LV 稳定细胞株筛选手册

预实验

确定 MOI 值（实验步骤详见“细胞实验--病毒感染 MOI 预实验”中描述），并设置药物用量梯度。

第 1 天进行细胞铺板，保证第 2 天细胞汇合度达到 90 %。按照设置的药物用量梯度加入药物，复孔一次。第 4 天换液后，重新加入与第 2 天浓度相同的药物。第 7 天观察细胞生长情况，找到致死率为 100 %的孔，使用该孔药物剂量，即为药物筛选浓度。

稳转株筛选和构建

细胞铺板

第 1 天将细胞接种于 6 孔板中（4 个孔），使第 2 天细胞汇合度约 70%。

病毒上清

分别弃去 6 孔板中 3 个孔的 0.5 毫升培养基、1 毫升培养基、2 毫升培养基和，分别加入 2 毫升病毒上清、1.5 毫升病毒上清和 0.5 毫升病毒上清。

纯化病毒

选 3 个孔，并可按推荐 MOI、大于此 MOI 及小于此 MOI，共三个 MOI 值，添加病毒；

观察感染效率

感染后 72 小时，观察感染效率，效率高于 80%最佳，最低不应低于 40%，选择 1-2 个感染效率较好的孔。

多克隆稳转株筛选

从感染 72 小时后开始于 6 孔板中加筛选药物，每隔 2 天，重新换液加入药物。药物筛选需至少持续 14 天，直至显微镜下观察荧光细胞比例为 100%。

注：第一次加入药物时在上午进行，4-6 小时后观察细胞状态，如细胞死亡过多，需更换新鲜不含药物的培养基。

单克隆稳转株筛选

建立在获得多克隆稳转株基础上。

1） 有限稀释法：

① 取 24 个 1.5 毫升 EP 管，每管中加入 800 毫升完全培养基；

企业名称 ： 布林凯斯生物技术有限公司
地址 ： 中国·武汉经济技术开发区 华中智谷
Tel: +027-8439-6606 | E-mail: j.li@wiat.ac.cn

② 用胰酶将多克隆稳转株消化（90%汇合度，10 毫升培养基终止消化），取 80 微升至第一个 EP 管中，混合均匀；

注：应使用 1000 微升枪尖，混合时不要过度吸打，以免破坏细胞。

③ 从第一个 EP 管中取 80 微升至第二个 EP 管中，混合均匀，以此类推。

④ 将 EP 管中的细胞悬液，以每孔 100 微升，接种于 96 孔板中；

⑤ 过夜培养后，观察第 12-24 列，寻找只含有 1 个细胞的孔，并做好标记；

⑥ 培养 3-4 周，待标记孔中细胞扩增后，消化传代扩增，即为单克隆稳转株细胞。

注：培养的第一周不要换液，接下来每 3-4 天换液。

2） 平板挑取法

① 计数 100 个多克隆稳转株细胞，接种于一个 10cm 培养盘中；

注：尽量吹打均匀，防止细胞聚团。

② 过夜培养后，观察并寻找单个细胞的位置，并在盘底做标记；

③ 培养 2 周；

注：培养的第一周不要换液，接下来每 3-4 天换液。

④ 待标记处的细胞扩增为肉眼可见的白点，使用 10 微升移液器，调至最大量程，在尖端吸取一点胰酶（约 5 微升，且尖端为空气），缓慢滴至白点处，保持枪尖静置在白点上，且不让胰酶留出白点所在范围，1min 后，迅速吹打，将消化下的细胞转移至 96 孔板中，传代扩增，即为单克隆稳转株细胞。约需 2-3 周。

注：每盘选取 20 个为宜，在消化时，需按照先消化边缘