

哺乳动物细胞传代培养

随着细胞基因工程的不断发展,目前有多种生物表达系统都能够大规模的生产重组蛋白,主要分为原核和真核两类。真核表达系统又包括:酵母表达系统, [哺乳动物细胞表达系统](#), 昆虫杆状病毒表达系统。相比之下,哺乳动物细胞表达系统最突出的优点是能够促进蛋白的正确折叠和糖基化等翻译后修饰,从而保证蛋白的天然活性,目前已成为表达和生产部分蛋白药物、基因工程抗体等目的蛋白的首选宿主。

哺乳动物蛋白表达常用的细胞有 HEK293 (人胚肾细胞) 和 CHO (中国仓鼠卵巢细胞)。这两种细胞的应用最为广泛,是在真核蛋白表达系统中最常用的细胞,具有以下特点:

1. 具有准确的转录后修饰功能,表达蛋白在任何方面都最接近天然状态;
2. 具有重组基因的高效扩增和表达能力,外源蛋白整合稳定;
3. 具有较高的耐受剪切力和渗透压能力,表达水平较高;
4. CHO 属于成纤维细胞,是一种非分泌细胞,自身很少分泌内源蛋白,有利于目的蛋白的分离纯化;
5. HEK293 细胞具有更高的生长密度更快的生长速度,易培养,易转染。

本文主要对 HEK293 细胞及 CHO 细胞传代培养的基本原则、实验步骤及注意事项进行介绍。

细胞培养基本原则

合适的细胞培养基

合适的细胞培养基是细胞传代培养最重要的条件,培养基不仅提供给细胞在体外生长繁殖需要的基础物质,还维持细胞生长的整个环境,不同的细胞有不同的生长习性,因此要选择合适的培养基。

优质血清

目前,多数的合成细胞培养基都有添加血清,常用的血清有小牛血清、马血清等。血清中含有细胞生长所必需的生长因子,作为哺乳动物细胞培养的附加物,血清十分昂贵且存在多种问题,因此人们在不断寻找可以替代血清的物质。

无毒无菌的生长环境

体外生长的细胞缺乏对微生物和有毒物质的抵御能力，一旦被污染，会导致细胞死亡。因此在进行细胞传代培养时，无毒无菌的培养环境是必要条件。

温度与气体环境

细胞生长需要恒定的温度，同时气体（氧气与二氧化碳）也是哺乳动物细胞培养的所必须的物质，HEK293 和 CHO 的细胞培养条件一般是 37°C，5%的二氧化碳环境。

细胞传代实验流程

细胞复苏

1. 提前将水浴锅打开，预热 37°C。
2. 细胞培养基提前预热，5-10ml 于 15ml 离心管中。
3. 把冻存细胞立即投入 37°C 水浴锅中，轻微摇动，待融化后（大概 1-1.5min），取出。
4. 用 75%乙醇消毒管外壁，放入超净台，转移到含 5-10ml 培养基的 15ml 离心管中，离心 800-1000rpm，5min。
5. 去掉上清，加入完全培养基重悬细胞，转移到培养皿中，前后左右轻轻摇动，使培养皿中的细胞分散均匀。
6. 标记好细胞名称，代数，日期，培养基等，放到 37°C 的 5% CO₂ 培养箱中培养。
7. 贴壁细胞培养一般第二天就可以贴壁，根据细胞生长速度，2-3 天换一次培养基。
8. 离心可能对某些细胞造成伤害，这些细胞可以不离心，只需要将 DMSO 的浓度降到 1% 以下即可。（一般冻存液中 DMSO 浓度为 10%，即 1ml 冻存细胞需加 9ml 培养基。）

细胞传代培养

1. 当培养皿中的细胞覆盖率达到 80%-90% 时需要进行细胞传代。
2. 吸掉培养皿中的旧培养液。
3. 用 5ml PBS 洗涤细胞 1-2 次。
4. 用 1ml 的 trypsin（胰酶）溶液，37°C 作用数分钟，于倒立显微镜下观察，当细胞呈圆形即将分离时，吸掉 trypsin 溶液。（若不去掉 trypsin 溶液，则在消化后加入适量（5:1）含血清培养基终止作用，离心后再去掉上清。）

