

## 重组抗体稳定细胞系构建实验

1. 案例概述	1
2. 实验设计	1
3. 密码子优化	1
4. 基因合成与测序验证	2
5. 质粒抽提	2
6. 转染级质粒准备	2
7. 稳定细胞转染	3
8. 单克隆筛选	3
8.1. cell pool 筛选	3
8.2. 单克隆筛选	4
8.3. 单克隆表达量评估	4
9. 单克隆扩大培养	6
10. 稳定性评估	6
11. 表达检测	7
12. 服务网址	7

德泰生物拥有 cGMP 标准的百级洁净细胞房，利用自主研发的高表达载体 proEM，以及密码子优化软件 MaxCodon™，结合定向驯化的 CHO 或 HEK293 细胞，全面提高构建稳定细胞系的成功率，我们构建的稳定细胞系，蛋白表达量高达毫克至克级别，实验项目成功率高于 95%。

## 1. 案例概述

某客户想要构建能够表达重组抗体的稳定细胞株，但转染成功率低，多次失败。德泰生物凭借着丰富的经验，制定详细可行的实验方案，最终成功构建出能够稳定表达重组抗体的细胞株。

## 2. 实验设计

优化客户提供的目的基因序列，全基因合成后，将重链与轻链基因分别插入到德泰自行优化的表达载体上。经过测序和酶切验证，提取出低内毒素水平的质粒。通过电转的方式稳定转染到 CHO-K1 细胞后进行 cell pool 筛选，之后进行单克隆筛选、分批培养和稳定性评估等实验，每阶段检测蛋白或抗体的表达情况，最终挑选出高表达的稳定细胞株。

## 3. 密码子优化

CAI (密码子适应指数)，可以用来预测外源基因的表达水平，而 mRNA 二级结构的数量与复杂程度也关系到蛋白的表达效率。因此，优化 CAI 与 mRNA 二级结构能提高蛋白质表达效率。MaxCodon™ 用同义密码子替换作为手段，以使用频率更高的同义密码子替换掉稀有密码子。在提高 CAI (密码子适应指数) 同时，软件还对 mRNA 二级结构进行预测，减少 mRNA 二级结构数量 (详细过程见密码子优化案例)。

用软件分析基因序列后可知，该抗体蛋白来自哺乳动物细胞，其密码子使用偏性与宿主细胞相差不大，CAI 为 0.83。软件对其 mRNA 二级结构做了优化，减少了其 mRNA 二级结构的数量。

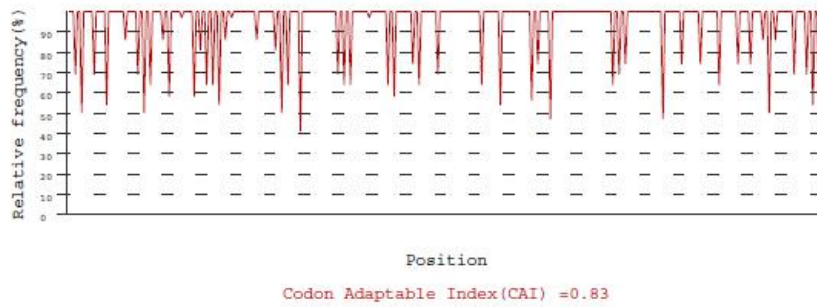


图 3-1 原始序列 CAI 计算结果

#### 4. 基因合成与测序验证

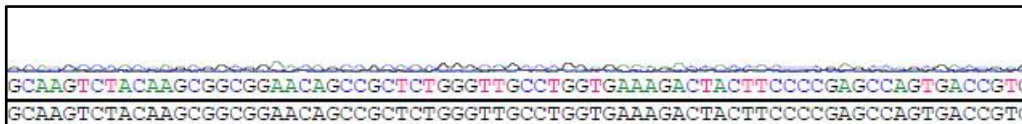


图 4-1 测序峰图

#### 5. 质粒抽提

检测内容	转染级质粒标准	质粒检测结果
A260/A280	1.8-2.0	1.86
内毒素	内毒素 < 0.05EU/ug	LAL 检测, < 0.05EU/ug
无菌检测	无菌	LB 平板检测, 无菌落

