

无血清贴壁培养基说明书

目 录

一、 产品概述	3
1. 产品名称	3
2. 产品简介	3
3. 产品规格与储存	3
二、 适用范围	4
三、 培养条件与培养基预处理	5
1. 标准培养环境	5
2. 培养基预处理规范	5
四、 核心优化操作：细胞驯化、复苏、传代、冻存（无血清体系 专属）	6
1. 快速细胞驯化（血清体系转无血清体系，优化缩短周期）	6
2. 细胞复苏操作（无血清专属优化，低应激、高贴壁率）	6
3. 常规传代操作（无血清专用，TrypLE 消化体系）	8
4. 无血清体系细胞冻存（配套专用冻存方案，无血清、无动物源） ...	9
5. 293T 细胞转染与病毒包装专项适配	9



6. 3T3 细胞专属培养要点	10
五、 注意事项.....	11

一、产品概述

1. 产品名称

通用型无血清贴壁培养基（适用于 HEK293T、NIH/3T3、BHK-21、CHO-K1、Vero、HeLa 等贴壁细胞）

2. 产品简介

本产品为化学成分明确、无动物源（ADCF）、无血清、低蛋白的完全培养基，专为贴壁细胞悬浮驯化、稳定贴壁增殖优化。全程无需胎牛血清、无需动物源添加剂，可直接支持 293T、3T3 等贴壁细胞稳定传代、复苏、冻存、瞬时转染、慢病毒/AAV 包装、重组蛋白表达及稳株筛选。体系稳定性强、细胞活率高、贴壁牢固、转染与病毒包装效率稳定，可满足科研常规培养及体外规模化制备需求。

3. 产品规格与储存

规格：500 mL/瓶、1 L/瓶（液体即用型，无需额外添加组分）

储存条件：2–8℃避光密封保存，严禁冷冻、严禁反复冻融

有效期：未开封 12 个月；开封后 2–8℃保存，建议 1 个月内用完

运输方式：蓝冰低温运输，收货后立即转入 2–8℃冷藏保存

二、适用范围

适配细胞：HEK293T、NIH/3T3、BHK-21、CHO-K1、Vero、HeLa 等主流贴壁细胞。

适用场景：常规细胞传代培养、细胞复苏与冻存、无血清细胞驯化、瞬时转染实验、慢病毒/AAV 病毒包装、重组蛋白表达、稳定细胞株筛选。

禁止用途：本产品仅用于科研体外细胞培养，不可用于人体临床注射、治疗、诊断及体内实验。

三、培养条件与培养基预处理

1. 标准培养环境

培养温度：37℃；CO₂浓度：5%；相对湿度：95%饱和湿度

培养器皿要求：优先选用 CellBIND、TC 处理高贴壁培养瓶/板；普通未包被器皿，需提前用重组纤连蛋白 0.5–1 μg/cm²室温包被 60 min，弃包被液后备用，保障无血清体系细胞贴壁效果。

2. 培养基预处理规范

1. 取出冷藏培养基，37℃水浴预热 15–20 min，温和预热，避免高温久置、暴晒。

2. 全程生物安全柜无菌操作，本产品为完全培养基，无需添加血清、额外谷氨酰胺、常规抗生素。

3. 接种前将培养基加入培养器皿，放入培养箱平衡 30 min 以上，稳定 pH 值与温度，减少细胞应激。

四、核心优化操作：细胞驯化、复苏、传代、冻存（无血清体系专属）

1. 快速细胞驯化（血清体系转无血清体系，优化缩短周期）

适用：原本使用 10% FBS 血清培养基培养的 293T、3T3 等贴壁细胞，跳过传统冗长梯度，3 代快速完成驯化，稳定性更强。

第 1 代（过渡）：50% 含血清完全培养基 + 50% 本款无血清贴壁培养基，正常密度接种培养

第 2 代（适配）：20% 含血清完全培养基 + 80% 本款无血清贴壁培养基，正常传代

第 3 代（完全驯化）：100% 无血清贴壁培养基培养

备注：完全无血清培养后，稳定传代 3-5 代，细胞形态、增殖速率稳定后，即可正常开展复苏、冻存、转染、病毒包装等实验。

2. 细胞复苏操作（无血清专属优化，低应激、高贴壁率）

无血清体系细胞复苏耐受性更低，需提高接种密度、彻底去除 DMSO、减少机械应激，杜绝飘亡、不贴壁问题。

1. 前期准备：无血清培养基 37℃ 充分预热，培养器皿提前包被处理备用。

2. 冻存管快速复苏：37℃ 水浴快速晃动融化 1-2 min，仅留微小冰

粒即刻取出，避免室温久置损伤细胞。

3. 温和稀释：将细胞悬液缓慢滴入 5 mL 预热新鲜无血清培养基中，轻柔混匀，梯度稀释 DMSO，禁止直接高浓度离心。

4. 离心纯化：300×g 离心 5 min，彻底弃除上清，完全去除 DMSO 残留。

5. 接种铺板：新鲜无血清培养基轻柔重悬细胞，精准密度接种：293T： $1.8 \times 10^5 \sim 2.2 \times 10^5$ cells/cm²；NIH/3T3： $1.2 \times 10^5 \sim 1.5 \times 10^5$ cells/cm²。

