野生型CHO-K1细胞稳转方案(GS系统) （3.2版）

# 细胞准备与转染

## 1.1实验内容

复苏CHO-K1细胞，培养传代使细胞活率状态恢复，转染前传代接种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：

**自备试剂**：纯水、荧光质粒、目的质粒、75%乙醇

**自备或珠海恺瑞提供**：力肽溶液（产品号K80002）：200m mol/L

**珠海恺瑞提供试剂**：

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

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

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

* 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、超净工作台、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，搅拌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KDCHO-CD3+力肽（7.0-8.0 mmol/L）培养液重悬细胞，使其密度为0.3~0.6×106 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

每周两次计数传代，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，在细胞的对数生长期时转染。

### 1.3.3转染（铺板25块24孔板，则要转染10 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，获取长势较好且密度处于细胞对数生长期的 CHO-K1细胞。按接种密度为2.0×106 cells/ml，体积为2 ml/孔，其中5个孔为目的质粒，1个孔为荧光质粒对照组，取所需的细胞量。室温1000 rpm离心5 min，去上清。沉淀重悬于KD-Clone 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200-300 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100 μl的KPM培养液、2 μg线性化的DNA；
2. 离心管2中加入100 μl的KPM培养液、6 μl的TA-CHO（DNA:转染试剂=1:3 m/v）；
3. 将离心管2加入离心管1中，混匀，静置10 min；
4. 将上述复合物加入6孔板中，置于37℃，5% CO2浓度的静置培养箱内的酶标板混匀器200 -300 rpm培养;
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。

**注意事项：**

1. 在转染过程，若GS基因连在蛋白的其中的一条链上（L链或H链），在转染时没有连GS基因的链的量要比连有GS基因的链的量多（1:2-1:5）。
2. 在转染时若细胞平时培养在KDCHO-CD3培养液中，在转染时要用KD-Clone培养液洗一遍细胞再转染。
3. 一般在荧光转染效率达到20%以上时，进行筛选得到的稳转细胞株的表达量较好。

# 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 ，之后更换没有谷氨酰胺的培养液KDCHO-CD3，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。加入合适的GS蛋白抑制剂MSX，可扩增GS和目的基因，从而提高蛋白表达量。

## 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. **自备或珠海恺瑞提供：**

G418添加液（产品号K80003）：50 mg/ml

MSX添加液（产品号K80004）：10mmol/L

力肽溶液（产品号K80002）：200m mol/L

1. **珠海恺瑞提供的试剂：**

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

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

* 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、超净工作台、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

### 2.3.1 G418加压

1. 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1000rpm离心5 min，去上清，加入2 ml KD-Clone培养液中重悬并稀释计数;
2. 按2.0×104 cells/ml的密度接种于24孔板中（1 ml/孔），用KD-Clone+G418（300μg/ml）+ITSplus(100×) 培养液开始筛选，经过2-3次换液，G418的浓度介于300μg/ml-800μg/ml，用KD-Clone+ITSplus(100×)培养液；**一般3-7天可以换一次液，具体看细胞的分裂生长情况。**

