

# CH150 medium

## Chemically defined medium

---

### 1 製品情報

CH150 培地は、チャイニーズハムスター由来 CHO 細胞（例；CHO-K1 細胞、CHO-S 細胞、DG44 細胞、DXB11/DUKX 細胞等）のシングルセルクローニング試験のためにデザインされた、化学的に成分が明らかな完全合成培地です。

CH150 培地には、タンパク質や抗生物質、加水分解物、動物成分、ヒト由来成分、高分子を含まず、ロット間の均一性を高めた培地です（エンドトキシンは 0.25 EU/mL 未満）。このため、ヒトモノクローナル抗体等の組換えタンパク質の精製ステップをより容易に進めることができます。また、遺伝子導入や遺伝子発現を阻害しませんので、CHO 細胞への高効率トランスフェクション試験や組換えタンパク質、ワクチン用ウイルス等の生産システムに利用できます。

(保存温度；2–8°C 冷暗所)

### 2 培養条件

Cell line: CHO cells

Culture type: Suspension or Adhesive

Culture vessels: Flask, plate, dish, or culture bag, etc.

Incubate atmosphere: Humidified atmosphere of 5–8% CO<sub>2</sub> in air

Temperature range: 36°C to 38°C

### 3 ご使用の前に

- ・開封後は期限表示に関わらずお早めにご使用ください。
- ・CH150 培地には、L-アラニル-L-グルタミンまたは L-グルタミンは含まれていません。最終濃度 2–8 mM となるように、適量加えてご使用ください。
- ・CH150 培地には、ヒポキサンチンまたはチミジンは含まれていません。DHFR (dihydrofolate reductase) が機能していない CHO 細胞 (dhfr<sup>-</sup>) には、ヒポキサンチンとチミジンの両方を培地に、適量加えてご使用ください。

・CH150 培地には、抗生物質は含まれていません。血清培養と異なり、無血清培養時に抗生物質を添加する際には注意が必要です。抗生物質が細胞増殖を抑制する場合があります。ご使用の際には、血清培地で使用する場合と比べて、半分量～10 倍量少ない条件でのご使用をオススメしています。

## 4 培養プロトコール

### (1) 凍結細胞の播種

CHO 細胞（凍結保存；無血清培地に馴化した細胞）を、素早く Water-Bath 中で溶解します。浮遊系 CHO 細胞の場合は CH400/CH400AZ 培地（CH200/CH300/CH300AZ 培地）を、接着系 CHO 細胞の場合は CH100 培地を、または、ご使用の継代培養用無血清培地を、10 mL 加えた 15-mL 用の遠心チューブに、CHO 細胞を移します。遠心回収（200 x g、5 分間）した細胞ペレットに、継代培養用培地を 10 mL 加えて懸濁します。細胞数と生存率を測定します。

培養形態（浮遊系／接着系）によって、下記の培養手法とスケールアップ培養用（継代培養用）の培地を選択ください。凍結保存した CHO 細胞は、継代培養を 3 回繰り返して、細胞の状態を回復してから、研究試験にご使用ください。

### (2) 継代培養（シングルクローニング前培養）

#### < 浮遊系 CHO 細胞（125-mL Shaker Flasks） >

細胞密度  $2 \times 10^5$  cells/mL（ $1-3 \times 10^5$  cells/mL）で、継代培養用培地を加えた 125 mL ディスポーザブル三角フラスコ（Erlenmeyer Flasks）に播種します。その際の最終の培地量は 30 mL として、三角フラスコは、ガス交換ができる状態にして、37℃、湿度の保たれた CO<sub>2</sub> インキュベーター庫内でシェーカー培養（ $125 \pm 5$  rpm）します。

培養 3 日目（2-4 日間）に、50-mL 用の遠心チューブに、CHO 細胞を移します。遠心回収した細胞ペレットに、培地を 10 mL 加えて懸濁します。細胞数と生存率を測定します。細胞密度  $2 \times 10^5$  cells/mL（ $1-3 \times 10^5$  cells/mL）で、培地を加えた 125 mL ディスポーザブル三角フラスコ（培地量 30 mL）に播種して、シェーカー培養します。

