

细胞的稳定转染

稳定转染的是将外源基因整合到细胞自身的基因组上，使外源基因成为细胞基因组的一部分而得以复制。对细胞进行稳定转染最终可筛选得到稳定细胞株，稳定细胞株在重组蛋白/抗体生产、基因编辑、功能研究等方面起着重要的作用。本文主要介绍了细胞稳定转染的原理、如何进行稳转株筛选得到高表达的细胞株，同时还介绍了细胞稳转的影响因素及稳定转染的应用。

稳定转染实验流程

从实验流程的角度看，稳定转染是建立在瞬时转染的基础上的：先对哺乳动物细胞进行转染，再对得到的细胞池进行筛选最终得到稳定细胞系。在建立稳定转染细胞系时，我们需要使用选择标记来区分瞬时转染和稳定转染，通常质粒中带有选择标记，选择标记会与目的基因共表达，由此可以筛选出阳性克隆（外源基因已稳定整合至细胞的基因组上），同时剔除未稳定整合的细胞。最终通过有限稀释得到稳定转染的单克隆细胞株。

细胞复苏

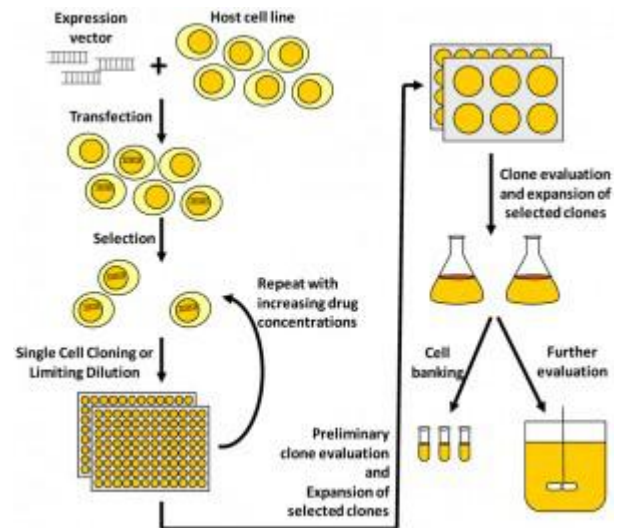
细胞复苏是将保存在液氮冰箱中的细胞株解冻并重新培养的过程，将哺乳动物细胞进行复苏用于后续的细胞转染。细胞复苏的关键是快融，防止在解冻过程中，产生的水珠形成冰晶损伤细胞。（查看[细胞复苏及细胞传代培养实验操作](#)）

载体构建及细胞转染

将目的基因构建至载体（载体需带有抗性），随后将构建好的质粒线性化。接着进行细胞转染，用于转染细胞的方式有多种，包括病毒转染、脂质体转染、电转、基因枪法等，在[瞬时转染与稳定转染实验流程](#)一文中介绍了脂质体转染细胞的详细实验操作流程。

细胞池筛选

相关阅读：[细胞池筛选](#)



转染结束后即可得到细胞池，想要得到稳定转染的单克隆细胞株需要对细胞池进行筛选：先利用抗性标记筛选稳定转染的阳性克隆，再用有限稀释法挑取单克隆株。另外如果想要得到高表达的稳定细胞株，需要对细胞池进行压力筛选（GS 筛选系统或 DHFR 筛选系统），最终得到表达能力高的稳转细胞株。

稳定转染实验影响因素

- 外源基因整合几率：外源基因整合几率决定了稳转株筛选的简易程度；
- 拷贝数：一般情况下低拷贝或者单拷贝可以降低人为因素的干扰；
- 结合位点：不同的整合位点决定了外源片段在染色体中的稳定性，有些区域易发生重组或者丢失，从而使稳转株筛选后出现丢失的现象；
- 整合位点转录活跃度：整合位点转录活跃度决定了稳转株中外源基因片段的表达质量；

稳定转染的应用

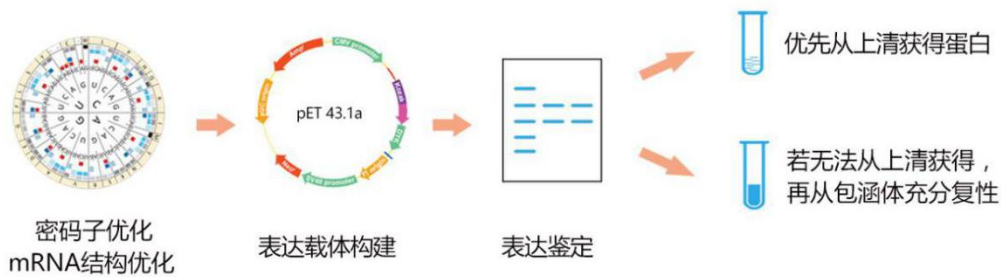
待解决的问题	解决方案
外源基因要整合到细胞染色体上	基因敲除以及基因插入突变筛选等修饰基因组的研究
细胞之间存在个体差异，同一类型细胞，不同个体细胞	单克隆稳转株筛选
基因组存在差异，会对实验结果造成干扰	
外源基因未整合到细胞会导致注射入动物体内后，外源	需要在动物体内注射已经表达外源基因的细胞
基因片段很快丢失	
一些蛋白稳定性很强，瞬时 RNA 干扰作用周期短，无法	需要通过稳转株筛选，实现更好的基因干扰效果
去除已经表达的目的蛋白	
稳转株筛选很大程度上降低频繁转染或者病毒包装的成	在某些细胞中长期研究基因的功能
本，也很大程度上方便实验研究	
通过稳转株筛选，能使那些病毒载体也无法达到高转导	获得外源片段的高效表达
效率的细胞高效表达外源片段	
避免引入人为因素影响实验结果的精确性，稳转株筛选	得到过表达的目的基因或干扰拷贝数
有助于筛选出拷贝数适量的细胞	

南京德泰生物 -- 专注蛋白与抗体

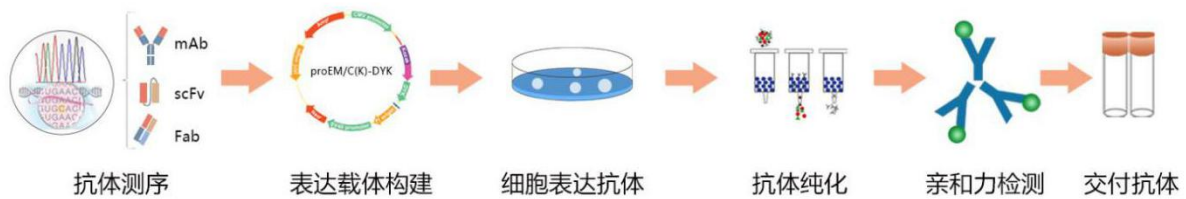
一、蛋白表达（哺乳动物细胞表达）蛋白被细胞充分修饰，活性有保障



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