6. 静置培养：放入培养箱后 48 h 内严禁挪动、晃动培养器皿；培养 36 h 进行半量换液，清除凋亡细胞碎片，提升细胞存活率。

关键点：无血清体系绝对不能使用血清培养的低密度复苏方式，密度不足会直接导致细胞不贴壁、大面积漂浮死亡。

3. 常规传代操作（无血清专用，TrypLE 消化体系）

最佳传代窗口期：细胞汇合度 80%–85%，对数生长期传代，严禁 100% 满层汇合，避免细胞接触抑制、老化、脱落。

1. 清洗除杂：弃旧培养基，无菌 DPBS 清洗细胞单层 1 次，彻底去除代谢废物与残留抑制物，提升消化效率。

2. 无动物源消化：加入 TrypLE Express 消化液（T25 培养瓶 1 mL、T75 培养瓶 3 mL），37℃精准消化：293T 消化 2–2.5 min；NIH/3T3 消化 3–3.5 min（3T3 细胞贴壁更牢，需适当延长消化时间）。

3. 温和终止：显微镜观察 80% 细胞变圆、边缘收缩，立即加入等体积本款无血清培养基轻柔吹打终止消化，无需血清终止。

4. 制备悬液：轻柔吹打瓶壁 3–5 次，制成均匀单细胞悬液，避免过度吹打产生细胞碎片。

5. 离心分瓶：300×g 离心 5 min，弃上清，新鲜无血清培养基重悬，按比例分瓶：293T：1:3 ~ 1:4；NIH/3T3：1:5 ~ 1:6（3T3 增殖快、易接触抑制，需高比例传代）。

6. 常规维护：补全培养基后放入培养箱，稳定培养 48–72 h 完成一轮增殖传代。

常见问题修正：出现漂浮细胞，可通过提升接种密度、提前包被器皿、缩短消化时间、严格把控传代汇合度解决。

4. 无血清体系细胞冻存（配套专用冻存方案，无血清、无动物源）

适配本培养基专用冻存液，全程无 FBS，匹配无血清细胞特性，复苏存活率更高。

冻存液自配配方：90% 本款无血清完全培养基 + 10% 细胞级高纯 DMSO，现配现用，严禁添加血清。

1. 冻存细胞筛选：选取对数生长期、细胞活率 $\geq 92\%$ 、汇合度 75%–80%的健康细胞，杜绝老化、密集、状态不佳细胞冻存。

2. 细胞制备：按常规传代步骤消化、终止、离心，收集纯净细胞沉淀。

3. 重悬分装：用预配无血清冻存液轻柔重悬细胞，调整终密度为 $1.0 \times 10^6 \sim 1.5 \times 10^6$ cells/mL，每支冻存管分装 1 mL 悬液。

4. 梯度降温程序（优化复苏存活率）：室温静置 20 min $\rightarrow$ 4℃冷藏 30 min $\rightarrow$ -20℃冷冻 2 h $\rightarrow$ 转入-80℃冰箱过夜 $\rightarrow$ 次日移入液氮罐长期保存。

储存说明：-80℃仅可短期存放（ ≤ 3 个月），长期保种必须存放于液氮中，保障细胞活性稳定。

5. 293T 细胞转染与病毒包装专项适配

1. 转染时机：细胞汇合度 70%–80%对数生长期，换新鲜无血清培养基培养 2–4 h 后开展转染。

2. 转染试剂：适配无血清体系试剂（PEI、Sinofection 等），DNA 与转染试剂比例 1:2–1:4，按需优化。

3. 后期培养：转染后 6–8 h 更换新鲜无血清培养基，持续培养 48–72 h 收集病毒上清，常规病毒滴度可达 10^8 – 10^9 TU/mL。

6. 3T3 细胞专属培养要点

1. 3T3 细胞对 pH 高度敏感，培养基必须充分平衡，严格把控 pH 7.2–7.4，避免 pH 异常导致生长停滞、脱落。

4. 严格控制传代比例与密度，避免高密度接触抑制引发细胞衰老、形态异常。

5. 禁止长时间高密度培养，每 3–4 天固定传代一次，维持稳定对数增殖状态。

五、注意事项

1. 全程严格无菌操作，所有实验操作必须在合格生物安全柜内完成，杜绝微生物污染。
2. 培养基仅 37℃温和预热，禁止高温加热、煮沸，防止活性添加剂失活。
3. 本体系为无血清优化配方，禁止随意添加血清、杂蛋白及无关添加剂，避免破坏体系平衡、影响细胞贴壁与转染效率。
4. 消化优先使用无动物源 TrypLE 消化液，不建议使用普通含动物源胰酶，适配无血清培养体系。
5. 开封后培养基建议分装使用，减少反复开盖污染与活性流失。