

## 细胞池筛选

在稳定细胞系构建实验中，部分外源基因能够通过细胞质进入细胞核内，并通过分子间重组，最终整合进宿主细胞染色体，不同外源基因整合位点不同，只有整合到表达区的基因才会表达。想要获得稳定表达的细胞株，需要对转染后得到的细胞池进行阳性克隆筛选。如果想要获得稳定转染的单克隆细胞株，还需要进行单克隆筛选。

本文主要对细胞池的筛选原理、筛选系统及单克隆细胞株的筛选策略做一介绍。

### 细胞池筛选

细胞池筛选系统可以分为非基因扩增选择系统与基因扩增选择系统两种。G418 是最常用的非基因扩增系统，基因扩增选择系统 DHFR 系统及 GS 系统最为常用。

### 细胞池筛选原理

转染宿主细胞的质粒带有某种选择性标记（例如代谢标记、抗生素标记等），将带有标记的质粒转入宿主细胞后，利用选择性培养基进行筛选，未成功转染质粒或转染位点不合适的宿主细胞会因为缺乏选择标记，无法在选择培养基上生长而死亡，成功转染的阳性克隆可以在选择培养基上生长，从而达到筛选阳性克隆的目的。

在扩增选择系统中，还会对转染后的宿主细胞施加相应的选择压力，只有外源基因表达水平高的细胞株才可以存活，从而筛选得到高表达的稳定细胞株。

### G418 筛选系统

G418 是一种氨基糖类抗生素，可通过干扰核糖体功能来阻止哺乳动物细胞蛋白质的合成，因此哺乳动物细胞无法在含有 G418 的培养基上生长。neo 抗性基因对 G418 有抗性，可以将 G418 转变为无毒形式，带有 neo 基因的宿主细胞可以在 G418 培养基上生长。将带有 neo 抗性基因（抗生素标记）的质粒转入哺乳动物细胞，如果 neo 基因被整合进真核细胞基因组中合适的地方，则哺乳动物细胞会获得抗性在含有 G418 的选择培养基中正常生长，而没有成功整合 neo 抗性基因的细胞则会死亡，从而达到筛选阳性克隆的目的。

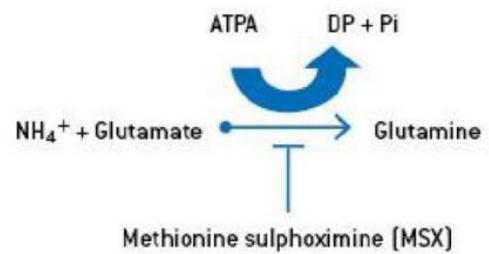
### DHFR 筛选系统

DHFR 筛选系统的宿主细胞为 CHO-dhfr-细胞。由于缺少 dhfr，无法合成核酸，宿主细胞无法在不含 HT 的选择培养基中生长，当携带 dhfr 基因的表达质粒转染 CHO 细胞后，转染成功的阳性克隆可在选择培养基中生长。dhfr

可被叶酸类似物氨甲喋呤 ( Amethopterin , MTX ) 所抑制, 不断提高 MTX 浓度, 绝大多数细胞死亡, 但存在少数稳定转染的细胞, dhfr 基因扩增获得抗性, 从而生存下来。用带有目的基因和 dhfr 标记的质粒转染 CHO-dhfr-细胞, 再通过 MTX 加压筛选, 当 dhfr 基因进行扩增时, 目的基因也会随 dhfr 基因一起扩增, 从而获得高表达的细胞株。

## GS 筛选系统

GS 系统 ( glutamine synthetase Gene Expression System ) 即谷氨酰胺合成酶基因表达系统, 是新近发展的更有效率的扩增表达系统。谷氨酰胺合成酶能将谷氨酸和氨合成为谷氨酰胺, 这种酶促反应是动物细胞获得谷氨酰胺的途径。



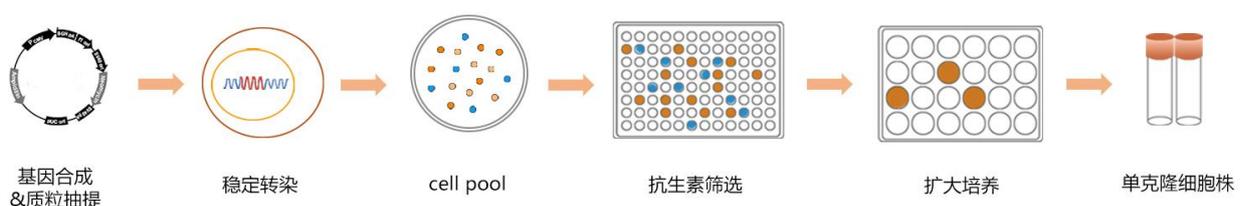
化学诱变获得的 GS 缺陷型细胞株不能在不含谷氨酰胺的培养基中生长, 除非它被含有 GS 表达原件的载体转染后获得了有活性的 GS, 通过向培养有 GS 重组细胞的培养基中添加浓度不断提高的 GS 抑制剂 L-氨基亚砷蛋氨酸 ( Methionine Sulphoximine ,MSX), 这种选择压力可使细胞发生基因重排和扩增。通过多轮筛选, 可获得高表达的细胞株 ( 细胞内的外源基因拷贝数可达 1000~2000 拷贝/细胞 )。

