



稳转细胞构建实验报告

一、实验器材及试剂

1、实验器材

名称	厂家	型号
立式冷藏柜	海尔	SC-332
台式高速冷冻离心机	湖南恒诺仪器设备有限公司	2-16R
超净工作台	苏净安泰	SW-CJ-1FD
CO ₂ 细胞培养箱	Thermo	4131
电热恒温水浴锅	恩谊	HH-48

2、主要实验试剂及耗材

耗材	厂家	货号
1.5 ml 离心管	安徽科兔生物科技有限公司	KTL-15-W
2 ml 研磨管	安徽科兔生物科技有限公司	KTL-20-W
10 μ l 移液器	安徽科兔生物科技有限公司	KTY-10
100 μ l 移液器	安徽科兔生物科技有限公司	KTY-100
200 μ l 移液器	安徽科兔生物科技有限公司	KTY-200
1000 μ l 移液器	安徽科兔生物科技有限公司	KTY-1000
5000 μ l 移液器	安徽科兔生物科技有限公司	KTY-5000
T25	安徽科兔生物科技有限公司	KTP-25-T
胰酶	安徽科兔生物科技有限公司	RG-CE-18
PBS 缓冲液	安徽科兔生物科技有限公司	RG-RT-01
DMEM 培养基	安徽科兔生物科技有限公司	RG-CE-2
血清	安徽科兔生物科技有限公司	CG-SR-02
6 孔板	安徽科兔生物科技有限公司	KTB-6
Lipofectamine 3000	赛默飞	L3000015
Opti-MEM	赛默飞	31985070



二、实验步骤

- 1) 铺板：将 HEK293T 细胞接种于 6 孔板（或按实验需求选择 12/24 孔板），使转染时细胞融合度达到 50–70%。通常提前 18–24 h 接种。铺板量：6 孔板： $2.0\text{--}3.0 \times 10^5$ cells/well；12 孔板： $1.0\text{--}1.5 \times 10^5$ cells/well；24 孔板： $0.5\text{--}0.8 \times 10^5$ cells/well
- 2) 根据实验目的设计目标基因序列。若进行过表达实验，将目标基因 CDS 序列克隆至慢病毒过表达载体中；若进行敲低实验，则设计针对目标基因的 shRNA 序列并连接至慢病毒干扰载体中。
- 3) 构建完成后进行菌液 PCR、酶切鉴定或测序验证，确认插入序列及读码框正确。测序无误后，提取高纯度质粒用于后续病毒包装。
- 4) 将 HEK293T 细胞接种于培养皿或培养板中，使转染当天细胞密度达到约 70%–80%。按照载体质粒、包装质粒和包膜质粒的比例进行共转染。
- 5) 转染后 6–8 h 可根据细胞状态更换新鲜完全培养基。继续培养 48 h 和 72 h 后分别收集病毒上清。收集的病毒液经离心去除细胞碎片，并可使用 $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜过滤。根据实验需要，可直接使用病毒上清感染细胞，或进行病毒浓缩后保存于 -80°C 备用。
- 6) 将目的细胞提前一天接种于 6 孔板或其他合适培养容器中，使感染当天细胞密度约为 40%–60%。加入适量慢病毒液，并加入 Polybrene 以提高感染效率。
- 7) 感染 12–24 h 后更换为新鲜完全培养基。若感染载体带有荧光标记，可在感染后 48–72 h 通过荧光显微镜观察荧光表达情况，初步判断感染效率。
- 8) 对于感染效率较低的细胞，可适当提高病毒 MOI，或进行二次感染。
- 9) 感染后 48–72 h 开始加入相应抗生素进行筛选。筛选前应先进行抗生素杀伤曲线实验，确定目的细胞对抗生素的最低有效筛选浓度。
- 10) 以嘌呤霉素为例，常用筛选浓度一般为 $1\text{--}5 \mu\text{g/mL}$ ，但不同细胞系差异较大，应以预实验结果为准。筛选期间每 2–3 d 更换含抗生素的新鲜培养基，持续筛选约 5–10 d，直至阴性对照细胞基本死亡，实验组剩余细胞状态稳定。
- 11) 筛选完成后，可降低抗生素浓度进行维持培养，获得稳定表达或稳定敲低的细胞群体。
- 12) 根据实验需求，可选择获得混合稳定株或进行单克隆筛选。
- 13) 若采用混合克隆，筛选后存活细胞扩增培养即可用于后续验证和实验。该方法周期较短，能降低单克隆差异带来的偏倚。



14) 若需获得单克隆细胞株，可采用有限稀释法、单细胞分选或克隆环挑取法进行单克隆分离。将单细胞接种至 96 孔板中，待克隆形成后逐步扩增至 24 孔板、6 孔板及培养瓶。随后对各克隆进行表达水平检测，筛选目标基因表达变化最明显且细胞状态良好的克隆用于后续实验。

三、结果判读

稳转细胞构建结果主要看三点：是否感染/筛选成功、目标基因是否稳定改变、功能表型是否符合预期。

四、注意事项

- 1、稳转构建周期较长，细胞状态直接影响感染效率和筛选成功率。
- 2、稳转一般优先采用慢病毒感染法。病毒滴度过低会导致阳性细胞比例低，后续筛选困难；病毒滴度过高则可能引起细胞毒性或影响细胞状态。