如何进行稳转株筛选

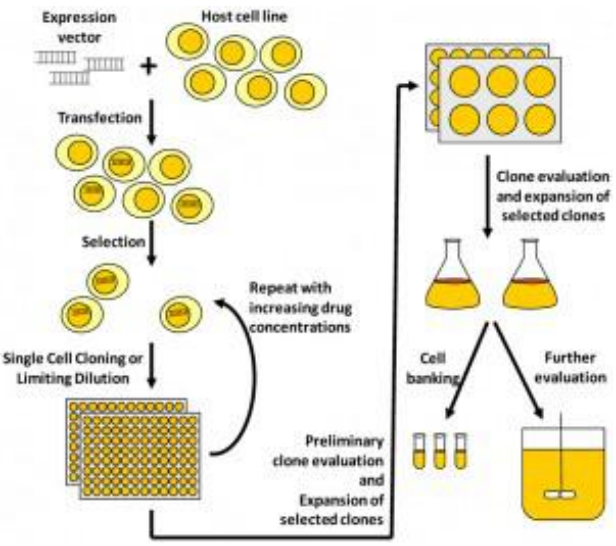
本文主要介绍了稳定转染的原理，常用方法以及如何进行稳转株筛选得到高表达的细胞株，同时包括稳定转染的应用及其影响因素，从而满足活性蛋白的大量制备。

利用哺乳动物系统生产蛋白的方式有两种：瞬时转染和稳转株筛选。通过稳定细胞系构建筛选稳定表达细胞株。针对瞬时转染，外源基因在短时间转录翻译得到的蛋白量较少，能够满足小量蛋白制备，大量生产成本很高。相对于此，稳定转染的是将外源基因整合到细胞自身的基因组上，随着细胞的生长分裂外源基因可以稳定转染表达，同时经过抗生素加压筛选，最终得到能够稳定转染表达蛋白的细胞株，稳转株生产蛋白稳定性更好，批次差异性更小。

稳定转染过程

细胞复苏

细胞复苏是将保存在液氮冰箱中的细胞株解冻并重新培养的过程。细胞复苏的关键是快融，防止在解冻过程中，产生的水珠形成冰晶损伤细胞。细胞复苏一般步骤如下：



- 预先加热水浴锅，温度至 37-40℃，并在离心管中准备好 10ml 培养基；
- 从液氮罐中取出细胞，迅速放进预热的水浴锅中，镊子夹住冻存管晃动，使其受热均匀；
- 当冻存管内达到 90%左右融化时，注意用酒精擦拭冻存管消毒，将细胞悬液吸入含有 10ml 培养基的离心管中；
- 离心 5min，去除上清，得到沉淀；
- 用培养基悬浮沉淀，并接种到培养瓶常规培养。
- 细胞复苏后，生长一段时间，细胞状态良好，细胞活力达到 95%以上，说明细胞复苏成功。
- 瞬时转染以脂质体转染为例的操作流程。

- 将复苏后常规培养的细胞按照 1-3x10^5 接种到 6 孔板中，加入 2-4ml 的完全培养基，混匀放置在二氧化碳培养箱中 37℃过夜；
- 无菌状态下配置如下溶液：a 用 100ul 的无血清培养基稀释 4ug 的待转染的质粒; b 用 100ul 的无血清培养基稀释 10ul 的 Lipofectamine 转染试剂（血清的存在会影响转染效率，因此要使用无血清培养基转染）
- 将 ab 溶液混合并摇匀，室温下放置 15-20min 左右；
- 细胞培养至 80%单层左右，用无血清培养基洗涤细胞 2 次，每孔加入 1.8ml 的无血清培养基，并将混合后的 ab 溶液逐滴加入到每孔，按十字方向轻摇混匀，二氧化碳培养箱中 37℃培养 24 小时；
- 将转染液倒出，换为完全培养基继续培养。

稳转株筛选

48h 加入选择性抗生素进行稳转株筛选，预实验确定抗生素的杀伤浓度（在规定时间内，将细胞全部杀死的最低浓度）。

- 提前一天接种细胞与 24 孔板中，待第二天长成 25%单层为宜，二氧化碳培养箱中 37℃过夜培养；
- 第二天将培养液换成含抗生素的培养基，抗生素浓度按梯度递增；
- 培养 7-10 天左右绝大多数细胞死亡抗生素浓度为准，筛选细胞时刻适当提高浓度；
- 二氧化碳培养箱中 37℃培养 72h 后按照 1:10 的比例将转染细胞传代，使用预实验得到的抗生素浓度的培养基培养。后挑选单克隆，有限稀释法挑取单克隆。
- Western blot 或 ELISA 检测蛋白的表达情况，挑取多个单克隆进行表达检测，筛选出表达量最高的克隆传代并保存。最终进行稳转株筛选高表达的稳定细胞株，相对于瞬时转染稳定细胞系构建需大量的时间和成本，是满足活性蛋白大量制备的最好方法。

