

分类号: Q816

单位代码: 10363

密 级: 公开

学 号: 2210530124

高产重组蛋白 CHO 细胞高通量液滴筛选系统的构建
Development of a high-throughput screening system for droplets of
high-yield recombinant protein CHO cells

学生姓名: 周捷
指导教师: 邢新会 教授
专 业: 生物与医药
研究方向: 合成生物学

论文答辩日期: 2024 年 5 月 30 日

安徽工程大学学位论文原创性声明

本人郑重声明：我恪守学术道德，崇尚严谨学风。所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已明确注明和引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品及成果的内容。论文为本人亲自撰写，我对所写的内容负责，并完全意识到本声明的法律后果由本人承担。

学位论文作者签名：周捷

日期：2024 年 5 月 30 日

安徽工程大学学位论文版权使用授权书

学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅或借阅。本人授权安徽工程大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文。

保密 ☐，在 _____ 年解密后适用本版权书。

本学位论文属于

不保密 ☒。

学位论文作者签名：周捷

日期：2024 年 5 月 30 日

指导教师签名：邢新彦

日期：2024 年 5 月 30 日

高产重组蛋白 CHO 细胞高通量液滴筛选系统的构建

摘要

随着生物制药技术的迅速发展,底盘细胞的选择成为了药物研发过程中的关键环节。中国仓鼠卵巢细胞(Chinese Hamster Ovary cells, 简称 CHO 细胞)因其独特的生物学特性和广泛的应用前景,在生物制药领域受到了广泛应用。传统 CHO 细胞单克隆株细胞株耗时长久、效率低下、成本高昂。在最近这些年以来,液滴微流控技术的得到了极大的发展。特别是在生物育种这些方面,和传统相比带来了巨大的改变,液滴微流控其具有超高的筛选通量以及具有更好的筛选效果。并且,此系统目前还没有被应用在高产 CHO 细胞筛选。

本文提出了一种基于荧光激活液滴分选(Fluorescence-activated droplet sorting, FADS)技术的高产 CHO 细胞筛选方法,首先搭建了适用于 CHO 细胞的液滴操作平台,基于绿色荧光蛋白(eGFP)的传感器传感器,建立了荧光检测方法,每天可筛选 10^5 个转染细胞,相对于传统的筛选方法降低了文库中假阳性细胞的概率,可省略 ELISA 试验筛选高产细胞。

(1) CHO 细胞高通量筛选的液滴操作平台搭建。通过构建液滴生成芯片、注入芯片和分选芯片,稳定生成直径 20-90 μm 的液滴;采用注入芯片以 5 nL/s 流速、500 个每秒的注入速度将检测试剂注入带有目标细胞的液滴;通过分选芯片,以每秒超过 100 个的分选速度分选液滴。结果表明,对于包含绿色荧光蛋白 eGFP 的液滴,分选准确性在 99%以上。

(2) 高产 CHO 细胞的筛选与鉴定。分别将高产 CHO 细胞与野生型 CHO 细胞进行混合，设置高产细胞分别占 0.1%、1%和 10%进行筛选，生成 33 pL 的液滴进行培养 24 小时。24 小时后将 2 μ M 的 GBP4 与 eGFP 混合溶液以 5 nL/s 流速注入液滴中，然后将注入后的液滴进行分选。收集分选后的液滴，采用 1H,1H,2H,2H-全氟辛醇裂解液滴，收集细胞在 96 孔板中制备单克隆细胞，将获得的单克隆细胞扩增后检测上清液中的 RSPO-1 蛋白表达情况。结果显示各组，富集倍数分别达到了 800 倍、90 倍和 10 倍。

(3) 高产 CHO 细胞文库的高通量筛选与鉴定。在经过转染后，通过液滴微流控平台筛选文库与传统药物筛选对比。结果表明传统药物筛选的 10 株单克隆中有 4 个高产细胞，液滴微流控筛选系统筛选的 10 株单克隆细胞株均为高产细胞，为传统筛选效率的 2.5 倍，降低了假阳性的比例。

关键词：CHO 细胞，液滴微流控技术，荧光蛋白传感器,高通量筛选。

Development of a high-throughput screening system for droplets of high-yield recombinant protein CHO cells

ABSTRACT

With the rapid development of biopharmaceutical technology, the selection of chassis cells has become a key link in the drug development process. Chinese hamster ovary cells (CHO cells) have been widely used in the field of biopharmaceuticals due to their unique biological characteristics and wide application prospects. Traditional CHO cell monoclonal cell lines are time-consuming, inefficient, and costly. In recent years, droplet microfluidic technology has been greatly developed. Especially in the aspect of biological breeding, compared with the traditional has brought great changes, droplet microfluidics has ultra-high screening throughput and has better screening effect. Moreover, this system has not yet been used for the screening of high-yielding CHO cells.

In this paper, we propose a screening method for high-yield CHO cells based on fluorescence-activated droplet sorting (FADS) technology, in which a droplet operation platform suitable for CHO cells is built firstly, and a fluorescence detection method is established based on the green fluorescent protein (eGFP) sensor sensor, which can screen 10^5 transfected cells per day, which reduces the probability of false positive cells in the library compared with the traditional screening method, ELISA assays can be omitted to screen high-yielding cells.

(1) Construction of droplet operation platform for high-throughput

screening of CHO cells. Droplets with a diameter of 20-90 μm were stably generated by constructing droplet generation chips, injecting chips, and sorting chips. The assay was injected into droplets with target cells at a flow rate of 5 nL/s at a rate of 500 injections per second using an injection chip; Droplets are sorted at a sorting speed of more than 100 per second by means of a sorting chip. The results showed that the sorting accuracy was more than 99% for droplets containing green fluorescent protein eGFP.

(2) Screening and identification of high-yielding CHO cells. High-yielding CHO cells were mixed with wild-type CHO cells, and 0.1%, 1%, and 10% high-yielding cells were screened, and 33 pL droplets were generated for 24 hours. After 24 hours, 2 μM of the GBP4 mixed solution with eGFP was injected into the droplets at a flow rate of 5 nL/s, and the injected droplets were sorted. The sorted droplets were collected, and the cells were collected in 96-well plates using 1H, 1H, 2H, 2H-PFOOCTT lysate droplets, and the RSPO-1 protein expression in the supernatant was detected after the expansion of the obtained monoclonal cells. The results showed that the enrichment folds of each group reached 800-fold, 90-fold and 10-fold, respectively.

(3) High-throughput screening and identification of high-yield CHO cell libraries. After transfection, the library was screened by a droplet microfluidic platform compared to traditional drug screening. The results showed that there were 4 high-yielding cells among the 10 monoclonal strains screened by traditional drugs, and the 10 monoclonal cell lines screened by the droplet microfluidic screening system were all high-yielding cells, which was 2.5 times more efficient than the traditional screening efficiency, and the proportion of false positives was reduced.

KEY WORDS: CHO, droplet microfluidic technology, fluorescent protein sensor, High-throughput screening.

目 录

摘要.....	I
ABSTRACT.....	III
第一章 绪论	1
1.1 CHO 细胞在生物制药市场的重要性.....	1
1.2 高产单克隆 CHO 细胞构建的必要性.....	1
1.3 高产单克隆 CHO 细胞开发.....	1
1.3.1 基于外源抗性基因的筛选系统	1
1.3.2 基于荧光信号的筛选方法	2
1.3.4 荧光激活液滴分选.....	5
1.4 课题的研究意义及内容	7
1.4.1 研究意义	7
1.4.2 研究内容	8
第二章 高产 CHO 细胞高通量筛选的液滴操作平台搭建.....	9
2.1 引言	9
2.2 实验材料	12
2.3 实验方法	13
2.3.1 微流控芯片的加工	13
2.3.2 液滴的生成	14
2.3.3 液滴的注入	16
2.3.4 液滴的分选	17
2.4 结果与分析	17
2.4.1 液滴大小、生成速度与泵压表征曲面图	17
2.4.2 senser 注入液滴稳定性验证	18
2.4.3 液滴分选准确性	19
2.5 本章小结	20
第三章 高产 CHO 细胞的模式筛选.....	21
3.1 引言	21
3.2 实验材料	21
3.2.1 细胞株	21
3.2.2 培养基	22

3.2.3 实验试剂	22
3.3 实验方法	22
3.3.1 CHO 细胞培养	22
3.3.2 用于 CHO 细胞液滴生成	23
3.3.3 皮升级液滴单细胞生成和培养	24
3.3.4 细胞在液滴中培养活性检测	24
3.3.5 单细胞液滴中 RSPO-1 蛋白的表达检测	24
3.3.6 高产 CHO 细胞模式筛选	25
3.3.6.1 电压信号的采集	25
3.3.6.2 Western Blot 检测模式筛选后的 RSPO-1 蛋白表达	25
3.4 结果与分析	27
3.4.1 用于单细胞液滴的生成密度选择	27
3.4.2 细胞在液滴中活性检测	27
3.4.3 Senser 注入时间的选择	28
3.4.4 高产细胞液滴筛选前后信号比较	29
3.4.5 设备筛选效率检测	29
3.5 本章小结	29
第四章 高产 CHO 细胞文库筛选	31
4.1 引言	31
4.2 实验材料	33
4.2.1 细胞株	33
4.2.2 培养基	33
4.2.3 实验试剂	33
4.3 实验方法	34
4.3.1 重组 GBP1-RSPO-1 真核表达载体的构建	34
4.3.2 重组 GBP1-RSPO-1 蛋白的鉴定	34
4.3.3 细胞文库筛选	34
4.4 结果与分析	35
4.5 本章小结	35
第五章 结论与展望	36
参考文献	39

第一章 绪论

1.1 CHO 细胞在生物制药市场的重要性

中国仓鼠卵巢（CHO）细胞是工业化生产重组治疗性蛋白药物最常用的宿主细胞之一。在 2019 年全球生物制药市场中，排名前 10 位有 8 种是生物制药，其中有 7 种是用 CHO 细胞生产的单克隆抗体^[1,2]，这主要是因为 CHO 细胞能够表达各种重组蛋白质，其翻译后修饰模式与人体细胞的蛋白质相似^[3]。CHO 细胞的基因组数据中与糖基化相关的转录本比例与人体细胞相似^[4]。使用 CHO 细胞生产的生物制剂，可良好的避免人类病毒感染。

1.2 高产单克隆 CHO 细胞构建的必要性

在当前的情况下，开发稳转细胞，需要将带有目的基因（GOI）的片段稳定地整合到 CHO 细胞的基因组之中。最常见的最普遍的方法是将 GOI 作为质粒的一部分随机整合到宿主基因组中，然后筛选转基因细胞^[5]。由于细胞间的异质性、基因拷贝数和染色体环境的差异等因素，很少能观察到单个转染细胞间蛋白质表达的同质水平^[6,7]。筛选单细胞分选的另一个原因是，经过转染和选择后，高产克隆在异质性细胞群中出现的频率很低^[8,9]。除了随机整合的不可预测影响外，CHO 细胞系和大多数永生化细胞系在基因型和表型方面也存在高度克隆变异^[10,11]。

1.3 高产单克隆 CHO 细胞开发

1.3.1 基于外源抗性基因的筛选系统

传统筛选方法是使用基于抗生素的抗性基因标记，赋予抗生素抗性，如 Geneticin、Zeocin、Hygromycin B 和 Puromycin^[13]。抗性基因筛选通常与传统的有限稀释法相结合，以获得单克隆。在传统的方式中，将细胞经过转染后，经过多轮的抗生素加压筛选，去除未整合到基因组的

