稳转方案-G418系统(2.2版)

# 细胞的准备与转染

## 1.1实验内容

复苏CHO细胞，培养传代使细胞活率状态恢复，转染前两天传代接种0.3×106 cells/ml。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。**

## 1.2试剂与仪器设备

实验前请确保准备好以下试剂与材料：

* 试剂：

1. 自备试剂：纯水、荧光质粒、目的质粒、75%乙醇
2. 珠海恺瑞可提供的试剂：

KD-CHO（产品号K03201）：CHO化学限定高密度无血清细胞培养液

KPM（产品号K03125）：无血清细胞转染缓冲溶液100 ml

TA-CHO(产品号K20002)：CHO细胞悬浮化学转染试剂

KD-Freeze（产品号K60001）：无血清细胞冻存液20 ml

G418添加液（产品号K80003）：G418 50mg/ml

* 耗材：500 ml烧杯、温度计、镊子、6孔板(或小培养皿)、1.5 ml离心管、15 ml离心管、50 ml离心管、100 ml锥形瓶、250 ml锥形瓶、各种型号的枪头及其移液枪、标记笔、离心管架。
* 仪器：细胞活力计数仪、生物安全柜、酶标板混匀器、微波炉、静置CO2 培养箱、摇床、台式低速自动平衡离心机、荧光显微镜。

## 1.3实验步骤

### 1.3.1复苏

1. 从液氮罐、干冰或超低温冰箱中取出冻存管，立刻放置于37℃的温水中，直至管内冰晶完全融化；
2. 解冻后用75%乙醇彻底擦拭冻存管，用移液枪将细胞悬液全部转移至一个50 ml的离心管中，缓慢加入细胞培养液，至其终体积为20 ml；
3. 1000 rpm离心5min，弃去含有冻存保护剂的上清液（若使用珠海恺瑞的冻存液KD-Freeze则无需经过此离心过程）；
4. 用新鲜的KD-CHO培养液重悬细胞，使其密度为0.2-0.6×106 cells/ml，接种于规格为100 ml的摇瓶中震荡培养（摇床参数：120 rpm、37℃、5%CO2）；
5. 培养3-5天后对细胞进行计数，观察细胞密度和存活率是否上升。若细胞密度达到3-6×106 cells/ml，可对细胞进行传代处理，一般细胞传代1-2次后即可恢复正常的生长状态。

### 1.3.2传代

每两天计数，记录细胞活率与密度。 传代培养至细胞活率密度较好时，以0.3-0.5×106 cells/ml传代，在细胞对数生长期内转染。

### 1.3.3转染（铺板25块24孔板，则要转染12 μg质粒，铺板的数量可以按照客户自己的要求决定铺板的数量）

测细胞活率与密度并计数，获取长势较好的、密度介于细胞对数生长期内的 CHO细胞。按1×106 cells/ml，2ml/孔，取所需的细胞量。室温1000 rpm离心5 min，去上清。沉淀重悬于KD-CHO 培养液中，并吸取至6孔板中。置于CO2培养箱内的酶标板混匀器200 rpm培养，参数设置为：37℃、5%CO2。

**同时配制复合物，以一孔为例**：

1. 离心管1中加入100μl的KPM培养液、4μg线性化的DNA；离心管2中加入100μl的KPM培养液、20 ul的TA-CHO（DNA:转染试剂=1:5 m/v）；
2. 将管2加入管1中，混匀，静置10 min；
3. 将上述复合物加入6孔板或者小培养皿中，置于37℃，5%CO2的静置培养箱内的酶标板混匀器200 rpm中培养；
4. 24小时后，取荧光质粒组细胞进行稀释，计算出转染率。如果转染效率满足要求，可将目的蛋白质粒组进行加压筛选。

