**KD-CHO细胞培养液使用说明（2.4版）**

# 产品说明

本产品为化学界定、无血清及无动物成分的高密度细胞培养液，适用于CHO-K1细胞及其它CHO细胞的高密度悬浮培养及重组蛋白质表达。

**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细胞高密度无血清悬浮培养，使用时无需添加任何添加物，开封即可使用；
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%，转速为100-130rpm，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积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培养。待细胞密度恢复至3-5×106cells/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）**复苏和培养；
3. 传代时，需先做细胞计数，密度确认后无需对细胞悬液进行离心，可直接将细胞悬液依照所需比例兑入培养液中。传代后的细胞密度应控制在0.2-0.6×106 cells/ml，建议每周（7天）传代2次。在不添加任何蛋白胨等营养试剂的情况下，本培养液可支撑的最高细胞密度为10×106 cells/ml，细胞在达到此密度时存活率一般仍可保持在95%以上；

# 细胞的冻存与复苏

## 5.1冻存

1. 用培养液制备10% 二甲基亚砜（DMSO）细胞冻存液；
2. 将细胞培养至对数生长期（密度约为6×106 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的浓度重悬；
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2分钟内），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，用移液枪将细胞悬液全部转移至一个50ml的离心管中，缓慢加入细胞培养液，至其终体积为20ml；
3. 1000rpm离心5min，弃去含有冻存保护剂的上清液；
4. 用新鲜的KD-CHO培养液重悬细胞，使其密度为0.2-0.6×106 cells/ml，接种于规格为120ml的摇瓶中震荡培养（摇床参数：120rpm、37℃、5%CO2）；
5. 培养3-5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3-6×106 cells/ml，可对细胞进行传代处理，一般细胞传代1-2次后即可恢复正常的生长状态。

# 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℃ |  | 用温度计检测温度是否正常，必要时校正摇床温度 |
| 摇床转速是否合适 |  | 调节摇床至合适转速 |
| 湿度是否大于75% |  | 往摇床水槽中加入适量纯水 |
| 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 |  | 重新清洗摇瓶或更换新摇瓶 |
| 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0.2×106 cells/ml |  | 离心并重悬细胞，使其密度大于0.2×106 cells/ml |

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0.2×106 cells/ml，接种于摇瓶中震荡培养。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2×106 cells/ml时方可传代。传代密度继续使用0.2×106 cells/ml，直至细胞存活率恢复至95%以上时。

1. 当细胞存活率为60%-80%时

将细胞离心去上清，用新鲜KD-CHO重悬，使其密度为0.2×106 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1.2×106 cells/ml，传代至0.2×106 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，可转移至摇瓶中震荡培养，接种密度应不少于0.2×106 cells/ml。

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

 细胞悬浮震荡培养过程中若出现结团现象，可在培养液中添加一定量的抗结团剂例如硫酸葡聚糖（浓度为20mg/L左右）。细胞结团或粘附于摇瓶瓶壁上通常会导致细胞存活率和培养密度降低，加入抗结团剂则基本上可以解决这一问题。