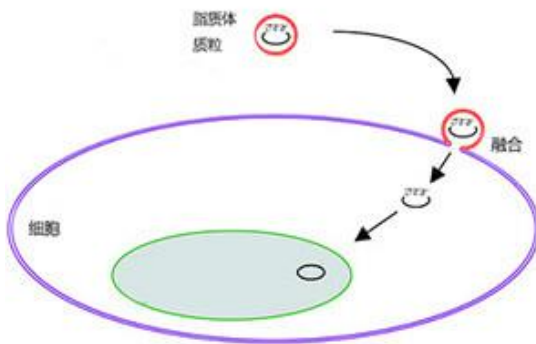


瞬时转染和稳定转染实验流程

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，按十字方向轻轻混匀，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℃ 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℃ 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℃ 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](#)

更多优质服务推荐

1

SingleB® mAb Discovery Service

SingleB®单B细胞快速单抗发现

德泰生物提供SingleB®单B细胞快速单抗发现服务,利用SmartFlow® FACS记忆B细胞筛选平台与DeepLight®浆细胞筛选平台,实现记忆B细胞与浆细胞的双筛选。平台适用于小鼠、兔、羊驼、人源化小鼠、绵羊等多种免疫对象,从动物免疫到获得单抗,快至29天,比传统杂交瘤技术至少节省120天。

平台优势



支持蛋白、多肽、细胞、病毒等多种类型抗原免疫



记忆B细胞 & 浆细胞双筛选,保证B细胞多样性



单细胞扩增阳性率高,无需刺激培养,减少多样性损失



重轻链天然配对,亲和力更优



高通量,周期短,单抗发现快至29天



ELISA、FACS、WB、IHC等多平台验证

可开发单抗物种



小鼠



兔



羊驼



人源化小鼠



猪



犬

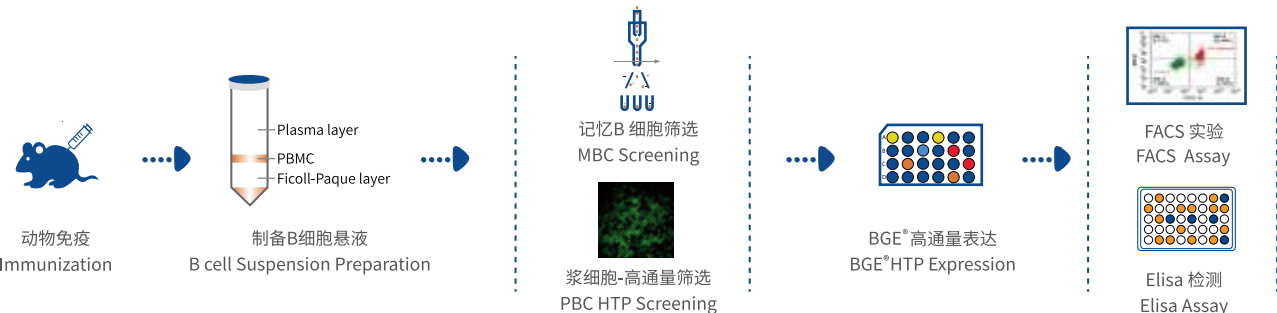


绵羊



人

服务流程





Recombinant Antibody Expression Service

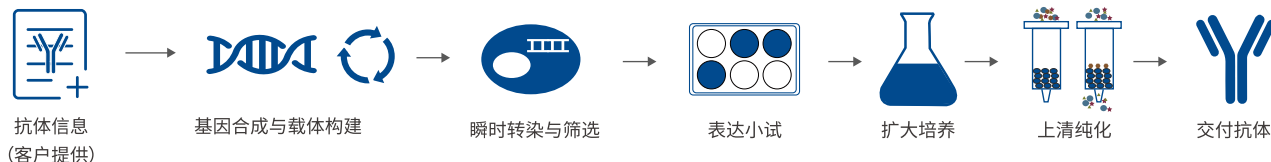
重组抗体表达

德泰生物拥有完善的重组抗体表达与纯化体系、抗体多工艺质量验证体系。已交付的重组抗体项目种类包括scFv、Fab、 $(\text{Fab}')_2$ 、VHH、嵌合抗体、双特异性抗体、Fc融合蛋白、全长IgG、IgM。cGMP标准的百级洁净细胞房及生物反应器用于HEK293/CHO细胞的小试及大量培养。HPLC纯度、内毒素、浓度等要求均可以根据您的下游应用进行定制。

服务优势



服务流程

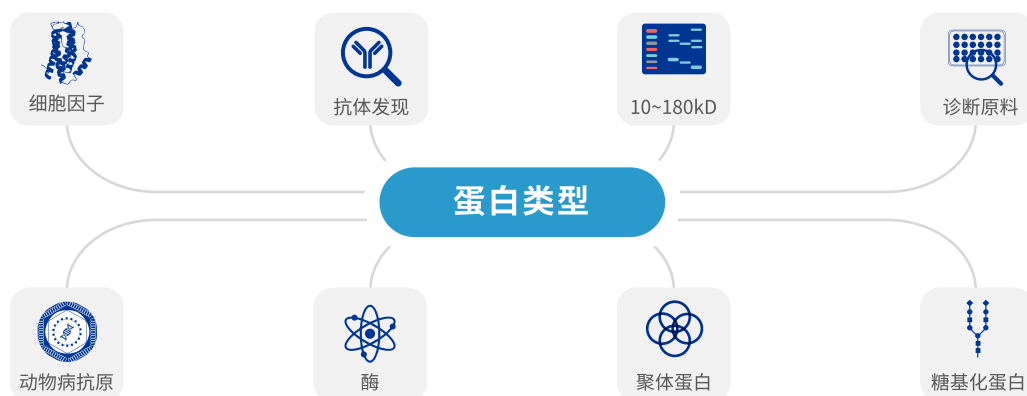


Recombinant Protein Expression Service

重组蛋白表达

原核蛋白表达系统、哺乳动物细胞蛋白表达系统

德泰生物拥有完善的原核蛋白表达与纯化体系和哺乳动物细胞蛋白表达与纯化体系。基于细胞因子、酶、诊断原料蛋白的工业化需求，我们配备了发酵设备并推出了大规模发酵制备服务；我们还配备了cGMP标准的百级洁净细胞房及生物反应器，用于HEK293/CHO等真核细胞的小试及大量培养。