**注意事项：**

1. 转染前需检查PEI是否均匀，浑浊需加热到80℃，使其澄清且PEI是线性化的；
2. 一定是管2（PEI组）加入到管1（DNA组）中，顺序不可颠倒；
3. 将复合物加入6孔板时，需滴加并快速混匀，避免都加在同一区域；
4. 荧光组拍照时，细胞如果较多，可进行稀释再拍照。
5. 24小时后，取荧光质粒组细胞进行稀释，计算出转染率。如果转染效率满足要求，可将目的蛋白质粒组进行加压筛选

# 细胞加压筛选

## 2.1实验内容

通过KD-Clone 与G418 的共同作用初步筛选出稳定转染的 Pool ，使未整合目的基因的细胞生长变缓或死亡，从而筛选稳定整合细胞株。

## 2.2试剂与仪器设备

实验前请确保准备好以下试剂与材料：

* 试剂：（1）珠海恺瑞可提供的试剂：

KDCHO-CD3（产品号K03201-CD3）：工艺开发CHO化学限定高密度无血清培养液

KD-Freeze （产品号K60001）：无血清细胞冻存液20 ml

G418添加液（产品号K80003）：G418 50mg/ml

力肽溶液（产品号K80002）：力肽溶液200mM

* 耗材：50 ml 离心管、6孔板、24孔板、培养瓶、各型号的移液枪及其枪头、离心管架。
* 仪器：细胞活力计数仪、生物安全柜、台式低速自动平衡离心机、静置CO2培养箱、摇床。

## 2.3实验步骤

**G418加压**

1. 转染 24小时后，荧光质粒组混匀取200μl荧光细胞液稀释测荧光含量，计算出转染率；
2. 特定质粒组转染24小时后开始加压筛选，筛选操作步骤：将细胞混匀吸入离心管中，室温1000 rpm离心5 min，去上清，加入6 ml KD-Clone培养液中重悬并稀释计数；
3. 按2.0×104 cells/ml密度，1 ml/孔接种于24孔板中，用KD-Clone+G418(300μg/ml)培养液开始筛选，经过1-2次换液（4-7天换1次），G418的浓度介于300μg/ml～800μg/ml**(细胞分裂生长较多后再提高G418的浓度，细胞分裂较少则G418的浓度不用提高)**，用KD-Clone培养液；
4. 将上述经过G418（800 μg/ml）筛选的细胞Pool换0.4-0.6 ml/孔的KDCHO-CD3+ 7.0-8.0mmol/L的力肽+G418(1200μg/ml)培养；（注意：等细胞分裂增长到其汇合度约为50%及以上时按该步骤操作，若未达到还是使用原来的培养基进行筛选。）
5. 3-7天后全换KDCHO-CD3+7.0-8.0mmol/L的力肽+ G418(1200μg/ml)培养液筛选；3-7天移0.3-0.6ml的细胞液到新的24孔板总体积1 ml筛选，原板继续培养到继上次换液时7-10天收集细胞上清进行第一次Elisa检测；
6. 第一次Elisa检测后挑选高表达细胞孔移到新的24或6孔板中筛选，并挑选2-3个Pool进行多克隆与单克隆；所有挑选出来的Pool重复上述（5）中的步骤细胞Pool经过进行多次筛选，进行2-3次 Elisa 检测后挑选1-5个表达量比较高的进行单克隆。

**注意事项：**

1. 细胞转染率大于等于30%时铺板筛选，得到的Pool比较好。

# 细胞克隆

## 3.1实验内容

将筛选过的稳转细胞进行克隆，待增长起来后，检测克隆孔的蛋白表达量。挑表达量较高的几孔冻存几管备用后，再进行第二次克隆。以此类推，再进行第三次克隆。

## 3.2试剂与仪器设备

实验前请确保准备好以下试剂与材料:

* 试剂：

KD-CHO（产品号K03201）：CHO化学限定高密度无血清细胞培养液

ITS plus（产品号K50001）：人重组蛋白（IGF-1，Transferrin，HSA）以及Selenium等

KD-Clone(产品号K07001)：杂交瘤、CHO及293细胞无血清克隆培养液

KDCHO-CD3（产品号K03201-CD3）：工艺开发CHO化学限定高密度无血清培养液

KD-Freeze（产品号K60001）：无血清细胞冻存液20 ml

力肽溶液（产品号K80002）：力肽溶液200mM

* 仪器：1.5 ml离心管、摇瓶、12道排枪、12道管槽、显微镜、小（大））平皿、各种型号的移液枪及其枪头、96孔板、静置CO2培养箱 、摇床、细胞活力计数仪。

## 3.3实验步骤

以单克隆三板，每板50个细胞为例：

1. 取摇瓶，加入33 ml的KD-Clone并向摇瓶中加入ITSplus（100×）混匀。从摇瓶中分别取900 ul的培养液加入3个1.5 ml的离心管中，分别标号为管1、管2、管3；
2. 取待单克隆的细胞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30 ml的KD-Clone培养液中，混匀；
3. 将上述混合好的KD-Clone的细胞混合液倒入12道管槽中，用12道排枪吸取100µl/孔加入到96孔板中，铺三板。置于37 ℃、5%CO2培养箱中静置培养，保持一周不动；

**注意事项：**

1. KD-Clone打开时间较久时（与初次打开的颜色不一样时）可以将其置于37 ℃、5%CO2 、120rpm的摇床平衡30min，平衡好后再加ITSplus，进行单克隆；
2. 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；
3. 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；
4. 在1.5 ml离心管混匀细胞液时尽量不要吹打，上下颠倒数次即可。
5. 一周之后观察细胞，圈出长势较佳且单个细胞分裂的孔继续培养，10-14天将单个细胞长起来的孔移到24或48孔板0.5 ml /孔的KD-CHO培养，细胞长起来后补加0.5 ml/孔的KDCHO-CD3+7.0-8.0mmol/L的力肽培养液培养；
6. 5-7天移 一半细胞液到新的孔中KDCHO-CD3+7.0-8.0mmol/L的力肽 + G418（400μg/ml)筛选**,**旧板继续培养3-5天后收上清第一次单克隆检测
7. 第一次单克隆检测后挑选高表达细胞孔移到新的24孔板或6孔板，用KDCHO-CD3+ 7.0-8.0 mmol/L的力肽+ G418（400μg/ml)培养；重复上述步骤（5）经过1-2次检测后保留1-5个表达量较高的单克隆细胞株进行扩大，扩大到6孔板或T25或T75方瓶，直到上摇瓶后进行稳定性实验；
8. 每周2次计数传代，密度为0.5×106 cells/ml。重悬后接种于摇瓶中，加入G418（1200μg/ml) 培养并置于二氧化碳培养箱中静置或摇床培养；每次剩余的细胞保留在下一次传代时收样进行Elisa检测；
9. 重复上述（7）中的步骤，进行多次筛选，检测其稳定性，可以对细胞株进行生长曲线及表达量的检测与工艺开发检测哪株细胞株细胞生长较好，表达量高且稳定，保留下来用于后面的实验。表达量有增高且稳定则筛选成功，离心换液，开始进行第二次单克隆，克隆后剩余的细胞可以继续筛选或进行冻存；
10. 第二次单克隆方法与第一次克隆方法相同， 50个/板接种到96孔板中。其筛选方法与第一次单克隆的一样。（可以根据自己的需求是否进行多次单克隆）

**注意事项：**

1. 在单克隆移板时细胞长势较好的直接换KD-CHO培养液，长势差的用KD-Clone培养液，在单克隆细胞扩大时要注意细胞的密度，适时的使用培养液；
2. 在单克隆的筛选的过程中可以用摇瓶筛选，剩余细胞液较多时可以不补加新鲜的KDCHO-CD3培养液继续培养7天收上清检测。