

Protein-Free CHO Medium, Liquid

With 4500 mg/L D-glucose

With HEPES

With Pluronic® F68

With 4 mM L-glutamine

With sodium bicarbonate

For the suspension culture of CHO cell

Catalog Number **PF 486A**

Storage Temperature 2~8°C

Product Description

Protein-free CHO Medium은 Chinese Hamster Ovary (CHO) 세포의 현탁배양 (suspension culture)을 위하여 제조된, 단백질 성분이 제거된 액상 배지로 일반적으로 혈청을 첨가하는 동물의 조직/세포배양을 위해서 사용되는 전통적인 배지와는 아미노산, 비타민, 무기염류 등의 조성을 달리하고 혈청 대체물로서 peptide류, fatty acid류, growth factor 등을 첨가하여 개발되었다. 무단백질배지에 배양하고자 하는 CHO 세포가 혈청배지에서 배양된 경우에는 일반적으로 무단백질배지에 적응하는 기간이 필요하며, 그 적응 방법 (adaptation process)에 따라서 기간을 단축할 수도 있다. 부착 배양된 세포에 무단백 배지를 적용할 경우에는 trypsin 처리후 trypsin 저해제를 처리할 필요가 있다. 현탁 배양된 세포에 적용할 경우에는 trypsin을 처리할 필요가 없으므로 세포가 포함된 배양액의 일부를 새 배양용기 (spinner flask)에 옮기고 새로운 무단백질배지를 첨가하여 계속 배양하거나, 800 rpm에서 5분간 원심분리 후 새로운 무단백질배지를 첨가하여 CHO 세포를 계속 배양할 수 있다.

PF 486A에는 4500 mg/L의 D-glucose, 4 mM L-glutamine, sodium bicarbonate, 그리고 HEPES가 첨가되어 있다. 현탁배양 때의 CHO 세포의 손상을 방지하기 위하여 Pluronic® F68을 최종 농도 0.1%로 첨가하였다. **PF 486A**와 다른 무단백질배지는 아미노산, 비타민, 무기염류 등의 차이가 있으므로 연구중인 CHO 세포주에 맞는 배지를 선택하여 사용하여야 한다. 적절한 배양조건을 선택하기 위해서는 (1) 배양할 세포주의 기원 (어떤 종류인지), (2) 어떠한 배양용기를 이용하여 배양할 것인지 (tissue flask, roller bottle, spinner flask, 또는 bioreactor), 그리고 (3) 사용 CHO 세포주의 세포특성 등을 고려하여야 한다. **PF 486A**는 동물유래 성분을 전혀 함유하고 있지 않기 때문에 재조합 단백질의 연구 및 생산에 적합하고, 따라서 세포 배양에 의한 최종 산물 (재조합 단백질)의 품질이 의약품으로써 적합하다고 할 수 있다. 또한 hypoxanthine과 thymidine을 포함되어 있지 않으므로 세포성장을 위하여 이들이 요구될 경우에는 추가로 배지 중에 넣어주어야 한다.

Storage/Stability

무단백질배지는 차광하여 2~8°C에서 보관하여야 한다. 액상 배지의 변성은 (1) 침전을 또는 부유물, (2) 용액의 탁해짐, (3) 색의 변화, 그리고 (4) pH의 변화 등으로 나타날 수 있다. 추가로 첨가하는 첨가제의 성질에 의해 보관조건 및 배지의 유효기간이 바뀔 수 있다. 유효기간은 제품 label에 표시 되어있다.

Instructions for Use

PF 486A 배지는 사용하기 전에 (1) 필요하면 2~8 mM (일반적으로 4 mM)의 L-glutamine (**LS 002-01**)을 첨가하며, (2) 각 유전자 발현 시스템에 따라 영양 요구 조건을 변경할 필요성이 있고, (3) D-glucose (**LS 001-01** 또는 **LS 001-02**) 농도를 6.8 g/L 까지 조정할 수 있으며, (4) 재조합 단백질의 발현을 증가시키기 위하여 polyamine (**LS 018-01**), fatty acid (**LS 017-01**), sodium butyrate (**LS 033-01**)를 첨가하는 것이 바람직하고, (5) CO₂ incubator에서 배양하기 위해서는 NaHCO₃ 농도를 조정하여 배양 중의 pH를 조절하는 것이 바람직하며, (6) aeration을 위하여 spinner flask 뚜껑의 1/4 정도를 열어 주는 것이 바람직하다.

