



GenePharma

股票代码：430601

吉玛基因
www.genepharma.com

稳定细胞系构建服务

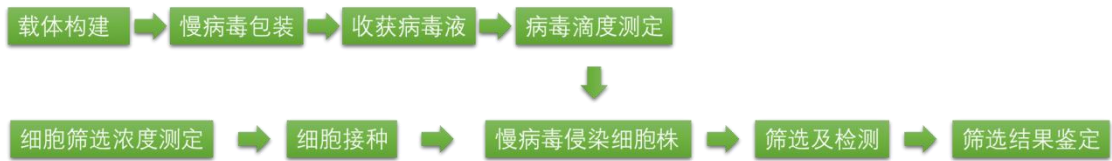
一、服务简介：

稳定表达细胞株指在细胞中持续稳定表达特定基因或干扰特定基因表达。在稳定细胞株中，目的基因整合到细胞染色体上，使细胞长期稳定表达该基因或持续干扰目的基因。

稳定细胞株包括多克隆稳定细胞株和单克隆稳定细胞株。慢病毒侵染目的细胞后，通过慢病毒介导的抗性基因，筛选得到细胞株是多个细胞克隆的组合，称为多克隆稳定细胞株；单克隆细胞株是从多克隆细胞中经单克隆化筛选得到的，是由一个细胞扩增得到的细胞株。单克隆细胞株性状统一，传代过程中细胞的基因表达能够保持稳定。

吉玛基因在由质粒及慢病毒系统方法获得稳定细胞株上具有丰富的经验，对于难转染的细胞系，通过电转法可以获得较高的转染效率。

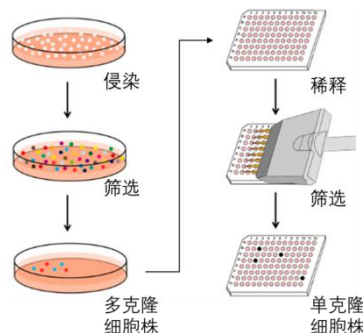
二、服务流程：



三、稳定细胞株筛选方法

1. 质粒转染介导的稳定细胞系：基因过表达，如果转染效率达 50%-70%，基因过表达基本满足实验需求。但是基因干扰实验对转染效率的要求较高，质粒转染的手段通常无法满足实验需求。另外，质粒在细胞中很快降解，最多维持 72 h-96 h，无法满足较长时间的检测项目；质粒转染整合几率极低，稳定细胞株构建耗时耗力，且得率很低，往往需要挑取单克隆株。
2. 病毒侵染筛选稳定细胞株：病毒感染方法较质粒转染筛选单克隆方法更方便和高效，是目前主流的稳定细胞系筛选方法。用慢病毒侵染稳转细胞株，由于其高效整合、高效转录、高效表达、宿主范围广，感染效率高，且与细胞染色体整合而不发生基因重排，是制备稳定细胞株的理想载体。

四、模式图：





GenePharma

股票代码：430601

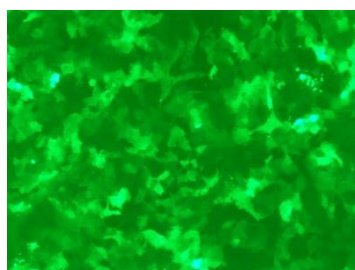
吉玛基因
www.genepharma.com

五、实验操作

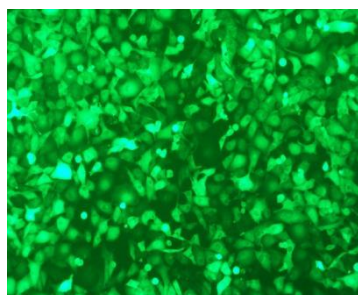
慢病毒侵染流程可参考吉玛基因《吉玛重组慢病毒操作手册》，
下载网址如下：<https://www.genepharma.com/public/upload/1554370505.pdf>

稳筛时 puromycin 抗性及 Neo 抗性药物最小浓度确认的方法可参考吉玛基因《嘌呤霉素盐酸盐 (Puromycin)》及《G418 硫酸盐溶液》的说明书，
下载网址如下：<https://www.genepharma.com/public/upload/1554366910.pdf>
<https://www.genepharma.com/public/upload/1554366727.pdf>

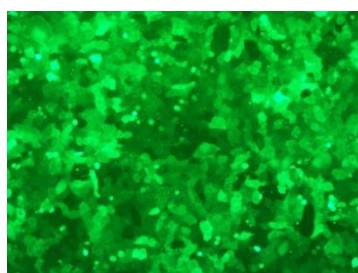
六、实验结果



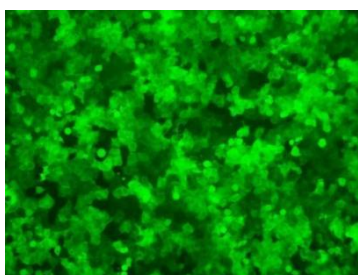
细胞 A 稳转细胞系



细胞 B 稳转细胞系



细胞 C 稳转细胞系



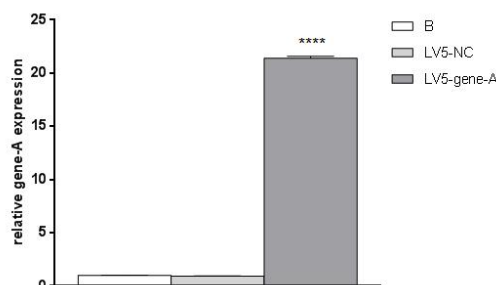
细胞 D 稳转细胞系



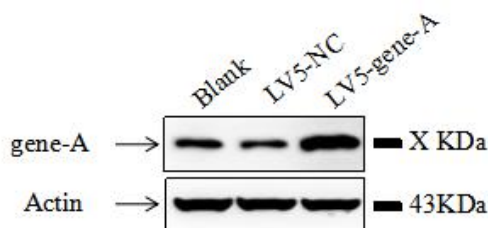
GenePharma

股票代码: 430601

过表达稳筛株结果模式图:

