

货号	品名	规格	有效期	外观	储存条件	运输条件
H840KJ	TC-100 昆虫细胞培养基	500mL	12 个月	液体	2 ~ 8 °C, 避光	蓝冰

## 1. 产品描述

TC-100 昆虫细胞培养基是对 Grace's 昆虫细胞培养基的改良型配方。改良是为了优化斜纹夜蛾细胞对 NPV 病毒（核多角体病毒）的生产。它不含原始配方中的蔗糖、果糖和几个三羧酸循环中间体。

TC-100 是基础配方，使用时需添加 10% 的胎牛血清（货号 S660JY）。该培养基支持几种鳞翅目细胞系的生长，包括草地贪夜蛾（即斜纹夜蛾细胞），用于杆状病毒的生产。

本产品使用注射用水（Water-For-Injection）配置。

### 本产品关注点

含有（+）

- D-葡萄糖
- L-谷氨酰胺
- 碳酸氢钠

不含（-）

- 酚红

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

本产品为过滤除菌产品

物理外观：黄色澄清液体

内毒素：≤1 EU/mL

渗透压：330 ~ 370 mOsm/kg·H<sub>2</sub>O

pH 值：5.9 ~ 6.5

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

TC-100 是基础培养基，使用时需添加 10% 的胎牛血清（货号 S660JY），配制成 TC-100 昆虫细胞完全培养基。

## 6. 细胞培养的条件

培养基：TC-100 昆虫细胞完全培养基

细胞系：鳞翅目细胞系

细胞类型：贴壁或悬浮

培养容器和设备：培养瓶，摇瓶、生物反应器或 CO<sub>2</sub> 恒温摇床

培养条件：36 ~ 37 °C，CO<sub>2</sub> 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 CO<sub>2</sub> 含量的设置。

注：以下实验方案，悬浮培养采用容器均以 125mL 锥形瓶为例；贴壁培养容器均以 T75 细胞培养瓶为例，贴壁细胞培养时请确保适当的气体交换。

## 7. 复苏

以下实验方案，悬浮培养采用容器均以 125mL 锥形瓶为例。

以—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（125mL 锥形瓶），在容器中加入 28.5mL 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—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，采用合适的封闭材质封闭瓶口，确保适当的气体交换；
4. 将锥形瓶放到摇床中，设置转速 120~140rpm，进行细胞培养；
5. 细胞复苏 3~5 天后，挑选对数生长期的细胞进行传代；推荐以  $3 \times 10^5$  个/mL 的活细胞密度进行传代，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. 悬浮细胞传代

昆虫细胞对机械剪切力非常敏感，请注意操作轻柔，避免过多的机械损伤。在细胞传代 30 次或者持续 3 个月以上时，复苏新的冻存细胞进行传代。

**推荐当细胞满足以下条件时进行传代：**

- ① 对数生长期；
- ② 细胞活率大于 90 %

③ 活细胞密度达到 $\sim 2 \times 10^6$ 个/mL。

#### 传代步骤：

1. 离心收集细胞 (100×g, 5~10 分钟)；
2. 使用少量预热培养基重悬细胞，进行细胞计数，确定细胞活率，计算活细胞密度；
3. 在无菌的培养容器 (125mL 锥形瓶) 中加入合适体积的预热的完全培养基；然后立即以  $3 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$  个/mL 的最终活细胞密度，把细胞接种入锥形瓶中；
4. 将锥形瓶放到摇床中，设置转速 120~140rpm，进行细胞培养；
5. 当活细胞密度达到  $2 \times 10^6$  个/mL 时，可以进行传代；

**注意：**悬浮细胞传代过程最好使用上面推荐的步骤，也可以不离心，直接细胞计数然后添加预热的新培养基分瓶培养。但是为减少细胞代谢物和碎片在培养基中的积累，进而影响细胞活性，每 1~2 周应该彻底更换一次培养基。

如果距复苏或者上次传代已满 5 天，活细胞密度仍然不达标要求，请彻底更换培养基，或者复苏新的冻存细胞。

#### 9. 贴壁细胞传代

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 4mL (每 25cm<sup>2</sup>用量) 预热的培养基重悬细胞。采用反复轻轻吹打单层贴壁细胞的方法进行重悬；
2. 观察细胞脱落情况，如果需要，使用不损坏培养瓶的方法，可轻轻敲打瓶壁，帮助细胞解离；
3. 将细胞悬液转移至无菌的 15mL 离心管中，所有细胞簇将会在之后的 1~2 分钟快速沉降至管底。使用移液器轻轻吹打分散细胞；
4. 进行细胞计数，确定细胞活率，计算活细胞密度；
5. 在含有预热培养基的培养瓶 (5mL/25 cm<sup>2</sup>) 中加入  $2 \sim 5 \times 10^4$  个/cm<sup>2</sup> 的活细胞；
6. 在推荐的培养条件下培养，一般 3~5 天，细胞发生 80~90% 的融合之后 可进行传代。

#### 11. 相关产品

货号	品名	规格	存储条件	运输条件
H832KJ	InsectPro® 昆虫细胞无血清培养基, 无动物源	500mL	2 ~ 8 °C	蓝冰
H861KJ	InsectPro® 昆虫细胞无血清培养基补料, 无动物源	500mL	2 ~ 8 °C	蓝冰
S660JY	胎牛血清	10*50mL	-30 ~ -5 °C	干冰

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 ( $\rho_1$ )；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 ( $\rho_2$ ) 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×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。