

杂交瘤细胞高密度无血清悬浮震荡培养(3.1 版)

单克隆杂交瘤细胞可在无血清培养条件下进行扩增和生产单克隆抗体蛋白。珠海恺瑞生物科技有限公司研发生产的无血清培养液 **KD-Hybri**（产品号 K04114）可用于杂交瘤细胞的高密度悬浮培养（细胞最高密度可达 8.0×10^6 cells/ml 左右），从而大幅度提高了抗体表达效率，并完全避免了单抗制备过程中来源于血清或其它动物源成份的污染风险。

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。

在含血清条件下产生和培养的杂交瘤细胞株一般经过一个适应过程后即可在 KD-Hybri 高密度无血清培养液中进行悬浮震荡培养。具体操作步骤如下：

1. 杂交瘤细胞无血清驯化培养

杂交瘤细胞从含血清到无血清培养过程可通过梯度降血清进行，一般建议采用摇瓶培养梯度降血清，细胞驯化方法如下：

1.1 杂交瘤细胞驯化重点要素

- (1) 驯化请从含血清培养的杂交瘤细胞开始进行。切勿用已驯化至其他厂家培养基的杂交瘤细胞株进行适应，该细胞较难适应，容易失败；
- (2) 摇瓶培养体积为摇瓶规格的 1/5，确定细胞培养的摇床参数：

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

- (3) 驯化过程中重点要注意细胞状态，细胞增殖良好的情况下才可以降血清；
- (4) 驯化过程使用 KD-Hybri+ITSplus 无血清培养接种密度 1.0×10^6 cells/ml；
- (5) 驯化完成后的细胞接种密度可降至 0.5×10^6 cells/ml。

1.2 驯化流程

- (1) **细胞摇瓶扩增**：将杂交瘤细胞在有血清培养条件下扩增培养，待 T75 方瓶（20ml 细胞悬液）中细胞长满时，用力拍打瓶身，待瓶中细胞悬浮后将细胞全部转移到 250ml 摇瓶中，加入 30ml KD-Hybri 新鲜培养基及 **100X ITSplus**。培养 24 小时后进行细胞计数，记录细胞活率及密度；
- (2) **细胞传代梯度降血清**：
 - a. 细胞在摇瓶扩增培养 24h 后，若细胞生长情况良好，且活率在 85% 以上，用新鲜 KD-Hybri 培养基和 100X ITSplus 将细胞稀释至 1.0×10^6 cells/ml（**无需添加 FBS**）；若细胞未达到以上要求，继续培养（此阶段请密切关注细胞活率及增殖情况）；如细胞活率明显降低至 60% 左右，则需考虑补充 2% 至 5% FBS 传代 2-3 次，待细胞适应低血清状态再进行下一步降血清操作；
 - b. 当细胞培养体系的血清残留低于 0.1%（连续传代 3-4 次）并且细胞生长状态良好时，细胞已完全适应无血清培养；此时可将细胞按 1000rpm 离心 5min，弃上清，用完全培养液 KD-Hybri+**100X ITSplus** 重悬细胞。
- (3) **无血清培养**：若细胞在上述 b 步骤传代降血清培养过程中已完全适应无血清悬浮培养条件，则可在其对数生长期进行传代，以密度 $0.5-1.0 \times 10^6$ cells/ml 接种，约 48 小时传代 1 次。（**不同细胞株请根据其生长曲线选择传代接种密度及传代时间**）同时将已适应无血清悬浮培养的杂交瘤生产细胞株进行扩增保种，用于后续抗体生产。

注意事项：

- a. **整个驯化过程均需添加 100X ITSplus；**
- b. 杂交瘤细胞传代要及时，选择对数生长期进行传代并注意保种；
- c. 杂交瘤细胞不同克隆生长速率不同，对无血清适应能力也不同，最高生长密度也不同；
- d. **细胞状态良好时，每次稀释传代都无需额外添加 FBS，培养体系中 FBS 随每次传代逐渐减少。**