

文档编号: PJ-SOP-011

版本编号: version 1.3

SILAC **DMEM** Medium Kits (Powder Form)

名称	货号	组件	组件编号	数量	保存条件	制备溶液体积 (mL)
SILAC-DMEM (K6R6) Kit	SM202101	K0R0 -DMEM (powder)	SCD01	1	4°C/RT	500
		K6R6 -DMEM (powder)	SD01	1	4°C/RT	500
		Dialyzed FBS (50mL)	DF-50	2	-20°C/4°C	
		Vacuum Bottle Filter		2	RT	
		Label Tag (70mm × 40mm)		4	RT	
SILAC-DMEM (K8R10) Kit	SM202103	K0R0 -DMEM (powder)	SCD01	1	4°C/RT	500
		K8R10 -DMEM (powder)	SD03	1	4°C/RT	500
		Dialyzed FBS (50mL)	DF-50	2	-20°C/4°C	
		Vacuum Bottle Filter		2	RT	
		Label Tag (70mm × 40mm)		4	RT	
SILAC-DMEM (3plex) Kit	SM202104	K0R0 -DMEM (powder)	SCD01	1	4°C/RT	500
		K4R6 -DMEM (powder)	SD04	1	4°C/RT	500
		K8R10 -DMEM (powder)	SD03	1	4°C/RT	500
		Dialyzed FBS (50mL)	DF-50	3	-20°C/4°C	
		Vacuum Bottle Filter		3	RT	
		Label Tag (70mm × 40mm)		6	RT	

SILAC **RPMI-1640** Medium Kits (Powder Form)

名称	货号	组件	组件编号	数量	保存条件	制备溶液体积 (mL)
SILAC-RPMI (K6R6) Kit	SM202106	K0R0 -RPMI (powder)	SCR01	1	4°C/RT	500
		K6R6 -RPMI (powder)	SR01	1	4°C/RT	500
		Dialyzed FBS (50mL)	DF-50	2	-20°C/4°C	
		Vacuum Bottle Filter		2	RT	
		Label Tag (70mm × 40mm)		4	RT	
SILAC-RPMI (K8R10) Kit	SM202108	K0R0 -RPMI (powder)	SCD01	1	4°C/RT	500
		K8R10 -RPMI (powder)	SR03	1	4°C/RT	500
		Dialyzed FBS (50mL)	DF-50	2	-20°C/4°C	
		Vacuum Bottle Filter		2	RT	
		Label Tag (70mm × 40mm)		4	RT	
SILAC-RPMI (3plex) Kit	SM202109	K0R0 -RPMI (powder)	SCD01	1	4°C/RT	500
		K4R6 -RPMI (powder)	SR04	1	4°C/RT	500
		K8R10 -RPMI (powder)	SR03	1	4°C/RT	500
		Dialyzed FBS (50mL)	DF-50	3	-20°C/4°C	
		Vacuum Bottle Filter		3	RT	
		Label Tag (70mm × 40mm)		6	RT	

■ 用户自备材料:

1. 细胞房及生物安全柜 (如 ESCO, #AC2-4S8-CN)

细胞房及生物安全柜	功能	本流程用途
	细胞培养等无菌操作	用于对 SILAC 干粉制备的液体培养基进行过滤和除菌。

2. 微型台式真空泵 (如海门市其林贝尔仪器制造有限公司, #GL-802C)

微型台式真空泵	功能	本流程用途
	细胞房生物安全柜通用配套小型仪器, 通过真空泵收集细胞培养过程中产生的废培养基和其他废液。	通过真空泵连接 SILAC Kits 配备的 Vacuum Bottle Filter , 对配制的 SILAC 液体培养基进行过滤和除菌。

3. 超纯水 ($18.2\text{M}\Omega\cdot\text{cm}@25^\circ\text{C}$) 或超纯水系统 (如厦门锐思捷水纯化技术有限公司, #RODI-220B1)

超纯水 ($18.2\text{M}\Omega\cdot\text{cm}@25^\circ\text{C}$)	功能	本流程用途
	溶剂配制等	SILAC 干粉培养基溶解及制备

4. 其他设备/试剂/耗材

序号	名称	数量	本流程用途
1	1000mL 玻璃烧杯	2~3	SILAC 干粉培养基溶解及制备
2	500mL 玻璃量筒	1	超纯水量取
3	小型漩涡混合仪 (如 Miulab, #MIX-25)	1	SILAC 培养基干粉溶解及混合
4	磁力搅拌器 (如 Miulab, TP-350+)	1	SILAC 培养基干粉溶解及混合
5	磁力搅拌子 2 个或 3 个	2~3	SILAC 培养基干粉溶解及混合
6	pH 计 (如 Sartorius, #PB-10)	1	SILAC 培养基溶液 pH 调节
7	浓盐酸 (~12M) 或 5M 的盐酸	/	SILAC 培养基溶液 pH 调节

SILAC 培养基制备流程

一. 准备工作:

1. 用水搭配洗洁精等去污剂和试管刷清洗 1000mL 的玻璃烧杯和 500mL 的玻璃量筒，并用足量的水冲洗掉去污剂。
2. 用足量的超纯水(18.2MΩ·cm@25°C)多次洗涤 1 的 1000mL 的玻璃烧杯和 500mL 的玻璃量筒后，沥干水分。
3. 用超纯水(18.2MΩ·cm@25°C) 洗涤磁力搅拌子后，并分别置于 2 中洗涤后的 1000mL 玻璃烧杯中，并将烧杯用记号笔做好标记，如 K0R0 和 K8R10。

二. SILAC 培养基干粉 (powder) 溶解及 pH 调节:

1. 以 SILAC-DMEM (K8R10) Kit (#SM202103) 为例，进行组件和制备流程说明:

名称	货号	组件	组件编号	数量	保存条件	制备溶液体积 (mL)
SILAC-DMEM (K8R10) Kit	SM202103	K0R0-DMEM (powder)	SCD01	1	4°C/RT	500
		K8R10-DMEM (powder)	SD03	1	4°C/RT	500
		Dialyzed FBS (50mL)	DF-50	2	-20°C/4°C	
		Vacuum Bottle Filter		2	RT	
		Label Tag (70mm × 40mm)		4	RT	

- (1) SCD01: K0R0-DMEM (powder) 干粉，可制备成 500mL 的 K0R0 液体培养基。
- (2) SD03: K8R10-DMEM (powder) 干粉，可制备成 500mL 的 K8R10 液体培养基。
- (3) DF-50: (Dialyzed FBS), SILAC 技术必须使用透析血清，才能实现细胞蛋白质的高效标记 (> 95%)。
- (4) Vacuum Bottle Filter



Vacuum Bottle Filter 为真空包装的一次性液体无菌过滤装置 (如用户发现外包装破损，请立即联系我方更换)。容积为 500mL，过滤膜为 PES 材质，孔径为 0.22μm。

- (5) Label Tag (70mm × 40mm): 标签纸，规格为 70mm (长) × 40mm (宽)。贴在 Vacuum Bottle Filter 瓶身上，以标识和区分 K0R0-DMEM 和 K8R10-DMEM 培养基。

SILAC-DMEM Item K0R0 Code SCD01 Volume 500 mL Storage 4°C	规格: 70mm (长) × 40mm (宽) 数量: 2
SILAC-DMEM Item K8R10 Code SD03 Volume 500 mL Storage 4°C	规格: 70mm (长) × 40mm (宽) 数量: 2

2. *强烈建议按先后顺序配制。即先溶解 SCD01 并调节好 pH 后，再按照同样的操作配制 SD03，以免出错。
3. **SCD01 溶解及溶液 pH 调节:**
 - (1) 用 **一. 准备工作** 中准备好的玻璃量筒，量取 **500ml** 超纯水(18.2MΩ·cm@25°C)。

- (2) 取出 **SCD01 干粉管**，开盖后，小心将干粉倒入 **一. 准备工作** 中标记 K0R0 的 1000mL 玻璃烧杯中。然后将量筒中的超纯水向 SCD01 干粉管中（管壁有刻度）加入~30ml，盖好盖子，漩涡混合后，倒入烧杯中。重复该步骤 1 次。最后将量筒中剩余的超纯水全部倒入烧杯中，共计 500mL 水+SCD01 干粉混合物。
- (3) 将 (2) 置于磁力搅拌器上，500~600rpm，**室温 (切勿加热)**，搅拌溶解 20~30 分钟。观察溶液颜色为紫红色，无不溶物后，使用 pH 计进行溶液 pH 调节。
- (4) (3) 中溶液的起始 pH 在 8.2~8.6 之间。使用盐酸调节溶液的 pH 至 **7.2~7.4**。***用 5M 盐酸进行 pH 调节所用总量为 400~500 μ L (经验值)，浓盐酸 (12M) 用量更少。故而调节 pH 时，缓慢滴加盐酸并观察 pH 变化，以免“过酸”。**

4. **SD03 溶解及溶液 pH 调节：**

按照 3 的方式，溶解 **SD03** 并调节溶液的 pH 至 **7.2~7.4**。

三. SILAC 液体培养基无菌过滤及保存：

(一) 生物安全柜及细胞房紫外杀菌：

1. 将 2 个 **Vacuum Bottle Filter (500mL)** 和 1m 的盒装无菌吸头一起放入细胞房的生物安全柜中（如 ESCO，#AC2-4S8-CN），开启紫外灯。
2. 人员撤出细胞房，开启细胞房的紫外灯，照射 20~30 分钟。

(二) 液体培养基过滤除菌：

1. 关闭细胞房紫外灯，开启风机 5-10 分钟后，进入细胞房，关闭生物安全柜紫外灯，开启风机。
2. 通过细胞房的传递窗将 **二. SILAC 培养基干粉 (powder) 溶解及 pH 调节** 制备的 **SCD01** 和 **SD03** 溶液培养基转入细胞房。
3. **制备的液体培养基过滤除菌，强烈建议按顺序进行，即先过滤 SCD01，再按照同样的操作过滤 SD03，以免出错。**
4. **在生物安全柜中**，按照下图流程分别进行 SCD01 和 SD03 的过滤除菌。过滤除菌的 SILAC 培养基置于 4°C 保存。

