



MDCK细胞全悬浮生长培养基

一、产品概述

MDCK306是MDCK细胞通用型无血清全悬浮培养基，广泛应用于流感疫苗的生产。

二、订购信息

表 1 订购信息

产品名称	液体		固体	
	货号	规格	货号	规格
MDCK306	SH10407-01	1L	SH1077	1L/5L/10L/50L/100L

三、产品参数

表2 MDCK306培养基产品参数

理化特性	外观	澄清浅红色液体 均匀细致粉末
	pH	6.8-7.2
	渗透压	280-320 mOsm/kg
	内毒素	≤5 EU/mL
	是否含有谷氨酰胺	是
细胞相关	适用细胞	MDCK
	倍增时间	24h
保质期	保质期限（固体）	15个月
	保质期限（液体）	12个月

四、使用范围

仅用于科研及工业生产，不能用于人体。

五、配制过程

MDCK306培养基含有两个组分：

表3 MDCK306配方量	
组分	配方量
<u>Part1</u>	<u>27.786g/L</u>
<u>Part2</u>	<u>0.06g/L</u>

MDCK306配制说明：

- 5.1. 确定配制总体积，选择两个容器进行配制，其中容器1体积大于总体积，容器2体积大于总体积的0.2%；
- 5.2. 按照配方量在容器1中加入Part1培养基粉末，再加入约配制总体积80%的超纯水或注射用水，建议机械搅拌30min；
- 5.3. 按照配方量在容器2中加入Part2培养基粉末，再加入约配制总体积0.2%的超纯水或者注射用水，70℃水浴加热30min至粉末全部溶解；
- 5.4. 将溶解后的容器2中液体移入容器1中混合；
- 5.5. 建议机械搅拌至少60min至粉末全部溶解；
- 5.6. 充分溶解后测定培养基pH，若测定值在正常范围内则无需调整，若测定值超出正常范围，则用1M的HCL或5M的NaOH调节至正常范围6.8-7.2；
- 5.7. 使用注射用水或超纯水调整总体积至目标值；
- 5.8. 无菌过滤。

六、储存条件

2-8℃低温避光保存。

七、培养基适应

7.1. 直接适应：最初培养阶段，细胞按初始密度 1×10^6 cells/mL 接种，直接将培养基更换为MDCK306，进行细胞培养。待细胞培养2-3代，且细胞生长稳定后进行后续实验。

MDCK细胞稳定生长时按照 1×10^6 cells/mL 密度接种，MDCK306培养基培养72h密度 8×10^6 cells/mL，细胞活率≥95%。

7.2. 间接适应：MDCK306与细胞原培养基1：1比例混合，培养细胞，连续传代2-3代，

细胞稳生长后可将培养基更换为MDCK306，连续传代2-3代，细胞生长 稳定后进行后续实验。MDCK细胞稳定生长时按照 1×10^6 cells/mL密度接种， MDCK306培养基培养72h密度 $8-10 \times 10^6$ cells/mL，细胞活率 $\geq 95\%$ 。

7.3. 注意事项:

7.3.1. 根据细胞具体情况选择进行培养基直接适应或者间接适应。

7.3.2. 细胞驯化初期，若出现细胞生长密度较低、细胞结团等其他不稳定状态， 根据当天细胞密度选择传代方式（稀释传代、离心传代）。

7.3.3. 稀释传代：根据细胞密度计算传代时所需细胞悬液，去除多余细胞悬液 并补加新鲜培养基至培养体积。

7.3.4. 离心传代：根据细胞密度计算传代时所需细胞悬液，进行800rpm离心 5min，去除上清，用新鲜培养基重悬细胞。

7.4. 细胞恢复正常状态传代:

表 4正常细胞生长数据

细胞名称	培养基	接种密度 (cells/mL)	第3天细胞密度 [1] (cells/mL)	细胞活率 (%)	细胞平均倍增时间 (h)
MDCK	MDCK306	1×10^6	$8-10 \times 10^6$	≥ 95	24

注释:

[1] 不同计数方式可能存在差异。

八、MDCK悬浮细胞冻存

8.1. 待细胞恢复至正常状态后，扩大细胞培养体积准备冻存建库。尽量多建细胞库，保证备份充足。

8.2. 选择处于对数生长期、活率 $>90\%$ 的细胞进行冻存，冻存细胞密度: $5-15 \times 10^6$ cells/mL 推荐 15×10^6 cells/mL。

8.3. 准备冻存盒：向程序降温盒注入适量异丙醇后，置于4℃冰箱预冷。

8.4. 配制细胞冻存液：冻存液=80%对应悬浮培养基+10%FBS(建议使用进口胎牛血清)+10%DMSO，冻存液配好后置于4℃冰箱预冷（冻存液配制时，先加培养基 再加入血清或DMSO，防止DMSO浓度过高导致某些有效成分变性）。

8.5. 取细胞悬液，800rpm离心5min，弃去上清，用适量细胞冻存液重悬细胞， 调整细胞密度至目标值。

8.6. 快速分装细胞液至冻存管中。

8.7. 将冻存管放入程序降温盒中，放于-80℃冰箱，24h后转至液氮罐中储存。一段时间后取一只复苏，检测冻存是否成功。

九、MDCK悬浮细胞复苏

9.1. 预热培养基：取25mL对应培养基置于摇瓶中，放入37℃二氧化碳培养箱中预热30min以上（目的平衡培养基pH值），保证预热充分。

9.2. 将冻存管从液氮保存罐或-80℃冰箱中取出，迅速转移至37℃水浴中，快速摇晃，直至完全融化。

9.3. 取预热好的培养基5mL于无菌离心管中，并将溶化后的细胞悬液移入此离心管中。

800rpm离心5min（目的除去冻存液中DMSO）。

9.4. 离心后去除上清，用20mL预热好的培养基（目的保证较高细胞复苏密度）重悬细胞，移回相应摇瓶，放于培养箱中悬浮培养。

BM20220519