CHO细胞无血清培养重组蛋白高表达系统使用指南（3.1版）

# 产品概述

Hi-KDCHO-K（产品号K03205K）是珠海恺瑞自主开发的超高密度CHO细胞瞬转表达重组蛋白质试剂盒，与珠海恺瑞筛选驯化的CHOK1-Hi细胞配合使用可大幅度提高重组蛋白的表达产量。

系统包括下列试剂：

1. Hi-KDCHO（K03205）：化学限定超高密度CHO细胞无血清细胞培养液
2. HiKDCHO-TA（K20003）： CHO细胞悬浮化学转染试剂
3. Hi-KEplus（K30004)： CHO细胞蛋白表达增强剂
4. HiKDCHO-Feed（K40005）：瞬时重组蛋白表达植物蛋白胨营养添加剂

 实验所需设备：生物安全柜、离心机、二氧化碳培养箱摇床（37℃及32℃）

**为确保使用效果，务必请用户在使用本系统前详细阅读此使用指南！**

**细胞培养基使用保存注意事项：**

1. **切勿紫外照射；**
2. **无需预热处理，可直接从冰箱取出使用；**
3. **储存细胞培养基时尽量使用医用冰箱，以确保恒温效果，切勿冷冻；**
4. **定期检查细胞培养基过期日期，并在过期前使用完或更换新的培养基，避免使用过期培养基导致细胞生长异常或失败。**

# 实验步骤

## 2.1转染前细胞传代

CHOK1-Hi是由珠海恺瑞驯化和筛选的适于在Hi-KDCHO无血清培养液中高密度悬浮培养的CHO-K1细胞。培养条件为37℃，5%CO2，摇床参数设定请见表Ⅰ。

本系统的Hi-KDCHO培养液可支持的最高细胞密度约为2.0×107 cells/ml左右，细胞在达到此密度时存活率一般仍可保持在95%以上。培养细胞时培养液体积不得超过摇瓶体积的1/5，一般每间隔3-4天需传代1次，传代时需先做细胞准确计数，确认密度后无需离心，直接将细胞悬液依照所需比例兑Hi-KDCHO培养液中，使传代后的细胞密度控制在0.5×106 cells/ml左右。

**表Ⅰ：摇床参数设定**

|  |  |
| --- | --- |
| 摇床振幅为**26mm** | 摇床振幅为**50mm** |
| **0.02-2L摇瓶** | **120rpm** | **0.02-2L摇瓶** | **85rpm** |
| **2-5L摇瓶** | **90rpm** | **2-5L摇瓶** | **65rpm** |

## 2.2转染细胞的准备

1. 将CHOK1-Hi细胞置于5%的CO2恒温摇床中，37℃、恒温震荡培养，确定其细胞密度及存活率。为确保转染效果，建议使用生长处于指数生长期（密度约为6-15×106cells/ml），且存活率大于97% 的细胞进行转染；
2. 细胞转染密度为20×106 cells/ml。待细胞生长至密度为6-15×106 cells/ml时，计算并转移所需体积细胞悬液于离心管中，1000rpm离心5min，弃上清，将细胞重悬于新鲜Hi-KDCHO培养液中，使其密度达到20×106 cells/ml。客户也可根据自身经验摸索更佳条件。

|  |
| --- |
| **操作要点及注意事项：**1. 转染前的细胞状态与转染效率及蛋白表达量的相关性很大，请确保细胞处于对数生长期且细胞存活率高于97%。若使用状态不佳的细胞转染，则蛋白表达量和表达天数都将会受到不同程度的影响；
2. 本系统采用高细胞密度转染方法，需将细胞接种至20×106 cells/ml方能取得理想的蛋白表达效果，为方便获取足够的细胞用量，在保证细胞的活率大于97%的前提下，可将细胞培养至15×106 cells/ml的密度再离心收集细胞；
3. 本系统在高细胞密度转染后需将细胞稀释3倍后培养，因此客户可根据所需表达的体积除以3来确定所需准备的转染体积和细胞数量。
 |

## 2.3瞬时转染

1. 将细胞转移至细胞培养摇瓶（密度为20×106 cells/ml）并放回摇床中，震荡培养1小时后从摇床中取出进行转染；
2. 转染时按浓度17µg/ml将质粒DNA添加至细胞中并充分摇匀，随后按浓度35µg/ml边添加转染试剂（HiKDCHO-TA）边混匀**（质粒与TA的浓度按稀释前的体积，详细添加可参考本节操作要点及注意事项d）**，待充分混匀后将细胞放回摇床中培养5小时；
3. 在摇床中培养5小时后，以体积为2：1的比例（**2份Hi-KDCHO，1份转染细胞悬液**）用培养液稀释转染后的细胞，放回摇床中继续培养。

