

FreeAdd 5X

货号: S6000

pH: 7.5 ± 0.5

内毒素: < 7.5 EU/ml

无菌测试:

厌氧菌和耐氧菌

真菌和酵母

储存: +2/+8°C, 避光

保质期: 12 个月

颜色: 亮白色液体

推荐使用:

无菌手法操作

仅用于科研

应用:

FreeAdd 是化学成分限定的血清替代品.

他可用于细胞的培养, 发展和表达.

FreeAdd 作为细胞培养的添加剂, 被设计用来在体外化学成分限定的条件下来培养细胞。.

FreeAdd 可替代绝大多数的添加剂 (例如胎牛血清), 可成功展现完美的细胞外环境, 使您的培养具有可重现性, 安全性, 验证性. 它几乎不含有蛋白质, 可以减少下游处理过程的成本. 完全限定的成分保证了无需做批次测试及批次预留. 并且只需要冷藏储存. FreeAdd适用于大多数的细胞种类, 包括贴壁细胞和悬浮细胞, 支持原代细胞和细胞系的生长。

在血清培养的条件下, 细胞对抗生素, 酶, 激素和生长因子会格外的敏感. 所以, 这些成分的添加也必须相应的调整. 1.5-2的折扣用量可以设定为起始点。

推荐使用非胰酶类试剂, 推荐使用accutase.

使用说明:

将FreeAdd添加到基础培养基中, 大部分的细胞种类需添加2%。完全培养基在+2/+8°C 避光条件下可储存30天。

使用前, 使FreeAdd在37°C水浴锅中加热并温和摇动, 使之充分混匀。

偶尔会有部分絮状物出现，但这种絮状物会在37°C水浴时溶解。

在血清中培养的细胞可通过下面的方法来适应无血清培养

a) 直接将含血清培养基换成含FreeAdd的培养基

b) 通过大致的逐步替代法更换

FreeAdd 是血清替代品，不是最终的培养基。

FreeAdd 必须加到基础培养基中使用 (例如IMDM, DMEM-F12)

不要过滤FreeAdd，或者是加入FreeAdd后的培养基

如果需要过滤，请先过滤培养基，然后再无菌加入FreeAdd。.

FreeAdd. 5倍稀释后等于血清，所以请等量使用。(例如. 2% FreeAdd replaces 10% FBS)

FreeAdd 不含有例如细胞因子，激素等的生长因子。同样不含有胰岛素。

从有血清向无血清的转换需要培养几代时间的选择。但是，直接转换成功也是有可能的。在两种极端的之间是都有可能发生的。

除了方法以外，关键的因素包括接种细胞的状态，培养密度，传代技术，及细胞培养的物理技术。

FreeAdd 血清替代品，使用方法与血清基本相同。

详细的使用指导：

1 准备

一般的无血清培养基准备方法

使用前，请轻轻的摇晃FreeAdd，按照血清的量最低5X稀释, 10% FBS等同行于2% FreeAdd。

不要过滤FreeAdd或者加入FreeAdd的培养基。（FreeAdd是无菌的）

如果需要过滤请在加入FreeAdd前过滤培养基。

在这个阶段不要加抗生素，事实上，大部分的抗生素会和血浆中的蛋白质结合，尤其是白蛋白，所以，等同的抗生素的量会表现出在无血清-无血清白蛋白培养基中更高的活性，这种高活性可能对细胞有毒性。

为了防止“无抗生素”培养的发生，推荐使用庆大霉素，50 mg/l.