细胞，然后将细胞进行有限稀释，通常采用 96 孔板或者 384 孔板。并通过 ELISA 和 Western 印迹进一步鉴定高产克隆。^[14]。

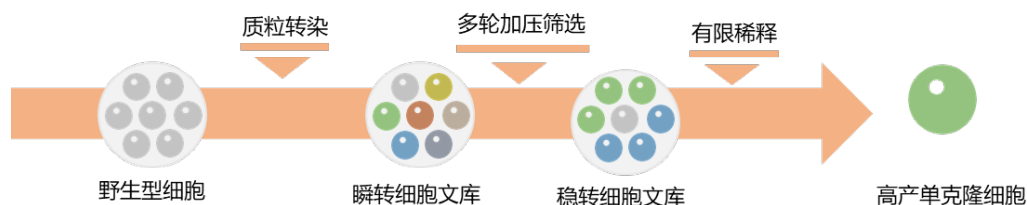


图 1-1 高产单克隆细胞开发路线

Fig.1-1 Development route of high-yield monoclonal cells

在传统筛选中虽然可以结合使用现代化的技术，比如使用机器人，但细胞系的生产开发依旧难以顺利完成，其时一项及其耗时、耗力、耗经济的工作，通常至少需要半年的时间，更久甚至数年。克隆筛选涉及多种的分析以及筛选方式与技术，以确保筛选出高产的克隆，这些克隆可生产滴度高、质量好、稳定的重组蛋白，且不会随着时间的推移而降低生产力^[15]。

1.3.2 基于荧光信号的筛选方法

流式细胞术已迅速成为最广泛使用的选择具有理想表型细胞的工具之一。其中，荧光激活细胞分选（FACS）根据确定的荧光水平对细胞进行分类（图 1-2）。流式细胞仪最理想的特点之一是其高通量能力，每分钟可分析数百万个细胞，从而节省时间、人力和资金等资源^[17]。分拣率由多种因素决定，如细胞的大小和密度。流式细胞仪除了是选择高表达变体的工具外，还可用于分析细胞生长和新陈代谢，这两者都会影响细胞的生产力^[18]。

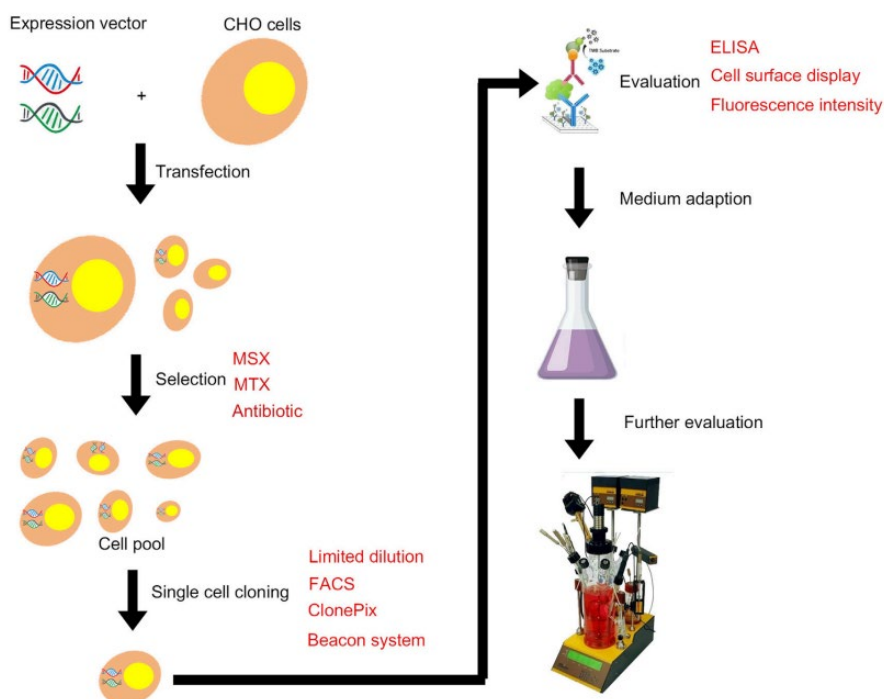
图 1-2 荧光筛选重组蛋白生产的哺乳动物细胞开发说明流程^[16]

Fig.1-2 Mammalian cell development process for fluorescently screened recombinant protein production

为了评估目标蛋白的表达水平，我们必须依赖于荧光信号作为流式细胞术中的关键指标。这通常涉及两种策略：首先，我们可以将目标基因（GOI）与报告基因一同表达，通过测量报告基因在不同克隆中的表达水平来间接推断 GOI 的表达水平^[19]；其次，我们可以直接针对 GOI 使用荧光标记的抗体来检测单个生产体表面或附近分泌的蛋白。值得注意的是，报告基因的表达通常保持在低于 GOI 的水平，以减轻对细胞生长和稳定性的潜在影响。在众多报告基因中，绿色荧光蛋白（GFP）、黄色荧光蛋白（YFP）和红色荧光蛋白（RFP）是常用的选择。然而，值得注意的是，高浓度的 GFP 可能对某些细胞产生毒性，从而影响细胞的生长和稳定性。尽管如此，一些研究表明，细胞的生产力与 eGFP 的突变体 GFPS65T 的荧光强度之间存在正相关关系。因此，利用这种荧光强度与细胞生产力之间的关联，我们可以有效地筛选出高产细胞株，而无需依赖复杂的 ELISA 方法，从而显著减少工作量。尽管荧光激活细胞分选（FACS）技术在单细胞水平上具有高通量和精确度的优势，使得其能够筛选具有目标表型的细胞，但它在分析胞外产物时面临着巨大的挑战。这主要是因为 FACS 主要适用于分析胞内或胞膜上的产物，而对于胞外产物的检测则需要其他更复杂的策略。因此，在利用流式细胞术评估目

标蛋白表达水平时，我们必须充分考虑这些因素，以确保实验的准确性和有效性

1.3.3 基于双乳化液滴的荧光激活细胞分选

最近这些年，微流控技术不断发展，重新乳化油包水的液滴，如图 1-3 所示，利用由鞘液携带的水包油包水双重乳化液滴，我们实现了基于流式细胞仪的液滴分选。目前，这种基于双乳化液滴的荧光激活细胞分选技术已成为高通量酶活筛选的有效手段之一，已成功应用于硫代内酯酶^[20]、噬热酯酶^[21]等多种酶的定向进化中。然而，水包油包水液滴操作繁琐，不利于双乳化液滴荧光分选技术的进一步发展和应用。另外双乳化稳定性差，因此，尽管已有少量成功案例报道，但普适性更高的荧光激活液滴分选技术仍更适用于高产 CHO 细胞的分选。为了突破这些限制，我们正在积极探索新的乳化方法和操作策略，以提高双乳化液滴荧光分选技术的稳定性和效率。我们希望通过这些努力，能够推动双乳化液滴荧光分选技术在更多领域的应用，为生物医学研究和工业生产带来更多的可能性。

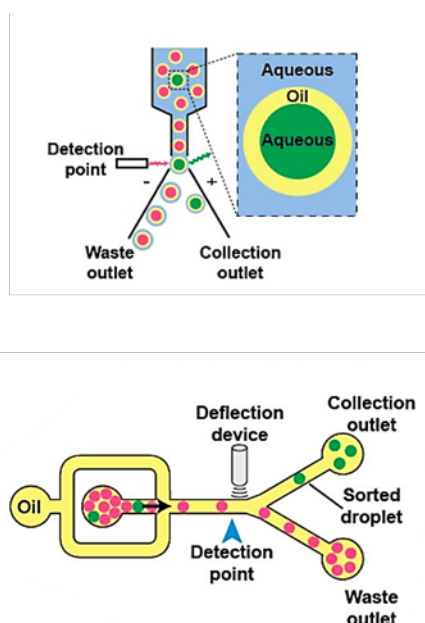


图 1-3 液滴分选策略^[22] (a) 基于双重乳化液滴的荧光激活细胞分选 (b) 荧光激活液滴分选 (FADS)

Fig.1-3 Droplet sorting strategies (a) Fluorescence-activated cell sorting based on double emulsion droplets and (b) Fluorescence-activated droplet sorting

1.3.4 荧光激活液滴分选 (FADS)

美国《Business 2.0》杂志将微流控技术列为“改变世界”的七大技术之一，《Nature》也称这一技术可能成为“这一世纪的技术”，该技术通过微型生物芯片可以实现常规实验室操作例如样品的制备、混合、反应、检测等，由此发展而来的液滴微流控技术具有超高通量、高灵敏度的特点^[23]。荧光激活液滴分选 (Fluorescence-activated droplet sorting, FADS) 是一种基于微液滴技术的超高通量筛选方法^[24]。如图 1-3b, FADS 技术，借助微流控芯片，展现出了对液滴进行精细操控能力。这一技术的操作单元涵盖了液滴的生成、注入、分裂、融合以及分选等多个步骤，每一步对液滴操作精准控制。操作速度高达每秒三万个液滴，微流控芯片作为 FADS 技术的核心，为液滴的生成提供了稳定且高效的环境。通过精确控制微通道内的流体流动，芯片能够迅速生成大小均匀、形态稳定的液滴。这一过程的实现，不仅提高了液滴生成的效率，还为后续的液滴操作奠定了坚实的基础。在液滴注入环节，FADS 技术展现出了其独特的优势。通过精确控制微流体的流动速度和方向，技术能够确保液滴在注入过程中不发生形变或破裂，从而保证了液滴的完整性和稳定性。这一环节的成功实现，为后续的液滴分裂、融合以及分选等操作提供了有力的保障。液滴分裂和融合是 FADS 技术中的两个重要环节。通过精确控制微流体的流动参数，技术能够实现液滴的精确分裂，使得每个分裂后的液滴都具有相同的体积和成分。同时，技术还能够实现不同液滴之间的精确融合，从而生成具有特定成分和功能的混合液滴。这些操作不仅丰富了液滴的多样性，还为后续的实验和应用提供了更多的可能性。最后，在液滴分选环节，通过精确识别和分析每个液滴的成分和特性，技术能够实现对液滴的快速分选。这一环节的成功实现，不仅提高了分选的准确性和效率，还为后续的实验和应用提供了更加纯净和可靠的样本。^[25]。已有研究报道了 FADS 用于辣根过氧化物酶的定向进化^[25]、以及生产淀粉酶的宿主酿酒酵母筛选^[26]。液滴生成时，油相剪切水相，形成液滴，表面活性剂它维持了液滴体系界面的稳定性，防止了液滴的破裂或融合。这些被表面活性剂稳定的液滴形成了一个独立的反应器，

为菌株及其产物的培养提供了良好的环境。这些细胞在液滴中生长、代谢，产生的产物被封装在液滴内部，与外界环境隔绝。为了实现对产物的有效检测，研究者们采用了荧光信号偶联技术，将产物与荧光信号连接起来。这样，当产物在液滴中生成时，就会释放出相应的荧光信号，使得液滴筛选过程可以直接在单细胞水平上进行，大大提高了筛选的效率和准确性。通过这一系列的液滴生成和筛选技术，我们可以实现对细胞及其产物的精确控制和研究。在细胞表达产物后通过激光器激发液滴的荧光，接收器输出液滴荧光强度并将其转化为电信号，当电信号高于所设定的阈值时，触发微液滴芯片检测模块的偏转装置，如电极对利用介电泳力使液滴进入收集通道，低于阈值的液滴由于电场未被激活而自然流入废液通道，从而实现对目标基因型细胞的液滴进行特异性分选^[27]。

