杂交瘤促生长组合因子使用指南KD-HybriGro（1.3版）

# 产品概述

珠海恺瑞自主研发**KD-HybriGro**为杂交瘤促生长组合因子，可有效促进杂交瘤细胞单株生长，提高存活率，明显增强克隆细胞的生长，有效提高杂交瘤细胞克隆生长率。

杂交瘤细胞生长及表达具有一定的不稳定性，传代多次有丢失阳性克隆株的风险，在细胞长期培养前进行多次亚克隆可筛选出更稳定表达阳性抗体的克隆株，不易丢失抗性。**KD-HybriGro**可明显提高杂交瘤亚克隆成功率，促进细胞生长，提高亚克隆细胞无血清培养适应能力。

**KD-HybriGro**可应用于杂交瘤细胞融合制备后的细胞培养、单克隆细胞的制备和高密度无血清悬浮培养单克隆抗体生产等。

珠海恺瑞杂交瘤促生长克隆培养系统包括下列试剂：

1. KD-Clone（K07001）：哺乳动物细胞单细胞培养液
2. **KD-HybriGro**（K50002）：杂交瘤促生长组合因子 (100X)
3. FBS（R01100）：胎牛血清（杂交瘤培养质量认证批次）

完全培养基的配制：KD-Clone，KD-HybriGro（100X），1%FBS(选择使用）

实验所需设备：生物安全柜、离心机、倒置相差显微镜，二氧化碳静置培养箱（37℃，5%CO2）

**为确保使用效果，建议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

本实验方法根据珠海恺瑞杂交瘤细胞制备及无血清培养经验总结而成，客户可根据个人经验对此实验方法做适当的调整。

## 2.1已适应无血清培养的杂交瘤细胞克隆

**KD-HybriGro**可应用于已适应无血清培养的杂交瘤细胞进行亚克隆，可显著提高克隆形成率，提高细胞活性。

已经适应低密度或高密度无血清培养条件的杂交瘤细胞一般可直接使用KD-Clone+ITSPlus进行亚克隆，不同杂交瘤细胞细胞株差异较大，只添加基础添加因子不一定能够克隆成功，而**KD-HybriGro促生长组合因子可保障亚克隆细的生长，显著提高不同细胞株的克隆形成率，提高细胞存活率。**实现无血清亚克隆后，可将细胞无血清扩增并冻存（可使用KD-Freeze，无血清细胞冻存液），建立更稳定的无血清杂交瘤工作库。后续无需驯化，可长期较稳定表达无血清目标抗体。

## 2.2尚未适应无血清培养的杂交瘤细胞克隆

**KD-HybriGro**可应用于尚未适应无血清培养的杂交瘤细胞亚克隆，配合1%FBS添加使用，其克隆效果接近10%FBS，明显降低了血清的使用量，同时明显提高克隆细胞对无血清培养的适应能力，使克隆细胞株的无血清驯化更加简易高效，明显缩短细胞驯化时间，提高无血清驯化成功率。

尚未适应无血清培养的杂交瘤细胞亚克隆，添加1%FBS，**KD-HybriGro**（100X）与KD-Clone配制成完全无血清进行亚克隆。

**KD-HybriGro**杂交瘤促生长组合因子含有多种杂交瘤单细胞生长促进因子，有效促进杂交瘤单细胞生长，配合1%FBS添加使用，其克隆效果接近10%FBS不添加因子克隆效果，重点显著降低了克隆细胞株对血清的依赖性，更容易进行无血清培养。

## 2.3杂交瘤细胞亚克隆方法参考（以有限稀释法为例）：

## 2.3.1实验步骤

以克隆三块96孔板、每板200个细胞为例：

1. 完全培养基配制：取无菌摇瓶，加入48ml的KD-Clone，480µl的KD-HybriGro（1:100），480µl FBS(1%)混匀，再从摇瓶中分别取900 µl的培养液加入3个1.5 ml的离心管中，分别标号为管1、管2、管3。
2. 有限稀释法梯度稀释待克隆细胞：取待克隆的细胞100 µl，加入管1中，混匀；按梯度稀释的方法稀释。快速从管3中吸取3滴10 µl细胞混合液于小平皿中，显微镜镜下计数，取其平均数（\* 个/10 µl）。若细胞量较少（﹤10个），则按照同样的方法吸取管2细胞混合液。计算出共需细胞混合液体积，取相应细胞混合液加入到步骤（1）中剩余的45 ml的完全培养基中，混匀。

**注意事项：**

1. 离心管1、2、3在混合细胞时需要快，显微镜计数时也不要耗时过长。所有材料准备好后再把细胞取出来计数；
2. 管1、2、3依次为10倍关系，当管3细胞量不够时，可按倍数吸取管2中细胞混合液；若管2细胞量不够时，同理可吸取管1或管3中细胞混合液。
3. 在1.5 ml离心管混匀细胞液时尽量不要吹打，上下颠倒数次即可；
4. 将上述混合均匀的细胞悬液倒入12道管槽中，用12道排枪吸取150 µl/孔加入96孔板中，铺三板。置于37 ℃、5% CO2培养箱中静置培养，保持一周不动。

**注意事项：**

1. 接种时，细胞悬液需混合均匀，铺板细胞较多时，分批倒入混合均匀的细胞悬液。
2. 一周之后观察细胞，在孔板上方标记出长势较佳的克隆，根据需求进行相关阳性检测，挑选表达量更高的克隆株进行扩增冻存，根据需求是否进行二次亚克隆。

经**KD-HybriGro**克隆的杂交瘤细胞株能够快速适应无血清培养，客户经无血清驯化后的细胞株，建议建立无血清细胞株工作库，每次复苏工作细胞培养3-4代收集表达抗体后细胞丢弃更换新鲜细胞培养收集抗体上清。杂交瘤细胞长期培养抗性容易丢失，对细胞株进行亚克隆可以有效地筛选更单一有效表达细胞株，建立亚克隆工作库，保障抗体的高效快捷生产。

**附录:**

附录：试剂说明

|  |  |
| --- | --- |
| **产品名称** | **说明** |
| KD-Clone | KD-Clone为化学限定无血清系列基础培养液，分别添加不同组合的生长因子后可用于多种细胞的亚克隆。培养液化学成份明确，不含血清及其它动物成份。 |
| **KD-HybriGro** | 杂交瘤促生长组合因子，可有效提高杂交瘤克隆细胞单细胞或多细胞的增殖分裂，提高细胞活性，增加克隆率。 |
| ITSPlus | 基础添加因子，人重组蛋白（IGF-1,Transferrin,HSA）以及Selenium等 |
| FBS | 胎牛血清（杂交瘤培养质量认证批次） |

**实验相关数据：**

实验1：在1%FBS的基础上添加重组生长因子a，杂交瘤细胞株A、B克隆效果可与10%FBS效果相同，较难克隆的细胞C，克隆数低于10%FBS。

实验2：以较难克隆的细胞C进行实验，在1%FBS基础上添加促生长因子a、b的克隆细胞数可提高2倍。

实验3：在1%FBS的基础上添加KD-HybriGro，克隆效果效果接近10%FBS，对比1%FBS不添加KD-HybriGro可明显提高细胞克隆数量，细胞株V1提高1.7倍，细胞株V2提高5.2倍。