CHO-K1悬浮培养细胞稳定表达细胞株建立方法（2.1版）

（细胞克隆培养液KD-Clone使用方法）

# 细胞准备与转染

## 1.1细胞复苏与转染

复苏CHO-K1悬浮培养细胞，培养传代使细胞活率状态恢复，转染前两天按0.3×106 cells/ml传代。转染时，以荧光质粒转染作为对照试验，特定质粒转染作为实验组；

细胞转染可依据化学转染方法或电转染方法进行，具体操作方法请参考相关指南。

**细胞培养基使用保存注意事项：**

1. **切勿紫外照射；**
2. **无需预热处理，可直接从冰箱取出使用；**
3. **储存细胞培养基时尽量使用医用冰箱，以确保恒温效果，切勿冷冻；**
4. **定期检查细胞培养基过期日期，并在过期前使用完或更换新的培养基，避免使用过期培养基导致细胞生长异常或失败。**

# 细胞筛选

## 2.1实验内容

通过不断改变加入筛选抗生素（如G418）的量来筛选转染后的CHO 细胞，使细胞大量死亡，细胞活率降低直到回弹为筛选结束。

## 2.2实验步骤

1. 转染 24小时后，将细胞转移至离心管中，室温1000 rpm离心5 min，去上清，加入10ml KD-CHO 培养液（珠海恺瑞产品），转入100 mL摇瓶中，加入400µg/mL 的G418与ITSplus（100×，珠海恺瑞产品），置于37℃，CO2浓度为5%的，转速为120 rpm的叠加式振荡器（摇床）中培养。每两天（48小时）测一次活率及密度，并离心换液，体积为10 ml，将 G418终浓度提高至800-1200µg/mL，以此方法培养11天左右，细胞活率会有所回升；
2. 9天摇床培养之后，筛选成功，离心换液，开始第一次克隆，克隆后剩余的细胞进行冻存。

# 细胞克隆

## 3.1实验步骤

以克隆三板、每板1000个细胞为例：

1. 取摇瓶，加入48ml的KD-Clone 培养液（珠海恺瑞产品），将其置于37 ℃、CO2浓度为5%、120 rpm的摇床平衡30 min，平衡好后向摇瓶中加入ITSplus（100×）并混匀，再从摇瓶中分别取900µl的培养液加入3个1.5ml的离心管中，分别标号为管1、管2、管3；
2. 取待克隆的细胞100µl，加入 管1中，混匀；按梯度稀释的方法稀释。快速从管3中吸取3滴10µl细胞混合液于小平皿中，显微镜镜下计数，取其平均数（\* 个/10µl）。若细胞量较少（﹤10个），则按照同样的方法吸取管2细胞混合液。计算出共需细胞混合液体积，取相应细胞混合液加入到步骤（1）中剩余的45ml的KD-Clone培养液中，混匀；

**注意事项：**

1. 离心管1、2、3在混合细胞时需要快，显微镜计数时也不要耗时过长。所有材料准备好后再把细胞取出来计数；
2. 管1、2、3依次为10倍关系，当管3细胞量不够时，可按倍数吸取管2中细胞混合液；若管2细胞量不够时，同理可吸取管1或管3中细胞混合液；
3. 在1.5ml离心管混匀细胞液时尽量不要吹打，上下颠倒数次即可；
4. 在进行第一次克隆（多克隆）时克隆稳转的细胞要计数，并离心换液，以除去G418对克隆时的影响；’
5. 在进行第一次克隆（多克隆）时在显微镜下计数时是死活细胞一起数，因此计算所需细胞液体积时要乘以活率。
6. 将上步混合好的KD-Clone 培养液的细胞混合液倒入12道管槽中，用12道排枪吸取150µl/孔加入到96孔板中，铺三板。置于37℃、5%的CO2培养箱中静置培养，保持一周不动；

**注意事项：**

1. 接种时，到出的细胞混合液每次大概倒一板的细胞液到12道管槽中，接完一板再倒，接种时尽量不吹打细胞。
2. 一周之后观察细胞，圈出长势较佳的孔，换液KD-CHO培养，使其分泌较多蛋白，待增长较多时，**用ELISA检测其蛋白表达量**。挑出较高表达的孔，扩增到小平皿或6孔板中中，用KD-Clone培养液培养24小时后根据需要进行第二次单克隆。剩余的冻存保种；
3. 第二次单克隆方法与第一次克隆方法相同，按 100-200个/板接种到96孔板中。一周之后，显微镜镜下观察，挑选出单克隆孔，换液KD-CHO，待增长较多时，进行ELISA检测，挑出表达较高的孔。扩增到小平皿中，用KD-Clone培养液培养24小时后进行第三次单克隆。剩余的冻存保种。

**注意事项：**

1. 细胞是否需要进行多次单克隆可以根据个人需要来决定。