表 5-1 质粒检测结果

质粒转到 DH5a 克隆菌株, 进行质粒扩增后抽提。由于细菌中的内毒素会对哺乳动物细胞造成伤害, 在质粒抽提之后, 需要去除内毒素。内毒素去除之后, 对抽提的质粒进行检测, 确定质粒的内毒素水平达到转染的级别之后, 进行下一步实验。

#### 6. 转染级质粒准备

我们采用 QIAGEN 无内毒素质粒抽提试剂盒进行质粒提取, 抽提完之后检测内毒素水平。线性质粒与环状质

粒相比，整合到染色体中的概率更高。因此，在转染开始之前，需要酶切质粒使其线性化，通过琼脂糖凝胶电泳分析质粒抽提及线性化情况。

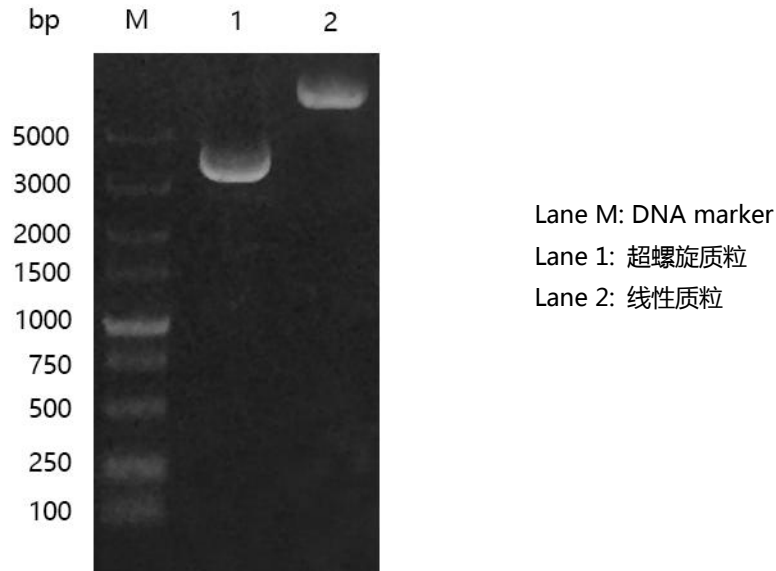


图 6-1 琼脂糖凝胶电泳分析抽提质粒

## 7. 稳定细胞转染

测序和酶切验证无误后，将质粒以电转的方法稳定转染到宿主细胞内。

查阅文献，确定电转化的条件，准备细胞悬液 760 $\mu$ l，DNA 40 $\mu$ l（质粒浓度为 1 $\mu$ g/ $\mu$ l），将质粒和细胞悬液加入到电转杯中混合均匀，用 BIO-RAD 的电转仪电转。结束后取细胞培养液培养 48h，检测上清，根据蛋白或抗体的表达情况进行后续实验。

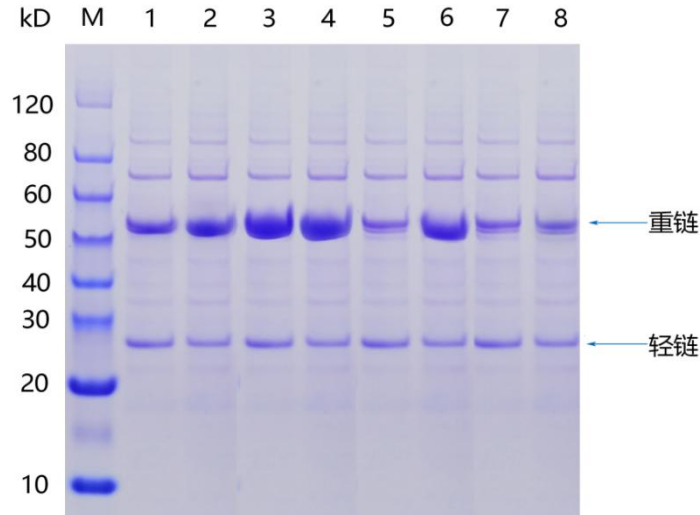
## 8. 单克隆筛选

### 8.1. cell pool 筛选

- 1) 取转染后 48 小时的细胞进行计数，将细胞转移到 15ml 无菌离心管中，室温离心 800rpm 5min。
- 2) 离心后弃上清，加入适量新鲜的筛选培养基重悬细胞。
- 3) 铺板，每孔 500 $\mu$ l，细胞密度在  $0.8 \times 10^5$  cells/孔，置于 37 $^{\circ}$ C 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。
- 4) 铺板后的第七天，换液，倾斜 24 孔板，轻轻吸取上清，尽量不要吸到细胞，每孔添加 500 $\mu$ l 新鲜培养基，

