

## 细胞生长曲线绘制-细胞计数法

摘要：细胞生长曲线的绘制方法多种，本文主要介绍通过细胞计数法绘制生长曲线，帮助我们更好的了解细胞的生长状态及活力，从而指导下游实验操作。

细胞计数法绘制生长曲线，是细胞培养研究中常用的技术手段。原理就是通过测定单位体积内的细胞数量，得到细胞的总浓度进而计算出细胞总数。

典型的细胞生长曲线分为四个时期：延滞期，指数期，稳定期和衰亡期。不同时期的细胞生长状态和性能各不相同。通过测定生长曲线，可以测定细胞绝对生长数，判断细胞活力，可用于测定药物等外来因素对细胞生长的影响，有助于我们选择该时期的细胞进行细胞下游实验（瞬时转染或稳定转染）。以下介绍细胞计数的主要方法和注意点：

### 实验准备

1. **仪器**：二氧化碳培养箱，显微镜，超净工作台，血球计数板
2. **试剂**：胰蛋白酶，培养基（血清）

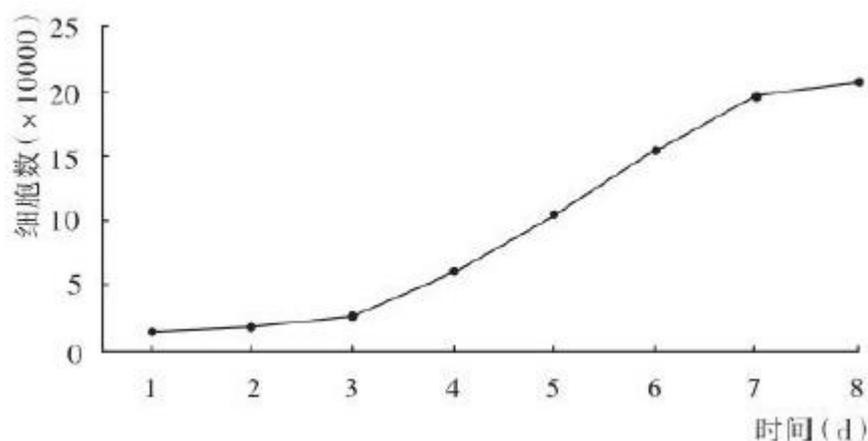
### 实验操作

1. 取生长良好的细胞，用胰蛋白酶消化，离心
2. 离心后去上清，加入新鲜适量的培养基重悬细胞，使之成为单细胞悬液
3. 按照一定的倍数稀释该单细胞悬液，稀释倍数以稀释结果细胞数在 20-200 之间为合适倍数
4. 准备血球计数板，洗净晾干
5. 吸取一定量的细胞悬液，加样到血球计数板上，显微镜下计数
6. 按照血球计数板的计数原理进行细胞计数（参考[血球计数板的原理](#)）
7. 计算细胞总数，调整细胞至一定浓度（ $1 \times 10^5 / \text{ml}$ ）。细胞浓度 = 细胞计数板得到的细胞数量 /  $4 \times$  稀释倍数  $\times 10^4 / \text{ml}$
8. 细胞再培养，准备 24 孔板，每孔中加入 0.1ml 的细胞（即  $1 \times 10^4$  个细胞）和 0.9ml 的细胞培养基，轻轻晃动孔板（十字方向晃动），使细胞分布均匀，并进行常规细胞培养（48h 后换液培养）
9. 培养 48h 后，即可每过 24h 取样一次，每次取样至少取 3 个孔的细胞，多次计数取平均值，提高准确性），取样细胞常规胰蛋白酶消化，制备单细胞悬液，显微镜下进行细胞计数

10. 计数结果，以时间 (d) 为横坐标，细胞数为纵坐标，绘制细胞生长曲线

## 结果分析

根据培养的时间和细胞计数的结果得到如下图，细胞培养初始几天生长缓慢，为延滞期。两到三天之后细胞进入对数生长期，此时细胞生长最为旺盛，细胞活力也相对最佳，通常在我们的细胞转染或构建稳定细胞系时选择对数生长期的细胞。一段时间后细胞进入稳定生长时期



## 操作要点

细胞用胰蛋白酶消化，消化时间要自己把握，时间短细胞消化不好形成团状，时间长细胞死亡率可能会增加，制备成单细胞悬液即可

细胞计数时，按照计数原理数细胞，每个大方格中的细胞大于 200 小于 20，则稀释倍数不适，需重新稀释。

在消化细胞计数之前，可自己估算培养瓶中的总细胞数，这样可以预估下稀释的倍数，避免重新稀释

细胞接种时细胞摇均匀，接种按照十字方向晃动，晃动时间可以延长，以避免形成细胞团为准，但要防止细胞液溅出

细胞培养易被污染，污染原因也多种多样，实验室环境，细胞自身原因，如果为菌类污染建议丢弃重新复苏培养，更多相关情况及解决可参考资料专区[细胞转染 FAQ](#)

细胞计数法绘制生长曲线，操作相对简便。此外，MTT 比色实验也能检测细胞的存活和生长，得到细胞生长曲线，且灵敏度高，重复性好，具体原理和操作见 [MTT 法绘制生长曲线](#)。

