

Tumor Cell Serum-free Medium

通用肿瘤细胞无血清培养基套装

/ 使用说明文件 /

— Instruction manual —



使用前请仔细阅读本操作说明

友康厚德生物制品（北京）有限公司

YOCON 友康®

通用肿瘤细胞无血清培养基套装使用说明书

【产品名称】

通用肿瘤细胞无血清培养基套装

【规格与保存】

产品名称	产品货号	包装规格	保存条件	保质期
通用肿瘤细胞无血清培养基基础	NC0306	500 mL/ 瓶	2-8℃, 避光	12 个月
通用肿瘤细胞培养基添加剂	NC0306.S	冻干粉	2-8℃, 避光	12 个月

【用途与描述】

通用肿瘤细胞无血清培养基套装, 可用于培养多种肿瘤细胞系 (如 HeLa, A549, HepG2, SP2/0) 和其他细胞系 (MDCK, Jurkat, Vero, LLC-MK2), 更适合研究癌症和其他疾病。本产品仅限科研使用, 不得用于诊断、治疗、临床及其它用途。

与传统基础培养基 (RPMI1640、DMEM 和 F12) 相比, 使用本产品无需添加血清或血清替代物, 同样可以很好地支持细胞生长, 维持细胞活性。大多数细胞系无需适应即可直接从常规培养基过渡到通用肿瘤细胞无血清培养基。

【主要组成成份】

氨基酸、维生素、无机盐、微量元素、生长因子、贴壁因子、重组人转铁蛋白、重组人胰岛素等。

【产品设计原理】

在诸如 DMEM/F12、MEM、M199 等基础培养基之上, 添加了各种氨基酸、维生素、无机盐、微量元素、生长因子、贴壁因子、重组人转铁蛋白、重组人胰岛素, 适用于培养肿瘤细胞, 可保持细胞正常的形态与扩增倍数。

【产品性能指标】

1. 从细胞培养综合评价 (以 HeLa 细胞为例)

HeLa 细胞	方法	标准	结果
细胞形态	镜检	背景干净, 细胞形态规则、饱满发亮	符合要求
细胞贴壁时间	镜检	<4 小时	<4 小时
连续传代	细胞培养	连续传代 10 次, 细胞形态正常, 增殖速度正常	符合要求

2. 产品指标

外观：橘红色澄清透明液体；pH 值：7.0 ~ 8.1；渗透压：320 ~ 350 mOsm/Kg。

【使用前特别提示】

1. 本产品的使用方法与血清培养基及血清替代物培养基相比，有些细胞可能需进行驯化操作。

1.1 直接适应

通常情况下，在传统血清培养基中培养的肿瘤细胞或其他细胞系可以直接传代至友康通用肿瘤细胞无血清完全培养基中进行培养。具体操作如下：

(1) 弃原细胞培养液，直接换成通用肿瘤细胞无血清完全培养基，连续培养 2~3 代次适应后，即可进行攻毒、药物筛选等实验。

(2) 如果在 3~5 代次监测到细胞形态变差、扩增倍数降低，即可使用间接适应方法。

1.2 间接适应

极少数情况下，有些细胞直接替换为友康通用肿瘤细胞无血清完全培养基后不能正常生长，具体表现为传代后细胞状态变差，死亡率逐渐变高，形态发生改变。这种情况下，建议改用间接适应的方法。具体操作如下：