尽管 FADS 技术具有应用价值，然而，其在实际操作中却面临着荧光标签的限制。这是因为 FADS 技术的有效实施，依赖于特定的荧光标记物质。这些荧光标签的研发过程充满挑战，不仅技术难度大，而且成本高昂。这种情况严重限制了 FADS 技术在各类实际项目中的广泛应用与推广。首先，FADS 技术的核心在于其能够通过对目标分子进行荧光标记，从而实现对其动态行为的精确追踪和观测。然而，目前可用于 FADS 技术的荧光标签种类有限，而且其制备过程复杂，需要高度专业化的设备和技能。此外，荧光标签的价格昂贵，使得许多研究机构和实验室难以承受其经济压力。其次，荧光标签的稳定性和生物相容性也是限制 FADS 技术应用的重要因素。在实际应用中，荧光标签可能会受到环境因素的影响，导致其荧光信号发生衰减或漂移，从而影响 FADS 技术的准确性和可靠性。同时，荧光标签在生物体内的行为也可能引发免疫反应或毒性问题，这进一步增加了 FADS 技术在生物医学领域应用的难度。

1.4 课题的研究意义及内容

1.4.1 研究意义

细胞系开发（Cell Line Development，简称 CLD）对于重组蛋白产品研发至关重要。在生物制药领域，缩短创新型重组治疗蛋白药物的上市时间不仅有助于生产商在有限的专利保护期内最大化产品的盈利潜力，还对市场竞争格局产生深远影响。CLD 技术的核心进步主要聚焦于蛋白质表达系统的优化以及高产克隆筛选技术的精进。通过改进蛋白质表达系统，科学家们能够更有效地在细胞中生产治疗性蛋白，从而提高生产效率并降低成本。同时，高产克隆筛选技术的突破使得研究人员能够迅速识别和筛选出具有高产特性的细胞系，从而加速药物的研发进程。此外，随着 CLD 技术的不断进步，生物制药生产商能够更加灵活地应对市场变化，快速响应未满足的医疗需求。这种灵活性不仅体现在产品的研发速度上，还体现在产品的多样性和个性化上。因此，CLD 技术的革新不仅推动了生物制药行业的快速发展，还为患者带来了更多更好的治疗选择。

在生物医药产业中，高效的细胞表达系统是药物研发和生产的关键。高产 CHO-S 细胞文库的筛选对于优化药物生产过程、提高药物产量和质量具有重要意义。通过筛选得到的高产细胞株，不仅能够提高药物的生产效率，降低生产成本，还能够保证药物的稳定性和安全性。因此，高产 CHO-S 细胞文库的筛选成为了生物医药领域的研究热点和难点

在高产 CHO 细胞高通量筛选方法的建立方面，国内外缺乏绿色荧光检测方法，传统的方法高产细胞获得率低、蛋白产量不稳定。高通量筛选技术能够通过自动化设备和数据分析软件，对大量细胞进行快速、准确的筛选。细胞工程技术则能够通过基因编辑、基因敲除等手段，对细胞进行定向改造，提高细胞的表达潜力。然而，现有的筛选方法仍存在一定的局限性，如筛选效率不高、细胞稳定性差等问题。因此，研发更加高效、稳定的筛选方法对于推动生物医药产业的发展具有重要意义。因此，我们的主要任务是通过液滴微流控技术开发更高效的高产 CHO 细胞筛选技术，首先绿色荧光检测方法，

接着结合液滴微流控技术，能快速获得大量的高产细胞，以进一步提高目标蛋白的生产水平。

1.4.2 研究内容

（1）高产 CHO 细胞筛选的液滴微流控平台构建：

为实现高产 CHO 细胞的高效筛选，我们开发了一个液滴微流控操作平台。这个平台集成了液滴生成芯片、液滴注入芯片和液滴分选芯片，具备生成、注入、分选液滴的全方位功能，生成芯片能够稳定地产生直径介于 20 至 90 微米之间的液滴，保证了实验的精准度；输入芯片的注入速度高达 500 赫兹，极大提升了实验效率；而分选芯片的分选速度也能达到 100 赫兹，确保了高通量的细胞筛选。

（2）绿色荧光检测技术的创新：

为了进一步提升筛选的精准性和效率，我们基于绿色荧光蛋白传感器 eGFP，开发了一种创新的液滴分选方法。eGFP 以其高灵敏度、快速响应、强特异性和高稳定性在生物传感器领域脱颖而出。在我们的方法中，eGFP 的应用使得液滴分选更加精准、高效，为高产 CHO 细胞的筛选提供了强有力的技术支持。

（3）高产 CHO 细胞稳转文库的高通量筛选与液滴微流控系统效果评估：

我们利用 CHO 细胞作为载体，结合试剂盒进行稳定转染，构建了一个高产 CHO 细胞稳转文库。随后，通过我们搭建的液滴微流控平台，成功分选出了荧光信号位于总液滴前 1‰比例的液滴。这一系统在短短 2 小时内便筛选了 10^5 个高产细胞，进一步筛选出 10 个具有显著高产特性的细胞株。

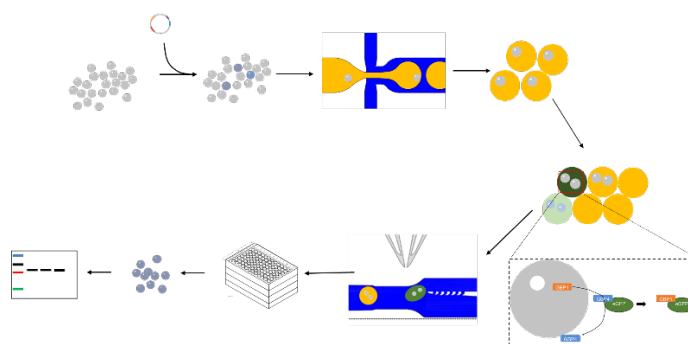


图 1-4 技术路线

Fig.1-4 Technical route

第二章 高产 CHO 细胞高通量筛选的液滴操作平台搭建

2.1 引言

细胞疗法作为现代生物医药领域的重要分支，在疾病治疗、组织工程和再生医学等领域展现出巨大的应用潜力。其中，CHO 细胞因其生长迅速、遗传背景清晰、表达外源蛋白能力强等特点，被广泛应用于生物制药领域，如生产重组蛋白药物、疫苗和基因治疗载体等。然而，CHO 细胞株的筛选和优化过程通常耗时耗力，传统的筛选方法往往受限于通量低、效率不高，难以满足现代生物医药产业对高效、快速、精准的需求。因此，开发一种高产 CHO 细胞的高通量筛选方法，对于提高药物研发效率、降低生产成本、推动生物医药产业发展具有重要意义。

近年来，FADS 技术的迅猛进步为庞大的稳定转染文库筛选带来了革命性的解决方案。这一筛选原理如图 2-1 所示，其核心构成包括动力系统、光路系统、电学系统、成像系统以及芯片系统。动力系统由压力泵提供，确保整个过程的稳定运行；光路系统则由激光器和光电转换器等组成，为操作提供精确的光照条件；电学系统通过电极电路等实现电信号的传输与控制；成像系统依赖相机和显示屏等设备，提供实时视觉反馈；而芯片系统则由微流控芯片组成，负责液滴的生成、操控和检测。FADS 技术的独特之处在于其平行性好、操作便捷且成本低廉。相较于传统方法，FADS 仅需毫升级别的培养基和检测试剂即可完成文库的筛选过程，极大地提高了实验效率和经济效益。然而，尽管 FADS 技术在多个领域都取得了显著成果，但在针对高产 CHO 细胞的筛选方面，目前尚未有相关的报道。这一现状表明，尽管 FADS 技术在文库筛选领域展现出了巨大的潜力，但仍需进一步的研究和探索，以克服现有技术瓶颈，实现其在水产 CHO 细胞筛选中的应用。未来，随着技术的不断进步和创新，我们有理由相信，FADS 技术将在生物工程和制药领域发挥更加重要的作用，为科学研究和产业发展带来更多的机遇和挑战。

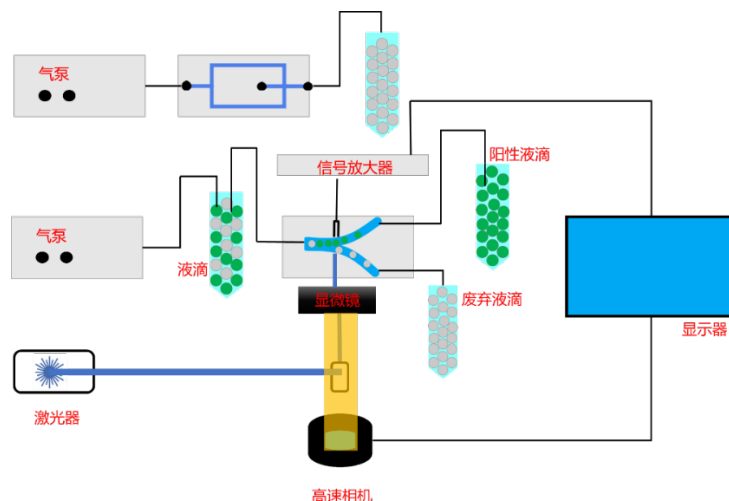
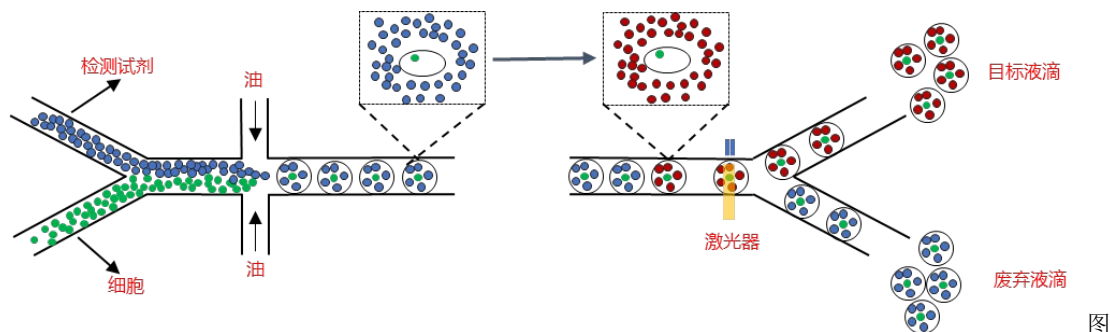


图 2-1 FADS 筛选技术原理

Fig.2-1 Principle of FADS technology

液滴操控模块涵盖生成、注入、分裂、融合以及分选等多个环节。每个模块都具备独特的操作功能，如生成环节能将试剂混合形成微液滴反应器，融合或注入环节则类似于在已形成的微反应器中添加额外的检测试剂。对于细胞筛选而言，分选功能则等同于挑选出具有特定表达的细胞。通过巧妙地组合这些液滴操控模块，我们能够满足不同的实验需求。一般而言，液滴操作主要依赖于生成和分选这两个模块。如图 2-2 所示，当液滴生成后，细胞在液滴中生长，经过一段时间产物表达，我们可以根据荧光强度来判断产物积累量，进一步完成液滴的分选过程。这种灵活的操作方式使得液滴操控在多个领域都展现出了广阔的应用前景。在上述过程中，每一个步骤都至关重要，它们共同构成了液滴操作的完整流程。从生成到分选，每一个环节都需要精确控制，以确保实验结果的准确性和可靠性。这种精密的控制能力使得液滴操控成为了一种强大而灵活的实验工具，为科研工作者提供了更多的可能性。



图

2-2 液滴的生成与分选

Fig.2-2 Droplet generation and sorting

在本章节中，我们构建了一个针对高产 CHO 细胞的高效筛选平台。该平台的核心在于如何构建液滴微反应器，进而培养能够分泌 RSPO-1 蛋白的 CHO 细胞，并在这些液滴表达 GBP1-RSPO-1 蛋白的产生。当液滴中生成了 GBP1-RSPO-1 后，我们引入特定的荧光检测试剂与其反应，将原本不可见的 RSPO-1 蛋白产量转化为强烈的荧光信号，从而便于观察和量化。接下来，我们筛选出那些荧光信号较强的液滴，破碎液滴后将其中的细胞转移到孔板中进行进一步的培养。通过梯度稀释，制备了单克隆细胞，并验证了其产 RSPO-1 蛋白的能力。

