

YOCON 友康®

用数据取信用户

杂交瘤无血清培养基
使用说明文件（2021年版）



杂交瘤细胞无血清培养基使用说明书

【产品名称】

杂交瘤细胞无血清培养基

【规格与保存】

| 产品货号 | 产品名称 | 包装规格 | 保存条件 | 保存期限 |
|----------|-------------|----------|-------------|------|
| NC0301 | 杂交瘤细胞无血清培养基 | 1000mL/瓶 | 2-8℃, 避光保存。 | 12个月 |
| NC0301.S | 抗增剂 | 100mL/瓶 | 2-8℃, 避光保存。 | 12个月 |

*抗增剂, 并不用于杂交瘤细胞的培养。仅单独用于培养后期刺激抗体表达。

对于表达量较低的杂交瘤细胞系, 可通过抗增剂后期刺激, 进一步提高抗体表达量。

抗增剂使用步骤:

- 1、当无血清培养的杂交瘤细胞生长至对数生长期时, 峰值的前一天, 依据培养基的体积添加抗增剂, 如培养基未100mL, 添加抗增剂为100uL, 添加后继续培养, 当细胞活率下降至30%至40%即可收获上清液, 进行抗体检测。

注意事项:

第一次使用抗增剂时, 请严格按照我公司推荐的浓度, 抗体一般可提高20%至50%, 不同细胞抗体刺激效果有所不同, 最佳浓度需要针对不同细胞系进一步摸索。

【用途与描述】

本培养基可用于杂交瘤细胞的培养, 以获取特定的单克隆抗体。

杂交瘤细胞是将免疫小鼠的淋巴细胞(B细胞)与小鼠骨髓瘤细胞融合在一起, 该细胞既具备细胞能够产生特异性抗体的特性, 同时又具有骨髓瘤细胞的无限增殖能力, 是目前单克隆抗体生产常用的细胞株, 杂交瘤无血清培养基及化学成分明确、没有添加血清或血清替代物(血小板裂解物)、没有任何动物源的组分。产品批间差异小, 所有原料均符合GMP标准。更适合临床研究用途。

【主要组成成份】

氨基酸、维生素、无机盐、人白蛋白、转铁蛋白、胰岛素、微量元素等。

【产品设计原理】

在诸如DMEM、MEM、M199等基础培养基之上, 添加了各种氨基酸、维生素、无机盐、白蛋白、转铁蛋白、胰岛素、微量元素, 既能培养杂交瘤细胞, 又能培养小鼠骨髓瘤细胞(sp2/0)。

【产品性能指标】

PH值: 7.0-7.4

渗透压: 270-350 mOsm/Kg

无菌: 霉菌、细菌不得检出

装量: 1000mL/瓶

外观: 橘红色澄清液体

保存温度: 2-8℃, 避光保存

【使用前特别提示】

1. 本产品的使用方法与血清培养基及血清替代物培养基相比，确有差别。

敬请用户仔细查看本产品使用说明书后操作，请勿仅以既往经验使用本产品。

与血清培养基相比，本产品在培养某些杂交瘤细胞时，需提前进行驯化，如直接培养，生长效果不能达到最佳状态。

1) 对于采用血清及血清替代物培养的杂交瘤细胞，在初次使用的yocon 杂交瘤细胞无血清培养基时，为防止培养环境的剧烈变化对细胞造成的损伤，需要对细胞进行驯化操作。

首次更换为yocon杂交瘤细胞无血清培养基时，需要在其中添加原培养方法中灯亮的血清或者替代物。在此后的两次细胞传代中，一次减半血清或者血清替代物的浓度，第三次传代，直接离心取上清，更换为yocon杂交瘤无血清培养基，完成驯化过程。

2) 对于已经采用无血清培养基培养的杂交瘤细胞，可以直接更换为本产品进行换液和传代操作，无需驯化过程。

2. 使用培养基静态培养和动态培养的不同之处

静态培养：如客户静态培养，可直接使用本培养基，无需做任何处理

动态培养：如客户动态培养，需额外添加0.1% PLURONIC F-68，防止在搅拌培养中，剪切力对细胞的损伤。
如未添加防剪切力保护剂，细胞生长不佳，甚至死亡。