5. 轻拍培养皿或培养瓶使细胞从瓶壁脱落，加入适量的新鲜完全培养基，轻柔地吹打数次，使细胞分散均匀。再根据稀释比例转移至新的培养瓶中，正常培养即可，剩余细胞悬液舍弃，放入收集瓶中。（细胞传代时按 1：5 或更大比例稀释）
6. trypsin 溶液中可以加入 0.02% EDTA 溶液，解离效果会更好，但消化后残留在培养基中的 EDTA 会影响细胞的再次贴壁。

细胞冻存

1. 冷冻前确保细胞处于指数生长期，传代后的 5mL 细胞悬液取出 1mL 接种到培养瓶继续传代。另取一无菌离心管，将剩余 4mL 细胞悬液置于其中，离心 1000rpm，5min（转速勿超过 1500rpm）。
2. 离心后倒掉上层清液，收集下层细胞沉淀。向离心管中加入 900ul 完全培养基，用枪头反复吹打重悬起细胞。取少量细胞悬液计数细胞浓度及冻前存活率。一般细胞浓度为 $2\sim 5\times 10^6$ cells/mL 较适宜。
3. 将细胞悬液转入 1.5mL 无菌冻存管中，再加入 100ul 试剂级 DMSO，混匀，制成细胞冻存悬液（DMSO 最后浓度为 10%）。严密封口后，注明细胞名称、代数、日期，然后进行冻存。
4. 传统方法：冷存管置于 4℃ 10 分钟→-20℃ 30 分钟→-80℃ 16~18 小时（隔夜）→液氮罐长期储存（-20℃ 勿超过 1 小时，防止胞内冰晶过大造成细胞死亡）。

细胞培养注意事项

- 细胞培养大瓶好于小瓶，细胞能够充分汲取到养分且有利于细胞均匀分布
- 细胞培养基 DEME 为高糖培养基
- 保证细胞培养液新鲜，采用少量多次配置，或培养基保存于-20℃
- 控制胰蛋白酶消化时间，消化时间长，细胞贴壁效果差
- 控制好细胞传代时间，细胞没有完全铺满、细胞之间留有空隙时传代最佳
- 细胞冻存和复苏的原则是慢冻快复，最大程度的保证细胞复苏成功率

相关阅读

[细胞培养实验常见问题及解决方案](#)

[细胞生长曲线绘制](#)

[细胞的瞬时转染](#)

更多优质服务推荐



SingleB® mAb Discovery Service

SingleB® 单B细胞快速单抗发现

德泰生物提供SingleB®单B细胞快速单抗发现服务,利用SmartFlow® FACS记忆B细胞筛选平台与DeepLight®浆细胞筛选平台,实现记忆B细胞与浆细胞的双筛选。平台适用于小鼠、兔、羊驼、人源化小鼠、绵羊等多种免疫对象,从动物免疫到获得单抗,快至29天,比传统杂交瘤技术至少节省120天。

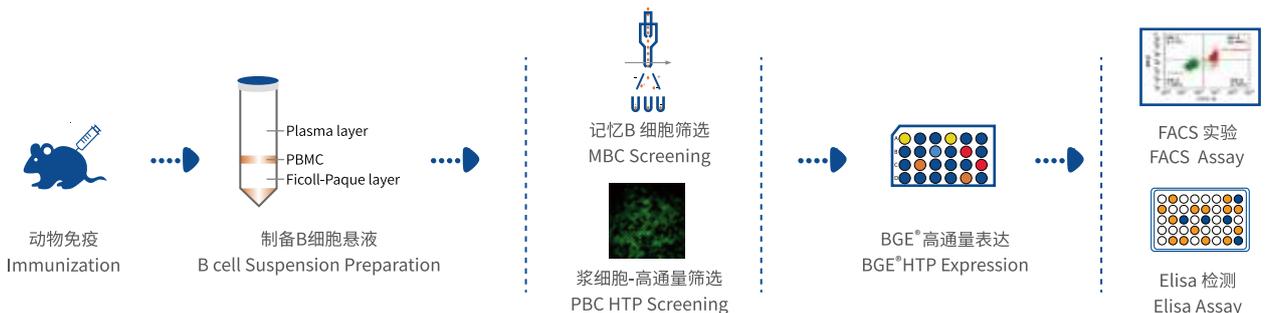
平台优势

- 支持蛋白、多肽、细胞、病毒等多种类型抗原免疫
- 记忆B细胞 & 浆细胞双筛选,保证B细胞多样性
- 单细胞扩增阳性率高,无需刺激培养,减少多样性损失
- 重轻链天然配对,亲和力更优
- 高通量,周期短,单抗发现快至29天
- ELISA、FACS、WB、IHC等多平台验证

