

稳定细胞株构建SOP

1. 实验仪器

仪器名称	型号/厂家
高速冷冻离心机	Neofuge 15R
生物安全柜	Heal Force
电热恒温水浴锅	HHW21.600A II
恒温培养箱	Heal force
振荡培养箱	ZCZY-AS8
自动细胞计数仪	Count Star

2. 实验试剂

试剂名称	货号	生产公司
CD fortiCHO	SH30084.03	Hyclone
Freestyle CHO Expression Medium	12651022	Gbico
Anti-clumping Agent	10131-035	Gibco
L-Glutamine 200 mM Solution	Sigma	D5879
支原体检测试剂盒	K0103	杭州华安
DMSO	D2650-100mL	SIGMA

3. 实验步骤

3.1 重组表达质粒构建及提取

根据分子克隆标准方法构建表达载体并提取质粒。

3.2 最佳药物筛选浓度测定

(1) 将宿主细胞以 2×10^4 个/孔的接种密度传至一块24孔板中，使用不含药物的完全培养基培养，37 °C，5% CO₂ 培养过夜。

(2) 第二天吸掉无药的完全培养基，加入含药物浓度梯度增加的筛选培养基，药物浓度如下：0、0.2、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、1.0 mg/ml。每个浓度做3个重复。

(3) 每2-3天换新鲜的筛选培养基，培养到7-14天在显微镜下观察细胞死亡情况。通常将10-14天细胞全部死亡的最低药物浓度定为最小致死浓度。选比此浓度略高的药物浓度为最佳药物筛选浓度。

3.3 细胞转染及加药初筛

3.3.1 细胞转染方法（125摇瓶）

(1) 转染前一天，接种 27×10^6 个细胞到完全培养基中培养（不含抗生素），使细胞在转染当天处于对数生长期。

(2) 转染复合物的准备

① 稀释15 μg DNA 至1.5 ml 完全培养基中，轻柔混匀。

② 稀释45 μl PEI转染试剂至1.5 ml 完全培养基中，轻柔混匀，室温孵育5 min。

③ 加稀释的PEI到稀释的DNA中，转染混合物总体积为3 ml，轻柔混匀，室温孵育20-30 min。

(3) 转染：加入3 ml转染混合物到27 ml细胞悬液中，轻柔混匀，在 37°C ，5% CO_2 ，130 rpm条件下培养。

3.3.2 加药初筛

(1) 转染48小时后，以 1×10^5 cells/ml 细胞密度接种细胞至T75培养瓶中，用含一定药物浓度的加压培养基进行初筛，每个T75加15 ml细胞悬液。

(2) 每2-3天换新鲜的筛选培养基。细胞在加压第一周会大量死亡，一周后细胞活率和密度逐渐上升，2-3周后，阳性克隆逐渐生长起来。在加药筛选后期，细胞生长较快，及时对细胞进行传代处理，不能让培养瓶中的细胞长得过满。

(3) 加压筛选3周后，获得混合多克隆细胞株，即为stable pools。利用Elisa方法对阳性克隆进行鉴定。

3.4 单克隆分离及筛选

(1) 接种对数生长期的stable pools细胞至摇瓶中，培养基为含一定药物浓度的加压培养基， 37°C ，5% CO_2 ，130 rpm培养过夜。次日，收集细胞培养上清，1000 rpm离心5 min。取上清用0.22 μm 无菌滤器进行无菌过滤，4度放置，可保存1周备用。

(2) 克隆培养基的配制：30%条件培养基+70%含一定药物浓度的加压培养基。

(3) 取生长良好的stable pool计数，以1个细胞/孔的密度铺96孔板，共接种20块96孔板。96孔板放置在 37°C ，5% CO_2 的培养箱中静置培养两小时，在显微镜下观察铺板情况，用记号笔标出含单个细胞的孔。在 37°C ，5% CO_2 条件下培养21天左右，观察含单个细胞的孔中单克隆生长情况。

(4) 当单克隆长至96孔板底面积20-50%时，取96孔板培养上清用Elisa对阳性单克隆进行鉴定。挑取最优的30个阳性克隆进行逐级扩大培养，在24孔板中进行Elisa复筛，挑取最优10个阳性克隆继续进行扩大培养至125摇瓶，并进行冻存备份。

3.5 单克隆产量鉴定

(1) 以 1×10^6 个/mL细胞密度（细胞活率 $>95\%$ ）接种30 mL新鲜的完全培养基到125摇瓶中。

(2) 在 37°C ，80%相对湿度，5% CO_2 ，130 rpm条件下孵育细胞。

(3) 从第3天开始每隔2天补加原始体积2.5%的补料培养基。从第10天开始， 33°C 降温培养细胞，其他条件不变。

(4) 从第三天开始，每两天取200 μ l 细胞悬液计数，监测细胞密度及活率的变化，同时分析上清中葡萄糖的含量（参照葡萄糖（Glu）检测试剂盒4*50ml/盒，南京建成，F006），始终保持糖浓度为3 g/L。

(5) 细胞活率降到50%后收样，离心收集培养上清进行纯化操作，SDS-PAGE 分析纯化结果，测定产品浓度。

3.6 支原体检测

(1) 当细胞生长至80%-90%时，使用枪头刮取细胞(不能使用胰酶消化)，取150 μ l 细胞悬液（ $1-3 \times 10^5$ 个细胞）至1.5 ml 离心管中，沸水浴10分钟，12000 rpm 离心5 min，取4 μ l 上清做PCR 模板。

(2) PCR 反应体系如下（25 μ l）：

PCR反应液：20 μ l；

Taq 酶：1 μ l；

DNA 模板：4 μ l；

PCR 扩增程序：

预变性	94 $^{\circ}$ C for 5min	} 30cycles
循环	94 $^{\circ}$ C for 30sec	
	56 $^{\circ}$ C for 30sec	
	72 $^{\circ}$ C for 45sec	
延伸	72 $^{\circ}$ C for 5min	

(3) 取 5 μ l PCR 扩增产物，在 1%琼脂糖凝胶上直接点样（注：无需再加溴酚蓝，扩增产物已包含溴酚蓝），120V 电泳 20 分钟（可根据电泳仪的情况，适当调整参数）。EB 染色观察。

The end



• 一站式蛋白抗体发现服务

重组蛋白·抗体·噬菌体文库·诊断原料

武汉国家生物产业基地·光谷抗体发现与筛选公共服务平台