



BalanCD HEK293 Viral Feed 病毒载体生产补料

货号 #	产品	形式	标准规格
91176	BalanCD HEK293 Viral Feed	液体	500 mL
981921**	BalanCD HEK293 Viral Feed	粉末	10 L

* 可按需提供定制规格

** 可根据要求提供

预期用途

仅用于研究或进一步生产使用。

产品描述

BalanCD HEK293 病毒载体生产补料是一种化学成分限定的、不含动物源成分的培养基补料，经优化以提高HEK293细胞中病毒载体的产量。它不含水解物、L-谷氨酰胺、抗生素、抗真菌剂或任何其他未定义的成分，是转染后HEK293悬浮培养的即用型补料添加剂。BalanCD HEK293 病毒载体生产补料含有40 g/L葡萄糖。优化其与BalanCD HEK293 培养基的搭配使用，并与HEK293悬浮培养的其他基础生长培养基兼容。BalanCD HEK293 病毒载体生产补料可在培养物中与抗结团补充剂搭配使用，以减少细胞聚团。

质量保证

所有质量控制测试结果参见产品各个批次的分析报告（COA），详情可在 <https://fujifilmbiosciences.fujifilm.com/us> 上获取或咨询相关人员。

储存说明和稳定性

液体培养基

产品须在无菌技术下使用以避免发生污染。产品储存在2-8°C并避光。本产品在未开封和正确储存的情况下可稳定12个月。产品超过保质期之后请勿使用。未开封保质期之后的使用未经验证。若出现颗粒或浑浊请立即停止使用。

粉末培养基

请将产品储存在2-8°C远离大气水分的干燥环境中。本产品具有很强的吸湿性，应保存在干燥的环境中，避免受潮。开封前将粉末平衡至室温，使用后请重新密封。粉末应该是自由流动的，如发现结块请勿使用。该产品在未开封和正确储存的情况下，可稳定保存24个月。超过保质期之后请勿使用。

使用说明

BalanCD HEK293 病毒载体生产补料粉末培养基的水化

1. 在适当大小的容器将粉末培养基(130.03 g/L, 货号 981921)加入到所需的最终体积的WFI(定容至1000 mL/L, 货号9309或其它替代产品)进行水化。
 2. 将溶液混合约30-60分钟或直到粉末充分溶解(此时溶液可能仍然浑浊)。可滴加5N HCL以使pH降至弱酸条件以完全溶解。
 3. 向溶液中加入2.20 g/L碳酸氢钠, 并以中速混合直至完全溶解。
 4. 测量pH值, 并使用5N NaOH溶液将其调整至预期范围6.9-7.4。预期渗透压摩尔浓度范围为1100-1500 mOsm/kg。
 5. 通过0.2 μ m滤膜进行无菌过滤。
 6. 在2-8°C的避光环境下最长可保存1年。
 7. 如有必要, 在使用前向BalanCD HEK293病毒载体生产补料中添加20 mL/L的200 mM L-谷氨酰胺(货号 9317), 以达到4 mM的最终浓度。
 8. BalanCD HEK293病毒载体生产补料含有0.1% 泊洛沙姆(Poloxamer); 然而, 如有必要, 可补充0.05%至0.1%。
- 注意: 关于细胞复苏和驯化、传代和冷冻保存, 请参阅《BalanCD HEK293系统产品说明书》(货号 91165 和 94137)。

补料和补充物

在 BalanCD HEK293 培养基 (货号 91165 or 94137 含有 4 mM L-谷氨酰胺, 货号 9317) 中培养的细胞可补充有 BalanCD HEK293 病毒载体补料和补充物生产补料来提高病毒的产量。

如果细胞开始聚集, 可以将抗结团补充剂 (货号 91150) 添加到培养物中。对于添加了该补充物的培养物, 在转染之前必须从培养基中去除抗结团补充剂, 因为该补充物将完全抑制转染。为了从培养物中去除抗结团补充剂, 重悬细胞, 然后用1X PBS (货号 9240) 或BalanCD HEK23 培养基 (货号 91165) 洗涤细胞。在进行转染之前, 将细胞重新悬浮在不含抗结团补充剂的BalanCD HEK293 培养基中。

