

货号	品名	规格	有效期	外观	储存条件	运输条件
H515L7	VirusPro® MSVP 无血清培养基, 干粉	10L	24 个月	干粉	2 ~ 8 °C, 避光	蓝冰

1. 产品描述

VirusPro™ MSVP 无血清培养基, 是一种无动物源成分、无蛋白, 含有植物蛋白水解物的培养基, 广泛适用于多种哺乳动物细胞的贴壁培养。使用时无需添加额外的蛋白成分, 也无须预处理培养器皿表面。VirusPro™ MSVP 无血清培养基主要应用于病毒扩增或者疫苗生产。与传统培养基相比, 它具有等同或者更优越的培养能力, 最大限度降低引进外源病毒的风险。

与其它无血清培养基相比, VirusPro™ MSVP 无血清培养基最显著的特点就是多功能性, 它可以培养很多种肾上皮细胞系, 提高增殖的病毒滴度。比如可以培养 MDCK、VERO、Marc 145、ST、PK-15、MDBK、HEp2 和 BHK-21, 也可以培养 COS-7 和 HeLa 细胞系。

我们建议, 在疫苗生产过程中, 除培养 Vero 细胞不添加血清外, 培养其它细胞可适当添加 1~2 % 的血清。

本产品建议使用注射用水 (Water-For-Injection) 配置。

本产品关注点

含有 (+)

- 酚红
- 3.9 g/L D-葡萄糖

不含 (-)

- L-谷氨酰胺
- 碳酸氢钠

本产品供科学研究和生产使用, 用于组织和细胞的体外培养。

严禁用于临床。

2. 质量体系

上海源培生物科技股份有限公司的产品是在 cGMP 标准车间中生产的。

上海源培生物科技股份有限公司已取得 ISO9001:2015、ISO13485:2016 质量体系认证。

3. 产品参数

物理外观: 白色至浅粉红色粉末

内毒素: ≤ 3 EU/mL

储藏条件: 2 ~ 8 °C, 避光

运输条件: 蓝冰

用途: 仅供科研和生产使用

4. 使用指南

使用时请穿戴合适的安全手套、实验服和护目镜。产品不能用于人体。

细胞直接接触的环境必须是无菌的, 用于细胞培养的试剂必须是无菌的。请在无菌环境中进行细胞实验, 任何器皿或工具, 移入无菌环境之前, 应在入口处去除外包装并使用酒精擦拭进行消毒。

5. 制备培养基

1. 将配制总量 95% 的室温 (20°C 至 30°C) 注射用水加入混合容器。
2. 边搅拌边将干粉培养基加入到水中, 不要将水加热。
3. 冲洗包装内部所有遗留粉末至混合容器中, 搅拌均匀。
4. 加入适量 L-谷氨酰胺或 L-丙氨酰-谷氨酰胺搅拌均匀。
5. 边搅拌, 边慢慢添加 5M 的氢氧化钠, 将 pH 值调整至 6.8, 搅拌 15-30 分钟使干粉溶解。
6. 每升培养基加入 2.2 g 碳酸氢钠, 搅拌至溶解。
7. 滴加氢氧化钠或盐酸, 调整 pH 值使其低于最终工作 pH 0.1 到 0.2 个单位 (溶液过滤后 pH 值会升高 0.1 到 0.2 个单位)。
8. 加水至所需容量, 搅拌均匀, 不要过度搅拌, 将容器密闭。
9. 立即用 0.2 μ m 孔径滤膜过滤至无菌容器中。

备注: 本产品不含 L-谷氨酰胺、L-丙氨酰-谷氨酰胺, 请根据需要自行添加。

建议使用量 L-谷氨酰胺或 L-丙氨酰-谷氨酰胺为 2-4mM。

6. 细胞培养的条件

培养基: 完全 VirusPro™ MSVP 无血清培养基

细胞系: MDCK、VERO、Marc 145、ST、PK-15、MDBK、HEp 2、BHK-21、COS-7 和 HeLa 细胞

细胞类型: 贴壁细胞

培养容器和设备: 培养瓶、生物反应器或细胞工厂

培养条件: 36 ~ 37 °C, CO₂ 含量 5~10% 的湿润空气, 避光。

实验前应对细胞培养仪器进行温度和 CO₂ 含量的设置。

7. 复苏

以下实验方案, 均以 T75 细胞培养瓶为例。

以一管冻存细胞体积 1.5mL, 活细胞密度 $0.5 \times 10^7 \sim 1 \times 10^7$ 个/mL 为例:

1. 准备无菌的培养容器 (T75 细胞培养瓶), 在容器中加入 15mL 预热的完全培养基, 然后立刻开始冻存细胞的解冻;
2. 在 37 °C 水浴中, 迅速 (<1 分钟) 解冻一管冻存细胞。当最后一丝冰融化时, 迅速从水浴中移出细胞冻存管;
3. 轻轻吸出管中内容物, 并转移到第 1 步预先准备好的锥形瓶中, 拧紧培养瓶盖后再反拧 1/4 圈, 确保适当的气体交换;
4. 将培养瓶放入培养箱中培养;
5. 细胞复苏~3 天后, 融合度达到 80~90 % 时, 可以进行细胞传代; 推荐传代 3 次后再进行细胞应用

注意: 由于复苏的细胞非常脆弱, 一般无需离心去除 DMSO。

8. 细胞传代

1. 当细胞发生 80~90 % 融合时, 可以进行传代。吸出培养瓶中旧培养基和脱落的细胞, 然后用 5mL 不含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的 DPBS 漂洗贴壁细胞, 冲洗后吸出 DPBS 漂洗液;
2. 加入 3ml 1X Trpzyme™ 细胞消化液 (S342) (T25 培养瓶中仅需加入 1 mL; Trpzyme™ 细胞消化液是源培生物专门为 MSVP 无血清培养基适用细胞设计的不含动物源成分的消化液);
3. 室温放置 2~5 分钟, 期间可轻轻敲打瓶壁, 帮助细胞解离; 待细胞从培养瓶壁脱离后, 迅速加入 9mL 完全的 VirusPro™ MSVP 无血清培养基, 倾斜、轻晃培养瓶, 混匀新加入的液体, 且充分接触培养瓶内壁所有角落;
4. 离心, 去掉上清, 用培养液重悬细胞计数;
5. 以 $1\sim 5 \times 10^4$ 个/mL 的细胞密度接种入新的细胞培养瓶中;
6. 放入培养箱培养, 当细胞发生 80~100% 的融合之后可进行传代, 一般 3~5 天。

9. 细胞驯化

指细胞从添加血清的培养基转换到无血清培养基 (SFM) 中的过程。针对本培养基, VERO 细胞仅需要少量驯化或者完全不需要驯化。

推荐当细胞满足以下条件时进行驯化:

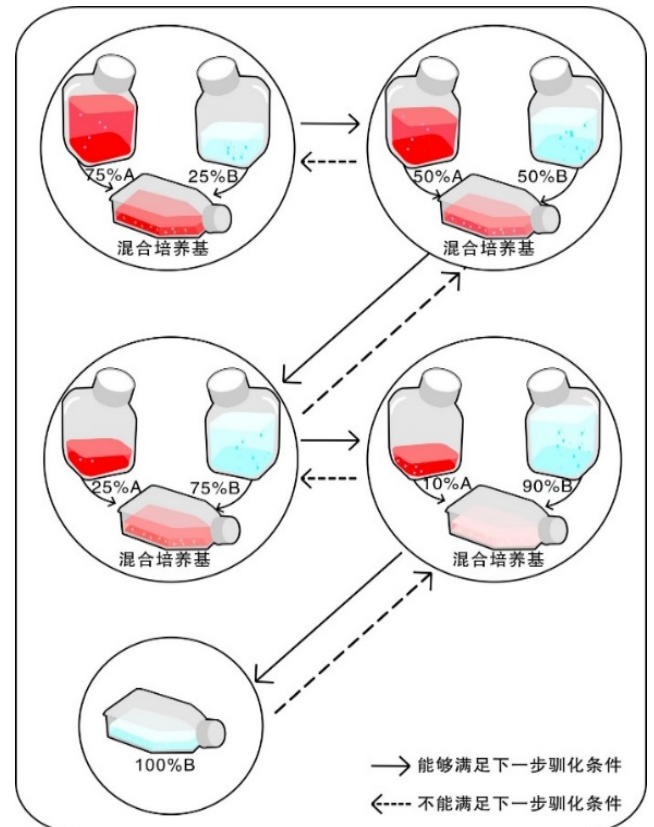
- ① 对数生长期;
- ② 细胞贴壁融合率在 80~100%

驯化成功标准: 细胞实现无血清或低血清培养, 每 3~5 天, 细胞贴壁融合率在 80~100%, 细胞的比生长速率与驯化前一致。

对于需要驯化的细胞, 请直接采用间接驯化法, 即分几步把细胞从待替换的培养基 (一般是含血清培养基, 也可以是其它无血清培养基) 转换到目标培养基 (一般指无血清培养基, SFM, 此处指完全的 VirusPro™ MSVP 无血清培养基) 中。

下述步骤, 待替换的培养基称为 A; 目标培养基称为 B。

与传代操作相同, 参考贴壁细胞传代 1~6 步的操作方法, 每一次传代过程, 使用一种如下图方案配比的混合培养基 (起始 75% A + 25% B), 保证细胞在当前混合比例的培养基中达到下一次驯化标准时, 再按照方案更换下一比例的培养基, 直到最后使用 100 % B 培养基;