可开发单抗物种



服务流程





Recombinant Antibody Expression Service

重组抗体表达

德泰生物拥有完善的重组抗体表达与纯化体系、抗体多工艺质量验证体系。已交付的重组抗体项目种类包括scFv、Fab、(Fab')₂、VHH、嵌合抗体、双特异性抗体、Fc融合蛋白、全长IgG、IgM。cGMP标准的百级洁净细胞房及生物反应器用于HEK293/CHO细胞的小试及大量培养。HPLC纯度、内毒素、浓度等要求均可以根据您的下游应用进行定制。

服务优势



服务流程

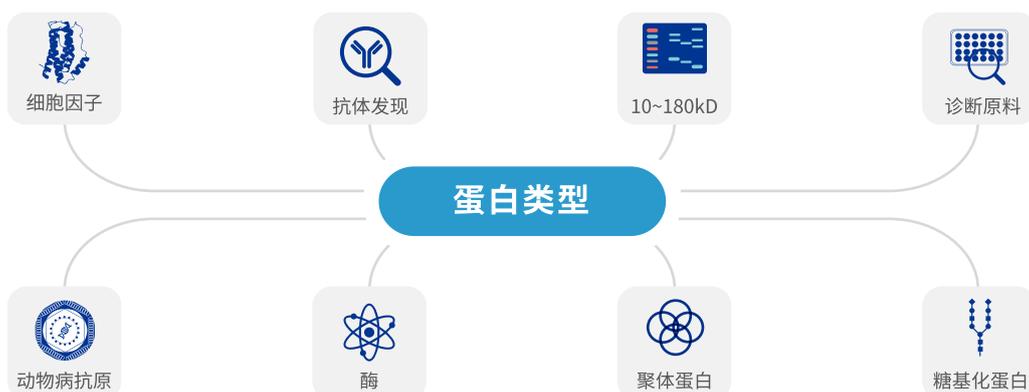


Recombinant Protein Expression Service

重组蛋白表达

原核蛋白表达系统、哺乳动物细胞蛋白表达系统

德泰生物拥有完善的原核蛋白表达与纯化体系和哺乳动物细胞蛋白表达与纯化体系。基于细胞因子、酶、诊断原料蛋白的工业化需求，我们配备了发酵设备并推出了大规模发酵制备服务；我们还配备了cGMP标准的百级洁净细胞房及生物反应器，用于HEK293/CHO等真核细胞的小试及大量培养。



4

Hybridoma Antibody Gene Sequencing Service

杂交瘤抗体基因测序

德泰生物拥有mRNA全长测序平台和Failsafe®假基因排除技术,能够提供快速、可靠的杂交瘤抗体基因测序服务。

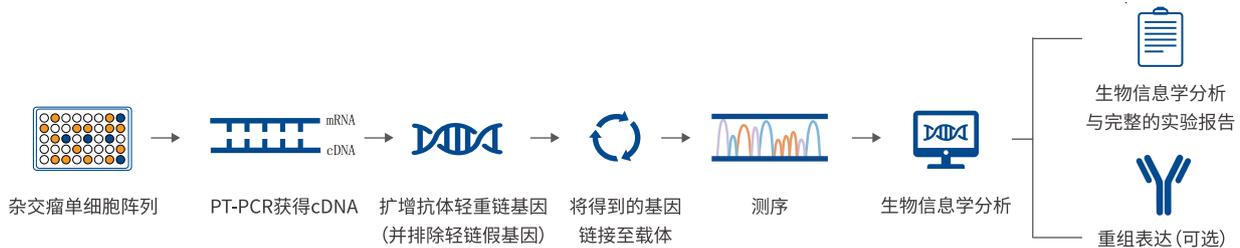
应用场景

- 抗体序列保护:获取抗体基因序列后可通过专利对CDR区进行保护。
- 生产方式备份:杂交瘤存在退化转阴风险,抗体序列可通过基因工程方式轻松转化为抗体样品。
- 抗体工程改造:获得的抗体序列可用于抗体人源化、双特异性抗体等抗体工程改造。