(1) 弃原细胞培养液，换含 5%FBS 肿瘤细胞无血清完全培养基培养，待细胞融合度达 80% 左右后，进行传代培养；

(2) 待细胞成良好致密单层时，对细胞进行传代，降低胎牛血清使用量至 3%，使用该浓度血清连续传代 2~3 次，然后继续降低血清使用量；

(3) 待细胞生长增殖、贴壁率等与使用高浓度血清培养效果无显著差异时，继续传代，降低血清浓度至 1%；

(4) 一般使用含 1%FBS 肿瘤细胞无血清完全培养基培养 2~3 代，转至通用肿瘤细胞无血清完全培养基，即可进入正常培养程序。

【通用肿瘤细胞无血清培养基准备】

取 5mL 通用肿瘤细胞无血清培养基基础，置于通用肿瘤细胞培养基添加剂瓶中，使得通用肿瘤细胞培养基添加剂彻底溶解后，转入 500mL/ 瓶通用肿瘤细胞无血清培养基基础即成为通用肿瘤细胞无血清完全培养基。由于包装瓶壁及吸取枪头有残留，建议再次取出适量培养基润洗通用肿瘤细胞培养基添加剂瓶子。

通用肿瘤细胞无血清完全培养基 2~8°C 可避光保存 30 天，由于蛋白在溶液中易降解，所以最好能在 2 周内用完，使用前需在室温下预温 10~30min，时间不宜过长，切勿强光或紫外照射。科研小量、多次使用时，建议分装成小体积预温使用。完全培养基配制完成后，不可多次反复预温（控制在 5 次以内），禁止使用超过 30 日未使用完的完全培养基。

【细胞培养：以Hela细胞，T-25瓶培养体系为例】

1. 细胞复苏

(1) 从冰箱中取出完全培养基，在生物安全柜或超净台中吸取适量（如 T-25 瓶：5mL）完全培养基沿上表面加入细胞培养瓶中，然后慢慢将培养瓶放平，备用，在室温中预热培养基 10~30min。

(2) 从液氮中快速取出 1 支 Hela 细胞株，传递至实验室，迅速在水浴锅中复融，可左右晃动以缩短融化时间，一般 1~2min。

(3) 将冻存管表面喷洒酒精消毒，移入超净工作台中，使用无尘布擦拭表面。将解冻后细胞悬液移入 10mL 完全培养基中。

(4) 混匀后立即离心，1000rpm，5min 即可。离心结束后缓慢弃去上清，使用移液枪转移。转移时应缓慢，避免将离心的细胞吸起来造成浪费。

(5) 弃去上清后，吸取 1mL 完全培养基于离心管中，重悬细胞，混合均匀。取 200 μ L，在流式细胞仪上进行计数，结果作为接种依据。

(6) 将先前预温的 T-25 瓶取出，按照 1.5×10^4 cells/cm² 密度进行接种，取相应量的细胞悬液加入溶液中，不必吹吸，摇匀即可。瓶上标注：批号、培养时间、细胞代数。

2. 细胞传代

(1) 在超净台中，弃去 T-25 瓶中培养液，加入 5mL 无钙镁离子 PBS 清洗，连续三遍。使用 1mL 移液枪移去残留缓冲液。

(2) 加入 1mL 的友康温和消化酶溶液（货号：NC1004.1），轻轻晃动培养瓶使之浸润所有细胞，置于 37°C 培养箱中进行适度消化。计时 2~5min，在显微镜下观察所有细胞收缩变圆，即可终止消化。

(3) 加入温和酶使用量 2 倍（或以上）体积（ ≥ 2 mL）的肿瘤通用无血清完全培养基来进行终止消化。用移液器轻轻吹打瓶壁上未完全脱离的细胞，并轻轻吹打混匀，使细胞完全分散。吹打轻柔程度以不起泡沫为准。

(4) 将细胞悬液转移到 15mL 离心管中，1000 rpm 离心 5 min。离心结束后，弃上清，加入 1 mL 完全培养基重悬细胞，混匀后取 200 μ L，用流式细胞仪进行计数，结果作为接种依据。