在挑选出高产细胞的过程中，我们选用了分选微流控芯片。主要由废液通道和收集通道两部分构成。废液通道的入口设计得相对较宽，因此阻力较小；而收集通道的入口则显得更为狭窄，相应地，其阻力也就更大。正是这样的设计特点，使得能够通过介电泳力对细胞进行精确的分选。当液滴中的荧光信号超过了预设的阈值时，电场会迅速被激活，进而将液滴极化并拉入分选通道。相反，如果液滴未被激活，它则会顺着阻力较小的废液通道流走。这种分选机制确保了只有满足条件的液滴才能被收集，从而大大提高了分选效率和准确性。液滴操作平台芯片的结构如图 2-3 所示。

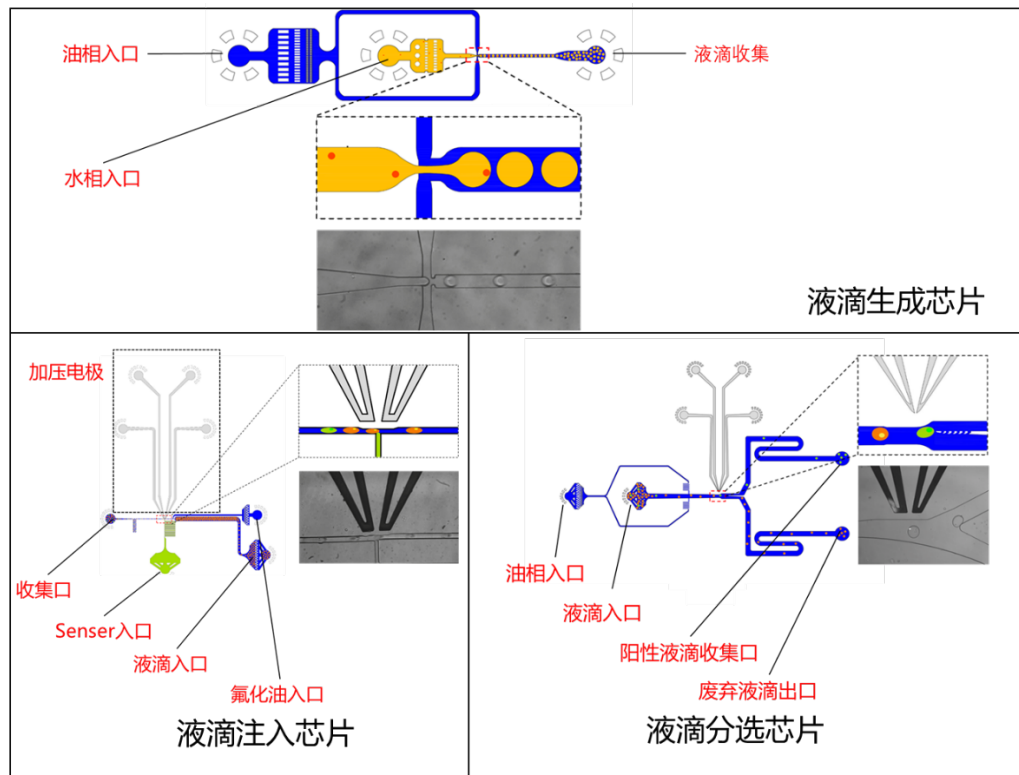


图 2-3 液滴操作芯片

Fig.2-3 Droplet manipulation chip

2.2 实验材料

2.2.1 实验试剂

本章实验中所用试剂如下表 2-1 所示

表 2-1 实验试剂

Table 2-1 Experimental reagents

试剂名称	厂家	等级
胰蛋白胨	OXOID	
甘油	国药集团化学试剂有限公司	分析纯
酵母提取物	BD	
琼脂粉	BD	
蛋白胨	BD	
氯化钠	国药集团化学试剂有限公司	分析纯
D-葡萄糖	Solarbio	≥99.0%
氟化油	Bio-Rad	
破乳剂	Bio-Rad	分析纯
氢氧化钠	北京化工厂	分析纯
光刻胶	USA	
FITC	Solarbio	试剂级
PDMS	道康宁	
DAPI	Solarbio	试剂级

2.2.2 实验仪器

本章实验中所用仪器如表 2-2 所示。

表 2-2 实验仪器

Table 2-2 Experimental instruments

仪器名称	厂家	型号
电子分析天平	OHAUS	Adventurer AR2140
酶标仪	Tecan	Infinite M200 Pro
超净工作台	哈尔滨东联公司	DL-CJ-1NDI
DREM cell	天木生物科技有限公司	G3c
注射泵	Harvard Apparatus	Pump 11 Elite
氦气瓶	北京氮普北分气体工业有限公司	
数显恒温水浴锅	国华电器有限公司	HH-2
涡旋振荡器	Kylin-Bell	VORTEX-5
荧光倒置显微镜	Nikon	ECLIPSE Ti-E
微量进样器	上海高鸽工贸有限公司	250/500 μ L
高速冷冻离心机	KUBOTA	KUBOTA 5922

2.3 实验方法

2.3.1 微流控芯片的加工

在本研究中，我们设计了三种基于液滴的微流控芯片：液滴生成芯片、液滴注入芯片以及液滴分选芯片。这些芯片的构造如图 2-3 所示，每一种都承载着独特的功能。在芯片的设计阶段，我们利用了 computer-aided design (CAD) 软件，设计了掩模的图案。接着，我们使用光刻胶——SU-8 2025 (Micro Chem, 美国)，将其均匀地涂覆在 4 英寸的硅片上。经过凝粘处理，我们利用 SU-8 光刻技术在硅片上成功地光刻出了微流控通道。接下来，为了制作出最终的芯片，我们将聚二甲基硅氧烷预聚物(PDMS)与固化剂按照 10: 1 的比例混合，然后将其浇筑在 SU-8

模具上。待其凝固后，我们将其切下，并使用氧等离子体（Harrick 等离子体清洗机，PDC-002）将其粘接到载玻片上，以确保其与设计中的三种芯片结构结合到玻片上。通过上述步骤，我们完成了三种基于液滴的微流控芯片的制作。

2.3.2 液滴的生成

在微流控领域中，液滴的生成结构呈现出多样化的形态，如图 2-4 所示，这些结构包括共聚焦、T 型结构、流聚焦以及阶梯式结构等。每一种结构都有其独特的设计特点，能够完成不同的功能需求。流聚焦结构，以其精确的控制能力，特别适合于形成微小至皮升级别的液滴。这种结构通过精确调节流体的流动，使得液滴的生成过程更加稳定可控，为许多需要高精度液滴的应用提供了有力支持。相比之下，共聚焦和 T 型结构生成的液滴尺寸较大。它们的设计原理在于通过两个或多个通道的交汇，使得不同流体在交汇点产生剪切力，从而形成液滴。这种结构生成的液滴尺寸较大，适用于某些对液滴大小要求不那么严格的应用场景。阶梯式结构则更加适合水相粘度较大的液滴生成。其独特的设计使得在粘度较大的水相中，液滴能够顺利生成而不易堵塞。这一特性使得阶梯式结构在处理高粘度流体时具有显著优势，为相关领域的实验研究提供了便利。不同的液滴生成结构在微流控领域中发挥着各自独特的作用。通过合理选择和应用这些结构，我们可以实现更加精准和高效的液滴生成，为微流控技术的发展提供有力支持。

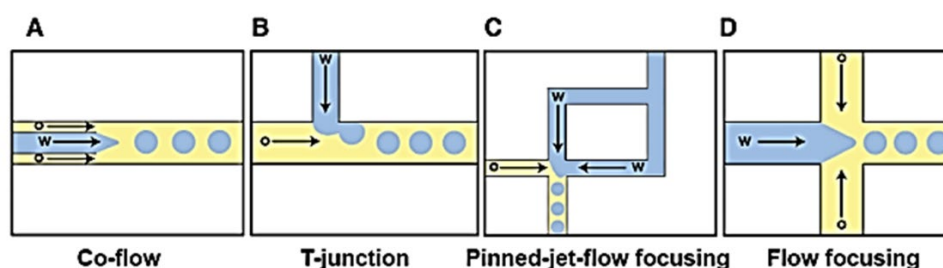


图 2-4 液滴生成的芯片结构^[29]

Fig.2-4 Droplet generated chip structure

在液滴生成过程中，两个关键参数是液滴体积和生成速度。这两个参数都可以通过调节油相与水相的压力来优化。具体来说，油相与水相的压力比值对液滴体积有重要影响。通过调整这个比值，可以控制液滴的大小，从而满足特定应用的需求。另一方面，油相与水相的压力大小则直接决定了液滴的生成速度。压力越大，剪切力就越强，液滴生成的速度也就越快。图 2-5 展示了流聚焦结构的工

作原理。在这种结构中，两种不相溶的液体（通常是油和水）通过特定的通道相遇。当这些液体在通道中流动时，由于剪切力的作用，水相被切割成小的液滴，并由油相包裹和携带。这种结构的关键在于，通过精确控制流体的流速和压力，可以实现液滴的稳定生成。除了液滴体积和生成速度外，液滴的均匀性和稳定性也是非常重要的。流聚焦结构通过其独特的流体动力学设计，可以在一定程度上保证液滴的均匀性和稳定性。

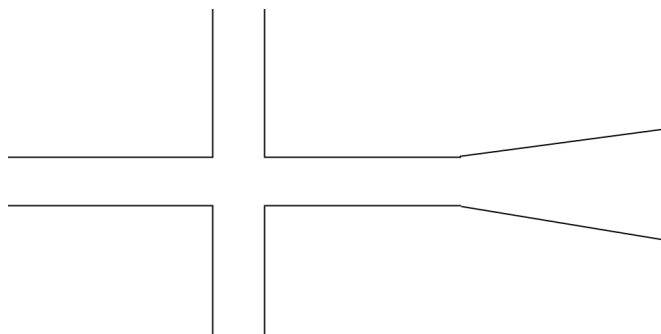


图 2-5 液滴生成的流聚焦结构^[30]

Fig.2-5 Droplet generated by flow-focusing junction

在微流控芯片中，液滴的生成是一个关键步骤。利用流体力学原理，在十字形的流聚焦结构中，使氟化油与水相相互作用。氟化油以其剪切力，将水相切割成微小的液滴，形成乳化液。这种乳化液不仅稳定性强，而且液滴大小均匀，为后续的实验和分析提供了良好的基础。当液滴生成后，在芯片的出口处，连接了一个特氟龙管。这个特氟龙管的作用不仅在于收集液滴，更在于对液滴进行精确的导向和控制。通过毛细管的引导，液滴可以有序地排出，避免了液滴之间的融合和交叉污染。这一设计既保证了液滴的纯净度，又提高了整个液滴生成过程的效率。

为了深入探究压力、液滴尺寸以及液滴生成速率之间的相互关联，在不同的油压和水压条件下生成了油包水的液滴，并详细记录了各项数据。首先，针对每秒生成的液滴数量进行了统计。通过这一步骤，我们能够清晰地了解到在不同的压力条件下，液滴生成的频率是如何变化的。此外，本研究还借助显微镜对生成的液滴进行了详细的尺寸测定。

2.3.3 液滴的注入

在检测液滴中细胞产物的过程中，液滴的注入成为了一个至关重要的环节。这一步骤，它的核心在于精准地添加检测试剂。利用油相作为隔离介质，将液滴进行分隔。当这些液滴流经特设的注入入口时，一个恒定的电场被引入，这一电场会破坏液滴的稳定性。由于注入的相是水相，能破开油相，进而深入到液滴的内部。如图 2-6 示，液滴注入过程。从液滴的原始状态，到油相的隔离，再到恒电场的作用，以及最终水相的成功注入。

