

MetaCell® Vero-200

化学成分确定培养基

产品简介

MetaCell® Vero-200 是一种化学成分确定的无血清培养基，无任何动物源成分，不含谷氨酰胺衍生物。
MetaCell® Vero-200 适用于科研和基于细胞培养的大规模生物制品的生产，但不可直接用于人体或作为药物用。

产品名称	产品编码	包装规格	储存条件	有效期	推荐使用范围
MetaCell® Vero-200	P3001-X020	20L	2-8℃, 密闭、避光	12个月 (暂定)	Vero贴壁细胞生长，支 持疫苗、病毒生产
	P3001-X100	100L			

培养条件

培养基：MetaCell® Vero-200

培养类型：贴壁

细胞系：Vero

培养参数设置：

培养方瓶规格	T25	T75	T175
培养体积 (mL)	4-6	14-20	35-45
培养方瓶类型	PS 材质		
培养环境	37 ± 0.5 °C, 5-8% CO ₂ , 湿度≥80%, 尽量避光培养		

MetaCell® Vero-200配液方法 (以1kg为例)

- 在干净的容器中添加900.0-920.0g的超纯水或注射用水 (水温20-30℃)。
- 称取15.400-15.462g培养基干粉缓慢倒入容器 (培养基每升标示量：15.431g/L)。
- 添加碳酸氢钠2.180-2.220g至培养基溶液中，搅拌至完全溶解 (碳酸氢钠每升标示量：2.200g/L)。
- 添加5mol/L氢氧化钠溶液或5mol/L盐酸溶液调节pH至所需范围内 (建议范围为：7.20-7.40)。
- 补水定容至溶液净重至998.0-1002.0g，搅拌5-10分钟。如PH出现明显变化，继续用5mol/L氢氧化钠溶液或5mol/L盐酸溶液调节pH至7.20-7.40范围内。
- 使用0.22μm除菌级滤膜过滤除菌。
- 除菌后的溶液应在2-8℃下密闭避光保存，并于12个月内使用完毕。

准备完全培养基

MetaCell® Vero-200 使用时需要根据需求额外添加谷氨酰胺衍生物 (推荐添加量为4mM)。

细胞复苏

- 干冰运输的细胞应放置在液氮环境下3-7天后再进行细胞复苏。
- 从液氮罐中取出一支冻存细胞，置37 °C水浴锅中，水浴1-2分钟，注意观察冻存管里细胞冰块状态，当仅剩较小冰晶后取出，冰晶在一次吹打后即会消失。
- 15mL离心管里添加9mL预热的完全MetaCell® Vero-200，将复融后的细胞转移至15mL离心管中混匀。
- 100×g离心5分钟后，弃上清，使用已预热的完全MetaCell® Vero-200重悬细胞，然后全部转移至T25培养方瓶中，最终培养体积为4-6mL。
- 当细胞长满培养瓶80-100%时 (复苏1-3天后)，可以进行传代培养，在其他应用前，至少传代3次。

注：若细胞复苏3代后，细胞生长状态正常，应尽快安排冻存。

细胞传代

- 细胞培养72小时后使用倒置显微镜观察细胞生长情况，细胞已长满大约90%左右则可以准备传代 (通常3-5天)；

2. 以T25方瓶为例弃去培养方瓶中的培养液，用2mL已预热的PBS溶液（不含Ca²⁺或Mg²⁺离子）冲洗方瓶中的单层细胞；
3. 向方瓶中加入1-2mL已预热的胰蛋白酶溶液（0.25%胰蛋白酶-EDTA），确保所有细胞浸润到胰蛋白酶溶液；
4. 弃去胰蛋白酶溶液，放回培养箱中孵育4-7min，镜检观察细胞消化情况；
5. 当镜检下细胞全部变成卵圆形，轻拍瓶壁细胞可以成股流下时，加入4-5mL预热好的完全MetaCell® Vero-200，用移液器轻轻吹打细胞面，彻底冲洗细胞面；
6. 将细胞悬液移至15mL无菌离心管中，以100×g离心5分钟，弃去上清，使用4-5mL预热好的完全MetaCell® Vero-200重悬细胞，如果观察到细胞结块，则通过移液器轻轻吹打或涡旋振荡使细胞分散；
7. 使用细胞计数器对重悬细胞液计数以3.0-5.0 × 10⁴ cells/cm²接种培养方瓶。

细胞冻存

1. 最终的细胞冻存密度应控制在3.0-5.0 × 10⁶ cells/mL；
2. 提前配制冻存液：92.5% 完全MetaCell® Vero-200（新鲜培养基和条件培养基的比例为50: 50）+7.5% DMSO，2-8 °C预冷30分钟备用；
3. 取适量细胞悬液，100×g离心5-10分钟，弃上清，用2-8 °C预冷的冻存液重悬后，按照冻存规格，立即将细胞悬液分装至冻存管中（在1.8mL冻存管中分装1mL）；
4. 按照标准程序（每分钟降低1°C），在自动或手动控制速率的冷冻设备中实现冷冻保存；
5. 将冷冻细胞转移至液氮（气相）中储存。

细胞驯化

大多数情况下，无血清培养或低血清培养（3%及3%以下）的Vero细胞可以直接适应MetaCell® Vero-200，含5%-10%血清培养的Vero细胞需要在完全MetaCell® Vero-200中，梯度降低血清含量，如果直接更换培养基（直接驯化）失败，则推荐采用梯度替换（间接驯化）的方法使Vero细胞适应MetaCell® Vero-200。

注：用于驯化的Vero细胞需要处于对数生长期的中早期，且活率>90%。

• 直接驯化法

1. 对于可以直接驯化的细胞，当细胞活率≥90%且处于对数生长中早期时，可尝试直接从无血清培养基或低血清培养（3%及3%以下）接种到完全MetaCell® Vero-200中。
2. 前2到3次传代的接种密度应是正常接种密度的两倍，继续传代3-5次，细胞生长一致后可以开始后续实验。
3. 含5-10%血清培养的Vero细胞，在保证细胞活率≥90%且处于细胞对数生长中早期时，可尝试直接接种到含3%血清的完全MetaCell® Vero-200中，传代2-3次，细胞状态及生长正常后，将血清降至1%，继续传代2-3次，细胞状态及生长正常后，传至无血清的完全MetaCell® Vero-200中，继续传代3-5次，细胞状态及生长正常后，可以开始后续实验。

• 间接驯化法

1. 将原培养基和MetaCell® Vero-200按75:25比例混合（如原培养过程中含有血清，则按原培养基血清含量向MetaCell® Vero-200中添加血清），接种密度为正常传代的1.5-2倍。
2. 培养3-4天后，细胞长满培养方瓶的90%左右传代，传代的接种密度仍为正常传代的1.5-2倍，
 - (1) 如细胞生长状态良好，且活率>90%，则传代时调整原培养基与MetaCell® Vero-200 的比例为50:50；
 - (2) 如细胞生长缓慢，可对细胞进行离心换液，离心条件为100×g离心5分钟。此时的混合培养基依旧为原培养基和MetaCell® Vero-200 以75:25比例混合。
3. 重复步骤2并逐渐增加MetaCell® Vero-200 所占的比例（推荐比例 50:50, 25:75），直到使用100%的MetaCell® Vero-200进行细胞培养。
4. 在100%的MetaCell® Vero-200 中继续培养2-3代，当细胞生长一致后，可认为驯化完成，连续稳定传代3代以上，可进行后续实验。
5. 若原培养方式中含有较高血清（5%-10%）成分，则可在间接驯化后进行梯度无血清驯化，具体驯化过程可参考，直接驯化法步骤2。