

细胞培养基基础操作

From Gene To Antibody

普健生物（武汉）科技有限公司

AtaGenix Laboratories

2023年3月





蛋白重组表达

XtenCHO高密度表达系统

昆虫杆状病毒表达系统

稳定细胞株构建

抗体定制服务

兔单克隆抗体制备

纳米抗体制备

抗体对开发

重组抗体表达

嵌合抗体生产

抗体片段生产

大规模重组抗体生产

抗体药物开发

人源化抗体

双特异性抗体

抗独特型抗体

普健生物（武汉）科技有限公司

始于2012，一站式抗体发现整体解决方案

3551光谷人才计划

——2013年

高新技术企业

——2017年

光谷瞪羚企业

——2018年

武汉国家生物产业基地
抗体发现与筛选公共服务平台

——2022年



无菌操作概念

无菌操作，是指在无菌室或超净台中进行以防止微生物进入人体或污染培养物的操作技术。无菌操作是各种生物实验和生产实践中一项重要的基本操作。



无菌操作原则

环境要清洁，避免不必要的人群流动。

执行无菌操作前，在缓冲间更换专用实验服、戴好乳胶手套、帽子、口罩，进入无菌室后，使用酒精喷壶对手部及臂部区域进行消毒。

超净工作台内不要放置过多物品，在使用前半小时，需进行紫外照射30min。

手臂不可在敞开的瓶口或培养容器上方经过。

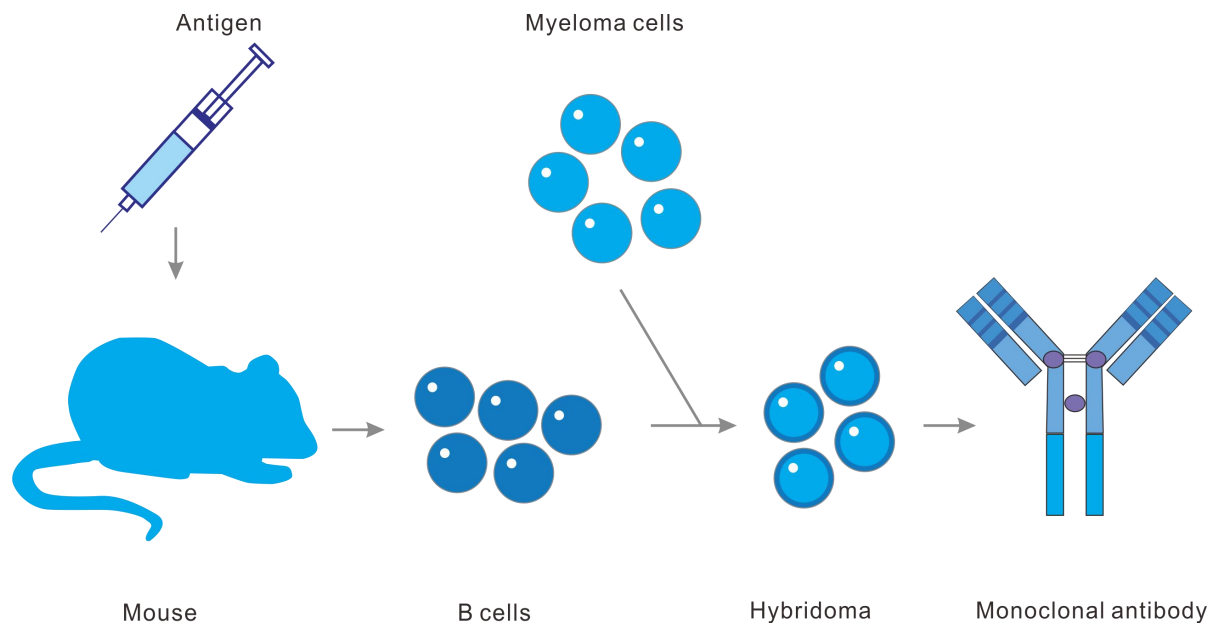
夹取无菌物品，必须使用无菌持物钳。无菌操作间进行无菌操作时，凡未经消毒的手、臂、均不可直接接触无菌物品或超过无菌区取物。

无菌物品必须保存在无菌包或灭菌容器内，不可暴露在空气中过久。无菌物与非无菌物应分别放置。无菌包一经打开即不能视为绝对无菌，应尽早使用。凡已取出的无菌物品虽未使用也不可再放回无菌容器内。