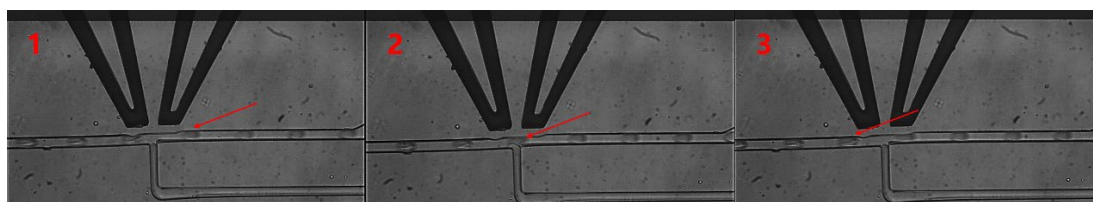


图 2-6 液滴注入流程

Fig.2-6 The process of droplet pico-injection

在实际操作过程中，液滴的完整性至关重要。一旦液滴出现破碎或融合的情况，所注入的传感器的体积将不可避免地发生变化。这种变化会导致每个液滴中传感器的体积不一致，进而在后续的荧光测定中产生误差。因此，在维持液滴稳定性的同时，我们必须密切关注并检测由此产生的误差。为了探究液滴中传感器的体积变化，我们首先采用细胞培养基生成油包水的液滴。随后，向这些液滴中注入 $10\ \mu\text{M}$ 的 FITC。通过对比实验前后的信号强度，我们可以判断注入体积的差距。如果检测到的信号差异显著，这意味着注入的传感器体积存在较大的差异；而信号差异较小，则意味着注入体积相对接近。为了确保实验结果的可靠性，我们在不同的时间点重复了三次上述实验。

2.3.4 液滴的分选

液滴的分选流程如图 2-7，当荧光信号超出设定的阈值时，液滴流向收集通道，信号低于设定的阈值时，液滴流入废液通道。

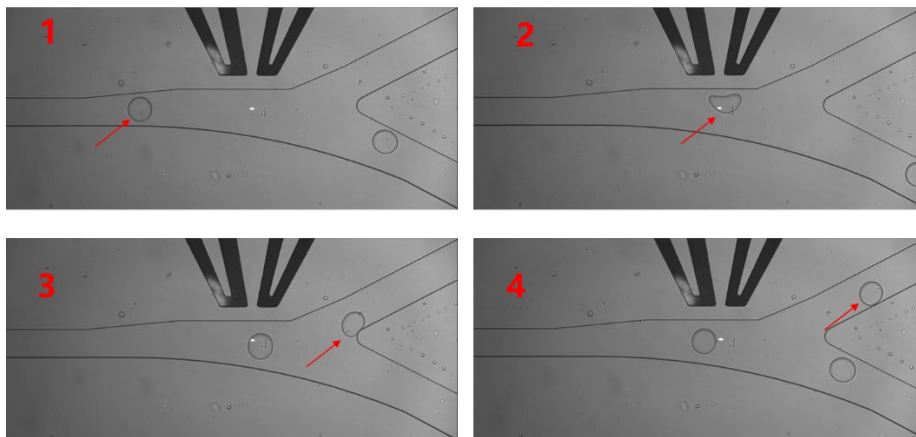


图 2-7 液滴分选流程

Fig.2-7 The process of droplet sorting

在液滴分选的过程中，精确性无疑是决定性因素，液滴由于流速过快，未能顺利流入收集通道，或是液滴之间的排列过于紧密，会造成筛选出的液滴中出现假阳性。为了更准确地表征分选芯片的液滴分选功能，我们采用了绿色荧光蛋白 eGFP 作为指示剂。具体操作是，将含有 $2\ \mu\text{M}$ 浓度的 eGFP 液滴与等体积的 PBS 液滴按 1: 1 的比例混合，然后设定分选阈值为 8。接下来，我们比较分选前后液滴的荧光变化，并在荧光显微镜下观察统计带有绿色荧光的液滴所占的比例。

2.4 结果与分析

2.4.1 液滴大小、生成速度与泵压表征曲面图

实验结果显示，如图 2-8，液滴生成芯片能够稳定生成直径介于 20 至 90 微米之间的液滴。如图 2-9 所呈现的数据显示，随着压力的增大，液滴的生成速度也呈现出明显的上升趋势。基于上述实验结果，我们最终选择在油压为 200 mbar，水压为 190 mbar 的条件下进行稳定的液滴生成。在这一条件下，我们能够稳定地生成直径为 40 微米的液滴。

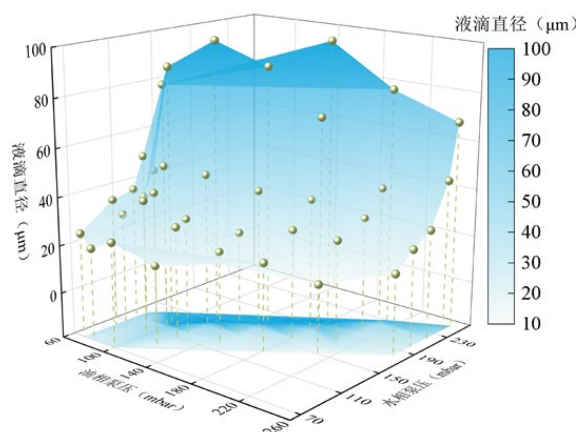


图 2-8 液滴生成体积与压力关系

Fig.2-8 Relationship between droplet volume and pressure

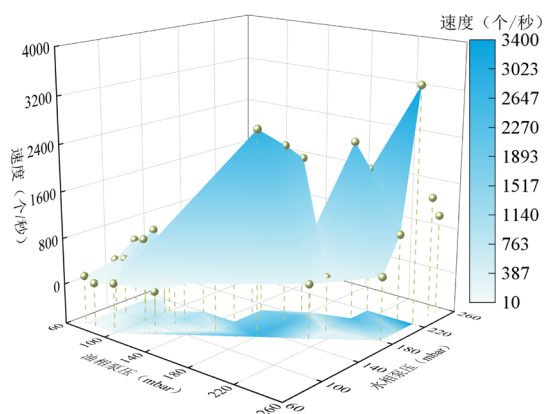


图 2-9 液滴生成速度与压力关系

Fig.2-9 Relationship between droplet generation speed and pressure

液滴生成中最核心的参数就是液滴的大小与液滴生成的速度，在本实验中，严重了液滴生成芯片可稳定生成均一大小的液滴，且生成速度可控。

2.4.2 sensor 注入液滴稳定性验证

如图 2-10 所示，三次实验的液滴信号虽然有微小的偏移，但这种偏移并不会对最终的实验结果产生显著影响。通过这一系列的实验与检测，我们不仅能够确保液滴的稳定性，还能有效控制由此产生的误差，从而提高实验的准确性。

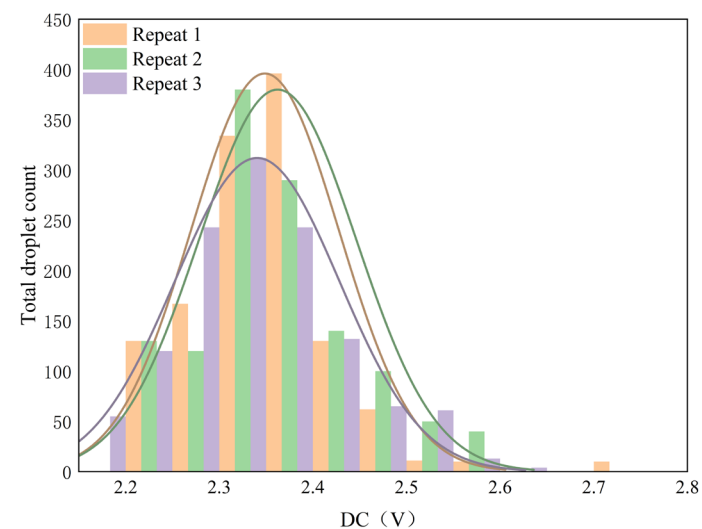


图 2-10 液滴注入的荧光信号

Fig.2-10 Fluorescence signal in droplet pico-injection process

2.4.3 液滴分选准确性

如图 2-11 所示，实验结果显示，采用荧光蛋白注入液滴后进行分选，液滴分选的准确性高达 99%以上，而假阳性率则低于 1%。这一结果充分证明了我们的分选方法的高精确性和可靠性，为后续的实验研究奠定了坚实的基础。

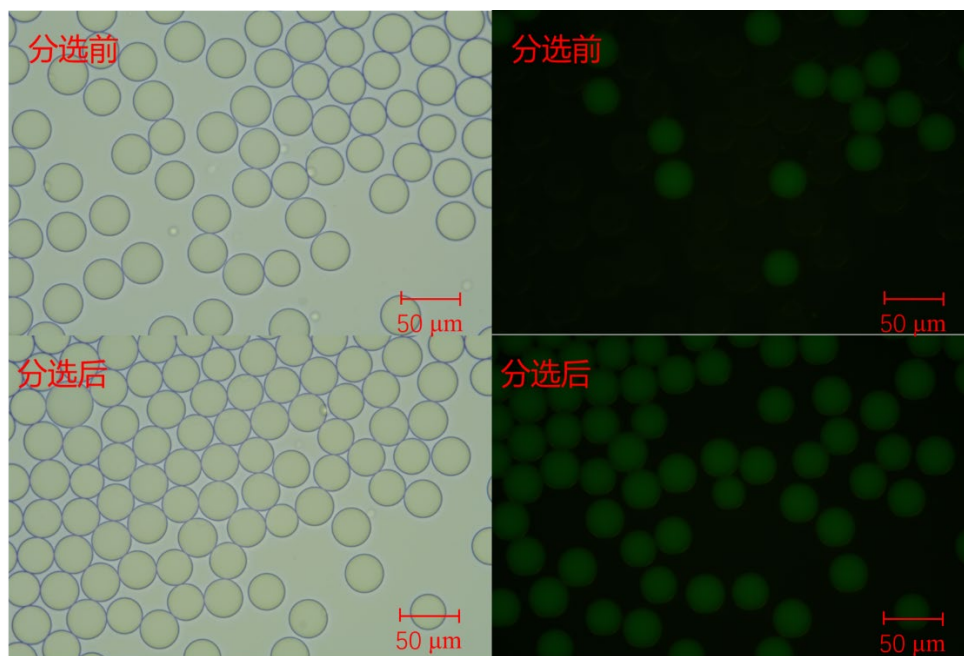


图 2-11 分选前后液滴图

Fig.2-11 Droplet diagram before and after sorting

2.5 本章小结

在本章节中，制备了液滴生成芯片、液滴注入芯片和液滴分选芯片，均符合预设的标准。

对每一种芯片进行了深入的表征。生成芯片可制备直径范围在 20 至 90 微米之间，最高生成速度达到了 3000 个/秒。

在液滴的注入过程中，我们实现了高达每秒 500 个，这极大地提升了实验效率。三次重复实验采集的信号偏差细微，不会对后续的实验过程产生实质性的影响，为后续胞内蛋白细胞注入 *senser* 奠定了基础。

至于分选芯片，系统能够准确无误地筛选出目标液滴，准确率超过 99%，这为后续胞外分泌型稳转细胞液滴的筛选工作奠定了坚实的基础。通过这一系列精细化的操作，我们不仅提高了实验效率，也为 CHO 细胞筛选流程的优化提供了有力的技术支持。