## 单克隆细胞株筛选

根据下游应用的不同, 单克隆细胞株可以分为两类: 用于研究的研究型单克隆细胞株以及用于蛋白/抗体大量生产的生产型高表达单克隆细胞株。

### 研究型单克隆细胞株筛选

研究型稳定细胞株通常利用 G418 系统进行阳性克隆筛选, neo 基因为非扩增基因, 它对基因的拷贝数没有影响, 利用 G418 对细胞池进行筛选可得到稳定转染的阳性克隆, 对得到的阳性克隆进行有限稀释挑取单克隆即可得到[研究型单克隆稳定细胞株](#) ( 获得单克隆后需进行稳定性测试测试稳转株的稳定性 )。



## 生产型单克隆细胞株筛选

相关服务：[稳定细胞系构建](#)

生产型稳定细胞株通常利用 GS 系统或 DHFR 系统进行阳性克隆筛选，dhfr 与 GS 都具有基因扩增的功能，对其进行加压会促使基因扩增，从而使目的基因共扩增而提高表达水平。外源基因在 CHO 细胞中扩增是提高表达水平的重要策略之一。

生产型细胞株筛选通常有以下几种实验方案：

1. 从细胞池中挑取单克隆，然后对每个单克隆进行加压扩大培养继续筛选单克隆；
2. 对细胞池进行加压筛选，在多次加压筛选后，最后一步进行克隆化；
3. 先对细胞池进行加压筛选，随后挑取单克隆，最后针对每个单克隆进行加压扩大培养继续筛选。

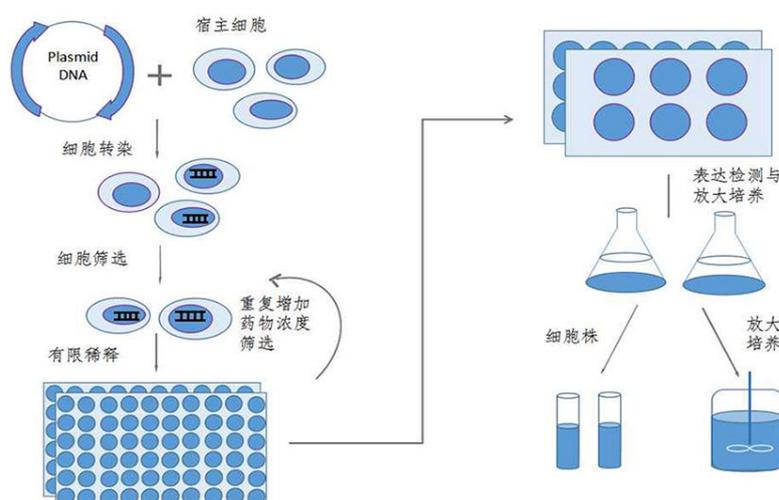


图 2：生产型稳定细胞株筛选流程（c 方案）

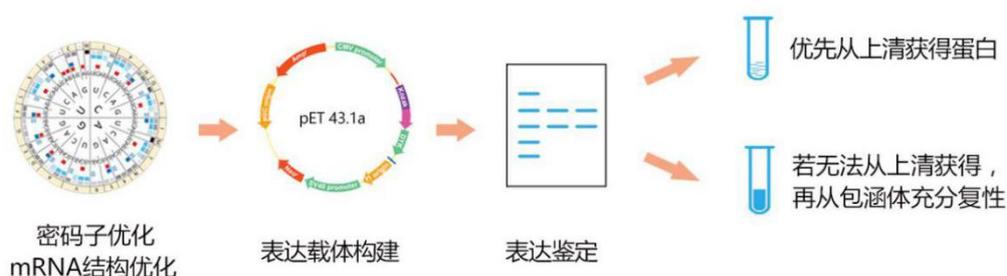
三种实验方案比较：通常来说 b 策略的表达水平比不上 a，即混合克隆的表达水平远赶不上表达较高的单个克隆，原因是转染的 CHO 细胞中存在不表达或低表达的非生产细胞，并可长期生存，甚至加压筛选时占生长优势，排斥其它高表达细胞，成为细胞群体中的主要部分，导致产量严重下降；a 方案与 b 方案相比耗费更多的人力及时间，通常稳转细胞株的实验周期为 3 个多月，而采用方案 a，至少需要 4 个月甚至更多；c 方案综合了方案 a 与 b 的优点，是目前推荐的实验方案。

## 南京德泰生物 -- 专注蛋白与抗体

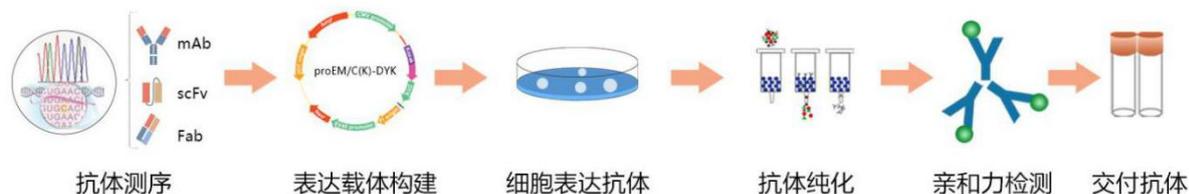
### 一、蛋白表达（哺乳动物细胞表达）蛋白被细胞充分修饰，活性有保障



### 二、蛋白表达（大肠杆菌表达）成功率>95%，不成功不收费，成功有保障



### 三、重组抗体表达 若想改造一个抗体，可以试试重组表达



### 四、稳定细胞系构建 研究级细胞系构建 & 高表达细胞株开发