服务优势

- 极速体验:测序5天,表达5天,全程高通量
- 细胞需求少:只需1~5个细胞,可以接收孔板样品
- 保证测序结果准确:采用Failsafe®假基因排除技术,可排除κ轻链假基因
- 测序范围广:可测小鼠、大鼠、兔、羊等物种的IgM和IgG的所有亚型
- 一站式服务:德泰生物拥有丰富经验,可提供表达验证服务

服务流程



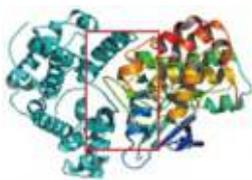
5

Biomolecular Interaction Analysis Service

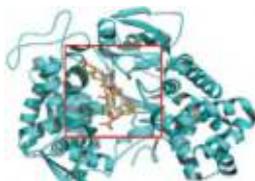
分子间相互作用检测

德泰生物提供的分子间相互作用检测服务基于表面等离子共振 (SPR) 平台及生物膜干涉技术 (BLI) 平台,能够实现对分子间亲和力的定量和定性分析。与传统的GST pull down, 免疫共沉淀, 酵母双杂交等相比, 具有更高的灵敏度、检测通量及较低的样品要求等优点。

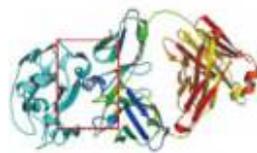
检测范围



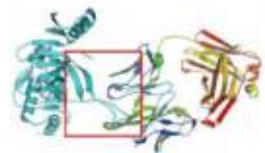
蛋白和蛋白



蛋白和小分子



蛋白和抗体



蛋白和抗体Fab片段

检测范围包括蛋白-蛋白、抗体-抗原、抗体片段-抗原、蛋白-抗体、蛋白-小分子、抗体-多肽、蛋白-DNA、DNA-DNA间的相互作用。

6

Antibody Humanization Service

抗体人源化

德泰生物人源化改造服务基于人工智能之深度学习算法,通过构建抗体结构模型、CDR移植与回复突变、识别关键氨基酸及人源化运算,获得人源化程度高且突变能低的抗体序列。

服务优势



重链和轻链同时参与优化



改造后的抗体人源化程度>90%



人源化抗体的亲和力与初始抗体相当



可进行多物种的抗体人源化

服务流程

- 1 Antibody sequence confirmation
- 2 Human germline acceptor selection
- 3 CDR grafting
- 4 Back mutation
- 5 Mutation energy ranking
- 6 Antibody expression
- 7 Affinity ranking

7

Stable Cell Line Development Service

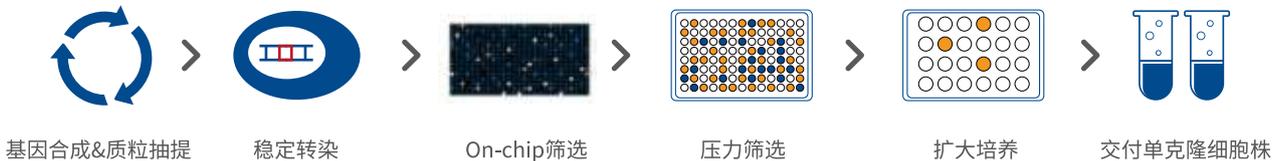
生产型稳转细胞株构建

德泰生物提供高表达哺乳动物稳定细胞株构建服务,筛选过程使用先进的可视化DeepLight®单克隆细胞筛选平台,较传统筛选流程快近100天,大大缩短了稳定细胞株的开发周期。

DeepLight®细胞筛选平台的优势

	有限稀释法筛选	DeepLight® On-chip筛选
筛选时间	8周	1天
细胞分离效率	低	高
筛选通量	低	高
单细胞水平筛选	否	是

服务流程



服务优势



更快的筛选速度

从DNA到细胞株
较传统方法快近100天



百k级筛选通量

一次筛选640k细胞
优选高表达细胞株



可视化筛选结果

先进DeepLight®平台
高表达细胞株实时成像



稳定高产

可稳定转代50代
重组单抗可达5 g/L