Hi-KDCHO细胞培养液使用说明（1.1版）

# 产品说明

本产品为化学限定、无血清和无动物来源成分的超高密度细胞培养液，适用于CHO-K1细胞的超高密度悬浮培养及重组蛋白表达。

**注意：从其他厂家培养液转移至Hi-KDCHO，细胞往往会出现结团、生长缓慢等现象。客户可将新、旧培养液混合后使用，并逐步减低原培养液体积比例，待细胞完全过渡到Hi-KDCHO后，将细胞在Hi-KDCHO中持续传代培养数周时间，等细胞恢复正常生长状态后再开展下一步实验。**

**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。**

# 培养液使用前的准备

1. 本培养液适合CHO-K1细胞超高密度无血清悬浮培养，使用时无需添加其它任何添加物；
2. **常规的换液或传代时，从4℃冰箱取出的培养液可立刻使用，无需预热至室温或37℃。**

# 培养条件设置

1. 使用二氧化碳恒温摇床悬浮震荡培养细胞时，摇床温度应调至36-37℃，CO2的使用浓度为5%，转速≤120rpm（具体转速可根据用户培养箱摇床种类及实际培养情况自行调节），湿度控制在75%以上；
2. 摇瓶使用的封口盖（膜）应具备可透气的功能。

# 细胞的换液与传代

1. 新收到的储存在培养液中的细胞应马上转移至合适的摇瓶中（培养液体积应控制在摇瓶容量规格的五分之一以内），盖上封口膜，置于上述条件下的摇床中震荡培养。待细胞密度恢复至4-7×106 cells/ml时，可进行传代或冻存；
2. 从液氮罐中取出的细胞或用干冰运输的细胞请依照下述方法**（5.细胞的冻存与复苏）**进行细胞复苏和培养；
3. 传代时，需先做细胞计数，确认密度后无需离心细胞，可直接将细胞悬液依照所需比例兑入培养液中。建议传代后的细胞密度为0.3×106 cells/ml，一般每4天需传代1次（或选择传代密度0.6×106 cells/ml，每隔3天传代1次）。本培养液可支撑的最高细胞密度约为2.2×107 cells/ml，细胞在达到此密度时存活率一般仍可保持在95%以上；
4. 若在震荡培养过程中出现死细胞数过多的状况，可接种低细胞密度进行静置培养，待细胞恢复到正常活率后再进行震荡培养。

# 细胞的冻存与复苏

## 5.1冻存

1. 用细胞培养液制备7.5% 二甲基亚砜（DMSO）细胞冻存液，或使用珠海恺瑞无血清细胞冻存液（KD-Freeze）；
2. 将细胞培养至对数生长期（密度约为7-15×106 cells/ml），计数并离心收集细胞；
3. 用细胞冻存液将离心的细胞以5-20×106 cells/ml的密度重悬；
4. 将细胞悬液分装到标记好的冻存管内，确保拧紧管盖使其完全密封；
5. 将冻存管放置于-80℃冰箱中缓慢降温；
6. 次日将冻存管转移至液氮内长期保存。此过程需尽可能快速完成（建议在2min内），如果在此过程中冻存管温度升至-50℃以上，细胞则可能会迅速受损。

## 5.2复苏

1. 从液氮罐、干冰或超低温冰箱中取出细胞冻存管，立刻放置于37℃的温水中，直至管内冰晶完全融化；
2. 解冻后用75%乙醇彻底擦拭冻存管，用移液枪将管内细胞悬液全部转移至一个50ml的无菌离心管中，缓慢加入细胞培养液，至其终体积为20ml；
3. 1000rpm离心5min，弃去含有冻存液的上清液（若使用珠海恺瑞的冻存液KD-Freeze则无需经过此离心过程）；
4. 用新鲜的Hi-KDCHO培养液重悬细胞，使其密度为0.3-0.6×106 cells/ml，接种于摇瓶中震荡培养。培养3-6天后对细胞进行计数，观察细胞密度和存活率是否上升。若细胞密度达到4-7×106 cells/ml，可对细胞进行传代，一般细胞传代1-2次后即可恢复正常的生长状态；
5. 若化冻后细胞密度过低，可先接种于培养瓶中静置培养，待其密度恢复至0.6-1.0×106 cells/ml时，再接种于摇瓶中震荡培养。

# 常见问题及应对方法

## 6.1细胞密度或存活率较低

首先检查是否存在以下表中的问题，若存在，请采取相应措施，若不存在，则请从下述（1）部分开始逐一排查。

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **问题** | **是** | **否** |
| 摇床温度是否为36-37摄氏度 |  | 用温度计检测摇床内温度并做必要的校正 |
| 摇床转速是否合适 |  | 调节摇床至合适转速 |
| 摇床内湿度是否大于75% |  | 往摇床水槽中加入适量纯水 |
| 摇床CO2浓度是否为5% |  | 调节摇床CO2的浓度至5% |
| 摇瓶是否干净无异物 |  | 更换新摇瓶 |
| 摇瓶是否带透气功能 |  | 使用透气膜或其它含有透气结构的摇瓶 |
| 细胞接种密度是否大于0.3×106 cells/ml |  | 离心并重悬细胞，使其密度大于0.3×106 cells/ml |
| 传代是否过频 | 密度达到4-7×106 cells/ml时传代 |  |

1. 当细胞存活率为80%-95%时

将细胞离心去上清，用新鲜培养液重悬，使其密度为3×106 cells/ml，接种于摇瓶中振荡培养。每天观察细胞是否增殖，若有增殖，继续培养，直至细胞密度为9×106 cells/ml时方可传代。传代密度继续使用3×106 cells/ml，直至细胞存活率恢复至95%以上时，可将传代密度恢复至0.3-0.6×106 cells/ml。

1. 当细胞存活率为60%-80%时

将细胞离心去上清，用新鲜Hi-KDCHO重悬，使其密度为0.5×106 cells/ml，接种于培养瓶中静置培养。每两天观察一次细胞是否生长，若细胞有生长，继续培养至细胞密度为2.0×106 cells/ml，传代至0.5×106 cells/ml于培养瓶中静置培养。重复上述过程，直至细胞活率大于90%时，可转移至摇瓶中培养，接种密度应不少于2.0×106 cells/ml。在静置培养过程中若发现有细胞贴壁，可继续培养。当细胞密度达到一定程度时，部分细胞会自然脱落，继续贴壁的细胞则可以借助移液管的轻微吹打脱离培养瓶。

1. 细胞存活率小于60%时

丢弃细胞，重新获取细胞。

## 6.2细胞结团

检查是否往培养液中添加了其它物质，若使用可重复使用的玻璃摇瓶，需检查瓶子是否清洗干净。如果结团细胞成球状，可能是因为添加了其它外源物质或洗涤剂；如果结团细胞成片状或不规则的松散结构，可能是因为摇瓶有上一次培养时没洗干净的残留物粘附于瓶身或细胞成活率较低。