杂交瘤细胞

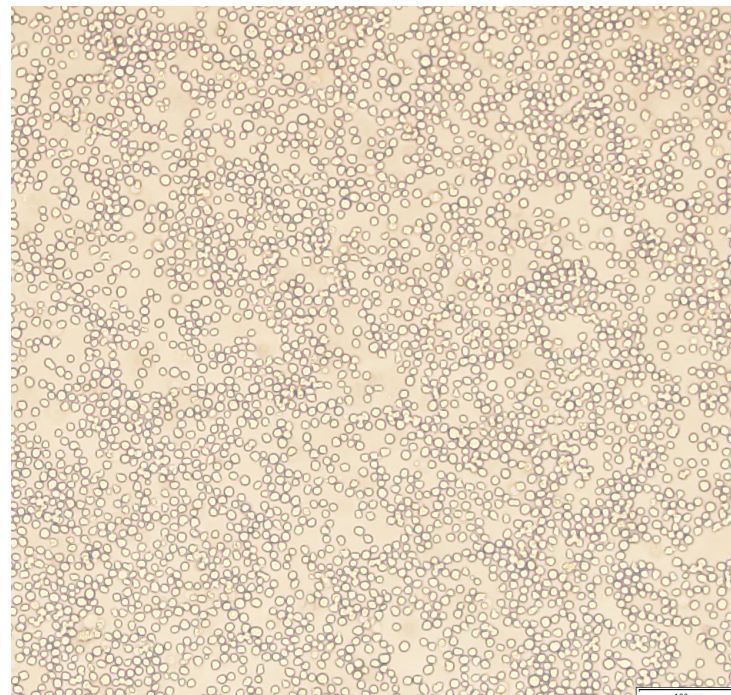
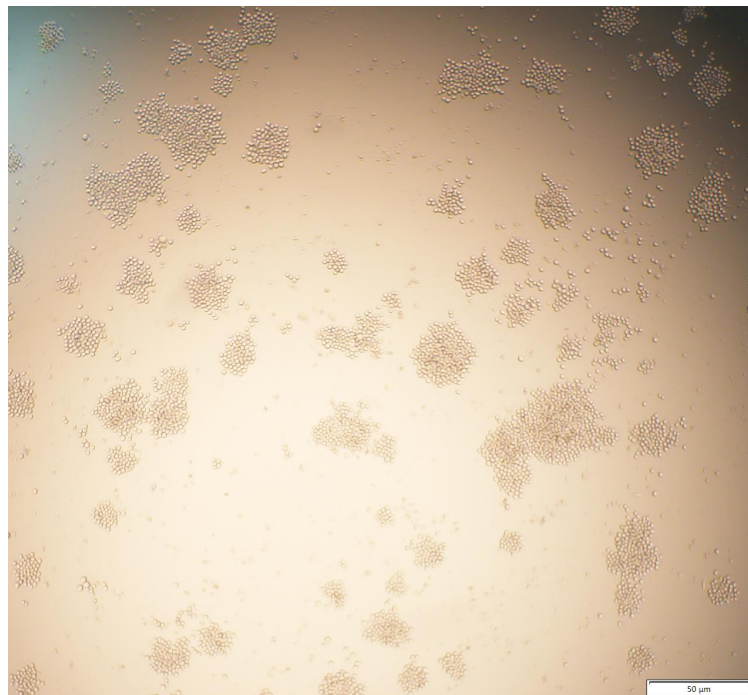
杂交瘤细胞(hybridoma)是一种在制备单克隆抗体过程中，用骨髓瘤细胞和B淋巴细胞融合而成的细胞。B淋巴细胞的主要特征是它的抗体分泌功能和能够在选择培养基中生长，小鼠骨髓瘤细胞则可在体外培养条件下无限分裂、增殖，即所谓永生性。在选择培养基的作用下，只有B细胞与骨髓瘤细胞融合的杂交细胞才具有持续增殖的能力，形成同时具备抗体分泌功能和保持细胞永生性两种特征的细胞，这种杂种细胞叫做杂交瘤细胞。





杂交瘤细胞生长特性-半贴壁型细胞

- a. 杂交瘤细胞为半贴壁型细胞，轻微贴壁，可直接吹打成悬液，不需要进行胰酶消化；
- b. 细胞个大，圆且透亮；
- c. 单个细胞不断向四周分裂增殖，形成细胞集落；
- d. 接种密度过低时，细胞生长缓慢；培养密度过高，会导致细胞形态变化或细胞营养不足。





杂交瘤细胞传代培养

01

传代原则：96孔→24孔→T25→T75。细胞培养过程中，需每天观察细胞状态是否圆润、透亮，培养基是否清澈。

02

当杂交瘤细胞培养至占96孔板底面积达到80%-90%时，将96孔板里的细胞轻吹下来转移到24孔细胞培养板中培养。准备24孔细胞培养板，加入1mL的10%FBS-1640培养基，然后充分吹打96孔细胞并转入24孔细胞培养板。

