

## 中国仓鼠 卵巢细胞 (CHO-S)

### 细胞介绍

贴壁生长及悬浮生长均可（用于蛋白表达时，应使用悬浮生长状态，此时细胞生长状态更好，比表面积更高，生物反应器中的传质、传热效率更高，同时也可提高生物反应器空间使用效率。工业上大规模生产单抗，重组蛋白，大部分使用悬浮培养法来生产）

### 细胞特性

- 1 来源：中国仓鼠
- 2 形态：成纤维细胞样
- 3 含量： $>1 \times 10^6$  个/mL
- 4 污染：支原体、细菌、酵母和真菌检测为阴性
- 5 规格：T25 瓶或者 1mL 冻存管包装

运输和保存：可选择干冰运输及发送复苏存活细胞方式：（1）干冰运输，收到后立即转入液氮冻存或直接复苏；（2）存活细胞，收到后应继续生长，传代达到细胞生长状态良好时，再进行冻存。具体操作见细胞培养步骤。

细胞用途：仅供科研使用。

### 细胞培养步骤

#### 一. 培养基及培养冻存条件准备：

1) 培养基信息：EX-CELL CD-CHO CHO Serum-free Medium, Chemically Defined (Sigma-Aldrich, 货号：24361C)

添加物：

L-谷氨酰胺 (Sigma-Aldrich, 货号：G8540-25G)  
Anti-Clumping Agent (Gibco, 货号：01-0057AE)

备注：CD-CHO CHO Serum-free Medium 请按照培养基配制说明书配制，L-谷氨酰胺配制浓度为 200mM，工作浓度为 8mM（即稀释 25 倍，如 500ml CHO Serum-free Medium 中添加 20ml 200mM L-谷氨酰胺，抗结团剂使用为 1%，即 500ml CHO Serum-free Medium 中添加 5ml 抗结团剂）

2) 培养条件：气相：空气，95%；二氧化碳，5%。温度：37 摄氏度，培养箱湿度为 70%-80%。

3) 冻存液：90%完全培养基，10%DMSO，现用现配。液氮储存。

#### 二. 细胞处理：

传代、转染、建库及实验室规模小试方法：

赛百慷（上海）生物技术股份有限公司提供的 CHO-S 细胞为已驯化的细胞，具有良好的适应悬浮生长及适应无血清培养基生长特性。

传代方法：

1. 10cm 皿中培养：使用计数器（计数器或者血球计数板计数）计数，接种密度为  $3 \times 10^5$  个细胞/ml 接种于提前 37℃ 预热的新鲜培养基中（建议培养基取 7-8ml，

此时细胞生长状态较好），置于摇床上生长，转速为 120-130rpm，湿度为 70-80%，

5%二氧化碳，温度为 37℃。

2. 培养约 2-3 天，细胞密度达到  $1 \times 10^6$  个活细胞/ml 时，应 1000rpm，25℃ 离心 5min，离心后计数（此时应稀释），然后接种密度为  $3 \times 10^5$  个细胞/ml 接种于提前 37℃ 预热的新鲜培养基中。细胞数目足够时，可冻存。

也可选择 125ml 或者 250ml 摇瓶中培养细胞。（注意细胞培养液体积一般在总体

积的五分之一，如在 125ml 摇瓶中加入 25ml 培养物，应注意在摇瓶中培养细胞时应将瓶盖稍微拧松，以便于气体交换，同时也不宜拧得过松，防止细胞污染)

转染 方法:

在连续 5 代细胞密度未超过  $2 \times 10^6$  个活细胞/ml 时，可以使用 FreeStyle Max 转染试剂 (Gibco, 货号: 16447) 在 CD CHO Serum-free Medium 中直接转染。(注意: Anti-Clumping Agent 会干扰 FreeStyle Max 转染试剂转染效率，同时也会干扰

其他脂质体型转染试剂的转染效率)

建库方法 :

若需要建库，可将细胞接种于 125ml 摇瓶中 (接种密度为  $3 \times 10^5$  个细胞/ml，总体积为 25ml)，此方法同样适用于稳定表达所需要蛋白的细胞株的建库工作。建库时，需要先建初级库 (master bank) (一般为 10 支，每支细胞总数不少于  $4.5 \times 10^7$  个细胞)，此步骤结束后，从冻存的初级库中取出一支复苏，按照同样步骤建次级库 (working bank) (相同的，一般为 10 支，每支细胞总数不少于  $4.5 \times 10^7$

个细胞)。

实验室 规模小试方法:

将挑选出的稳定细胞株从 96 孔板到 24 孔板到 6 孔板到 10cm 皿中逐级扩大培养后 (此时需要注意在培养过程中应及时保种，以防止后续步骤出现污染，及应对可能的表达量衰退现象) 以  $3 \times 10^5$  个细胞/ml 接种于 125ml 摇瓶中，转速为 120-130rpm，温度为 37℃，湿度为 70-80%，连续培养一周，每天取样做出相应的细胞生长曲线，细胞活率曲线，蛋白表达曲线，可根据实际情况，每天取样测出培养基中葡萄糖含量，以便决定是否需要补加葡萄糖，同时可使用 CHO Feed Bioreactor Supplement 作为细胞发酵中补料，同时做出相应的细胞生长曲线，细胞活率曲线，蛋白表达曲线，为中试放大补料添加做出合理数据支持。

注意事项:

1. 收到细胞后，若发现干冰已挥发干净、冻存管瓶盖脱落、破损及细胞有污染，请立即与我们联系。
2. 所有动物细胞均视为有潜在的生物危害性，必须在二级生物安全台内操作，并注意防护，所有废液及接触过此细胞的器皿需要灭菌后方能丢弃。