骨髓瘤细胞高密度无血清培养（1.4版）

骨髓瘤细胞可用于杂交瘤融合，骨髓瘤细胞的状态对杂交瘤融合及筛选的成功率有较大的影响，因此培养健康的骨髓瘤细胞对杂交瘤的制备至关重要。传统的骨髓瘤细胞需在含血清的培养液中贴壁生长，而珠海恺瑞推出的无血清培养液**KD-Hybri**可用于杂交瘤和骨髓瘤细胞的无血清高密度悬浮培养。

采用高密度悬浮培养的骨髓瘤细胞不仅可以明显提高杂交瘤制备的工作效率，同时也更利于后续杂交瘤细胞的无血清培养及抗体高效表达与纯化。

骨髓瘤细胞高密度无血清培养实验方法可参考“**珠海恺瑞杂交瘤细胞高密度无血清悬浮震荡培养**”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。**

# 已适应无血清培养的骨髓瘤细胞培养

已经适应无血清培养的骨髓瘤细胞一般可直接切换至**KD-Hybri+ITSplus（100X）**中进行高密度悬浮培养。将细胞以密度为0.3-0.5×106 cells/ml接种，注意每天观察细胞活率及密度。刚适应无血清悬浮培养的细胞活率及最高生长密度都可能偏低，但经过一段时间的适应以后，细胞活率会逐渐增加，最高生长密度也会随之增加。

选择对数生长期（3.0-5.0×106 cells/ml）的细胞进行传代，以密度为0.3-0.5×106 cells/ml接种，每隔2-3天传代1次。

# 尚未适应无血清培养的骨髓瘤细胞培养

**注意事项**：

1. 骨髓瘤细胞生长速度较快，请留意细胞密度，选择对数生长期及时传代并注意保种。
2. 骨髓瘤细胞可通过静置及摇瓶培养逐步降低血清的方式进行无血清驯化；
3. 细胞摇瓶扩增：将骨髓瘤细胞在常规有血清培养条件下扩增培养，待T75方瓶中细胞汇合50ml离心管中，1000 rpm 离心5 min丢弃上清，将培养液切换为**含ITSpluas的KD-Hybri培养液**重悬，接种20ml密度为0.5-1.0 ×106 cells/ml的细胞至100ml摇瓶中（客户可根据需求调整培养体积），此时细胞培养基血清含量可降至2%-5%（客户可根据细胞状态选择血清浓度），培养24小时后进行细胞计数，记录细胞活率及密度；
4. 细胞状态监测：取上述步骤中完成24小时摇瓶培养后的细胞进行计数，若细胞密度明显增加且活率高于85%，则可进行下述步骤的无血清培养。若细胞状态未达到所述要求，则需继续在有血清条件下将细胞培养到状态良好时再进行无血清培养液切换；
5. 无血清培养：将细胞全部转移至50ml离心管，1000rpm离心5min，弃上清。细胞用**含ITSplus的KD-Hybri**完全培养液重悬，稀释至1.0 × 106 cells/ml，接种至100ml摇瓶中（培养体积为20ml）并置于120 rpm （摇床振幅为26mm，客户根据摇床振幅来调整转速）、37℃、5%CO2培养箱中震荡培养。（**ITSplus（产品号K50001） 添加因子现用现加**，需临时添加到从4℃冰箱中取出的培养液中，避免将培养液预热至室温或37℃，切勿将添加因子加入培养液后长期保存，否则易失去活性）；
6. 接种 24 小时后测定细胞活率和密度，此时细胞活率可能会在 60%左右。请重点观测细胞是否有生长，若接种 24-48 小时后细胞活率下降至 50%以下，则需考虑补充 2%-5% FBS 传代2 -3次，待细胞进一步恢复活率后，再重新将其离心除去血清，培养于完全培养液中。若细胞密度和活率均开始上升时，表明细胞已适应无血清悬浮培养条件，此时可对细胞进行传代处理。请在对数生长期进行传代，传代接种密度一般为 0.3-0.5×106 cells/ml，每隔2-3天传代1次。若细胞活率恢复较慢可将接种密度提高至1.0×106 cells/ml，传代2-3次细胞可快速恢复较高活率。

**注意事项**：

1. 在扩增培养转移细胞时，尽量在细胞生长状态良好且细胞汇合度达到80%左右进行，汇合度过高或过低均不利于细胞扩增。