【完全培养基准备】

完全培养基2-8°C可避光保存12个月。使用前室温平衡。

静态培养，可直接使用该培养基。

动态培养，每1L 培养基添加10mL F-68溶液（10%），混匀备用。

【使用环境1：静态培养法】

培养器皿：培养皿或T25细胞培养瓶

接种密度：1-2x10⁵cells/mL

培养条件：5%二氧化碳环境

培养要求：直接使用,无需添加其它组分

待传代密度：1x10⁶cells/mL

传代后最佳密度：2-3x10⁵cells/mL

不离心传代（以T25瓶为例）：

1、复苏细胞时，接种5mL培养基，要求密度调至1-2x10⁵cells/mL。

2、当细胞密度长至1x10⁶cells/mL，向T25培养瓶中加入新鲜培养基10mL，用移液器充分混匀。

3、分别吸取5mL充分混合后的细胞悬液置于两个新T25瓶中，对细胞进行1：3传代。

4、传代后的细胞2-3天可继续扩瓶传代。

离心传代 (以T25瓶为例) :

- 1、复苏细胞时, 接种5mL培养基, 要求密度调至 $1-2 \times 10^5$ cells/mL。
- 2、当细胞密度长至 1×10^6 cells/mL, 将T25培养瓶中培养液充分混匀后转移至50mL离心管中。
- 3、800rpm, 离心5min, 离心结束后, 弃上清, 添加新鲜培养液15mL, 并充分混匀。
- 4、分别吸取5mL充分混合后的细胞悬液置于三个新T25瓶中, 对细胞进行1: 3传代。
- 5、传代后的细胞2-3天可继续扩瓶传代。

【使用环境2: 动态培养法】

| | | |
|-----------------------------------|--------------------------------------|--------------------|
| 培养器皿 : 细胞摇瓶 | 细胞摇床 : 转速90rpm | 培养基要求 : 需添加0.1%F68 |
| 接种密度 : $1-2 \times 10^5$ cells/mL | 培养条件:5%二氧化碳环境 | |
| 待传代密度 : 1×10^6 cells/mL | 传代后最佳密度 : $2-3 \times 10^5$ cells/mL | |

(以125mL摇瓶为例) :

- 1、复苏细胞时, 接种5mL培养基, 要求密度调至 $1-2 \times 10^5$ cells/mL。
- 2、当细胞密度长至 1×10^6 cells/mL, 向T25培养瓶中加入新鲜培养基10mL, 用移液器充分混匀。
- 3、分别吸取5mL充分混合后的细胞悬液置于两个新T25瓶中, 对细胞进行1: 3传代。
- 4、待细胞生长至对数期时, 将细胞悬液置于50mL离心管中, 800rpm, 5min, 收集对数期细胞。
- 5、向50mL离心管中加入新鲜培养液, 调整密度至 $1-2 \times 10^5$ cells/mL, 将细胞悬液转移至125mL细胞摇瓶。
- 6、将125mL细胞摇瓶置于细胞摇床, 调整转速为90rpm, 进行动态培养。
- 7、当细胞密度至 $1-2 \times 10^6$ cells/mL时, 添加新鲜培养基扩瓶, 保持补液后密度维持在 $2-3 \times 10^5$ cells/mL即可。

特别提示:

- 1、动态培养, 需额外添加0.1%PLURONIC F-68, 防止在搅拌培养中, 剪切力对细胞的损伤。
如未添加防剪切力保护剂, 细胞生长不佳, 甚至死亡。
- 2、抗体收集 : 如进行抗体表达量检测, 一般情况抗体表达高点会在细胞峰值后的1-2天,
建议在峰值前一天和后 两天都进行细胞上清液收集, 备用检测

【使用环境3：培养袋法】

培养器皿：细胞培养袋

培养基要求：直接使用,无需添加其它组分

接种密度： $1-2 \times 10^5$ cells/mL

培养条件：5%二氧化碳环境

待传代密度： 1×10^6 cells/mL

传代后最佳密度： $2-3 \times 10^5$ cells/mL

(以1.6L培养袋为例)：

- 1、复苏细胞时，接种5mL培养基，要求密度调至 $1-2 \times 10^5$ cells/mL。
- 2、当细胞密度长至 1×10^6 cells/mL，向T25培养瓶中加入新鲜培养基10mL，用移液器充分混匀。
- 3、分别吸取5mL充分混合后的细胞悬液置于两个新T25瓶中，对细胞进行1：3传代。
- 4、待细胞生长至对数期时，将细胞悬液置于50mL离心管中，800rpm，5min，收集对数期细胞。
- 5、向50mL离心管中加入新鲜培养液，调整密度至 $1-2 \times 10^5$ cells/mL，将细胞悬液转移至细胞培养袋中（第一次入袋体积需100mL）。
- 6、将细胞培养袋置于5%的二氧化碳培养箱中培养。
- 7、当细胞密度至 $1-2 \times 10^6$ cells/mL时，向培养袋中加入新鲜培养基，保持补液后密度维持在 $2-3 \times 10^5$ cells/mL即可。

