细胞 , 在 37°C 水浴解冻(可以在水中轻轻晃动 , 时间控制在 1 分钟内);
2. 对冻存管表面消毒 ; 向 125 mL 培养瓶中加入 25 mL 的新鲜 SMM 293-TII 培养基 , 将融化的细胞全部转入培养瓶中 , 轻轻摇动培养瓶混匀细胞。由于刚复苏的细胞比较脆弱 , 所以整个过程应避免剧烈操作且无需离心细胞 ;
3. 将重悬好的细胞置于 37°C , 5% CO₂ , 150-175 rpm 转速的 恒温摇床中培养 ;

4. 监测培养 2-5 天内的细胞密度以及活率数据

- 如果细胞密度达到 1.0×10^6 cells/mL ,且活率达到 85% 以上则可进行正常传代培养 ;
- 如果细胞密度达不到 1.0×10^6 cells/mL , 或活率低于 85% , 则对细胞进行离心 (100 g 离心 5 分钟) , 用适量的新鲜培养基重悬细胞沉淀至活细胞密度为 $0.4-0.6 \times 10^6$ cells/mL , 转移到适宜容器中继续培养 ;
- 如果细胞密度达不到 1.0×10^6 cells/mL ,且活率低于 70% ,则建议重新复苏细胞。注意:若冻存管中的细胞数量较少 (5×10^6 cells) , 可以选择用 50 mL 离心管进行复苏 , 摇床转速为 175-200 rpm。

四、细胞传代

注意 : 细胞传代所用的 SMM 293-TII 培养基体积不超过容器体积的 20%。

1. 计数细胞 , 计算细胞密度和细胞活率 ;
2. 将细胞以 $0.3-0.4 \times 10^6$ cells/mL 的起始密度接种到新鲜 SMM 293-TII 培养基中 ;
3. 将培养瓶置于 37°C , 5% CO_2 , 150-175 rpm 转速的恒温摇床中培养 ;
4. 传代培养 3-4 天后 , 活细胞密度一般能达到 3×10^6 cells/mL 以上 , 且活率大于 90%。

注意 : 建议对新复苏的细胞传代两次以上 (一般复苏传两代以上细胞活力可达 95% 以上 , 3 天密度可达 $2.0-4.0 \times 10^6$ cells/mL) , 待其从冻存损伤中彻底恢复后再进行转染、冻存等实验操作 , 复苏后的细胞使用代次建议为 30 代以内。

五、细胞冻存

选择处于对数生长期 (一般为正常传代后第 3 天) 且细胞活率在 90% 以上的 HEK293 细胞直接用 90%FBS+10%DMSO 进行冻存 , 最终的活细胞冻存密度为 $5-10 \times 10^6$ cells/mL。

操作步骤如下：

1. 计数细胞，根据细胞数量计算所需的冻存体积；
2. 将 90%FBS 和 10% 冻存体积的 DMSO 混匀配制好后置于 4℃冰箱备用；
3. 离心适量细胞（100 g 离心 5 分钟）后去除上清并用配制好的细胞冻存液重悬细胞；
4. 混匀细胞并将其移至冻存管中，每管 1 mL 细胞。将细胞冻存管放到事先预冷（4℃过夜）的程序降温冻存盒中，置于-80℃冰箱(程序降温盒每分钟下降 1℃)内过夜；
5. 如需长期存放，可以转移到液氮罐中。

注意:冻存前一天，检查冻存盒夹套中的异丙醇液位合格，放在 4℃冰箱预冷。冻存操作 24 小时后可以抽样复苏-80℃ 冰箱或者液氮中的冻存细胞，从而检测细胞的冻存效果。

六、培养注意事项

1. 收到活细胞后首先观察细胞瓶是否完好，培养液是否有漏液、浑浊等现象，**干冰运输的细胞检查干冰是否完全挥发，细胞是否解冻**，若有上述现象发生请及时和我们联系。
2. 仔细阅读细胞说明书，了解细胞相关信息，如细胞形态、所用培养基、血清比例、所需细胞因子等，**确保细胞培养条件一致，若由于培养条件不一致而导致细胞出现问题，责任由客户自行承担。**
3. 请客户用相同条件的培养基用于细胞培养。
4. 建议客户收到细胞后前 3 天各拍几张细胞照片，记录细胞状态，便于和我司技术部沟通交流。由于运输的原因，个别敏感细胞会出现不稳定的情况，请及时和我们联系，告知细胞的具体情况，以便我们的技术人员跟踪回访直至问题解决。
5. 该细胞仅供科研使用。