

# 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

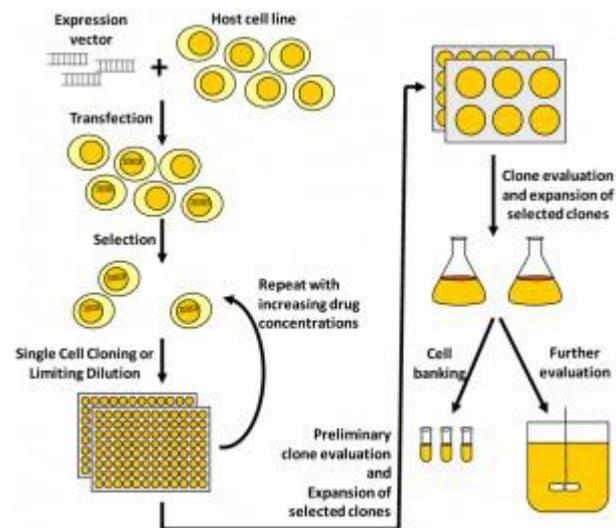
细胞复苏是将保存在液氮冰箱中的细胞株解冻并重新培养的过程，将哺乳动物细胞进行复苏用于后续的细胞转染。细胞复苏的关键是快融，防止在解冻过程中，产生的水珠形成冰晶损伤细胞。（查看[细胞复苏及细胞传代培养实验操作](#)）

## 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	

# 更多优质服务推荐



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。

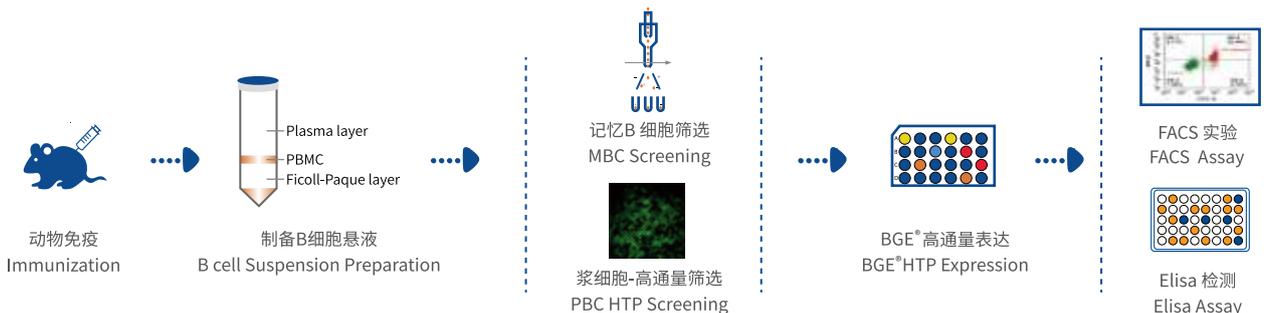
### 平台优势

- 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



### 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、(Fab')<sub>2</sub>、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

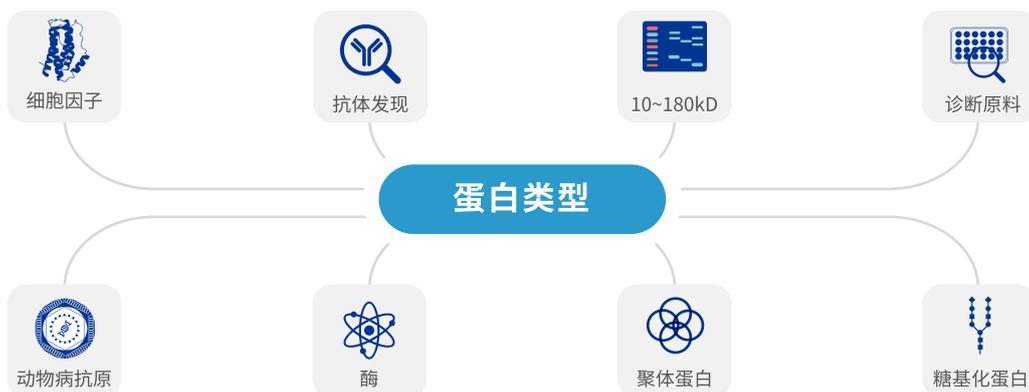


Recombinant Protein Expression Service

## 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。

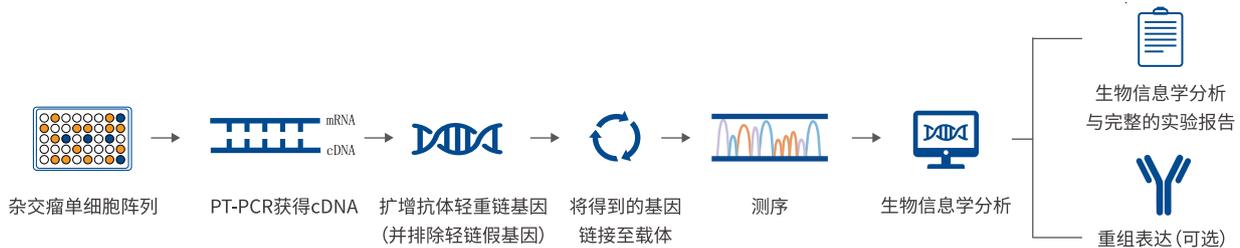
### 应用场景

- 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κ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



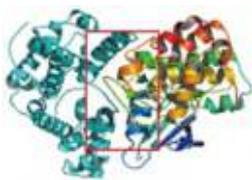
# 5

Biomolecular Interaction Analysis Service

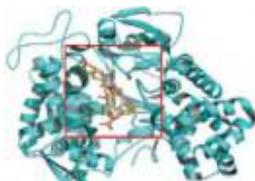
## 分子间相互作用检测

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。

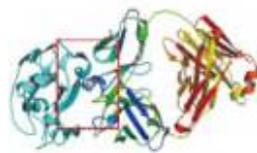
### 检测范围



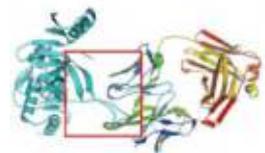
蛋白和蛋白



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。

# 6

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

# 7

Stable Cell Line Development Service

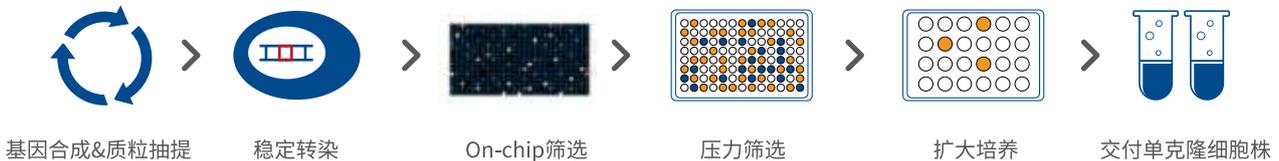
## 生产型稳转细胞株构建

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



### 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