Biological Performance Characteristics

무단백질 액상배지의 growth-promoting capacities는 액상 배지에 CHO 세포주를 배양하면서 테스트한다. Growth rates은 세 번의 계대배양을 통하여 측정한다. 시간에 따른 세포수의 변화를 측정하고

seeding efficiencies, doubling time, 그리고 final cell densities를 결정한다. 배양을 하면서 trypan blue법으로 세포의 형태 변화와 cytotoxicity의 현상이 나타나는지 관찰한다.

Precautions

무단백질배지는 *In Vitro*에만 사용하며, 빛과 열에 불안정하므로 (1) 빛에 가능한 노출을 하지 않고, (2) 37°C로 배지를 항온하는 시간을 단축하고, (3) 작업 후 바로 냉장고 (암실)에 보관하며, (4) 가능한 작업에 필요한 양만 꺼내어 사용한다.

Adaptation of CHO Cells to Protein-Free Medium

다른 종류의 무혈청/무단백질배지에서 배양된 대부분의 CHO 세포는 **PF 486A** 배지에 적응할 필요는 없다. 그러나, 혈청 배지에서 배양된 CHO 세포는 필요에 따라서 아래 방법으로 adaptation 하는 것이 바람직하다. 특히 각 CHO cell clone은 고유의 세포 특성을 갖고 있으므로 본 적응 과정을 참조하여 각 세포주에 맞추어 수정하는 것이 바람직하다.

A. Direct Adaptation (1)

1. 혈청배지에서 부착배양된 CHO 세포가 80% 이상의 confluence에 도달 하면, 배양액을 제거하고 trypsin 이나 trypsin-EDTA 용액을 세포가 부착되어 있는 배양용기 표면에 골고루 묻힌 후 제거한다.
2. 37°C incubator에서 2~3분 동안 반응시키고 세포를 배양용기 표면에서 떼어내어 혈청배지로 중화시킨 후 800 rpm에서 5분간 원심 분리한다.
3. 상층액을 버리고 무단백질배지 (L-glutamine 첨가된)로 세포를 현탁한 후 800 rpm에서 5분간 재 원심분리 한다.
4. 상층액을 버리고 2~5x10⁵ cells/ml의 점중농도로 무단백질배지에 현탁하여 spinner flask에서 40 rpm 속도로 배양한다. 초기 세포농도를 처음에는 높다가 점차 낮추어 주는 것이 바람직하다.

B. Direct Adaptation (2)

1. 혈청배지에서 부착배양된 CHO 세포가 90% 이상의 confluence에 도달 하면, 혈청배지를 제거하고 무단백질배지로 교환한다.
2. 매일 또는 2일에 1~2회씩 무단백질배지로 교환하면서 부유되는 세포를 하나의 T-flask에 모아 계속 배양한다.
3. 무단백질배지에서 세포성장이 확인된 세포를 취하여 계대배양 하고, 세포성장을 재확인한다. 2~5x10⁵ cells/ml의 점중농도로 무단백질배지에 현탁하여 spinner flask에서 40 rpm 속도로 배양한다. 초기 세포농도를 처음에는 높다가 점차 낮추어 주는 것이 바람직하다.

C. Sequential Adaptation

1. 혈청배지에서 부착 배양된 CHO 세포가 80% 이상의 confluence에 도달 하면, 세포를 trypsin이나 trypsin-EDTA 용액을 이용하여 떼어낸 후 혈청배지와 무단백질배지의 비율을 75%:25%로 하여 3~4x10⁵ cells/ml의 점중농도에서 배양한다.
2. 같은 조건에서 계대 배양을 2~4번 반복하여 세포성장을 확인 (기존 배양과 비교하여 90% 이상의 세포성장을 보여야 함)하고, 혈청배지와 무단백질배지의 비율을 50%:50%으로 하여 3~4x10⁵ cells/ml의 점중농도에서 배양한다.
3. 2의 과정을 반복하되 혈청배지와 무단백질배지의 비율을 25%:75%로 한다.
4. 2의 과정을 반복하되 혈청배지와 무단백질배지의 비율을 10%:90%로 한다.
5. 2의 과정을 반복하되 혈청배지와 무단백질배지의 비율을 5%:95%로 한다.
6. 2의 과정을 반복하되 무단백질배지만으로 배양한다. 단, 4, 5의 과정은 생략할 수 있다.
8. 무단백질배지에서 세포성장이 확인되면 세포를 무단백질배지가 포함된 동결배지에 동결하고 용해하여 세포 활력을 검사한다.

Product Profile

Appearance	Brown transparent solution
pH at RT	7.0 ~ 7.6
Osmolality	290 ~ 320 mOsm/kg H ₂ O
Endotoxin	≤ 1.0 EU/ml
Sterility	Sterilized by 0.2 μm filtration system. Sterility tests are performed in accordance with protocols described in USP.