稳定转染应用

稳定转染适用原因	稳定转染应用
外源基因要整合到细胞染色体上	基因敲除以及基因插入突变筛选等修饰基因组的研究
细胞之间存在个体差异，同一类型细胞，不同个体细胞基因组存在差异，会对实验结果造成干扰	单克隆稳转株筛选
外源基因未整合到细胞会导致注射入动物体内后，外源基因片段很快丢失	需要在动物体体内注射已经表达外源基因的细胞
一些蛋白稳定性很强，瞬时 RNA 干扰作用周期短，无法去除已经表达的目的蛋白	需要通过稳转株筛选，实现更好的基因干扰效果
稳转株筛选很大程度上降低频繁转染或者病毒包装的成本，也很大程度上方便实验研究	在某些细胞中长期研究基因的功能
通过稳转株筛选，能使那些病毒载体也无法达到高转导效率的细胞高效表达外源片段	获得外源片段的高效表达
避免引入人为因素影响实验结果的精确性，稳转株筛选有助于筛选出拷贝数适量的细胞	得到过表达的目的基因或干扰拷贝数

稳定转染影响因素

1. 外源基因整合的几率

   决定了稳转株筛选的简易程度，有利于稳定转染细胞的获得；

2. 插入外源基因片段的拷贝数

   一般情况下，低拷贝或者单拷贝可以降低人为因素的干扰；

3. 整合位点转录活跃度

   整合位点转录活跃度决定了稳转株筛选细胞后稳转株中外源基因片段的表达质量；

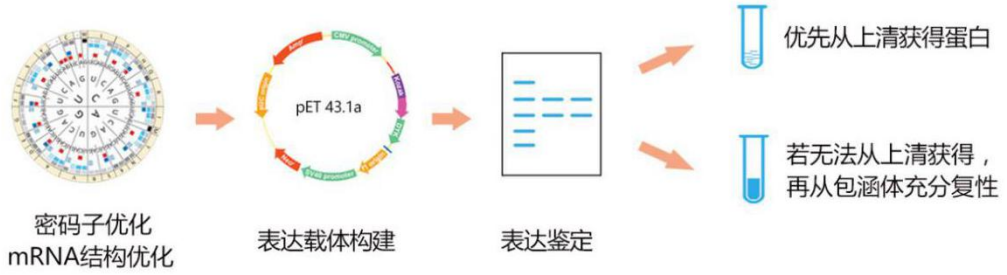
4. 外源基因片段整合到细胞后的稳定性

   不同的整合位点决定了外源片段在染色体中的稳定性，有些区域易发生重组或者丢失，从而使稳转株筛选后出现丢失的现象。

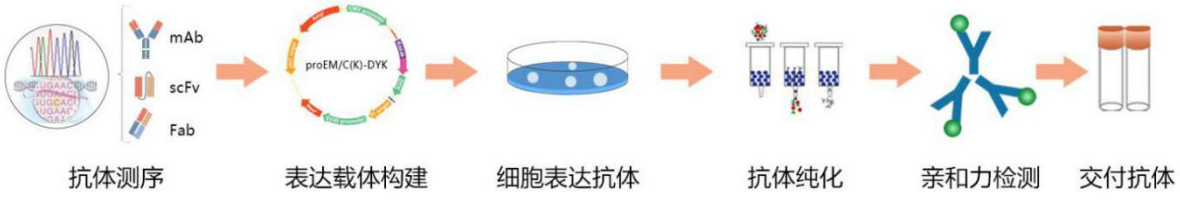
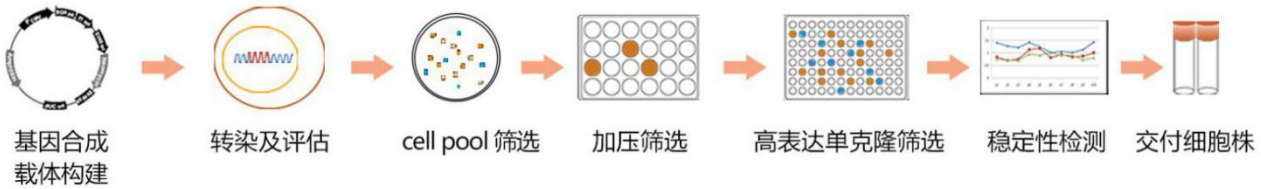
南京德泰生物 -- 专注蛋白与抗体

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