37°C 5% CO<sub>2</sub> 条件下培养。

- 5) 每 4-5 天进行一次换液，当 24 孔板中大部分细胞状态恢复后，即可对 24 孔板进行传代。
- 6) 经过 3-4 周的筛选，细胞适应压力筛选，状态恢复后对 24 孔板进行 1 : 5 传代，第六天收集上清检测。



8-1 重组抗体检测结果

## 8.2. 单克隆筛选

- 1) 单克隆铺板前一天将细胞按  $5.0 \times 10^5$  cells/ml 接种，体积 20ml，使细胞处于对数生长期。
- 2) 从 cell pool 中吸取 2ml 细胞悬液至 15ml 无菌离心管 吸取 1ml 至用于计数 吸取的细胞活力应高于 95%。
- 3) 计算所需细胞体积和培养基，0.5-1.0cell/well 每孔 100 $\mu$ l 筛选培养基。
- 4) 排枪槽内加入筛选培养基，吸取适量的细胞悬液，混匀，96 孔板中每孔加入 100 $\mu$ l 铺板，37°C，5%CO<sub>2</sub> 条件下培养。
- 5) 铺板 10 天后，每孔添加 100 $\mu$ l 新鲜的筛选培养基。铺板第 15 天时，显微镜下观察，标记单克隆。
- 6) 当克隆汇合度达到 50%时，取上清进行分析检测。

## 8.3. 单克隆表达量评估

根据检测结果，挑选表达量最高的 18 个克隆进行六孔板 Batch 培养，进一步分析评估单克隆表达量，根据检测结果挑选高表达 10 个克隆扩大进行 Fed-Batch 和 Stability 评估。