第三章 高产 CHO 细胞的模式筛选

3.1 引言

随着生物技术的飞速发展,细胞工程在医药、农业、工业等领域的应用日益广泛^[56]。其中,中国仓鼠卵巢(Chinese Hamster Ovary, CHO)细胞作为一种常用的表达系统,在重组蛋白药物的生产中发挥着举足轻重的作用。然而,传统的 CHO 细胞培养方法存在效率低下、操作复杂、成本高昂等问题,严重制约了生物药物的生产效率和经济效益^[57]。因此,探索一种高效、简便、低成本的 CHO 细胞培养筛选方法,对于推动生物医药产业的可持续发展具有重要的现实意义。

液滴微流控技术通过精确控制微尺度下的流体行为,实现了细胞在微小液滴中的高效培养和筛选^[58,59]。相比于传统方法,液滴微流控技术具有操作简便、高通量、低消耗等优势,为高产 CHO 细胞的快速筛选提供了新的思路。

目前,国内外在液滴微流控技术应用于 CHO 细胞培养筛选方面已取得了一定的研究成果^[60]。例如,通过优化液滴生成条件,实现了 CHO 细胞在微液滴中的均匀分布与高效培养;通过引入特异性标记物,实现了对高产 CHO 细胞的快速识别和筛选。然而,现有的研究仍存在一些不足,如液滴稳定性差、细胞生长环境难以控制、筛选效率不高等问题^[61],这些问题限制了液滴微流控技术在 CHO 细胞筛选中的广泛应用。

针对上述问题,未来的研究应着重于以下几个方向:一是提高液滴的稳定性,以确保 CHO 细胞在微液滴中的长期培养;二是优化细胞生长环境,以满足 CHO 细胞在微尺度下的生长需求;三是开发高效的筛选方法,以提高高产 CHO 细胞的识别与筛选效率。

3.2 实验材料

3.2.1 细胞株

大肠杆菌 *E.coli* JM109 感受态细胞由本实验室保存;pcDNA3.1 载体购于上海捷瑞生物工程有限公司;悬浮 CHO 细胞购于赛默飞公司。

3.2.2 培养基

CHO 细胞摇瓶培养基: ExpiCHO™ Medium (Gibco, 美国), 此培养基用于 ExpiCHO 细胞在摇瓶中培养。

CHO 细胞液滴培养基: 含有 8mM Glutamax 和 16% (v/v) Optiprep 的 ExpiCHO™ Medium, 此培养基用于 ExpiCHO 细胞在液滴环境培养。

3.2.3 实验试剂

本章实验中所用试剂如下表 3-1 所示。

表 3-1 实验试剂

Table 3-1 Experimental reagents

试剂名称	厂家
Prerce™ BCA Assay Kit 试剂盒	赛默飞
质粒中提试剂盒	赛默飞
ExpiFectamine™ CHO Transfection Kit	赛默飞
OptiPRO™ SFM	赛默飞
含 His 标签的 Recombinant Human alpha-Galactosidase A/GLA Protein	RD
SDS-PAGE 预制胶	碧云天
His-Tag (D3110) XP® Rabbit mAb 抗体	CST

3.3 实验方法

3.3.1 CHO 细胞培养

3.3.1.1 细胞复苏

准备工作: 用 75%乙醇喷洒到超净台, 采用无尘纸对超净台进行擦拭, 开启紫外对超净台进行灭菌 30 分钟, 等待灭菌结束后进行自净 15 分钟。打开恒温水浴锅, 设定 37℃后将装有 ExpiCHO™ Medium 离心管置于其中进行预热, 预热时间 30 min 以上。

将预热后的培养基喷洒 75%乙醇后放置于超净台中，取 125 mL 的摇瓶，加入 25 mL 预热过的培养基；将冻存细胞的冻存管从液氮中取出，使用镊子夹取于 37 °C 水浴锅中解冻细胞；细胞解冻后迅速喷洒 75%至冻存管表面灭菌，擦净后转移至超净台；采用移液器将冻存管中的细胞转移至含有培养基的摇瓶中；放置在二氧化碳培养箱中的摇床上，设置转速 120 rpm。1 h 后取出摇瓶，检测摇瓶中细胞的存活率，细胞活率在 90%初步复苏成功。

3.3.1.2 细胞传代

实验前的准备工作同 3.3.1.1。取出摇床上的摇瓶，取 10 μ L 的细胞悬液加入细胞计数板，检测细胞密度和细胞存活率。在细胞存活率大于 95%时，根据摇瓶中传代密度为 0.3×10^5 cells/mL 计算需要细胞悬液的体积，将细胞悬液接种于含有新鲜培养基的摇瓶中；将摇瓶放置于 37 °C 培养箱中，设置摇床转速 120 rpm。细胞每次传代间隔三天，当细胞密度达到试验要求后可用于后续试验。

3.3.1.3 细胞冻存

实验前的准备工作同 3.3.1.1。配置细胞冻存液（90% ExpiCHO™ Medium+10% DMSO），将配置好的细胞冻存液放置于 4 °C 冰箱预冷待用。将细胞从摇床中取出，吸取 10 μ L 的细胞悬液加入细胞计数板，检测细胞密度和细胞存活率。要求细胞存活率大于 95%，根据细胞冻存密度 1.0×10^7 cells/mL，计算所需要的细胞悬液体积，吸取相应体积细胞悬液，离心 300 g，5 分钟；弃除上清液，采用预冷后的细胞冻存液重悬细胞，每 800 μ L 分装于一支冻存管。将分装后的细胞装入异丙醇的程序降温盒，将降温盒放置于 -80 °C 保存，24 h 将冻存管取出保存于液氮中。

3.3.2 用于 CHO 细胞液滴生成

将含有 16% (v/v) Optiprep 的 ExpiCHO 细胞培养基作为水相，将氟化油作为油相通过液滴生成芯片生成液滴，采用氮气作为驱动力，通过调节控制水相和油相的气压大小从而改变两相流速，进而在液滴生成芯片的交叉口处形成不同大小液滴，液滴在氟化油的输送下进入液滴收

集口，采用 24 L 的特氟龙管收集液滴，并且将收集液滴后的特氟龙管存放在矿物油中。我们将特氟龙管中的液滴滴入载玻片中，在荧光显微镜下测量液滴直径，根据我们的结果显示，设计加工的液滴生成芯片可以稳定生成固定直径 20 μm ~90 μm 。我们采用 200 mbar 油相泵压、190 mbar 水相泵压生成了直径 40 μm (33pL) 的液滴，以此尺寸的液滴作为 ExpiCHO 细胞的培养液滴。

3.3.3 皮升级液滴单细胞生成和培养

理想情况下单细胞液滴的生成符合泊松分布，在本实验中，分别取 $\lambda=0.03\sim0.2$ 之间检测单包率和多包率（细胞密度为 1.0×10^6 cell/mL~ 6.0×10^6 cell/mL）。统计细胞在液滴中的包裹率，根据选择多包率低于 0.5%且单包率高的组别进行后续实验。

3.3.4 细胞在液滴中培养活性检测

将 CHO 细胞制备成液滴，采用特氟龙管收集。将特氟龙管浸泡在矿物油中于二氧化碳培养箱培养，分别在 0 h、12 h 和、24 h、和 48 h 取特氟龙管中的液滴于载玻片上，在显微镜下进行拍照观察，观察细胞是否增值，在 0 h、12 h、24 h、36 h 和 48 h 使用 1H,1H,2H,2H-全氟辛醇对特氟龙管中的液滴进行裂解，收集液滴中释放出来的细胞检测存活率。

3.3.5 单细胞液滴中 RSPO-1 蛋白的表达检测

使用高产 ExpiCHO 细胞生成液滴后，分别培养 12 h 和 24 h，每个液滴中注入 33 pL 终浓度为 4 μM 的 GBP4 与 4 μM 的 eGFP 混合液，在荧光显微镜下进行拍照，观察荧光的表达时间，选择合适的时间注入 sensor。

3.3.6 高产 CHO 细胞模式筛选

3.3.6.1 电压信号的采集

为验证本设备对外泌型细胞实际分选的能力,将高产 CHO 细胞和不表达目的基因的野生型 CHO 细胞以三组不同的密度比例混合,高产细胞分别占比 0.1%、1%和 10%,稀释终密度为 3×10^6 cell/mL,将混合后的细胞生成 33 pL 的液滴,收集后培养 24 h,24 h 后在液滴中注入 4 μ M 的 eGFP 与 GBP4 的混合溶液,将注入 eGFP 和 GBP4 混合液的液滴接入液滴分选芯片,通过调节氮气压力调整液滴分选速度,将液滴分选速度控制在 200 个/秒,设置 8.0 作为分选电压阈值,采用离心管收集分选后的液滴,并且采集混合细胞液滴分选前的液滴信号。取三组筛选后的液滴 500 μ L 进行破乳,加入 300 μ L 的 1H,1H,2H,2H-全氟辛醇裂解液滴,吸取水相中的细胞转移至含有 6 mM 的 L-谷氨酰胺 ExpiCHO™ Medium 中,接种于 6 孔板中,7 天后,将富集后的细胞以 3.0×10^6 cell/mL 的密度生成 33 pL 的液滴,孵育 24 h 后,注入等体积 4 μ M 的 GBP4 与 4 μ M 的 eGFP 混合溶液,采集分选后的液滴电压信号,比较分选前后液滴信号变化,判断高产细胞是否有被筛选出。

3.3.6.2 Western Blot 检测模式筛选后的 RSPO-1 蛋白表达

(1) 有限稀释法制备单克隆细胞

取分选后的三组余下的液滴,破乳;分组收取破乳后上层的细胞,将细胞采用含有 6m M 的 L-谷氨酰胺 ExpiCHO™ Medium 进行稀释,稀释为每 400 μ L 培养基含有一个细胞的密度;将稀释后的细胞悬液接种于 96 孔板中,每个孔接种 200 μ L,理论上每个孔平均有 0.5 个细胞,即每个孔中含有一个细胞或者没有细胞。在接种 12 天后于显微镜下观察,标记出单克隆细胞团,在第 18 天将单克隆细胞团转移至 48 孔板中扩增,第 24 天将 48 孔板中的细胞转移至 6 孔板。在接种于 6 孔板后的第三天,计数,以 3×10^5 cells/mL 的密度接种于新的 6 孔板。

(2) 提取浓缩胞外分泌 RSPO-1 蛋白进行 Western Blot

重新接种后的第五天，三组各自取 10 株单克隆细胞，进行取样浓缩蛋白，0.1%组记作 A1-A10，1%组记作 B1-B10，10%组记作 C1-C10。超滤浓缩步骤如下：

取细胞悬液，300 g 下离心 5 分钟；离心后取 500 μ L 上清液于 10 kD 的超滤管中，14000 g 下离心 15 分钟；取一支新的离心管，将超滤管倒置在离心管中，1000 g 下离心 2 分钟，取出离心管中的样品，使用 PBS 定容至 50 μ L，即为 10 倍浓缩的蛋白样品。在浓缩后的蛋白样品中加入 10 μ L 的蛋白 Loading buffer 混匀，98 $^{\circ}$ C 加热 10 分钟。将提取的蛋白进行 Western Blot 检测各组的表达情况。

Western Blot 步骤：

上样跑胶：蛋白上样量根据样品试剂情况确定。Marker 使用量为 2~5 μ L，用 1 $\times$ Loading 补齐。用 10 μ L 枪头移取样品，枪头插入上样区中上部，缓慢加入样品。注意电极正负，盖上盖子，连接电源。140 V 恒压 1.5 hr~2.5 hr，跑胶时间的长短以溴酚蓝条形区域的移动位置以及目标蛋白的大小位置为准。

转膜：跑胶结束前 10 min 开始准备转膜所需的仪器试剂，包括：预冷的 1 $\times$ Transfer、转膜槽、转膜用盘子、三明治、滤纸、膜、平底镊子、5 mL 枪头（赶气泡用）、一大盆冰。