(5) 按照 1.5×10^4 cells/cm² 密度进行接种，左右、前后各平置晃动 3 下，摇匀后置于 37°C、5%CO₂ 的培养箱中。

3. 细胞冻存

(1) 取样计数确认细胞密度，宜冻存对数期、细胞活率大于 80% 的细胞。

(2) 细胞培养液 1000 rpm 室温离心 5 min，除尽上清。

(3) 友康无血清冻存液重悬细胞，根据需求调整冻存密度至 2×10^6 cells/mL，冰袋上快速分装。

(4) 分装好的细胞立即放入 -80 °C 冰箱中，24 h 后移入液氮长期保存。

【常见细胞系接种、培养和冻存程序推荐】

细胞类型	接种密度 (T-25)	传代周期	温和胰酶消化时间 (min)	冻存规格 (cells/mL)
A549 (人肺癌细胞)	2×10^4 cells/cm ²	2~3 次 / 周	4~6	$2 \sim 3 \times 10^6$
HepG2 (人肝癌细胞)	3.5×10^4 cells/cm ²	2~3 次 / 周	6~8	$3 \sim 5 \times 10^6$
Sp2/0 (小鼠骨髓瘤细胞)	1×10^5 cells/mL	2~3 次 / 周	/	$2 \sim 3 \times 10^6$
Vero (非洲绿猴肾细胞)	2×10^4 cells/cm ²	2~3 次 / 周	4~6	$1 \sim 2 \times 10^6$
MDCK (犬肾上皮细胞)	1.5×10^4 cells/cm ²	2~3 次 / 周	5~7	$2 \sim 3 \times 10^6$
LLC-MK2 (恒河猴肾细胞)	1.5×10^4 cells/cm ²	2~3 次 / 周	3~5	$2 \sim 3 \times 10^6$
Jurkat (人 T 淋巴细胞白血病细胞)	1×10^5 cells/mL	2~3 次 / 周	/	$2 \sim 3 \times 10^6$

注：因细胞代数、培养环境和操作手法不同，接种密度、消化时间参数仅供参考。

【用户经常提问的问题与解决方案】

1. 客户对常规培养基（DMEM 或 RPMI1640）+10%FBS 培养细胞效果已经很满意了，为什么要换用友康通用肿瘤细胞无血清培养基？

答：友康通用肿瘤细胞无血清培养基是不添加血清的合成培养基，批次一致性高，组分稳定，可大量配置。经过大量实验测试，大多数细胞系无需经历驯化适应程序，可直接转入通用肿瘤细胞无血清培养基中。成本降低，价格波动不大，如果使用血清，很容易受到周围环境的影响（如天气干旱、血清产量降低等）。解决方法：通过改变加入培养液的方式来解决。

2. 细胞复苏后生长缓慢，传代后细胞状态差？

答：分析可能有以下原因导致：1. 要排除操作失误、冻存细胞状态差和支原体或细菌感染等造成的细胞无法正常生长；2. 细胞传代时应处于对数生长期；3. 由于细胞刚复苏状态不佳，可能需适应 1 ~ 2 代次。

3. 我现在有很多冻存的细胞，这些细胞原来在别的培养基中培养。不知是否可以直接转入无血清培养基？

答：可以直接转入无血清培养基培养，为了使细胞尽快适应减血清培养，应以较高的起始密度接种，活细胞率达 90%，并处于对数生长中期。

4. 以友康通用肿瘤细胞无血清培养基套装培养细胞，进行消化传代时，是否可使用商品化胰酶操作？

答：不建议使用商品化胰酶进行消化处理，易对细胞造成损伤，若确需使用，需将商品化胰酶减半稀释为 0.125%，离心去除残留胰酶。

强烈推荐使友康温和消化酶（（货号：NC1004.1））消化细胞，经测试，细胞在消化酶中浸润 15 分钟，仍保持高活性，若有些细胞难于消化，可进行二次胰酶重复消化。

【说明书核准日期】 2024年6月18日



文件版本号：2023 -V1.0

ISO9001、ISO13485质量体系认证企业

国家高新技术企业

生产企业：友康厚德生物制品（北京）有限公司

生产地址：北京市密云区科技路6号

联系电话：400-001-1266 010-58711655

公司网址：www.yocon.cn