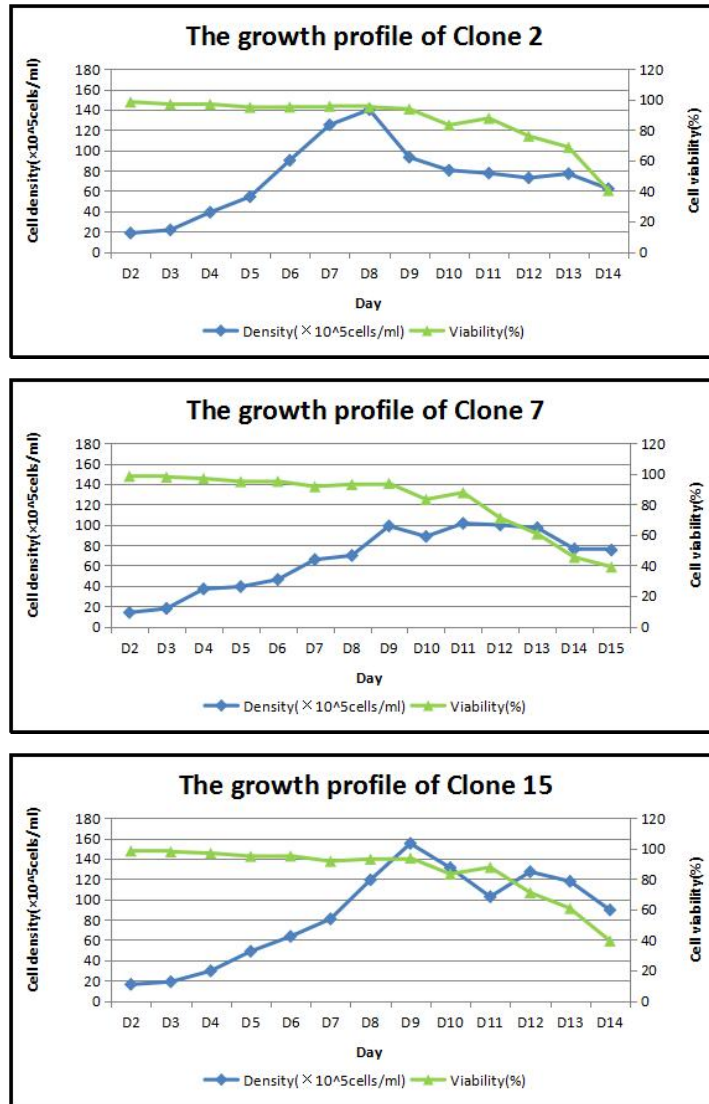


图 9-1 表达量最高的 3 个克隆的生长情况

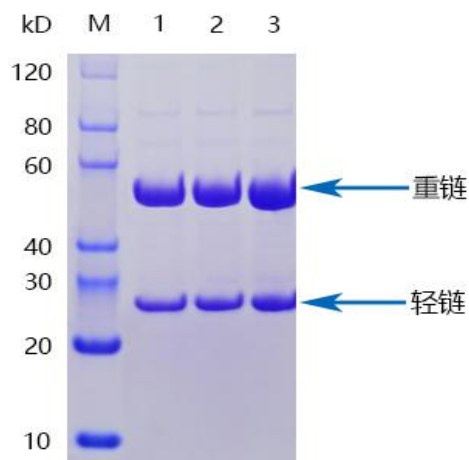


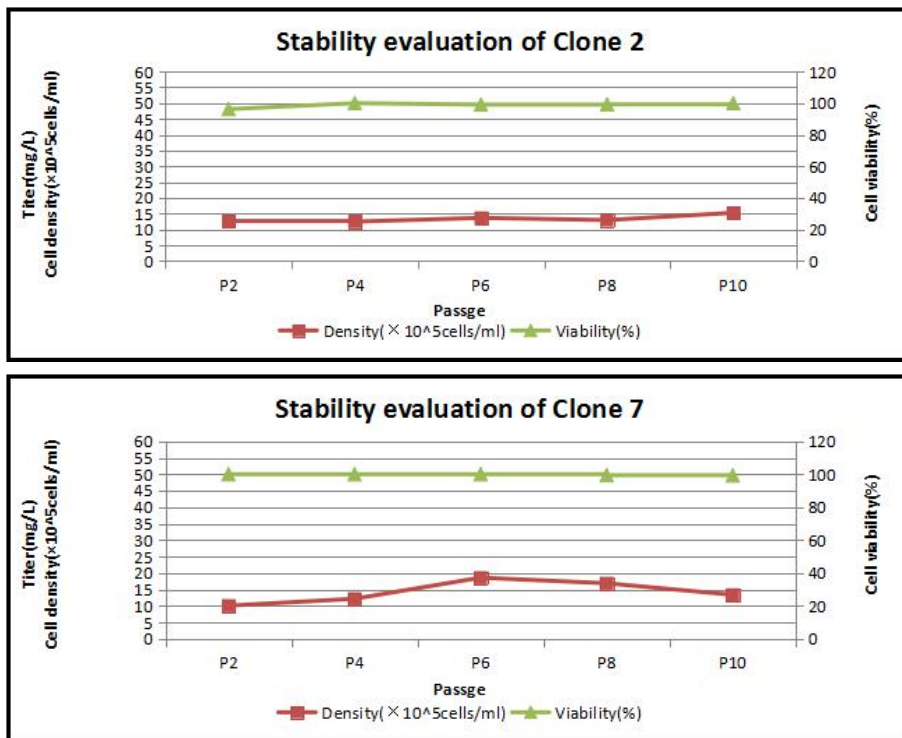
图 9-2 top 3 克隆 Fed-Batch 检测结果

## 9. 单克隆扩大培养

根据单克隆表达量的评估结果，挑选高表达的 10 个克隆进行 Fed-Batch 扩大培养，在 125ml 摇瓶内进行，总体积 40ml。第二天开始，每天取样计数。第七天开始，每天取上清留样，每个克隆各取 2 管，每管 200ul 用于检测和备份。当细胞活力低于 50% 时，收集所有上清用于检测。