継代培養の間隔は、グルタミンを選択した場合とアラニルグルタミンを選択した場合では異なります。コンフルエントの状況を観察して、継代培養の間隔を決定します。

#### < 接着系 CHO 細胞（T75 Flasks） >

細胞密度  $2 \times 10^5$  cells/mL（ $1-3 \times 10^5$  cells/mL）で、継代培養用培地を加えた T75 Flask に播種します。その際の最終の培地量は 25 mL として、ガス交換ができる状態にして、37℃、湿度の保たれた

CO<sub>2</sub> インキュベーター庫内で静置培養します。

培養 3 日目 (2–4 日間) に、50-mL 用の遠心チューブに、ピペッティングによって CHO 細胞を移します。トリプシン処理は、細胞にダメージを与えますので、トリプシンを用いて細胞を回収する場合は、トリプシンインヒビターを使用して酵素反応を止めてください。遠心回収した細胞ペレットに、培地を 10 mL 加えて懸濁します。細胞数と生存率を測定します。細胞密度  $2 \times 10^5$  cells/mL ( $1-3 \times 10^5$  cells/mL) で、培地を加えた T75 Flask (培地量 25 mL) に播種して、静置培養します。

継代培養の間隔は、グルタミンを選択した場合とアラニルグルタミンを選択した場合では異なります。コンフルエントの状況を観察して、継代培養の間隔を決定します。

### (3) シングルセルクローニング試験

#### < 浮遊系 CHO 細胞 (96-well plate) >

浮遊系 CHO 細胞を、細胞密度  $2 \times 10^5$  cells/mL ( $1-3 \times 10^5$  cells/mL) で、継代培養用培地を加えた 125 mL ディスポーザブル三角フラスコに播種します。その際の最終の培地量は 30 mL として、ガス交換ができる状態にして、37℃、湿度の保たれた CO<sub>2</sub> インキュベーター庫内でシェーカー培養します。

培養 2 日目に、50-mL 用の遠心チューブに、CHO 細胞を移します。遠心回収した細胞ペレットに、CH150 培地を 25 mL 加えて懸濁します。再度、細胞懸濁液を遠心して、細胞ペレットを作り、CH150 培地で懸濁して、継代培養用の培地を、完全に CH150 培地に置き換えます。

細胞懸濁液を、CH150 培地を使用して、細胞密度 0.5–5 viable cells/well に希釈して、96-well plate に播種 (0.2 mL/well) して、静置培養します。細胞観察を行いながら、細胞クローンの評価を行います。

#### < 接着系 CHO 細胞 (96-well plate) >

接着系 CHO 細胞を、細胞密度  $2 \times 10^5$  cells/mL ( $1-3 \times 10^5$  cells/mL) で、継代培養用培地を加えた T75 Flask に播種します。その際の最終の培地量は 25 mL として、ガス交換ができる状態にして、37℃、湿度の保たれた CO<sub>2</sub> インキュベーター庫内で静置培養します。

培養 2 日目に、50-mL 用の遠心チューブに、CHO 細胞を移します。遠心回収した細胞ペレットに、CH150 培地を 25 mL 加えて懸濁します。再度、細胞懸濁液を遠心して、細胞ペレットを作り、CH150 培地で懸濁して、継代培養用の培地を、完全に CH150 培地に置き換えます。

細胞懸濁液を、CH150 培地を使用して、細胞密度 0.5–5 viable cells/well に希釈して、96-well plate に播種 (0.2 mL/well) して、静置培養します。細胞観察を行いながら、細胞クローンの評価を行います。

#### (4) スケールアップ培養

##### < 浮遊系 CHO 細胞 (125-mL Shaker Flasks) >

はじめに、クローニング試験で得られたクローン細胞を継代培養までスケールアップするために、CH150 培地と継代培養用培地を 1 : 1 で混合した培地を準備します。

細胞クローンを回収して、混合培地を 1.5 mL 加えた 24-well plate に移して静置にて拡大培養します。\*トリプシン処理は、細胞にダメージを与えますので使用しないでください。

培養 2-4 日目に、細胞を回収し、混合培地を 5 mL 加えた 6-well plate に移して静置培養します。

培養 2-4 日目に、細胞を回収し、混合培地を 20 mL 加えた 100-mm dish に移して静置培養します。

培養 2-4 日目に、細胞を回収し、継代培養用培地を 10 mL 加えて懸濁します。細胞数と生存率を測定します。細胞密度  $2 \times 10^5$  cells/mL ( $1-3 \times 10^5$  cells/mL) で、継代培養用培地を 30 mL 加えた 125 mL ディスポーザブル三角フラスコに移して、シェーカー培養します ( $125 \pm 5$  rpm)。