## 更多优质服务推荐

1

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。

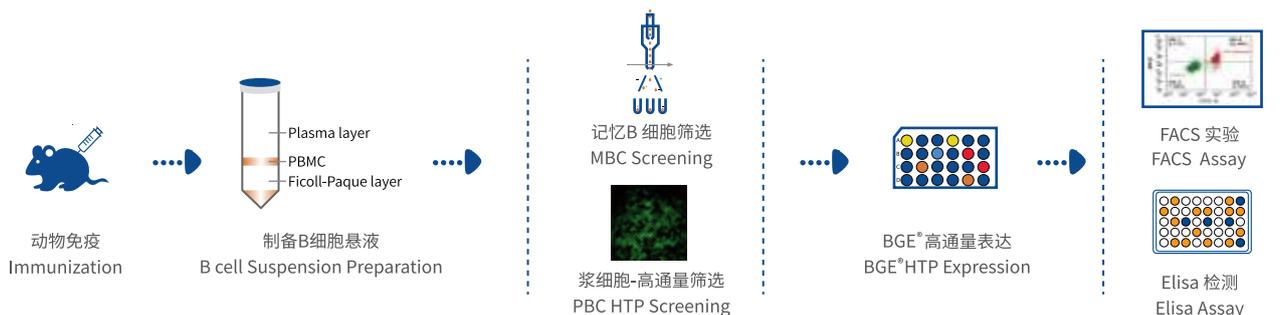
#### 平台优势

- 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')<sub>2</sub>、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

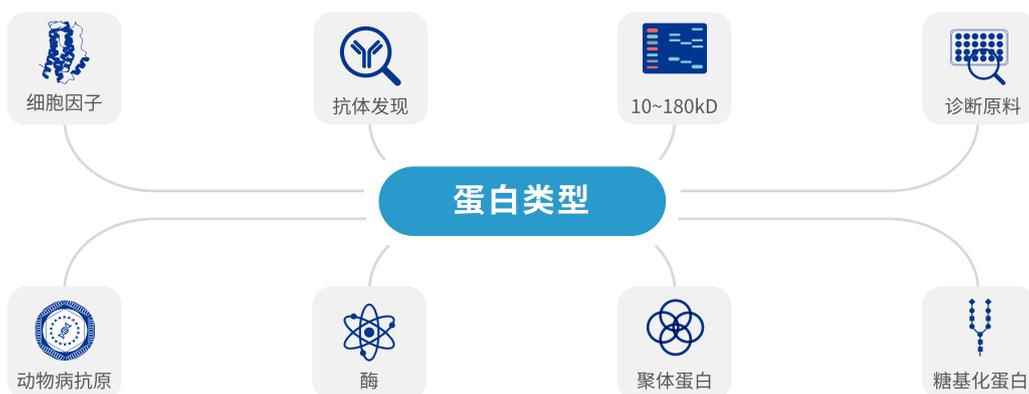


Recombinant Protein Expression Service

## 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。

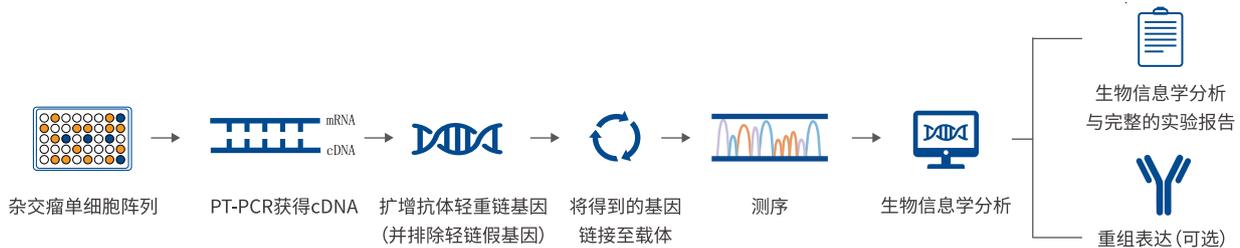
### 应用场景

- 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



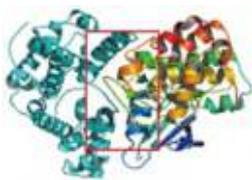
# 5

Biomolecular Interaction Analysis Service

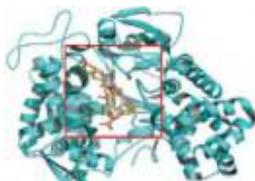
## 分子间相互作用检测

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。

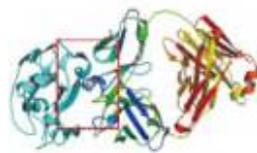
### 检测范围



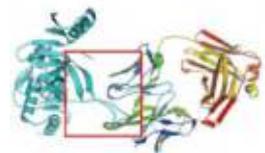
蛋白和蛋白



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

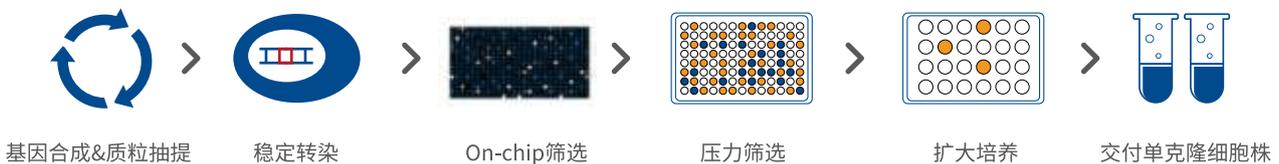
## 生产型稳转细胞株构建

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