- 注意: BalanCD HEK293 病毒载体生产补料用于转染后, 因为它会完全抑制转染。

使用指南

1. 使用对数生长期的细胞 ($1 - 5 \times 10^6$ cells/mL)且已适应于BalanCD HEK293 补充有 4 mM L-谷氨酰胺的培养基 (货号 9317)。
2. 转染前一天以 1×10^6 cells/mL 活细胞密度接种。
3. 按照转染试剂制造商提供的推荐方案, 在第0天用质粒载体和转染试剂的混合物转染细胞(最佳转染参数根据多种因素而变化, 包括但不限于细胞类型和DNA纯度。因此, 强烈建议用户对参数进行特定优化)。转染时的细胞活率应大于90%, 活细胞密度为 $1.5 - 2.5 \times 10^6$ cells/mL。转染后计数细胞以收集基线数据。
4. 在转染后约24小时(第+1天), 将12%(v/v)BalanCD HEK293病毒载体生产补料(货号91176)添加到总培养体积中。
5. 可选: 在转染后48小时(第+2天)收集细胞样本用于转染效率测量(使用FACS或任何基于图像的方法)。
6. 从第+1天开始, 每天收集样本进行细胞计数和病毒滴度测量, 以找到最佳收获时间(第+2天至第+4天)。
7. 在转染时(第0天)进行代谢产物测量(pH、渗透压、L-谷氨酰胺、葡萄糖、乳酸、铵), 并在收获时进行监测。
8. 在转染和收获时收集样本(500 μ L/样本), 用于进一步的培养基分析。需要将细胞分离, 培养基需要通过0.1或0.2 μ m的过滤器进行过滤, 并在-10°C下存储。

BalanCD HEK293 病毒载体生产补料优化指南

BalanCD HEK293 病毒载体生产补料可使用上述建议的补料方法进行评估。然而，为了达到最佳的培养性能和结果，我们强烈建议优化补料计划和体积。补料的开始时间应至少为转染后6小时，以避免对转染产生任何干扰。总补料量可以在10-15%的范围内，并且可以单次加入或分多个时间点加入。

➤ **注意：**终端用户应优化补料计划和条件，包括最通过监测细胞健康指数进行浓度滴定。

应用数据示例

腺相关病毒（AAV）的生产

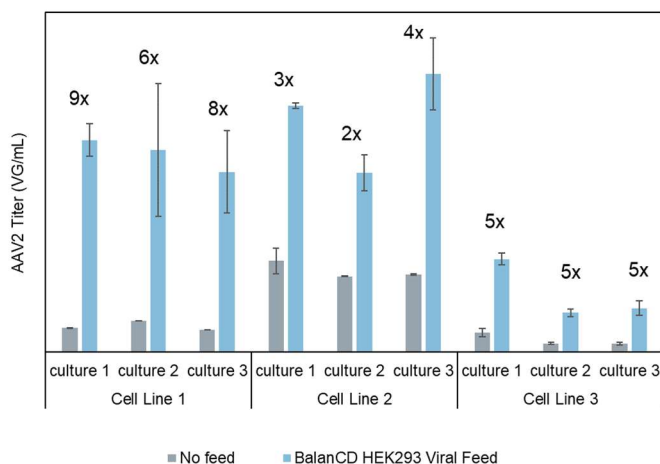
以下PEI介导的瞬时转染方案可作为优化转染方案的一般指南。我们强烈建议优化转染参数，因为最佳的转染参数可能根据应用的不同而变化。

BalanCD HEK293培养基也与其他如使用阳离子脂质体或电穿孔的转染方法兼容。

PEI-诱导的转染

示例的培养条件

- 培养基: 含有4mM L-谷氨酰胺补充物(货号 9317) 的BalanCD HEK293 (货号 91165)
- 细胞库: 将HEK 293 细胞直接在BalanCD HEK293培养基中复苏，如上所述进行补充,在转入生物反应器进行生产之前传代三次（每隔3-4天传代一次）。
- 培养容器: 125-mL平底聚碳酸酯摇瓶，带挡板
- 工作体积: 摇瓶体积的 20-25% (如 125 mL 摇瓶的 25-30 mL)
- 传代时的接种密度: 3×10^5 cells/mL
- 转染的接种密度: $\sim 1 \times 10^6$ cells/mL, 转染的前一天
- 转染时的细胞密度: $\sim 2 \times 10^6$ cells/mL
- 培养箱环境设定: 37°C, 5% CO₂, 120 rpm 摇动速度, 80% 湿度
- 如上所述，在第0天进行转染:
 - >90% 活率
 - 转染试剂: 聚乙烯亚胺PEIpro (PolyPlus)
 - 构建AAV使用的3质粒 (摩尔比, 1:1:1)
 - DNA:PEI的比例为1:2
 - 每毫升(mL)培养物的总DNA量为1.5 µg
- 补料: 转染后24小时，向培养物加入12% (v/v) 的BalanCD HEK293 Viral Feed。