培養 2-4 日目に、50-mL 用の遠心チューブに、CHO 細胞を移します。遠心回収した細胞ペレットに、継代培養用培地を 10 mL 加えて懸濁します。細胞数と生存率を測定します。細胞密度  $2 \times 10^5$  cells/mL ( $1-3 \times 10^5$  cells/mL) で、継代培養用培地を加えた 125 mL ディスポーザブル三角フラスコ (培地量 30 mL) に移して、シェーカー培養します。

継代培養の間隔は、グルタミンを選択した場合とアラニルグルタミンを選択した場合では異なります。コンフルエントの状況を観察して、継代培養の間隔を決定します。

##### < 接着系 CHO 細胞 (T75 Flasks) >

はじめに、クローニング試験で得られたクローン細胞を継代培養までスケールアップするために、CH150 培地と継代培養用培地を 1 : 1 で混合した培地を準備します。

細胞クローンを回収して、混合培地を 1.5 mL 加えた 24-well plate に移して静置して拡大培養します。\*トリプシン処理は、細胞にダメージを与えますので使用しないでください。

培養 2-4 日目に、細胞を回収し、混合培地を 5 mL 加えた 6-well plate に移して静置培養します。

培養 2-4 日目に、細胞を回収し、混合培地を 20 mL 加えた 100-mm dish に移して静置培養します。

培養 2-4 日目に、細胞を回収し、継代培養用培地を 10 mL 加えて懸濁します。細胞数と生存率を測定します。細胞密度  $2 \times 10^5$  cells/mL ( $1-3 \times 10^5$  cells/mL) で、継代培養用培地を 25 mL 加えた T75 Flask に移して、静置培養します。

培養 2-4 日目に、50-mL 用の遠心チューブに、CHO 細胞を移します。遠心回収した細胞ペレットに、継代培養用培地を 10 mL 加えて懸濁します。細胞数と生存率を測定します。細胞密度  $2 \times 10^5$  cells/mL ( $1-3 \times 10^5$  cells/mL) で、継代培養用培地を T75 Flask (培地量 25 mL) に移して、静置培養します。

継代培養の間隔は、グルタミンを選択した場合とアラニルグルタミンを選択した場合では異なります。コンフルエントの状況を観察して、継代培養の間隔を決定します。

## 5 凍結保存

CHO 細胞（生存率 95%以上、mid-log 増殖期の状態）を、遠心回収（200 x g、5 min）して、5–10 x 10<sup>6</sup> cells/mL の細胞密度で、保存培地（培地 with 10% DMSO）に懸濁します。一般的な細胞の凍結方法で液体窒素に保存します。

## 6 その他の情報

本製品は研究用です。ヒト及び動物の診断・治療、それ以外の特殊な条件下では、使用しないで下さい。本製品及び本製品を含む溶液に、酸または漂白剤を加えないで下さい。酸または漂白剤を混合すると有毒ガスを発生します。安全対策のもと、取り扱いには十分に注意してご使用下さい。安全データシート（SDS）及び品質保証データ（COA）はホームページ（<https://gmep.co.jp>）から取得して下さい。

## 7 関連製品

### < Transfection System >

Gxpress CHO Transfection & Medium Kit	GXCHO-MAK-0010
Gxpress CHO Transfection & Medium Kit II	GXCHO-MK-0010
Gxpress CHO Transfection Kit	GXCHO-RK-0010
Gxpress CHO TF Reagent	GXCHO-TF-0010
Gxpress CHO Enhancer	GXCHO-EN-0010

### < Chemically Defined Medium >

CH100 medium	CH100-0010	Adhesive culture
CH150 medium	CH150-0005	Cloning assay
CH200 medium	CH200-0010	Suspension culture
CH300 medium	CH300-0010	Suspension culture
CH300AZ medium*	CH300AZ-0010	Suspension culture
CH400 medium	CH400-0010	Suspension culture
CH400AZ medium*	CH400AZ-0010	Suspension culture
Gxpress CHO Feed medium	GXCHO-FD-0010	Fed-Batch culture
Scattering reagent CHO	SRCHO-005	Anti-clumping reagent

\* Ready-to-use medium with L-alanyl-L-glutamine