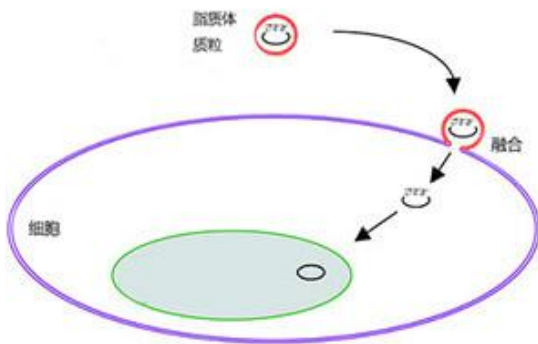


瞬时转染和稳定转染实验流程

瞬时转染与稳定转染是两种常见的哺乳动物表达系统生产蛋白的方式，通过瞬时转染能够快速实现微量至中量的重组蛋白的生产，通过稳定转染（稳定细胞系构建）能够实现长期、稳定的生产重组蛋白。本文主要对瞬时转染与稳定转染的实验操作流程做一介绍。

瞬时表达实验操作

目前有多种方式能够实现细胞转染，例如电穿孔法、基因枪法、脂质体转染法、磷酸钙转染法、病毒转染法等等。下面主要对脂质体转染法的实验操作进行介绍。



试剂配置

- HBS (HEPES-buffered saline): 876mg 的氯化钠溶于 90ml 左右的去离子水中，在加入 1mol/L 的 HEPES，调整 pH 至 7.4，定容至 100ml，过滤。
- 培养基：无血清的培养基，转染正常细胞的培养基。

实验流程

1. 载体构建：这一步可交给基因合成公司进行，提供优化后的基因序列，克隆至相应的载体上；
2. 细胞培养：转染实验开始前几天开始进行细胞复苏培养，至实验当日细胞密度应达到 60-80%；
3. 细胞转染：用无血清培养基洗涤细胞 2 次，每孔加入 1ml 的无血清培养基，随后加入转染试剂，按十字方向轻摇混匀，二氧化碳培养箱中 37°C 培养 24 小时
4. 将转染液倒出，换为完全培养基继续培养，培养 3-4 天后检测蛋白表达量

[瞬时转染实验完整流程 >>](#)

瞬转操作注意事项

- 优化细胞转染的条件，包括转染质粒的纯度（高纯度），脂质体的用量及细胞的生长密度（可通过经验论或实验摸索），避免微生物的污染；

- 脂质体混合物的制备，在脂质体转染情况下，培养基采用无血清培养基；
- 脂质体和 DNA 的加入保持一致，边加入边混匀，避免出现局部浓度过高；

稳定转染实验操作

- 质粒构建：目的基因构建至载体上，随后对质粒进行线性化处理以便于目的基因能够顺利转染至染色体上。
- 细胞转染：与瞬时转染的步骤相似。
- [细胞池筛选](#)：细胞转染 24-72 小时后，去掉转染液，进行抗生素筛选。

提前一天接种细胞于 24 孔板中，待第二天长成 25% 单层为宜，二氧化碳培养箱中 37°C 过夜培养；

第二天将培养液换成含抗生素的培养基，抗生素浓度按梯度递增（0, 50, 100, 200, 400, 800, 1000 ug/ml）；

培养 15 天左右绝大多数细胞死亡抗生素浓度为准，一般为 400-800 ug/ml，筛选细胞时适当提高浓度；

二氧化碳培养箱中 37°C 培养 72h 后按照 1:10 的比例将转染细胞传代，使用预实验（见下文）得到的抗生素浓度的培养基培养。

1. 有限稀释法挑取单克隆：将细胞消化下来做连续的 10 倍稀释，每稀释一梯度都在 9 孔板中培养，生长一周左右再次挑取单克隆进行培养，如此反复 3 次；
2. Western blot 或 ELISA 检测蛋白的表达情况，挑取多个单克隆进行表达检测，筛选出表达量最高的克隆传代并保存。

稳转株筛选预实验

预实验的目的是确定抗生素的最佳浓度，同时确定抗生素对所选细胞的最低作用浓度。具体实验步骤如下：

1. G418 的配置：取 G418 共 1g 溶于 1mol/L 的 HEPES 溶液 1ml 中，加蒸馏水至 10ml，过滤除菌，4°C 保存；
2. 细胞培养：取处于对数生长期的细胞（未转染细胞，一般在铺满培养器皿底部的 70%~80% 时），用新鲜无抗生素无血清的培养基制成 1×10^4 个/ml 的细胞悬液。按等量接种入多孔培养板中，培养 6h 左右开始加药；
3. 制备细胞培养基：在 100~1000 ug/ml 范围内确定几个梯度，按梯度浓度用培养基稀释 G418 制成培养基；
4. 加 G418 筛选：吸除培养基，PBS 洗涤一次，每孔中加入不同浓度的培养基；
4. 换液：根据细胞活力和培养基的颜色，每三天（即每隔两天）更换筛选培养基一次。如细胞生长过快，可以缩短换液时间（每隔一天）。有死细胞勤换液，可以减少对存活细胞的影响；
5. 建立死亡曲线，确定最佳筛选浓度：筛选 10~14 天后，可见有抗性的克隆出现，停药用完全培养基培养。当有大量细胞死亡时，可以把 G418 浓度减半维持筛选。

[细胞的稳定转染 >>](#)

相关阅读

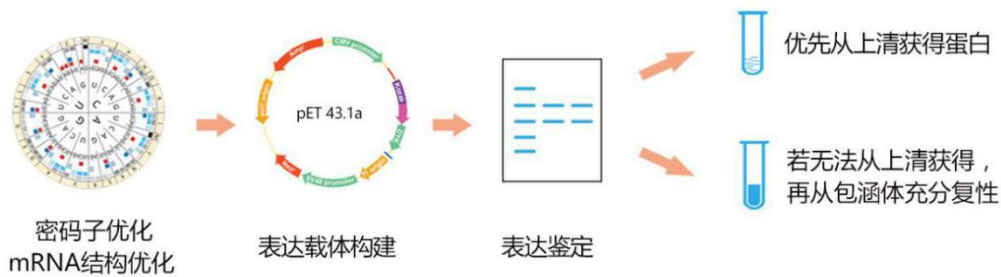
- [瞬时转染和稳定转染的区别](#)

南京德泰生物 -- 专注蛋白与抗体

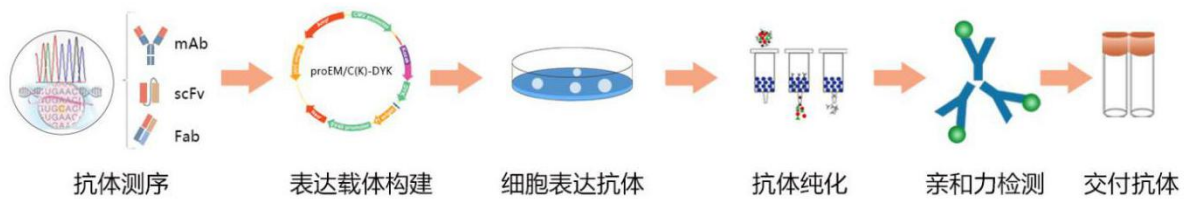
一、蛋白表达（哺乳动物细胞表达）蛋白被细胞充分修饰，活性有保障



二、蛋白表达（大肠杆菌表达）成功率>95%，不成功不收费，成功有保障



三、重组抗体表达 若想改造一个抗体，可以试试重组表达



四、稳定细胞系构建 研究级细胞系构建 & 高表达细胞株开发