制作三明治：首先向盘子内倒入适量预冷的 1 $\times$ Transfer（约盘子深度的 1/3），浸湿海绵、滤纸。将转膜板的黑面向下、白面向上，摆放好转膜板。铺下层海绵与下层滤纸。切断电源，立即将制胶仪取出，其中的内液倒入外液槽中，再将多余的 Running 从外液槽中倒出。制胶仪用 ddH₂O 冲洗，拆卸制胶仪，将含有胶的玻璃板用 ddH₂O 冲洗，拔去塑料垫片，小心使劲撬开玻璃板。留下拥有胶的玻璃板，用塑料垫片切割浓缩胶与分离胶的交接处，弃去浓缩胶。以平底镊子为辅助，掀开一角，将胶面向下放入 1 $\times$ Transfer 中。铺胶铺膜。按照蛋白胶水平翻转 180 $^{\circ}$ 的形式摆放胶。将 NC 膜直接放入盘子中完全润湿（或 PVDF 膜先在纯甲醇中活化 30s，再泡在转膜液中至完全浸湿），将膜铺在胶上。铺上层滤纸。之后按住滤纸的一侧，从固定端向自由端缓慢多次赶走气泡，期间需要用 5mL 枪头多次在滤纸上淋上转膜液赶走气泡。再换另外一侧，重复上述动作。铺上层海绵。夹好三明治。放入转膜槽中。向冰槽内填充满冰，放入转膜槽

中。向转膜槽倒入适量的转膜液。盖上盖子。将剩余所有的冰块加入至盆子中。加入适量水加入至盆子中，以冰水混合物的形式给转膜槽降温。

转膜：连接电源，设置 300 mA 恒流转膜 2 hr。转膜结束后，将三明治取出，用镊子夹出膜。查看 Marker 是否转到膜上以及其位置方向是否正确。

封闭孵育：裁剪 6 号自封袋将膜放入其中，视膜面积的大小，加入 2.5~4 mL milk TBST，要求自封袋较为饱满。将膜包热封。之后 37℃ 摇晃（60~70 rpm）封闭 1 hr 或 4 °C 静置封闭过夜。

抗体孵育：剪开自封袋封口处，倒出 milk TBST，加入 2.0~2.5 mL 一抗。从下至上赶气泡，热封。37 °C 摇床中以 70 rpm 的转速孵育 2 hr。将自封袋封口处剪开一角，回收一抗液。将膜放入洗膜盒中，从边缘加入适量的 1×TBST 浸没膜。晃动 10 min，之后倒出 1×TBST，再次加入新鲜的 1×TBST，重复三次。）孵育二抗。裁剪 6 号自封袋，将膜的片段放入其中，热封，37℃ 孵育 40min。再次洗膜三次。

曝光：打开曝光仪，裁剪自封袋，放置在曝光仪上，将膜的片段放入其中，将曝光液均匀地添加在膜上进行曝光，保存曝光后的图片。

3.4 结果与分析

3.4.1 用于单细胞液滴的生成密度选择

根据统计的包裹率显示，如图 3-1A，在 $\lambda=0.03\sim0.2$ 之间时，实际的单包率接近泊松分布。理论情况下，当制备 $\lambda=0.1$ 的细胞溶液时，细胞密度为 3×10^6 cells/mL，产生的液滴中 9.1% 为单细胞液滴，90.5% 为空液滴，在实际操作过程中，此时液滴的单包率为 8.16%，多包率为 0.36%，因此我们采用 $\lambda=0.1$ 制备单细胞液滴。

3.4.2 细胞在液滴中活性检测

如图 3-1B，细胞在液滴中培养 0 h、12 h、24 h 和 48 h 时，可观测到 24 h 内细胞可正常增值，说明此时细胞状态良好。根据图 3-1C 检测的存活率也表明，0 h、12 h、24 h、36 h 和 48 h，随着时间增加，细胞

的存活率也在降低、存活率分别是 98%、92%、83%、68%和 44%。这些结果表明 ExpiCHO 细胞在 33 pL 的液滴中培养，在 24 h 内细胞存活率依旧较高，24 h 以后细胞活性下降验证，不适合继续培养。

3.4.3 Senser 注入时间的选择

如图 3-1D，结果显示 24 小时液滴中有荧光显现，高产细胞分泌 RSPO-1 融合蛋白，因此液滴注入 senser 的时间选择细胞在液滴中培养 24 h 的时候。

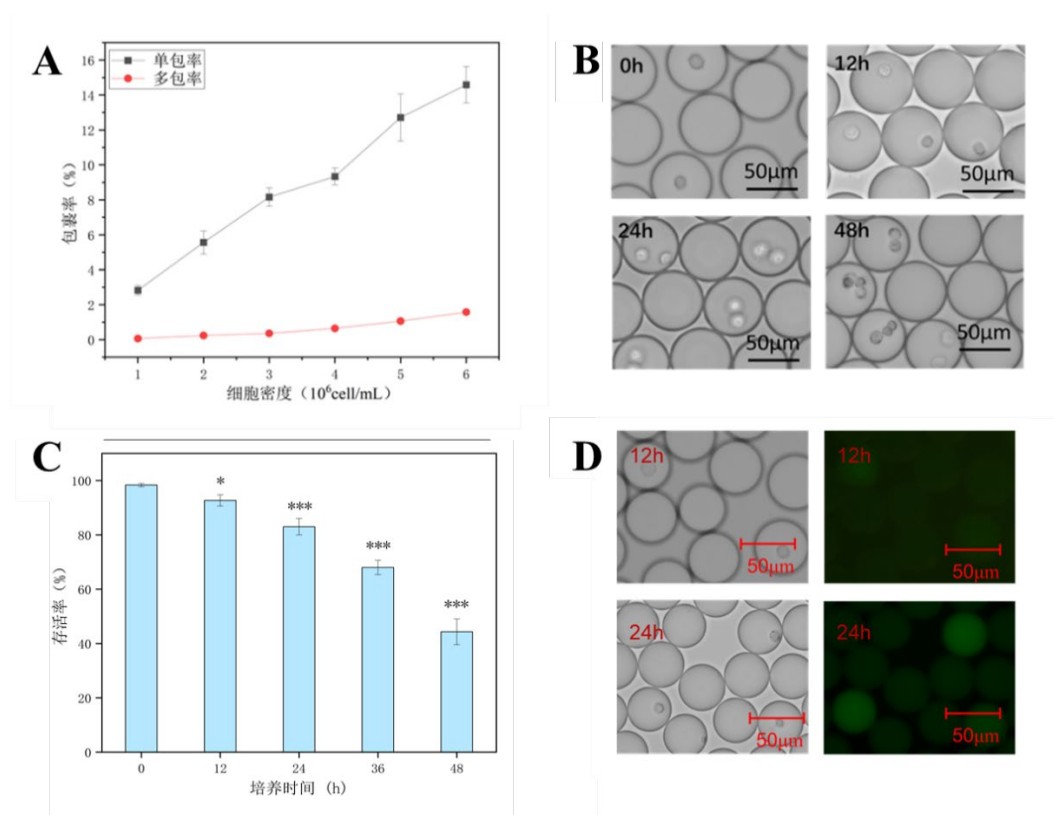


图 3-1 液滴中细胞活性图 A:不同密度细胞生成液滴的包裹率. B:细胞在液滴中培养 48h 明场图.C:细胞在液滴中培养 48h 存活率. D:细胞在液滴中培养 12h 和 48h 荧光表达

Fig.3-1 Plot of cell viability in droplets. A: Wrapping rate of cell-generated droplets at different densities. B: Brightfield diagram of cells cultured in droplets for 48 hours.C: Cell survival rate after 48 h of culture in droplets. D: Cells were cultured in droplets for 12 h and 48 h for fluorescent expression

3.4.4 高产细胞液滴筛选前后信号比较

如图 3-2A 所示, 与分选前相比, 分选后的信号峰值从 7.3 后移至 7.6, 说明低信号的液滴被筛选去除, 高信号液滴被筛选留下。高信号的液滴对应的是更高产的细胞, 说明本设备有效的选出高产细胞。

3.4.5 设备筛选效率检测

将进行 Western Blot 检测 RSPO-1 蛋白表达与否, 验证筛选后的细胞是否为产 RSPO-1 蛋白。结果如图 3-2B 所示, A 组共有 8 株表达目的蛋白, 富集倍数为 800 倍, B 组共有 9 株表达目的蛋白, 富集倍数为 90 倍, C 组 10 株全部表达, 富集倍数为 10 倍。

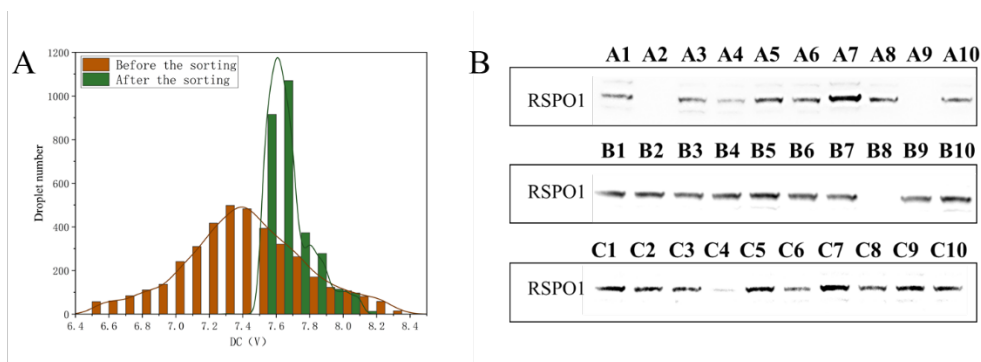


图 3-2 高产细胞与野生型细胞混合后分选 A: 10%高产细胞分选前后信号图. B: 三组野生型与高产细胞混合后分选随机挑选 10 组单克隆 RSPO-1 蛋白表达情况

Fig.3-2 Sorting of high-yielding cells after mixing with wild-type cells A: Signal diagram of 10% high-yielding cells before and after sorting. B: The expression of monoclonal RSPO-1 protein in 10 groups was randomly selected after mixing wild-type and high-yielding cells

3.5 本章小结

基于设计的微流控芯片, 优化了细胞液滴培养、注入和分选条件, 构建了一个单细胞皮升液滴筛选系统。该系统生成的 33 pL 液滴可稳定培养 CHO 细胞 24 h。

细胞在液滴中培养 24 h 后, 将 sensor 注入液滴中, 可在显微镜下观察细胞是否表达目的蛋白, 在表达蛋白后, 可用该系统自动化高通量筛选高产的 CHO 细胞, 在高产细胞占比 0.1%的组别中, 富集倍数达到 3996 倍, 在高产细胞占比