03

当杂交瘤细胞培养至占24孔板底面积达到80%-90%时，可转移至T25有孔培养瓶培养。准备T25细胞培养瓶，加入5mL的10%FBS-1640培养基，然后充分吹打24孔细胞并转入T25细胞培养瓶。

04

当杂交瘤细胞培养至占T25细胞培养瓶瓶底面积达到80%-90%时，可转移至T75有孔培养瓶培养。准备T75细胞培养瓶，加入15mL的10%FBS-1640培养基，然后轻拍T25细胞培养瓶瓶底使细胞松动，用移液枪轻柔的将细胞吹洗下来，转入到T75细胞培养瓶。



细胞冻存

细胞冻存是将细胞放在低温（ -196°C 液氮）环境，可以使细胞暂时脱离生长状态而将其细胞特性保存起来，以便长期储存的一种技术。细胞冻存是细胞保存的主要方法之一，起到了细胞保种的作用。

二甲基亚砜(DMSO): 细胞冻存时向培养基中加入的保护剂——终浓度5%–15%的，可使溶液冰点降低，加之在缓慢冻结条件下，细胞内水分透出，减少了冰晶形成，从而避免细胞损伤。



细胞冻存操作步骤

以T25细胞冻存为例：

1. 打印冻存细胞的标签，信息包括项目号、克隆号及冻存日期，并将标签贴在冻存管上；
2. 从37℃细胞培养箱取出细胞培养瓶，在显微镜下观察细胞状态，细胞圆润透亮，生长至占培养瓶底80%-90%；
3. 轻拍T25细胞培养瓶底，使细胞松动，并使用5mL移液枪将细胞吹散，吸取细胞悬液至15mL离心管中，180g离心5min；
4. 旋开离心管盖，倒放于稍远处，弃掉上清，盖上离心管盖，轻敲离心管底，使细胞松动后，加入3mL细胞冻存液后吹匀细胞，然后以1mL/vial分装至细胞冻存管，旋紧螺帽；
5. 程序降温盒提前恢复至室温，将细胞转移至程序降温盒后立即放入-80℃冰箱，次日转入液氮罐保存，同时复苏1支细胞，观察细胞生长状态。

程序降温：传统方法需要将冻存的细胞置于4℃、-20℃、-80℃、-196℃液氮进行慢冻，保证细胞膜内外冷冻均衡。程序降温盒内需加入异丙醇，异丙醇不会再细胞冷冻的温度范围内出现结冰，作为传热介质可以防止体系温度的剧烈变化。



细胞复苏

细胞复苏，即是细胞恢复生长的过程，是将冻存在液氮或者-70℃冰箱中的细胞解冻之后重新培养。当恢复到常温状态时，细胞的形态结构保持正常，生化反应即可恢复。



细胞复苏操作步骤

复苏细胞前，先温浴好培养基，放置在超净工作台内备用；

从液氮中取出细胞后，放入预冷的程序降温盒，并迅速转移至无菌室，在37℃水浴中快速晃动，使冻存液完全融化；

将冻存管放入离心机，180g 离心5min；

准备T25细胞培养瓶，加入5mL 10%FBS-1640培养基；

用酒精消毒冻存管表面后，放入超净工作台，小心开启瓶盖，弃去冻存液，吸取1mL培养基重悬细胞沉淀后，转入有孔T25细胞培养瓶，放入细胞培养箱，培养条件为37℃、5%CO₂；

此后每天观察，正常情况下的细胞上清应眼观澄清，显微镜下观察杂交瘤细胞状态为规则圆形，透亮，培养瓶底干净。



Tips

01

液氮操作有一定的危险性，打开液氮罐取出细胞时，建议戴上防护眼镜。

02

确保冻存管密封严实，若液氮进入冻存管，在解冻时冻存管中的气温急剧上升，将可能发生爆炸，建议戴上防护眼镜。

03

细胞复苏过程升温要快，防止在解冻过程中水分进入细胞，形成冰晶，影响细胞存活。

04

细胞放入水浴中注意用镊子夹住细胞冻存管并在水浴中不时晃动，使其受热均匀；将细胞冻存管的管身深入水浴中即可，防止水浴时水进入细胞冻存管污染细胞。

05

细胞融化后要尽快(约1min)移出37℃水浴，37℃水浴时间延长会提高细胞死亡率。

谢谢观看！

网址：www.atagenix.cn

邮箱：Sales@atagenix.com

武汉市东湖新技术开发区神墩四路666号C栋

