

Cellvento® 4CHO-X

扩增培养基

产品描述

在种子培养中使用灌流有几个优点，即增加生产过程中的灵活性、增加生产能力和减少占地面积。

减少种子培养中生物反应器的数量可以更好地提高利用率并消除传统瓶颈（缩短种子培养）。此外，使用N-1灌流能够接种具有更高细胞密度的生产生物反应器，满足高种子生产工艺需求。Cellvento® 4CHO-X扩增培养基是专门为中国仓鼠卵巢（CHO）细胞系的N-1灌流而开发的。它由高营养成分配制而成，可在高细胞密度下实现低细胞比灌流率（CSPRs）。该培养基是化学限定，非动物来源，不含水解产物或未知组分。

应用

Cellvento®4CHO-X扩增培养基经过专门配制，可控制细胞的代谢过程，在最大限度地减少有毒副产物的同时，确保满足高细胞密度所需的营养水平。防止养分消耗可以使种子培养流程更加稳健和可预测。这种培养基帮助提高生长速度和活力，从而增加细胞的生物量，以进行后续的冷冻保存或接种其他反应器。例如，与EX-CELL®Advanced HD Perfusion培养基(24370C)进行灌流生产时，或者与Cellvento®4 CHO培养基(103795)和Cellvento®4 Feed培养基(103796)进行流加生产时，可加快种子培养过程，并有利于IgG的生产。同时，也可以和其他培养基平台一起使用。Cellvento®4 CHO-X扩增培养基可用于所有的种子扩增培养步骤，包括N-1，可以在低CSPRs时稳定生长。

本产品用于研究或进一步生产，但不直接用于人体或治疗用途。



Cellvento®4CHO-X扩增培养基的配制方法

- 室温下(25°C)用适当大小的容器量取Milli-Q®或类似细胞培养级别用水，达到目标终体积的90%。
- 边搅拌边缓慢加入26.2g/L培养基，持续搅拌30分钟。可能会出现轻微混浊。
- 向溶液中加入1.565g/L的碳酸氢钠，持续搅拌30分钟。
- 测量pH值，调至7.4±0.3。如果需要可用5N HCl调整至细胞系所特需的最佳PH。
- 加入MIL-Q®或类似的细胞培养级用水至100%最终体积。
- 测量渗透压。最终渗透压应为310-370mOsmol/kg。
- 立即用无菌过滤器(≤0.22µm)进行过滤。有关过滤器建议，请参阅第3页。
- 2-8°C，避光保存。
 - 所配制的Cellvento®4CHO-X扩增培养基可稳定保存至少90天

- 当添加补充剂时，液体培养基最多可稳定保存4周。

注意：本培养基不含L-谷氨酰胺。使用前可按需进行无菌添加，或在加入干粉培养基时添加。

- 干粉和颗粒化培养基应在2-8°C避光保存
- 过期后请勿使用。
- 质保期：见CoA

使用Cellvento®4CHO-X培养基进行扩增和N-1阶段灌流培养

在与非GS CHO细胞系一起使用之前，将4-8mM的L-谷氨酰胺添加到Cellvento®4CHO-X扩增培养基中。

本产品无需补充表面活性剂（例如泊洛沙姆）。

在种子扩增培养期间，应根据需要添加细胞选择剂。

使用Cellvento®4CHO-X扩增培养基进行灌流，请按照配制说明对适量的培养基进行溶解，并通过适当的灌流设备向生物反应器灌流培养基。建议监测葡萄糖浓度以调整灌流速率。

直接培养基适应

细胞系可直接适应Cellvento®4CHO-X扩增培养基。细胞以 $3 \times 10^5 - 5 \times 10^5 / \text{mL}$ 的密度进行接种，然后在密度达到 $1 \times 10^6 - 3 \times 10^6 / \text{mL}$ 且细胞活力达 $\geq 80\%$ 时进行传代培养。当细胞达到稳定的倍增时间（20-30小时）并且VCD $\geq 90\%$ 时，适应过程就完成了。