继续监控细胞生长 3~5 代, 直到驯化成功;

注意: 在驯化过程中, 最好不要让细胞过度生长。

推荐在驯化成功前, 做好原始培养物的备份; 间接驯化时, 每次适应新比例的混合培养基之前, 做好当前培养物的备份。

10. 细胞冻存

推荐采用对数生长期且细胞活率大于 90% 的细胞进行冻存。

推荐准备足够的细胞培养物, 保存适量条件培养基。

1. 准备冻存培养基 (45 % 新鲜的完全培养基 + 45 % 条件培养基 + 10 % DMSO), 并在 2~8 °C 避光条件下预冷 (不超过 24 小时);

推荐使用源培生物 CD-Freezer® 化学成分限定细胞冻存液 (S919JV), 该冻存液已含有 7.5% 的 DMSO, 可做细胞冻存培养基。

2. 进行细胞计数, 计算细胞密度, 细胞活率和活细胞密度 (ρ_1); 然后根据待保存的细胞数 (n), 计算需要离心收集的细胞培养物的体积 (V_1), 以及所需的冻存培养基的体积 (V_2)。一般冻存

时的活细胞密度 (ρ_2) 为 $0.5 \times 10^7 \sim 1 \times 10^7$ 个/mL。 $V_1 = n/\rho_1, V_2 = n/\rho_2$ 。

3. 离心 ($100 \times g$, 5~10 分钟) V_1 体积的培养物收集细胞, 除去上清; 使用 V_2 体积预冷的细胞冻存液将细胞重悬;
4. 根据后续使用需求, 将上述细胞重悬液分装到细胞冻存管中 (一般 1.5mL 每管);
5. 在冻存管上做适当标识(例如细胞名称、冻存时间及操作者);

6. 可使用程序化降温仪或者人工控制细胞的温度下降 (标准的冻存降温速率为 $-1 \sim -2$ °C/min)。当温度达 -25 °C 以下时, 温度降速可增至 $-5 \sim -10$ °C/min; 到 -100 °C 时, 则可迅速浸入液氮中;

7. 人工降温的操作方法可以是: 将细胞冻存管放入含有异丙醇的冻存盒中, 置于 -20 °C 冰箱 2 小时, 然后置于 -80 °C 冰箱中过夜, 最后单独取出冻存管移入液氮容器内。

注意: 细胞冻存 24 小时之后, 或者长期冻存 (比如半年后), 应进行细胞复苏能力检测。

11. 相关产品

货号	品名	规格	存储条件	运输条件
S110JV	青霉素-链霉素 (双抗), 100X *	100 mL	$-30 \sim -5$ °C	干冰
S210JV	L-谷氨酰胺溶液, 100X *	100 mL	$-30 \sim -5$ °C	干冰
S240JV	L-丙氨酸-谷氨酰胺溶液, 100X *	100 mL	$2 \sim 8$ °C	蓝冰
S450J7	胰岛素-转铁蛋白-硒添加剂 (ITS-G), 100X *	10 mL	$2 \sim 8$ °C	蓝冰
S451J7	胰岛素-转铁蛋白-硒-丙酮酸钠添加剂 (ITS-A), 100X *	10 mL	$2 \sim 8$ °C	蓝冰
S452J7	胰岛素-转铁蛋白-硒-乙醇胺添加剂 (ITS-X), 100X *	10 mL	$2 \sim 8$ °C	蓝冰
FBS500	Moregate 胎牛血清, 澳洲原装进口	500 mL	$-30 \sim -5$ °C	干冰
S615JJ	Moregate 胎牛血清, 原装进口, 源培分装	50 mL	$-30 \sim -5$ °C	干冰
S615JY	Moregate 胎牛血清, 原装进口, 源培分装	10 X 50 mL	$-30 \sim -5$ °C	干冰
B310KJ	磷酸盐缓冲液 (PBS), pH7.2	500 mL	$2 \sim 30$ °C	常温
B320KJ	磷酸盐缓冲液 (PBS), pH7.4	500 mL	$2 \sim 30$ °C	常温
S310JV	胰酶 EDTA 溶液, 0.25%	100 mL	$-30 \sim -5$ °C	干冰
S320JV	胰酶 EDTA 溶液, 0.05%	100 mL	$-30 \sim -5$ °C	干冰
S342JV	Trpzyme® 重组胰蛋白酶消化液, 不含酚红	100mL	$-30 \sim -5$ °C	干冰
S919JV	CD-Freezer® 化学成分限定细胞冻存液	100mL	$2 \sim 8$ °C	蓝冰

* 100X 代表产品的浓度是工作浓度的 100 倍。