珠海恺瑞邮寄细胞处理方法（1.0版）

珠海恺瑞生物科技提供的细胞已经经过无血清培养驯化，支持高密度悬浮培养。细胞的邮寄方式有常温与干冰运输，我们会根据实际情况采用不同的寄送方式。

**一、干冰寄送细胞的处理方法**

# 1.常规说明

|  |  |
| --- | --- |
| 细胞名称 | HEK293 / CHOK1-Hi / CHO-K1 / SP2/0 细胞 |
| 生长特性 | 高密度悬浮 |
| 运输载体 | 1.8ml冻存管 |
| 细胞悬液体积 | 1ml |
| 细胞密度 | 1.0×107cells/ml |
| 细胞存活率 | 一般大于98% |

# 2.细胞处理方式

1. 收到细胞后请查看运输包装中是否还有足够的干冰，以确保没有因干冰过少而导致细胞化冻受损。如果发现干冰过少或消耗殆尽，请及时向我们反馈；
2. 确认细胞没问题后，建议立即对细胞进行复苏，或者将冻存管放入液氮中储存约72小时，使细胞适应环境后再解冻复苏。请勿将细胞长期存放在-80℃冰箱；
3. 从液氮罐或运输的干冰中取出冻存管，立即放置于37℃温水中，直至管内冰晶完全融化（复苏细胞应采用快速融化的方法，建议3min内，以减少细胞化冻过程中的损伤）；
4. 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规格为100ml的无菌摇瓶中，缓慢加入对应的细胞培养液，至其终体积为20ml、细胞密度为0.5×106 cells/ml**（由于冻存过程使用的是珠海恺瑞开发的冻存液KD-Freeze，该冻存液不影响细胞生长，所以无需离心去除）**；
5. 将摇瓶置于摇床中震荡培养（摇床参数：80-120rpm、37℃、5%CO2）；
6. 培养3-5天（SP2/0细胞则需2-3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；若细胞密度达到对数生长期3-5×106 cells/ml，可对细胞进行传代处理；若细胞活率较低，可转移至T75培养瓶中静置培养，待细胞恢复活率后再转移至摇瓶培养；
7. 一般细胞传代1-2次后即可恢复正常的生长状态，**后续的传代操作请参照“珠海恺瑞产品使用指南”。**
8. 不同细胞根据对应的培养液进行添加培养。

|  |  |
| --- | --- |
| 细胞名称 | 培养条件 |
| HEK293 | KOP293 |
| CHOK1-Hi | Hi-KDCHO |
| CHO-K1 | KDCHO-CD3 + 7.4mM力肽溶液 |
| SP2/0 | KD-Hybri+ITSplus |

二、**常温寄送细胞的处理方法**

# 1.常规说明

|  |  |
| --- | --- |
| 细胞名称 | HEK293 /HEK293-ATM/ CHOK1-Hi / CHO-K1 细胞 |
| 生长特性 | 高密度悬浮 |
| 运输载体 | 125ml无菌试剂瓶 |
| 细胞悬液体积 | 50-60ml |
| 细胞密度 | 1.0×106 cells/ml |
| 细胞存活率 | 一般大于98% |

# 2.细胞处理方式

1. 收到细胞后请先观察是否染菌，正常的细胞悬液应该是透亮微浑浊的液体，若出现污染而导致悬液浑浊请及时向珠海恺瑞反馈。运输中细胞悬液有可能会出现絮状颗粒，此为正常现象。
2. 确认细胞无污染后，请及时将细胞转移至规格为250ml的摇瓶中震荡培养，具体方法如下：
3. 用75%乙醇对试剂瓶表面进行擦拭消毒，在超净工作台内打开试剂瓶；
4. 用移液管轻轻吹打细胞2次，转移50ml细胞悬液于规格为250ml的摇瓶中**（请勿大力吹打，除HEK293-ATM细胞外，其他常温寄送细胞无需离心换液）**；
5. **常温寄送的HEK293-ATM细胞，800rpm离心5min后弃掉上清，补加50ml的KD293-ATM培养液置于250ml摇瓶中，将摇瓶置于温度为37℃、转速为120rpm的无二氧化碳培养箱摇床中进行震荡悬浮培养；**
6. **除HEK293-ATM细胞外**，其他常温寄送细胞将摇瓶置于CO2浓度为5%、转速为120rpm、温度为37℃的二氧化碳培养箱摇床中进行震荡悬浮培养。
7. 对试剂瓶中剩余的细胞进行分析，记录细胞的密度和活率；
8. 接种后3天对细胞进行计数，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，可用新鲜培养液直接稀释细胞进行传代培养，传代密度为0.3-0.6×106 cells/ml。尽量避免将细胞培养至超过6×106 cells/ml密度时再进行传代培养，以免影响细胞的正常生长状态和降低重组蛋白的表达效率。
9. 细胞密度和活率恢复后应及时对细胞进行冻存，**具体方法请参考“珠海恺瑞产品使用指南”**。