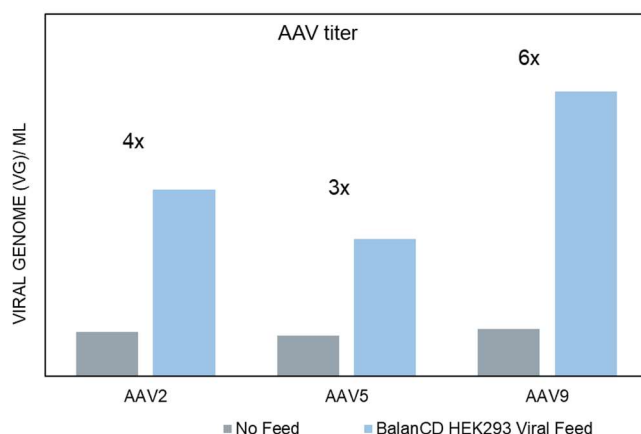


BalanCD HEK293 Viral Feed 提高了各种HEK293 细胞系中AAV2的产量。

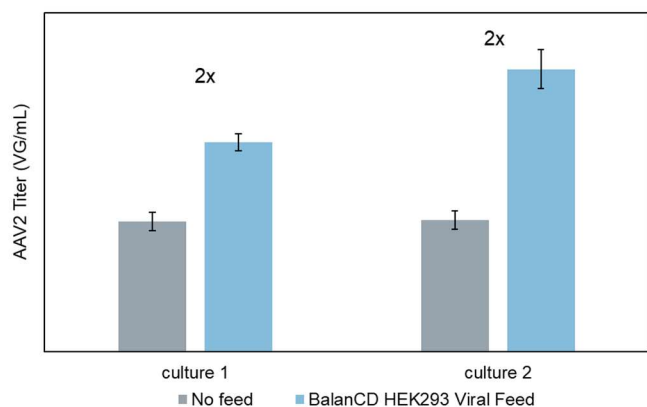
HEK293细胞(3个细胞系)用BalanCD HEK293培养基进行3重复培养(culture1-3), 转染后24 h 添加12%(v/v) BalanCD HEK293 Viral Feed或无补料对照。转染72小时后收集细胞。对于细胞系1和2, 使用real-time PCR滴定试剂盒(TakaraBio), 对于细胞系3, 使用数字PCR(QIAAcuity)进行AAV2, 通过qPCR定量每个细胞培养物中的AAV2滴度测定。所有实验中均使用ITR引物。误差条显示每个细胞裂解物样品的3次qPCR结果的标准偏差。在每个培养组中显示了与无补料对照组相比的滴度倍数提升。

BalanCD HEK293 Viral Feed 可提高多种不同AAV血清型的滴度。

HEK293细胞(细胞系4)在BalanCD HEK293培养基中培养, 用表达不同血清型AAV的载体转染, 并补充BalanCD HEK293 Viral Feed或无补料对照。在300 mL培养体积中, 每mL培养物使用1 μ g DNA。AAV滴度通过数字液滴PCR(Biorad)测定。每种血清型的滴度都比不加补料时提高了几倍。



脂质体介导的转染



BalanCD HEK293 Viral Feed 与脂质体转染兼容。

HEK293细胞(细胞系2, 代表两次重复培养的结果)在BalanCD HEK293中生长培养基并使用AAVmax(Thermo Fisher Scientific)转染试剂盒材料和方法, 包括阳离子脂质转染试剂、转染促进剂和AAV生产增强剂。按照建议添加BalanCD HEK293 Viral Feed或无补料对照。使用ITR引物通过dPCR(QIAAcuity)测量的病毒基因组滴度表明与无补料对照组相比, BalanCD HEK293 Viral Feed可使AAV2产量增加2倍。

相关产品

货号 #	产品	标准规格
91165	BalanCD HEK293, Liquid	1 L
94137	BalanCD HEK293, Powder	10 L
91150	Anti-Clumping Supplement	50 mL
9317	L-Glutamine Solution (200 mM)	100 mL, 500 mL
9309	Water for Injection (WFI)	1L, 20L, 200 L
9240	1X PBS, Dulbecco' s Phosphate Buffered Saline	100 mL, 500 mL, 1 L

技术支持

联系我们

更多信息或协助联系客服服务:

- Email: biopharma@fujifilm.com

网站资源

请访问网址<https://fujifilmbiosciences.fujifilm.com/us>, 技术资源和信息包括:

- 安全数据表(SDS)
- 分析证书(CoA)(如有)
- FAQs
- 产品文献

富士胶片(中国)投资有限公司

公司地址: 上海市浦东新区平家桥路100弄6号7号楼601单元
网址: <https://fujifilmbiosciences.fujifilm.com/us>
销售咨询: 021-5010 6000 转生命科学事业部