4 Hybridoma Antibody Gene Sequencing Service

杂交瘤抗体基因测序

德泰生物拥有mRNA全长测序平台和Failsafe®假基因排除技术,能够提供快速、可靠的杂交瘤抗体基因测序服务。

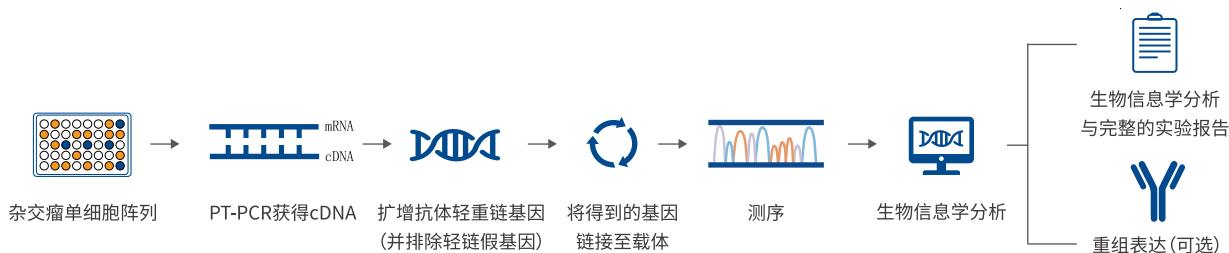
应用场景

- 抗体序列保护:获取抗体基因序列后可通过专利对CDR区进行保护。
- 生产方式备份:杂交瘤存在退化转阴风险,抗体序列可通过基因工程方式轻松转化为抗体样品。
- 抗体工程改造:获得的抗体序列可用于抗体人源化、双特异性抗体等抗体工程改造。

服务优势

- 极速体验:测序5天,表达5天,全程高通量
- 细胞需求少:只需1~5个细胞,可以接收孔板样品
- 保证测序结果准确:采用Failsafe®假基因排除技术,可排除k轻链假基因
- 测序范围广:可测小鼠、大鼠、兔、羊等物种的IgM和IgG的所有亚型
- 一站式服务:德泰生物拥有丰富经验,可提供表达验证服务

服务流程

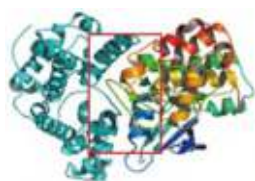


5 Biomolecular Interaction Analysis Service

分子间相互作用检测

德泰生物提供的分子间相互作用检测服务基于表面等离子共振 (SPR) 平台及生物膜干涉技术 (BLI) 平台,能够实现对分子间亲和力的定量和定性分析。与传统的GST pull down, 免疫共沉淀, 酵母双杂交等相比, 具有更高的灵敏度、检测通量及较低的样品要求等优点。

检测范围



蛋白和蛋白



蛋白和小分子



蛋白和抗体



蛋白和抗体Fab片段

检测范围包括蛋白-蛋白、抗体-抗原、抗体片段-抗原、蛋白-抗体、蛋白-小分子、抗体-多肽、蛋白-DNA、DNA-DNA间的相互作用。



Antibody Humanization Service

抗体人源化

德泰生物人源化改造服务基于人工智能之深度学习算法,通过构建抗体结构模型、CDR移植与回复突变、识别关键氨基酸及人源化运算,获得人源化程度高且突变能低的抗体序列。

服务优势



重链和轻链同时参与优化



改造后的抗体人源化程度>90%



人源化抗体的亲和力与初始抗体相当



可进行多物种的抗体人源化

服务流程

- 1 Antibody sequence confirmation
- 2 Human germline acceptor selection
- 3 CDR grafting
- 4 Back mutation
- 5 Mutation energy ranking
- 6 Antibody expression
- 7 Affinity ranking



Stable Cell Line Development Service

生产型稳转细胞株构建

德泰生物提供高表达哺乳动物稳定细胞株构建服务,筛选过程使用先进的可视化DeepLight®单克隆细胞筛选平台,较传统筛选流程快近100天,大大缩短了稳定细胞株的开发周期。

DeepLight®细胞筛选平台的优势

	有限稀释法筛选	DeepLight® On-chip筛选
筛选时间	8周	1天
细胞分离效率	低	高
筛选通量	低	高
单细胞水平筛选	否	是

服务流程



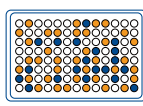
基因合成&质粒抽提



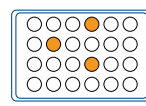
稳定转染



On-chip筛选



压力筛选



扩大培养



交付单克隆细胞株

服务优势



更快的筛选速度

从DNA到细胞株
较传统方法快近100天



百k级筛选通量

一次筛选640k细胞
优选高表达细胞株



可视化筛选结果

先进DeepLight®平台
高表达细胞株实时成像



稳定高产

可稳定转代50代
重组单抗可达5 g/L