|  |
| --- |
| **操作要点及注意事项：**1. HiKDCHO-TA（浓度为1 µg/µl）为白色悬浊液，使用前需摇匀或吹打均匀；
2. 将质粒DNA和转染试剂添加至细胞中时，请务必先添加质粒（17µg/ml）并摇匀，然后再添加HiKDCHO-TA（35µg/ml）。添加HiKDCHO-TA时应边添加边混匀；
3. 因本系统使用的细胞接种密度较高，在20×106 cells/ml密度条件下培养可能会出现轻微挂壁现象，这属于正常情况，可继续进行下一步操作；
4. 质粒和转染试剂的添加量是根据接种20.0×106 cells/ml的细胞体积而确定，比如当需做300ml细胞表达体积时，则需先接种100ml密度为20.0×106 cells/ml的CHOK1-Hi细胞，质粒添加量为1.7mg，转染试剂（HiKDCHO-TA）需添加3.5mg；
5. 转染5h后请务必将细胞用Hi-KDCHO培养液稀释3倍（Hi-KDCHO体积:转染后细胞体积=2:1）；
6. 若客户不方便在细胞转染5h后进行稀释，可延至转染后16h进行稀释。转染16h后稀释与5h稀释的蛋白表达效果无显著相差，但切勿超过16h再做稀释培养，以免高密度状态下培养时间过长而导致细胞的生长状态变差。
 |

## 2.4产物表达与检测

1. 转染24小时后加入2%（2ml/100ml）的CHO细胞蛋白表达增强剂Hi-KEplus；同时添加一次营养补充添加剂HiKDCHO-Feed（添加量为2%，2ml/100ml），并将细胞转移至**32℃摇床**培养箱中进行低温表达，以取得高表达效果；
2. 转染72小时后再添加一次HiKDCHO-Feed（添加量为2%，2ml/100ml），以提高产物的表达量；
3. 转染后第6-8天测定产物表达量。多数蛋白的合成在转染后第7天左右可达到最高值，客户可根据细胞状态及表达量选择适宜的收获时间。

|  |
| --- |
| **操作要点及注意事项：**1. Hi-KEplus可抑制细胞生长，添加后细胞生长速度可能变缓，此为正常现象；
2. HiKECHO-Feed是含有植物蛋白水解物的营养添加剂，可补充培养基中消耗的营养成分，从而提高蛋白表达量；
3. HiKDCHO-Feed需在转染后24h和72h各添加一次，以确保蛋白表达效率；
4. 蛋白表达时间长短可根据细胞存活率决定，建议在存活率不低于70% 时收取上清液。
 |

# 常见问题及解决方法

## 3.1 转染效率低

如果细胞转染效率偏低，则可能由以下原因造成：

1. 细胞存活率低于95%；
2. 细胞增殖速度过慢；
3. 细胞转染前结团；
4. DNA质粒纯度较低，或含有内毒素、蛋白质或其它影响细胞转染的物质。

## 3.2 转染后细胞存活率降低

转染后细胞活率有所降低属于正常现象，但转染7天后的细胞存活率一般仍可维持在70%以上。客户可根据细胞活率决定转染后的细胞培养天数，尽量在细胞活率降低至70%前收样。

## 3.3转染后细胞结团

若转染后出现松散的细胞结团现象，可能是细胞成团粘附于瓶壁上并在震动中脱落下来所致，这种情况多数可能是摇瓶未清洗干净或细胞存活率低所引起。若转染后细胞结团现象比较严重，可在转染1天后加入25mg/L左右的抗结团剂硫酸葡聚糖。

**附录:**

表Ⅰ：试剂说明

|  |  |
| --- | --- |
| **产品名称** | **说明** |
| **Hi-KDCHO** | Hi-KDCHO是由珠海恺瑞生物科技有限公司新研发生产的超高密度CHO细胞无血清重组蛋白表达化学限定培养液。该培养液适用于经珠海恺瑞驯化筛选的CHO-K1细胞CHOK1-Hi的高密度悬浮培养和重组蛋白质的高表达。培养液使用时无需添加任何生长因子等添加物，瞬转的重组蛋白表达量通常比使用市场其它CHO培养液及PEI转染试剂组合系统的表达量高3倍左右。 |
| **HiKDCHO-TA** | HiKDCHO-TA是 CHO细胞PEI转染试剂，为白色悬浊液，使用时需吹打均匀，在大规模、高密度CHO细胞转染条件下表现出良好的转染效果，具有很高的性价比。 |
| **Hi-KEplus** | Hi-KEplus 是CHO细胞蛋白表达化学限定增强剂，不含蛋白因子或动、植物提取成分， 通常在细胞转染后24小时添加。 |
| **HiKDCHO-Feed** | HiKDCHO-Feed含有植物蛋白水解物等营养成分，瞬时转染后添加可提高蛋白表达量。 |