在这个阶段不要加抗生素

大致的无血清培养适应方法

主要有两种方法可以达到效果

直接适应法

直接把含血清培养基转换成含freeadd培养

1.2.2 连续适应—断奶法

刚开始时使用一半的血清和一半的freeadd培养基，之后逐步降低血清的量，最终完全使用无血清培养，大约过程如下：

Phase 1: 50 % FreeAdd-添加剂/ 50 % 血清添加剂

Phase 2: 75 % FreeAdd-添加剂/ 25 % 血清添加剂

Phase 3: 87.5 % FreeAdd-添加剂/ 12.5 % 血清添加剂

Phase 4: 93.75 % FreeAdd-添加剂/ 6.25 % 血清添加剂

Phase 5: 96.88 % FreeAdd-添加剂/ 3.12 % 血清添加剂

Phase 6: 98.44 % FreeAdd-添加剂/ 1.56 % 血清添加剂

Phase 7: 100 % FreeAdd-添加剂

包括原代细胞和细胞系（悬浮和贴壁）都可用此方法。此外，从功能角度上来说，细胞类型可能分化为不同程度的细胞或者表现出未分化的状态，尤其是在干细胞的制备中。所以，为了更好的获得成功，适应过程需要把最终培养的需求和要求也考虑进去。

2 特殊的适应过程

2.1 细胞系

以下的过程适合于正常细胞（二倍体，有限寿命），转变细胞和永生化细胞（无限寿命）。

贴壁细胞系

关键成功点：

--用合适的试剂包被支持物

--减少胰酶用量

--选择抗生素

实验步骤：

A:使用适当的贴壁因子

市售的包被试剂盒，

纤连蛋白或者多聚赖氨酸

提高细胞贴壁能力的塑料制品

B: 分离单层细胞

推荐使用非哺乳动物来源的试剂，例如accutase,它在消化细胞的过程中无需去除和灭活，这种分离试剂可用于大部分的细胞消化，并且细胞膜和表面表位不会受到破坏。

C: 按照20000个细胞/cm²用完全培养基来培养。

需要明确一点，首次适应过程中保持高密度的细胞是非常重要的。细胞会分泌很多因子以用于细胞的贴壁，生长和增殖。而在新鲜的培养基中缺乏此类因子，所以高密度的细胞有利于生产该类因子。

D 37° C培养直到80%-90%的融合度

在此期间，每2-3天更换75%的新鲜培养基。不要丢弃使用过的培养基，收集起来，过滤并4度储存。一旦发现细胞生长处于停滞状态，要给予其生长的时间以适应无血清环境。

E 当接近融合度时，按照1: 3或者1:2传代

在第二代细胞使用freeadd时，可以不用再包被，但是强烈推荐使用条件培养基，用于细胞的贴壁。

使用75%的新鲜培养基加上25%的条件培养基（上次传代收集）。

每2-3天更换75%的新鲜培养基加上25%的条件培养基，并收集使用过的培养基。

F 重复E的工作，直到达到与含血清培养相同的效果。一般需要4-6次传代。

G 此时，可添加抗生素。我们推荐广谱抗菌的庆大霉素，他对细胞的毒性要比标准双抗溶液要小。

2.1.2 非贴壁的细胞

以下的步骤适用于悬浮细胞

成功的关键因素：

选择抗生素系统

实验步骤：

- A 当细胞密度 $3-5 \times 10^6/\text{ml}$ （决定于不同的细胞系）时，转换血清到freeadd。收集细胞悬液，取样以备计数，然后 200g 离心5分钟。
- B 计数细胞
- C 用含freeadd的培养基重悬细胞，密度为 1×10^6
需要明确一点，首次适应过程中保持高密度的细胞是非常重要的。细胞会分泌很多因子以用于细胞的贴壁，生长和增殖。而在新鲜的培养基中缺乏此类因子，所以高密度的细胞有利于生产该类因子。
- D 37°C 培养直到细胞密度达到 $3-5 \times 10^6/\text{ml}$
- E 按照1: 3或者1:4传代，通过补加培养基来完成。（例如25ml细胞悬液加入75ml的新鲜培养基，均匀分成四个容器培养）
- F 重复E的工作，直到达到与含血清培养相同的效果。
- G 此时，可添加抗生素。我们推荐广谱抗菌的庆大霉素，他对细胞的毒性要比标准双抗溶液要小。