细胞克隆培养液KD-Clone使用方法（3.0版）

# 产品说明

KD-Clone（产品号：K07001）为珠海恺瑞自主研发的化学限定的细胞无血清克隆培养基，适合于 CHO、293及杂交瘤等细胞的单细胞生长，培养液化学成份明确，不含血清及其他动物成份，可在珠海恺瑞生物产品技术服务人员的指导下对多种不同类型的哺乳类动物细胞进行单细胞克隆培养。

KD-Clone适用于单个或低密度细胞生长，可使细胞低密度培养时保持细胞活性并增值。根据不同类型细胞克隆需求，可搭配不同添加因子，提高克隆形成率，提高细胞单克隆效率。

**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。**

# 试剂及储存条件

## 2.1珠海恺瑞单细胞克隆系统包含下列试剂：

1. KD-Clone（产品号：K07001）：杂交瘤、CHO及293细胞无血清克隆培养液
2. ITSplus（产品号：K50001）：人重组蛋白（IGF-1, Transferrin, HSA）以及Selenium等
3. KD-HybriGro（产品号：K50002）：杂交瘤促生长组合因子

## 2.2试剂储存条件：

1. KD-Clone：2-8℃避光保存。
2. ITSPlus：-20℃避光保存
3. KD-HybriGro：-20℃避光保存

# 使用方法

KD-Clone使用时需根据不同细胞类型添加不同的因子，表1为珠海恺瑞推荐的不同类型细胞在单克隆及细胞扩大时搭配使用的因子，可供参考，客户也可根据相关文献及实验经验选择添加。

**表1不同类型细胞在单克隆及细胞扩大培养体系**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **细胞类型** | **接种细胞密度** | **接种体积** | **克隆时添加因子完全培养基** | **扩大时的培养基** |
| **空CHO细胞** | **200 cells/板** | **150µl/孔** | **KD-Clone****+ITSplus(100X）** | **KD-CHO** |
| **空CHO缺陷型细胞** | **200 cells/板** | **KDCHO-CD3****+8mM力肽** |
| **稳转CHO细胞** | **50 cells/板** | **100µl/孔** | **KDCHO-CD3** |
| **稳转CHO缺陷型细胞**  | **50 cells/板** |
| **杂交瘤细胞** | **200 cells/板** | **150µl/孔** | **KD-Clone****+3%-5%FBS** | **KD-Hybri****+3%-5%FBS** |
| **KD-Clone****+KD-HybriGro(100X）+1%FBS** |
| **HEK293细胞** | **200 cells/板** | **KD-Clone+5%FBS** | **KOP293** |

# 培养条件

CO2静置培养箱， 37℃，5%CO2。

# 实验步骤

以克隆3块96孔板、每板200个细胞为例：

1. 取无菌摇瓶，加入48ml的KD-Clone 培养液并向摇瓶中加入480µl 的ITSplus（1：100），混匀，再从摇瓶中分别取900µl的培养液加入3个1.5ml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100µl，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10µl细胞混合液于小平皿中，显微镜镜下计数 ，取其平均数（\* 个/10µl）。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45ml的KD-Clone培养液中，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1.5ml离心管混匀细胞液时尽量不要吹打，上下颠倒数次即可；

4.在进行第一次克隆（多克隆）时克隆稳转的细胞要计数，并离心换液，以除去G418对克隆时的影响；’

5.在进行第一次克隆（多克隆）时在显微镜下计数时是死活细胞一起数，因此计算所需细胞液体积时要乘以活率。

1. 将步骤2）中混合好的细胞混合液分多次混匀后倒入12道管槽中，用12道排枪吸取150µl/孔加入到96孔板中，铺三板。置于37℃、5%的CO2培养箱中静置培养，保持一周不动；

**注意事项：**

1. 接种时，倒出的细胞混合液每次大概倒一板的细胞液到12道管槽中，接完一板再倒，接种时尽量不吹打细胞，以保持细胞的活性。

1. 一周之后观察细胞，圈出长势较佳的孔，继续让细胞生长3-7天后，将单个细胞分裂的孔内的细胞扩大到48或24孔板中培养，并向48或24孔板中添加0.25-0.5ml/孔的对应培养基**（如表1）**，7-10天后补液0.25-0.5ml的对应培养基**（如表1，注意此后使用的培养基都是与该处相同；需要特别注意杂交瘤细胞驯化方式和稳转细胞需按照细胞池的筛选、添加抗性药物筛选，详情请看珠海恺瑞的杂交瘤单克隆指南和CHO稳转方案）**，使细胞分裂更多，等细胞汇合率约为60-80%时扩大到6孔板，2ml/孔培养基培养，以此类推将细胞扩大到T25或T75方瓶或摇瓶中培养；
2. 细胞扩大到摇瓶后，经过2周左右的传代，对各个单克隆细胞株进行生长曲线对比、空细胞的荧光蛋白转染率对比和空细胞各种不同类型的蛋白瞬时转染表达量对比，筛选出合适的单克隆细胞株。

# 常见的问题及应对方法

# a.克隆率低：其一，可能是由于所克隆的细胞株活性较差，可取对数生长期的细胞株进行克隆，可达到较好的克隆效果。其二，克隆的细胞数少，可适当增加克隆数，提高克隆效率。其三，人为细胞计数产生较大误差，可进行多次计数取平均值，减少误差。

# b.多克隆细胞株多于单克隆细胞株：可能是由于每板的克隆细胞数多、细胞结团或细胞分布不均导致，可适当等细胞不接团时克隆或减少克隆细胞数，并在铺板时经常混匀细胞液。

# c.克隆细胞扩大后长不起来：这种情况可能是由于克隆细胞团未达到扩大培养的要求，将其提前扩大。克隆细胞需铺满96孔板底部80%以上面积时，方可扩大到48孔板，再逐一扩大到24孔板、6孔板等。

# d.克隆细胞分裂终止：铺板培养1周后挑选克隆时，如遇到克隆分裂终止，单个细胞团细胞为个数，可能是由于铺板前稀释细胞进行吹打或大力混匀细胞导致细胞受损，生长受到抑制，因此在稀释细胞时动作务必轻柔，切记不可用枪头吹打细胞。

附录

附录1：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）。 |
| KDCHO-CD3 | KDCHO-CD3是由珠海恺瑞生物科技有限公司自主研发生产的化学限定高密度无血清培养液。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，与珠海恺瑞所生产的CD3Feed-K与CD3Feed-C 的CHO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。 |
| 力肽 | 力肽 (L-丙氨酰-L-谷胺酰胺) L-Alanyl-L-Glutamine 为白色粉末结晶。力肽配置的溶液是细胞谷氨酰胺的中间物质，为细胞提供额外的谷氨酰胺，促进细胞生长。 |
| KOP293 | KOP293是由珠海恺瑞生物科技有限公司自主研发生产的化学限定高密度无血清培养液。该培养液适用于人胚肾上皮 ( human embryo kidney 293, HEK293)细胞的悬浮生长和重组蛋白质的表达。培养液使用时无需添加任何生长因子等添加物，悬浮培养可支撑的细胞密度约为10-12×106 cells/ml。 |
| KD-CHO | KD-CHO为化学界定、无血清及无动物成分的高密度细胞培养液，适用于CHO-K1细胞、其它CHO细胞的高密度悬浮培养及重组蛋白质表达。 |
| KD-Hybri | 骨髓瘤及杂交瘤细胞高密度无血清培养液。 |