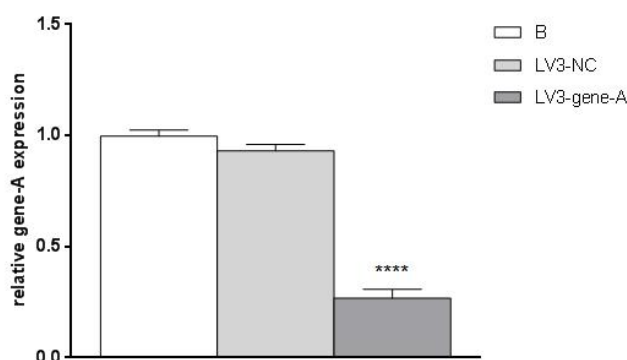


稳筛-q-PCR: 以 B 为校准 h-ACTB 为内参 gene-A 基因 mRNA 表达水平
注: B: 空白对照组; LV5-NC: 阴性对照组; LV5-gene-A: 过表达组



稳筛-wb: 样本 gene-A 检测结果 (以 Actin 为内参)
注: B: 空白对照组; LV5-NC: 阴性对照组; LV5-gene-A: 过表达组

干扰达稳筛株结果模式图:



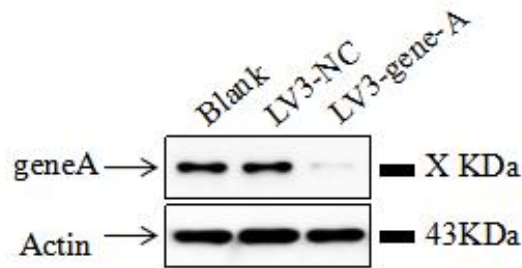
稳筛-q-PCR: 以 B 为校准 h-ACTB 为内参 gene-A 基因 mRNA 表达水平
注: B: 空白对照组; LV3-NC 阴性对照组; 干扰片段: LV3-gene-A-1



GenePharma

股票代码: 430601

吉玛基因
www.genepharma.com



稳筛-wb: 样本 gene-A 检测结果 (以 Actin 为内参)

注: B: 空白对照组; LV3-NC 阴性对照组; 干扰片段: LV3-gene-A

七、细胞稳筛服务的常见问题与解决方案

Q1: 如何确定筛选时细胞浓度?

A1: 细胞的密度, 太稀有可能细胞会死亡, 太密不利于后面的荧光观察。96 孔板大部分细胞可以接种 $1-5 \times 10^3$ /孔, 具体接种量要根据不同细胞的生长速度来确定。

Q2: 加压筛选如何选择最佳抗生素浓度?

A2: 首先是正常细胞必须全部死亡, 其次就是根据各孔细胞死亡情况来确定, 一般选择死亡超过 50%, 细胞生长速度较其它孔不会明显降低。因为细胞死亡少的话可能会有很多低表达量的细胞存在, 如果细胞死亡过多, 也会导致细胞扩增很慢, 不利于快速获得稳定细胞株;

嘌呤霉素的浓度设置, 可以去参考文献, 根据文献推荐的浓度来进行梯度设置, 如果没有文献支持, 可以多设置梯度去筛选; 选择了最佳的嘌呤霉素浓度, 不代表后面一直用这个浓度, 要根据细胞的生长情况来判断, 适时的去增减嘌呤霉素的浓度。

Q3: 我选择单克隆还是多克隆构建稳定细胞株?

A3: 多克隆细胞株制备周期短, 过表达和干扰效果往往也很好, 但随着传代次数的增加, 过表达和干扰效果可能会下降; 单克隆细胞株传代方面会比多克隆好, 但其制备周期长, 检测成本也翻很多倍。如果想要获得一株高表达或者高干扰的稳定株, 需要筛选很多单克隆细胞去进行检测, 工作量会增大很多倍。如果想获得效果好的单克隆细胞株, 建议是增加筛选的总量。很多研究者正是因为筛选总量不够, 或者的单克隆细胞株数量有限, 也就导致了很难筛到效果好的细胞株。
稳筛株相关实验:

Q4: 侵染效果不好

A4: 如果您初次使用慢病毒或采用了新的细胞系, 建议您首先对目的细胞进行侵



GenePharma

股票代码：430601

吉玛基因
www.genepharma.com

染效率评价，并优化慢病毒侵染滴度和剂量。

Q5:瞬时 mRNA 和 wb 表达结果不一致

A5: (1) 增加检测时间点

(2) 考虑更换不同抗原表位的抗体进行检测

Q6:沉默效果不理想，应该如何处理？

A6:最常见的影响沉默效果的两个原因是：侵染效率低和 shRNA 序列设计的效果不理想，如果已经提高了侵染效率但是沉默效果仍然未达到要求，可能是因为 shRNA 序列设计的效果不理想，可以考虑重新设计片段。



B047-V001-20210514