逐步培养基适应

下面提供的应用指南基于对细胞的常规传代培养，使其维持在对数生长期。该阶段细胞应每3到4天传代一次。在每个适应阶段建议至少传代两次，以确保细胞更好地适应它们的新培养基环境。

冷冻保存

可以在92.5% Cellvento® 4CHO-X扩增培养基和细胞培养级7.5%二甲基亚砜(DMSO)中冷冻保存细胞，建立细胞库。

细胞冻存步骤

- 在无菌操作台或超净工作台里，将无菌DMSO和Cellvento® 4CHO-X扩增培养基混匀。由于DMSO稀释会释放热量，因此培养基应先预冷，并在2-8°C中储存待用。
- 选择处在对数期且形态正常的细胞，细胞密度应 $> 1.5 \times 10^6$ 细胞/mL且细胞活力 $> 95\%$ 。
- 1200-1500 rpm (200-300g) 离心5分钟，理想温度是4°C。
- 弃去上清，并用预冷的培养基(4°C)以 $1 \times 10^7 - 2 \times 10^7$ 活细胞/mL的浓度重悬，将细胞悬液转移至无菌冻存管中，每管1毫升。
- 将冻存管置于-80°C冷冻过夜，并将其转移到液氮罐中进行长期存储。
- 另一种方法是使用含有异丙醇的冻存盒进行细胞冻存：将冻存管置于冻存盒中，并按照下列过程进行梯度冻存：
 - 4°C 30分钟
 - -20°C 2-4小时
 - -80°C 过夜
 - 将冻存管转移至液氮中长期储存。

注：冷冻过程可使用自动冷却仪进行标准化操作。在这种情况下，可以控制冷冻速度，细胞悬液可以在一小时内实现从4°C至-150°C的冻存。

当前培养基与Cellvento®4CHO-X 扩增培养基的比率 (%)	接种密度 ($\times 10^5$ 细胞/mL)	细胞生长评估	进行后续步骤的标准
75:25	3.0	对数生长期的细胞密度和活力	正常的细胞倍增时间；至少2次传代后的细胞活力 $> 80\%$
50:50	3.0	对数生长期的细胞密度和活力	正常的细胞倍增时间；至少2次传代后的细胞活力 $> 80\%$
25:75	3.0	对数生长期的细胞密度和活力	正常的细胞倍增时间；至少2次传代后的细胞活力 $> 80\%$
10:90	3.0	对数生长期的细胞密度和活力	正常的细胞倍增时间；至少2次传代后的细胞活力 $> 80\%$
0:100	3.0	对数生长期的细胞密度和活力	当细胞保持正常倍增时间时适应完成；至少2次传代后的细胞活力 $> 90\%$ 。

细胞复苏步骤

- 准备37°C的水浴进行细胞复苏。
- 在无菌操作台或超净工作台里, 在125 mL锥形瓶中准备29mL Cellvento®4CHO-X扩增培养基。
- 将CHO细胞从液氮转移至37°C水浴。
- 当冰粒从冻存管的侧面脱离时, 取出冻存管 (DMSO在较高温度下可能有毒性作用), 剩下的冰粒应近似米粒大小。
- 将CHO细胞悬浮液从冷冻管中转移到125毫升锥形瓶中, 以实现 3×10^5 - 5×10^5 /mL的密度接种, 在125mL锥形瓶中进行培养。在37°C的CO₂培养箱中培养细胞, 培养条件应为5%的CO₂, 80%的湿度和 $\geq 1 \times 10^6$ 细胞/mL。随后按照标准方案, 暨与Cellvento®4CHO-X扩增培养基的比率(%)进行传代培养。

如需去除DMSO (如果需要) :

- 准备37°C水浴进行细胞解冻。
- 在无菌操作台或超净工作台里, 在50毫升离心管中准备10mL培养基。
- 将CHO细胞从液氮转移至37°C水浴。
- 当冰粒脱离冻存管的侧面时, 取出冻存管 (DMSO在较高温度下可能有毒性), 剩下的冰粒应近似米粒大小。