特别提示：

- 1、细胞袋中培养的细胞，由于通气量大，气体流通较好，故细胞增长速度和最高支持密度较高于培养瓶方法。故1-2天即可传代，需及时监测细胞密度及培养基颜色，根据实际情况及时补液。
- 2、抗体收集：如进行抗体表达量检测，一般情况抗体表达高点会在细胞峰值后的1-2天，建议在峰值前一天和后两天都进行细胞上清液收集，备用检测。

【使用环境4-杂交瘤细胞冻存及复苏】

冻存器皿：2mL冻存管

细胞离心：转速800rpm,3min

培养基要求：无血清细胞冻存液

冻存密度： 5×10^6 cells/mL

冻存条件:-80度冰箱,液氮

冻存步骤：

1、细胞冻存前准备

- (1) 要求冻存的细胞在对数生长期，且活率大于90%。
- (2) 计算细胞密度，冻存密度在 5×10^6 cells/mL

2、细胞冻存过程

- (1) 将要冻存的细胞悬液，进行细胞计数，计数后离心，800rpm，3min即可
- (2) 弃去上清，将4度保存的无血清冻存液缓慢加入离心后的细胞沉淀中，根据密度调整细胞冻存液用量。
- (3) 反复吹吸混匀后，分装于细胞冻存管中，每管500ul-1000uL，（建议500uL/管）
- (4) 将分装好的细胞冻存管，直接置于-80度冰箱过夜冻存，次日投入液氮中保存即可。

备注：1)冻存过程中，第2步和第3步在冰袋附近操作时，低温避免保护剂对细胞造成损伤。

2)细胞冻存管一定要保证完全密封，否则在复苏过程中有可能会炸裂。

3)如用含血清冻存液,请注意冻存过程需程序降温,禁止直接-80度冻存。

3、细胞复苏过程

- (1) 提前开启水浴锅，温度调节到37°C。
- (2) 将冻存的细胞冷冻管从液氮中取出，迅速置于水浴锅中融化，尽量1min融化，时间越短，对细胞影响越小。
- (3) 将融化后的含细胞的冷冻保存液迅速析出置于新鲜培养基中充分混匀，（如细胞冷冻保存液为500uL，则加入到5ml新鲜培养基中，如细胞冷冻保存液为1mL，则加入10mL新鲜培养基中。）
- (4) 混匀后立即离心，800rpm，3min即可，离心结束后弃上清，加入预温的新鲜培养液
- (5) 混匀后分瓶置于5%二氧化碳培养箱中培养。

【客户使用遇到的问题及解决方案】

1、杂交瘤细胞初次培养及复苏效果不佳，如何解决此问题？

杂交瘤细胞系种类繁多，并不是所有的细胞系都能直接适应无血清培养基，如无法适应请先按照本公司驯化适应程序进行细胞驯化，驯化后的细胞即可完全适应本公司的无血清培养基。

复苏问题：如冻存的杂交瘤细胞活率较低，复苏时可加5%胎牛血清于无血清培养基中，可修复受损细胞的状态，细胞复苏时接种密度要求大于 1×10^5 cells/mL保证更好的复苏率。

2、杂交瘤细胞传代最低接种密度是多少？最佳的接种密度是多少？

经过我们反复测试，最低接种密度极限值 1×10^4 cells/mL，此密度仍可正常培养杂交瘤细胞，但细胞生长周期较长，6-7天达到峰值。

最佳接种密度为 $1-2 \times 10^5$ cells/mL,3-4天可达到峰值，细胞生长周期短，适合工业客户。

3、无血清培养杂交瘤细胞最大生长支持密度多少？怎么我养的几种杂交瘤细胞差距很大？

由于杂交瘤细胞系种类繁多，不同的细胞系最大生长密度也不一致，目前我们测试的细胞株最高的密度可到 3×10^6 cells/mL，最低的密度在 1.6×10^6 cells/mL。这取决于所培养的细胞株本身的特性。

4、贵公司无血清培养杂交瘤细胞抗体表达一般在什么水平？

目前我公司测试的两株细胞系，IgG抗体最高表达量在480-520ug/mL，国外培养基IgG抗体最高表达水平在400-500ug/mL，我公司的产品在抗体表达量上有明显的优势。

5、我培养的杂交瘤细胞抗体表达量总是很低，有办法进一步提高抗体表达量吗？

我公司在杂交瘤细胞培养方面，引入了全新的培养袋法，igG表达量可从300-400ug/mL提高到480-520ug/mL，我们可提供相关技术支持。



生产企业:

友康生物科技（北京）股份有限公司

地址：北京市海淀区丰贤中路7号A座三层、B座一层

电话：010-58711655

网址：www.yocon.com.cn

ISO9001、ISO13485质量体系认证企业

国家高新技术企业

文件版本号:

2021-V1.0



友康生物微信公众号