**CHO 细胞重组蛋白表达无血清细胞培养液（KDCHO-CD3）使用指南**

**（2.2版）**

# 产品说明

由CHO细胞系衍生而来的不同的亚细胞系、或使用同一CHO亚细胞系所构建的不同重组蛋白表达稳转细胞株对细胞培养基的成份要求往往有显著差别，KDCHO-CD3（产品号：K03201-CD3）是一款主要针对不同类型重组蛋白表达的CHO细胞株高密度培养的化学限定无血清培养基。

KDCHO-CD3不含谷氨酰胺及HT，可用于野生型及GS或dhfr基因缺陷型CHO宿主细胞以及使用这些细胞所建立的稳定表达细胞株，用户需根据培养不同细胞的实际需要添加适量的补充成分：

1. 野生型CHO细胞（CHO-K1等）：添加谷氨酰胺（7.4mMol）；
2. GS缺陷型CHO细胞（CHOZN等）： 添加谷氨酰胺（7.4mMol，已构建稳定细胞株无需添加或酌情少量添加）；
3. dhfr缺陷型CHO细胞（DG44等）：添加谷氨酰胺（7.4mMol）和HT（100uM Hypoxanthine及16uM Thymidine，或根据自己经验添加）。

KDCHO-CD3培养基与珠海恺瑞所生产的CD3feed-K & C细胞培养基补料配合使用，可进一步提高重组蛋白表达效率，用于重组蛋白生产工艺开发。用户也可在使用KDCHO-CD3培养基取得初步结果后，根据需要委托珠海恺瑞生物科技进行补料的筛选及优化。

受限于培养基类产品IP秘方保护以及各培养基公司研发团队的技术背景，不同品牌的培养基配方不尽相同。通常在更换使用不同配方的培养液时细胞会经历一段时间的适应期。初次使用KDCHO-CD3时细胞的适应过程一般会在传代7次左右完成。

**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。**

# 液体培养基使用前的准备

培养液需储存于4℃冰箱中避光保存。开始细胞培养实验时从冰箱中取出即可使用，无需恢复至室温或加热至37℃。

# 摇床培养条件设置

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100-130 rpm，湿度控制在70%以上。

# 细胞的换液与传代

建议细胞密度在3-5×106 cells/ml时进行传代或冻存。传代时需先做细胞准确计数，确认细胞密度后，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控制在0.5×106 cells/ml）。

|  |
| --- |
| **注意：**1. 若细胞在传代培养过程中需要添加MSX抑制剂，建议先离心（1000rpm 5min）细胞，然后用新鲜培养液重悬细胞。
2. 若用KDCHO-CD3培养液来培养GS缺陷型细胞建立的稳转细胞株时，在筛选过程的前期细胞可能生长较为缓慢，可以每间隔4天传代一次。
 |

# 常见的问题及应对方法

1. **传代过程中密度和活率明显降低**：当细胞密度降低但活率不低于80%时，可通过离心（1000rpm、5min）去上清，用新鲜的KDCHO-CD3培养液重悬至较高的密度（1.0-2.0×106 cells/ml）培养一段时间，使细胞恢复正常的生长状态；当细胞密度降低且活率低于80%时，可离心换液至**KD-Clone**（产品号K07001）培养液中静置培养，待细胞活率恢复至正常状态后可换回KDCHO-CD3培养液培养。
2. **使用GS缺陷型细胞建立稳定细胞株时，细胞生长密度较低：**这属于正常现象。在建立稳定细胞株时由于KDCHO-CD3培养液中未添加谷氨酰胺，因此稳转细胞在筛选初期往往生长较为缓慢，但随后一般都会恢复至正常生长状态。完成稳定细胞筛选后在培养液中补充适量的谷氨酰胺一般也会提高细胞的生长密度。
3. **细胞出现挂壁情况：**当细胞大部分死亡时会出现细胞挂壁的现象，此时需检查所使用的摇瓶是否清洗干净，或者是否因为传代不及时而导致了细胞死亡。若两者均正常，则需将细胞进行活率及密度的测定，再按照方法1来对细胞进行处理。