

Serum-Free CHO Medium, Liquid

With 4500 mg/L D-glucose

With 7.5 mM HEPES

With sodium bicarbonate

With L-glutamine

With Pluronic® F68

For the suspension culture of CHO cell

Catalog Number **SF 486**

Storage Temperature 2~8°C

Product Description

Serum-free CHO Medium은 Chinese Hamster Ovary (CHO) 세포의 현탁배양 (suspension culture)을 위하여 제조된 액상형 배지로 일반적으로 혈청을 첨가하는 동물 조직/세포배양을 위해서 사용되는 전통적인 배지와는 amino acids, vitamins, inorganic salts 등의 조성을 달리하고 혈청 대체물로서 peptide류, fatty acid류, growth factor 등을 첨가하여 개발되었다. 무혈청배지에 배양하고자 하는 CHO 세포가 혈청배지에서 배양된 경우에는 일반적으로 무혈청배지에 적응하는 기간이 필요하며, 그 적응 방법 (adaptation process)에 따라서 기간을 단축할 수도 있다. 세포를 계대배양 할 경우에 trypsin을 사용한다면 중화할 때 혈청 대신 trypsin inhibitor등을 사용하며, 원심분리 후 세포 세척을 통하여 trypsin 성분을 제거하여야 한다.

SF 486에는 4500 mg/L의 D-glucose, 7.5 mM의 HEPES, sodium bicarbonate, 그리고 L-glutamine이 첨가되어 있다. 또한 현탁배양 때의 CHO 세포의 손상을 방지하기 위하여 Pluronic® F68을 최종 농도 0.1%로 첨가하였다. 적절한 배양조건을 선택하기 위해서는 (1) 배양할 세포주의 기원 (어떤 종류인지), (2) 배양용기 (tissue flasks, roller bottle, multiplate flasks), 그리고 (3) 사용 CHO 세포주의 세포특성 등을 고려하여야 한다.

SF 486은 최소량의 동물유래 성분만을 함유하고 있으므로 재조합 단백질의 연구 및 생산에 적합하다. 특히 CHO 세포 배양으로 얻어진 최종 산물 (재조합 단백질)의 품질이 의약품으로써 적합하다고 할 수 있다. 또한 Pluronic F-68™ (BASF사의 등록된 제품임), hypoxanthine과 thymidine을 포함되어 있지 않으므로 세포성장을 위하여 이들이 요구될 경우에는 추가로 배지 중에 넣어주어야 한다.

Storage/Stability

무혈청배지는 차광하여 2~8°C에서 보관하여야 한다. 액상 배지의 변성은 (1) 침전물 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

SF 486 배지는 사용하기 전에 (1) 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 4.5~6.8 g/L로 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 바람직하며, (5) CO₂ incubator에서 배양하기 위해서는 NaHCO₃ 농도를 조정하여 배양 중의 pH를 조절하는 것이 바람직하다.

SF 386 배지를 이용하여 현탁배양 (suspension culture)을 하려면 Pluronic F-68™ (**LS 105-01**)을 0.07~0.1% 농도로 첨가하여 준다. 이 배지를 이용한 현탁배양은 adaptation process가 필요하지 않다. 위의 (1)~(5)에 언급된 내용을 적절히 조정하여 spinner flask에서 40~60 rpm 속도로 CHO 세포를 배양할 수 있다. Aeration을 위하여 뚜껑의 1/4 정도를 열어 주는 것이 바람직하다.

Biological Performance Characteristics

무혈청 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

무혈청배지는 *In Vitro*에만 사용하며, 빛과 열에 불안정 하므로 (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 Serum-Free Medium

혈청이 첨가된 배지나 다른 종류의 무혈청/무단백질배지에서 배양된 대부분의 CHO 세포는 **SF 486** 배지에 적응할 필요는 없다. 그러나, CHO 세포가 이 배지에 민감하면 아래의 방법으로 adaptation 하는 것이 바람직하다.

A. Direct Adaptation (1)

1. 혈청배지에서 부착 배양된 CHO 세포가 80% 이상의 confluence 에 도달하면, 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 원심분리 한다.
3. 상층액을 버리고 무혈청배지로 세포를 현탁한 후 800 rpm에서 5분간 재 원심분리 한다.
4. 상층액을 버리고 2~5x10⁵ cells/ml의 접종농도로 무혈청배지에 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 도달하면, 혈청 배지를 제거하고 무혈청배지로 교환한다.
2. 매일 또는 2일에 1~2회씩 무혈청배지로 교환하면서 부유되는 세포를 하나의 T-flask에 모아 계속 배양한다.
3. 무혈청배지에서 세포성장이 확인된 세포를 취하여 계대배양 하고, 세포성장을 재확인한다. 2~5x10⁵ cells/ml의 접종농도로 무혈청배지에 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 confluence 에 도달하면, 세포를 trypsin이나 trypsin-EDTA 용액을 이용하여 떼어낸 후 혈청배지와 무혈청배지의 비율을 75%:25%로 하여 3~4x10⁵ cells/ml의 접종농도에서 배양한다.
2. 같은 조건에서 계대 배양을 2~4번 반복하여 세포성장을 확인 (기존 혈청배양과 비교하여 90% 이상의 세포성장을 보여야 함)하고, 혈청배지와 무혈청배지의 비율을 50%:50%으로 하여 3~4x10⁵ cells/ml의 접종농도에서 배양한다.
3. 2의 과정을 반복하되 혈청배지와 무혈청배지의 비율을 25%:75% 로 한다.
4. 2의 과정을 반복하되 혈청배지와 무혈청배지의 비율을 10%:90% 로 한다.
5. 2의 과정을 반복하되 혈청배지와 무혈청배지의 비율을 5%:95% 로 한다.
6. 2의 과정을 반복하되 무혈청배지만으로 배양한다. 단, 4, 5의 과정은 생략할 수 있다.
7. 무혈청배지에서 세포성장이 확인 (기존 혈청배양과 비교하여 90% 이상의 세포성장을 보여야 함)되면 세포를 무혈청배지가 포함된 동결배지에 동결하고 용해하여 세포 활력을 검사한다.

Product Profile

Appearance	Faint brown transparent solution
pH at RT	7.0 ~ 7.6
Osmolality	316 ~ 350 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.