**注意事项：**

1. 等细胞长到其汇合度约为20-30% 时进行第一次换液同时增加G418的量（若细胞长到7天细胞的汇合度较低也要换液， G418则维持原浓度筛选。）

### 2.3.2 MSX加压(细胞换液间隔时间需要看细胞的生长状态来决定)

1. 将上述经过G418筛选的细胞Pool换0.4-0.6 ml/孔的KDCHO-CD3+力肽（2mmol/L)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。）
2. 4-7天后全换KDCHO-CD3+力肽（2mmol/L)培养液筛选；
3. 4-7天移0.5ml/孔的细胞液到新的24孔板，原24孔板补液0.5ml/孔的KDCHO-CD3+MSX（40μmol/L），新24孔板补液0.5ml/孔的KDCHO-CD3+MSX（20μmol/L）；
4. 4-7天后新24孔板换液0.3-0.5ml/孔的KDCHO-CD3+MSX（40μmol/L），旧板换液0.3-0.5ml/孔的KDCHO-CD3+MSX（40μmol/L），之后这2批新旧24孔板继续换液KDCHO-CD3+MSX（40μmol/L）；
5. 直到大部分细胞的直径较小为止，移0.3-0.5ml/孔的细胞液到新板（24孔板）并补液0.5ml/孔KDCHO-CD3+MSX（40μmol/L），原24孔板继续培养共10-14天（大部分细胞已死亡时）收样200ul用第一次Elisa于检测（在检测前先预测确定稀释度）；
6. 第一次Elisa检测后挑选高表达细胞孔移到新24或6孔板中筛选，重复上述（5）中的步骤细胞Pool经过进行多次筛选（即大部分细胞的直径较小时），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,扩大到6孔板或T25/T75方瓶筛选培养；
7. MSX的浓度介于20μmol/L-50μmol/L。筛选成功后，离心换液，开始第一次单克隆，克隆后剩余的细胞可以继续筛选或进行冻存保种（筛选完成的标志是大部分细胞的直径较小时）。

**注意事项：**

1. 在筛选过程细胞密度与活率太低时（如细胞密度介于0.2-0.5×106 cells/ml），MSX的添加量降为原来的一半，在换液时要注意细胞的密度。
2. 在孔板的筛选过程中每次换液最好换到新的孔板，降低染菌机率
3. 由于细胞量较少，每次测量可将细胞稀释2-3倍后，再进行测量;
4. 细胞生长速度较快时可以适当增加MSX浓度，但最高不要超过50μmol/L

# 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，检测克隆孔的抗体蛋白表达量。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：

1. **自备或珠海恺瑞提供：力肽溶液（产品号K80002）：200m mol/L**
2. **珠海恺瑞可提供试剂：**

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

ITSplus（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

KD-Freeze（产品号K60001）：无血清细胞冻存液20 ml

* 仪器：1.5ml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

以克隆三板，每板50个细胞为例：（单克隆补液、换液与扩大要根据细胞的生长情况来决定）

1. 取摇瓶，加入33ml的KD-Clone + ITSplus（100×）并混匀。从摇瓶中分别取900 μl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100 μl，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10 μl细胞混合液于小平皿中，显微镜镜下计数，取其平均数（\* 个/10 μl）。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；

**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，可根据细胞初始浓度用1管或2管或3管稀释；
3. 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。
4. 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的静置培养箱中培养，保持一周不动；

**注意事项：**

1. 接种时，每接种一板将CHO细胞克隆培养液的细胞混合液倒大概一板的细胞液到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，圈出单个的长势较佳的孔继续培养并对单克隆细胞补液50µl/孔KD-Clone + ITSplus（100×），10-14天将单个细胞长起来的孔移到24或48孔板0.25 ml /孔的KD-Clone + ITSplus（100×）培养，原96孔板补液继续培养，细胞长起来后补加0.5 ml/孔的KD-Clone 或KDCHO-CD3+2mmol/L的力肽或用KDCHO-CD3培养液；（注意：等细胞分裂增长到其汇合度约20%及以上时换成KDCHO-CD3+2mmol/L的力肽，等细胞分裂增长到其汇合度约50%及以上时换成KDCHO-CD3，否者这按照之前的培养液培养。）
3. 5-7天移一半细胞液到新板中KDCHO-CD3+ MSX（20μmol/L)筛选，旧板继续培养7-10天后收上清进行第一次单克隆检测；
4. 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+MSX（20μmol/L)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，直到上摇瓶后进行补料实验；
5. 每周2次计数传代，密度为0.5-1.0×106 cells/ml。重悬后接种于摇瓶中，加入MSX（终浓度20μmol/L）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；
6. 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；MSX的浓度介于20μmol/L-50μmol/L。表达量有增高且稳定则筛选成功，如有需要离心换液，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；
7. 第二次单克隆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换KDCHO-CD3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；
3. 细胞生长速度较快时可以适当增加MSX浓度，但最高不要超过50 μmol/L；在上摇瓶时先不加MSX筛选，等其生长稳定后再添加MSX筛选；