## 10. 稳定性评估

在 125ml 摇瓶内进行培养，评估其稳定性。接种培养 48 小时后，吸取 1ml 进行计数。收集上清留样，每个克隆各取 2 管，每管 200ul 用于检测及备份，根据计数结果吸取相应体积的细胞悬液，离心后在 125ml 摇瓶中新培养培养基重悬细胞，48 小时后重复计数，接种细胞，并收小样，实验结束后，收集所有上清进行检测。



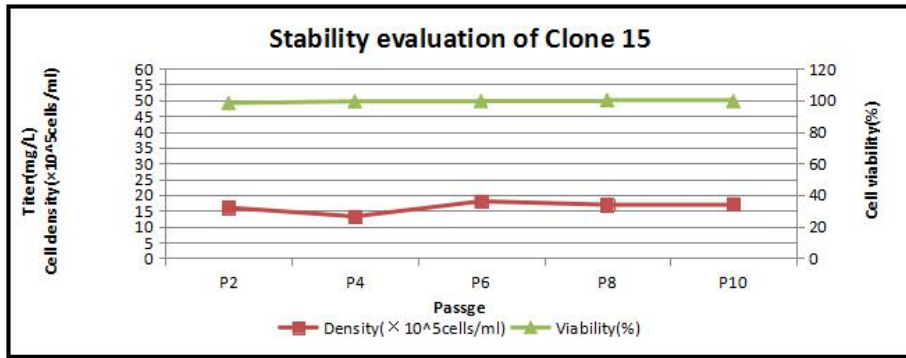


图 10-1 稳定性最高的 3 个克隆的生长情况

## 11. 表达检测

实验结束后，收集上清纯化后电泳检测。

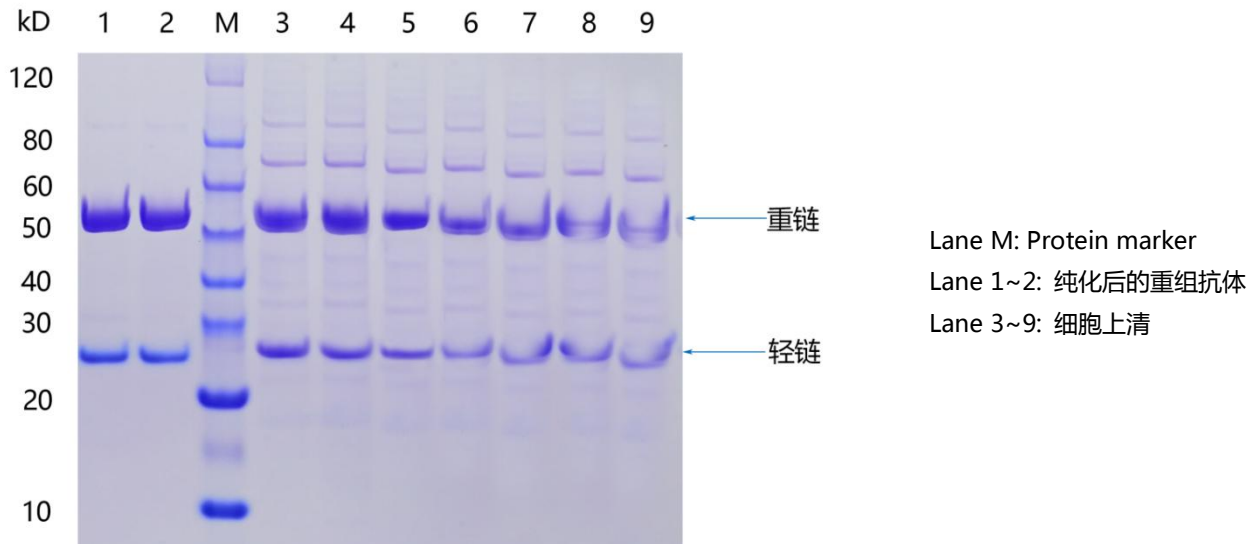


图 11-1 细胞上清电泳结果与纯化之后的电泳结果

## 12. 服务网址

[www.detaibio.com/mammalian-cell-stable-cell-line.html](http://www.detaibio.com/mammalian-cell-stable-cell-line.html)