- 将CHO细胞悬液转移到离心管中, 以1200-1500 rpm离心5分钟。
- 丢弃上清液, 用新鲜培养基 (Cellvento®4CHO-X培养基) 将细胞重悬, 以 3×10^5 - 5×10^5 /mL的接种密度, 接种到125毫升锥形烧瓶中进行培养。在37°C的CO₂培养箱中培养细胞, 培养条件应为5%的CO₂, 80%的湿度和 $\geq 1 \times 10^6$ 细胞/mL。随后按照标准方案, 暨与Cellvento®4CHO-X扩增培养基的比率(%)进行传代培养。

传代培养

- 将Cellvento®4CHO-X扩增培养基预热至室温。
- 无菌条件下, 从锥形瓶中取出少量的细胞培养样品, 用血细胞计数器或自动细胞计数器通过台盼蓝法进行细胞计数。细胞活力应始终高于90%。
- 选择合理的培养液体积, 以 $2-3 \times 10^5$ 个活细胞/mL的起始细胞密度接种至新的培养瓶。
- 在无菌条件下, 添加相应的已预热至室温的新鲜培养基至新培养瓶, 并进行细胞计数。
- 在定轨摇床平台上 (直径19mm的轨道), 以120-140 rpm, 在5%CO₂, 37°C中培养。
- 重复上述步骤至少每周传代两次, 并始终保持细胞呈指数增长。

Cellvento®4CHO-X扩增培养基订购信息

货号	产品名称	公斤 规格	相当于
1.03840.0001	Cellvento® 4CHO-X COMP	0.026公斤	1升 (样品尺寸)
1.03840.0010	Cellvento® 4CHO-X COMP	0.262公斤	10升
1.03840.0100	Cellvento® 4CHO-X COMP	2.620公斤	100升
1.03840.0500	Cellvento® 4CHO-X COMP	13.098公斤	500升

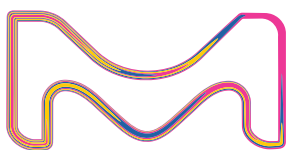
细胞培养添加剂订购信息

货号	产品名称	包装
1.37020.5000	氢氧化钠 适用于生物制药生产的EMPROVE® bio	5公斤
1.37013.2500	碳酸氢钠, 适用于生物制药生产的EMPROVE® bio, 符合 Ph Eur, BP, USP, JP药典	2.5公斤
1.00286.1000	L-谷氨酰胺, EMPROVE® exp, 符合 DAB, USP药典	1公斤
1.37117.0100	二甲亚砜, EMPROVE® Expert, 符合Ph EUR USP药典	100毫升

除菌过滤器订购信息

	除菌过滤	除菌过滤和支原体去除	除菌过滤，病毒和支原体去除
体积 (L)	Millipore Express® SHC	带预滤器的Millipore Express® SHR	Viresolve® Barrier
1	KHGES015FF3	KHVES015FF3	VBKG005TC1
10	KHGES015FF3	KHVES015FF3	VBKG015TC1
100	KHGES003FF3	KHVES006FF3	VBKG050TC1

欲了解更多关于Cellvento®CHO培养基的产品信息，
请访问EMDMillipore.com/cellvento



默克工艺解决方案

上海
上海市浦东新区东育路227弄3号
前滩世贸中心(二期)C栋15-18层
电话: (021)20338288
传真: (021)50803042
邮编: 200126

北京
北京市朝阳区将台路甲2号
诺金中心25层
电话: (010)59072688
传真: (010)59072699
邮编: 100016

广州
广州市天河区冼村路5号
凯华国际中心1201-1204
电话: (020)32255366
传真: (021)32255380
邮编: 510623

成都
成都市锦江区人民南路二段1号
仁恒置地广场1706室
电话: (028)80740222
传真: (028)80740227
邮编: 610016

本资料中所有内容(包括但不限于产品图片、公司logo等)为德国默克集团所有,未经允许,任何人或实体不得擅自使用或转载。

更多详情,敬请登陆: www.merckmillipore.com 技术服务电话: 021-61433900-2# 中国技术服务中心: china.pstech@merckgroup.com

资料编号: 07/2020