# 附录

表Ⅰ：试剂说明

|  |  |
| --- | --- |
| **产品名称** | **说明** |
| **KDCHO-CD3** | KDCHO-CD3是由珠海恺瑞生物科技有限公司自主研发生产的化学限定高密度无血清培养液。KDCHO-CD3不含谷氨酰胺及HT，可用于野生型及GS或dhfr基因缺陷型CHO宿主细胞以及使用这些细胞所建立的稳定表达细胞株，与珠海恺瑞所生产的CD3Feed-K&C细胞培养基补料配合使用，可进一步提高重组蛋白表达效率，用于重组蛋白生产工艺开发。 |
| **KPM** | KPM是一种转染缓冲溶液，为质粒-转染试剂复合物的形成提供稳定的环境，适用于CHO细胞和293细胞高密度转染和蛋白表达。产品转染时使用量为细胞悬液的1/10。 |
| **TA-CHO** | TA-CHO是CHO细胞转染试剂，为白色悬浊液，使用时需吹打均匀。可搭配KPM配制DNA质粒-转染试剂复合物，在大规模、高密度CHO细胞转染条件下表现出良好的转染效果。 |
| **ITSplus** | ITSplus是由珠海恺瑞生物自主研发的基础添加因子，内含IGF-1，Transferrin，HSA以及Selenium等，在细胞培养中添加可以有效的促进细胞生长速率。 |
| **KD-Clone** | KD-Clone是由珠海恺瑞生物科技有限公司自主研发生产的杂交瘤、CHO及293细胞无血清克隆培养液，适合于杂交瘤、CHO及293细胞低密度培养，最适于单个细胞克隆。 |
| **力肽溶液** | 力肽 (L-丙氨酰-L-谷胺酰胺) L-Alanyl-L-Glutamine 为白色粉末结晶。力肽配置的溶液是细胞谷氨酰胺的中间物质，为细胞提供额外的谷氨酰胺，促进细胞生长。 |
| **G418** | G418（Geneticin,遗传霉素） 是一种[氨基糖苷类抗生素](https://baike.baidu.com/item/%E6%B0%A8%E5%9F%BA%E7%B3%96%E8%8B%B7%E7%B1%BB%E6%8A%97%E7%94%9F%E7%B4%A0/422453) ,在分子遗传试验中，是[稳定转染](https://baike.baidu.com/item/%E7%A8%B3%E5%AE%9A%E8%BD%AC%E6%9F%93/5641719)最常用的抗性筛选试剂。它通过抑制[转座子](https://baike.baidu.com/item/%E8%BD%AC%E5%BA%A7%E5%AD%90/3560108)Tn601，Tn5 的[基因](https://baike.baidu.com/item/%E5%9F%BA%E5%9B%A0/227875),干扰[核糖体](https://baike.baidu.com/item/%E6%A0%B8%E7%B3%96%E4%BD%93/601372)功能而阻断[蛋白质合成](https://baike.baidu.com/item/%E8%9B%8B%E7%99%BD%E8%B4%A8%E5%90%88%E6%88%90/7043821)。当neo基因被整合进[真核细胞](https://baike.baidu.com/item/%E7%9C%9F%E6%A0%B8%E7%BB%86%E8%83%9E/599845)DNA后 ,则能启动neo基因编码的序列转录为mRNA ,从而获得抗性产物[氨基糖苷磷酸转移酶](https://baike.baidu.com/item/%E6%B0%A8%E5%9F%BA%E7%B3%96%E8%8B%B7%E7%A3%B7%E9%85%B8%E8%BD%AC%E7%A7%BB%E9%85%B6/5606004)的高效表达 ,使细胞获得抗性而能在含有G418的[选择性培养基](https://baike.baidu.com/item/%E9%80%89%E6%8B%A9%E6%80%A7%E5%9F%B9%E5%85%BB%E5%9F%BA/4488499)中生长。 |
| **MSX** | MSX（L-蛋氨酸砜亚胺）作为谷氨酰胺合成酶活性的有效抑制剂，已广泛应用于仓鼠卵巢(CHO)等哺乳动物细胞系质粒整合的筛选。 |
| **KD-Freeze** | KD-Freeze是由珠海恺瑞生物自主研发的无血清、无动物源成分的细胞冻存液，适用于HEK293细胞、CHO细胞及杂交瘤细胞的冷冻保存。 |