1%的组别中，富集倍数达到 891 倍，在高产细胞占比 10 的组别中，分选后的高产细胞可达到 100%。

第四章 高产 CHO 细胞文库筛选

4.1 引言

细胞株开发(CLD)是生物制药工艺开发的起点和基础,主要借由质粒转染、药物选择、单细胞克隆及克隆筛选得到稳定且高效表达的单克隆细胞株。因为 CLD 允许研究人员根据目标蛋白产物订制培养条件,所以 CLD 除了掌握药物的安全性及有效性,还决定了整个 GMP 生产流程的速度、成本及产量^[30,31]。为了能快速得到高产细胞株以应对巨大的市场需求,许多细胞工程及高通量筛选技术被分别应用于提高细胞的比生产率及单克隆的筛选通量^[32-37]。然而,在药物选择过程中生成的高表达细胞池经常存在低表达或是无表达,具有抗药性的细胞,而这些细胞相比于高表达细胞生长更快速,导致整体细胞群表达量下降,间接提高了后续筛选高产单克隆细胞的成本以及降低效率^[38],因此如何提高细胞池中所有克隆的比生产率成为生物制药行业的一大挑战,其中,提高整体细胞池的比生产率间接降低后续筛选克隆的成本同时提高效率,因此如何提高细胞池的表达量是生物制药行业的关键技术。现今大部分的重组治疗性蛋白都来自中国仓鼠卵巢(CHO)细胞,这是因为 CHO 细胞拥有类人翻译后修饰、较少内源性分泌蛋白、允许高细胞密度悬浮培养及对环境的高耐受性等特征,这些特性使 CHO 细胞相比于其他表达系统更适合用于制药生产^[39-42]。为了提高细胞生产量,转染的目标质粒可以透过靶向工程整合至 CHO 基因组中的高转录活性位点^[43]。然而,由于位置效应、分泌代谢能源分配不均、基因调控等造成的基因不稳定性,使得每个转染后的细胞拥有不同的表达能力^[44]。其中一种降低细胞间变异性的方法是在质粒设计上加入染色质修饰组件,这些组件通常设计在启动子前以防止启动子甲基化和转基因沉默,或是防止染色体结构破坏转录区域,进而提升整个细胞池的表达水平同时提高阳性克隆的比例^[45,46]。在 CHO 细胞中常见的染色质修饰元件有 MARS、UCOE、STAR、insulators^[48]。然而,这些染色质修饰元件的运作机制尚未清晰,需要搭配特定启动子、转基因、载体成分及细胞株进行使用^[45,47]。提高选择严谨度也能提高细胞表达的一致性。细胞在经过转染后,基于插入的抗药性基因^[48](Neomycin, Hygromycin, Puromycin)或缺失的代谢相关基因(DHFR, GS)^[49],透过指定药物或缺乏特定氨基酸培养基培养的筛选压力下

得到高产细胞池^[50]。由于抗药性基因或代谢相关基因常与转基因共表达,提高筛选压力可以将表达能力弱的细胞去除。然而这种方法会延缓细胞生长速度,提高细胞的突变率,并且在去除筛选压力后,会存在许多假阳性的细胞株。为了改善这一缺点,研究人员通过弱化抗性基因的表达,例如在转基因与抗药性基因之间插入多顺反子组件(IRES, 2A elements)^[51]或是弱化激活子^[52]的表达等,使细胞在低筛选压力下即可得到高表达细胞池。另外,有些研究人员认为野生型细胞的异质性是造成后续表达量不一致的主要原因。因此在进行基因操作前将野生型细胞进行单克隆扩增,进行药物选择后得到的高产细胞池表达一致性变高^[53]。或是使用可稳定高产的 CHO 细胞株进行转基因转染^[54]。另外也有使用蛋白酶抑制剂作为选择压力,得到具有特定折叠能力的细胞株,用于生产融合蛋白等难表达蛋白^[55]。以上这些方法都能有效提高细胞池整体的表达量及表达一致性,但都存在一些缺陷。例如染色质修饰元件的功能需要根据目标产物的性质、细胞株并搭配特定启动子才能发挥其功效^[45];增加选择严谨度容易出现细胞基因突变或是假阳性细胞的情况。利用表型筛选形成高产细胞池代替传统药筛模式可避免上述提到的缺陷。Weimin L. Kaufman 等人利用 FACS 筛选 EGFP 表达的 Hela 细胞及 CHO 细胞,相比于利用 g418 进行药物选择,生成的细胞池表达均一性及稳定性更高^[40,52]。然而 FACS 的高流速筛选会对细胞造成极大的物理伤害,并且需要结合凝胶微液滴、亲和捕获表面或低温捕捉等技术将外泌蛋白集中在细胞附近以有利于 FACS 筛选。为了能在短时间内利用表型筛选得到高产细胞池,本研究将药物选择后的高产细胞池透过皮升级液滴微流控技术及高灵敏度的荧光生物传感器 GBP 筛选并富集得到高阳性克隆比例的高产细胞池。GBP 是一个调控 GFP 结构及光学性质的纳米抗体,与 GFP 蛋白结合后能改变原来的荧光强度^[53]。其中,GBP-1 可以增强 gfp 四倍的荧光强度,而 gbp-4 可以减弱 gfp 五倍的荧光强度^[53]。本研究将 gbp-1 基因与目标基因(RSPO-1)在 CHO-S 细胞中融合表达,当细胞分泌蛋白时,GBP-1 会同时分泌并与溶液中的荧光探针(GFP 与 GBP-4 的结合体)反应,提高荧光检测的灵敏度。将单细胞以油包水的方式包裹在皮升级液滴中,由于液滴体积小,高产的单细胞液滴可以在短时间内分泌足够的蛋白浓度并被侦测^[54,55]。为了避免荧光探针影响单细胞液滴的检测,细胞在液滴中培养后,荧光探针以微注入的方式注入至液滴中,并利用荧光强度在微流控分选芯片上筛选高表达细胞株并富集形成更高产的细胞池。我们假设透过液滴微

流控的技术，可以提高并缩小高产细胞池的表达区间，除了可以避免基因操作、药物选择导致的基因沉默，还能提高后续单克隆筛选的通量。

4.2 实验材料

4.2.1 细胞株

大肠杆菌 *E.coli JM109* 感受态细胞由本实验室保存；pcDNA3.1 载体购于上海捷瑞生物工程有限公司；悬浮 CHO 细胞购于赛默飞公司。

4.2.2 培养基

CHO 细胞摇瓶培养基：ExpiCHO™ Medium（Gibco，美国），此培养基用于 CHO 细胞在摇瓶中培养。

CHO 细胞液滴培养基：含有 8mM Glutamax 和 16%（v/v）Optiprep 的 ExpiCHO™ Medium，此培养基用于 CHO 细胞在液滴环境培养。

4.2.3 实验试剂

本章实验中所用试剂如下表 4-1 所示。

表 4-1 实验试剂

Table 4-1 Experimental reagents

试剂名称	厂家
Prerce™ BCA Assay Kit 试剂盒	赛默飞
质粒中提试剂盒	赛默飞
ExpiFectamine™ CHO Transfection Kit	赛默飞
OptiPRO™ SFM	赛默飞
含 His 标签的 Recombinant Human alpha-Galactosidase A/GLA Protein	RD
SDS-PAGE 预制胶	碧云天
His-Tag（D3110）XP® Rabbit mAb 抗体	CST

4.3 实验方法

4.3.1 重组 GBP1-RSPO-1 真核表达载体的构建

根据实验室前期所构建的 GBP1-RSPO-1 载体质粒，采用转染试剂盒，将带有 GBP1-RSPO-1 融合蛋白基因的质粒转染至 CHO 细胞中，采用 700 $\mu\text{g/mL}$ 的 G418 进行初步筛选，去除大多数未成功转染的 CHO 细胞。

4.3.2 重组 GBP1-RSPO-1 蛋白的鉴定

将经过一周 G418 筛选后的细胞以 3×10^5 cells/mL 的密度接种于 6 孔板中，培养 7 天后按照 3.2.6.2 中方式提取浓缩蛋白，进行 Western Blot 检测是否有蛋白表达，经过检测，所构建的细胞文库中有融合蛋白的表达。

4.3.3 细胞文库筛选

将细胞文库中的细胞以 3.0×10^6 cell/mL 的密度作为水相生成 33pL 的液滴培养 24 h，在液滴注入 4 μM 的 GBP4 与 4 μM 的 eGFP 混合溶液进行分选，通过调节氮气压力调整液滴分选速度，将液滴分选速度控制在 200 个/秒，收集分选后的液滴，并且采集 10% 的组别的液滴电压信号，此时采集的电信号为未筛选的文库细胞信号。将收集的液滴破乳培养，7 天后再次将富集后的细胞生成 33 pL 的液滴，培养 24 h 注入 4 μM 的 eGFP 和 GBP4 混合液，采集注入后的液滴信号。对比分选前后的液滴信号。

采用有限稀释法，将文库未经筛选的细胞和筛选后的细胞制备为单克隆株，分别随机取 10 株未经筛选的单细胞株（N01-N10）和 10 株富集后的单细胞株（S01-S10），以 3×10^5 cell/mL 的密度接种于 6 孔板，第 5 天取 500 μL 细胞培养的上清液，采用 10kD 超滤管浓缩上清液中的蛋白，定容为 50 μL ，每组加入 10 μL Loading Buffer 混匀煮沸，在 12% 的预制胶中每组上样 10 μL 样品进行 Western Blot，检测这 20 组样品中的 RSPO-1 融合蛋白的表达。

4.4 结果与分析

如图 4-1A 所示, 转染后的细胞在经过筛选后, 液滴的信号峰值从 7.2 后移至 7.7, 说明本设备将稳转细胞文库中高产细胞筛选出。如图 4-1B 所示, 未经过分选的 10 株单克隆细胞, 其中共有 4 株细胞表达了 RSPO-1 融合蛋白, 6 株假阳性细胞, 筛选后的 10 株均表达 RSPO-1 融合蛋白表达。采用 Image J 分析蛋白绝对灰度, 比较蛋白表达量, 如图 4-1C。结果显示筛选后的细胞蛋白产量更高, 说明本设备可将更高产的细胞筛选出。

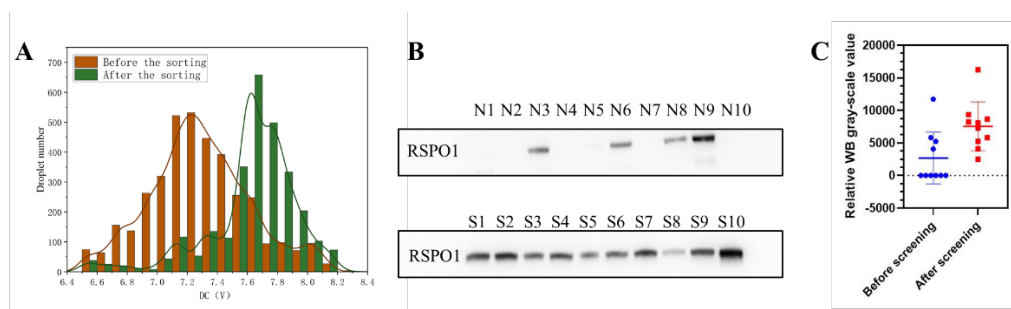


图 4-1 转染后细胞分选前后产物表达 A: 分选前后液滴信号分布. B: 分选前后各随机挑选 10 个单克隆细胞 RSPO-1 表达. C: 分选前后表达 RSPO-1 相对量

Fig.4-1 Expression of the product before and after cell sorting after transfection A: Droplet signal distribution before and after sorting. B: Ten monoclonal cells were randomly selected to express RSPO-1 before and after sorting. C: Relative amount of RSPO-1 expression before and after sorting

4.5 本章小结

实验结果显示, 本装置可实现高产细胞的筛选, 利用液滴微流控技术筛选出文库中高产细胞, 降低了文库中假阳性细胞的比例, 该技术具有高通量、低消耗等优点, 显著降低了细胞筛选的成本和时间。

本研究成功利用液滴微流控技术, 构建了一种高通量的 CHO 细胞筛选平台。该平台不仅提高了细胞筛选的效率和精度, 还降低了成本和时间。

第五章 结论与展望

自上世纪 70 年代起, CHO 细胞因其易于培养、生长迅速、遗传背景清晰等特点, 成为生产重组蛋白药物的首选细胞系。随着生物技术的不断发展, CHO 细胞在疫苗、抗体药物、生长因子、融合蛋白等领域的应用越来越广泛。近年来, 全球生物制药市场持续扩张, CHO 细胞作为生物制药的核心技术之一, 其市场规模也在稳步增长。据统计, 全球 CHO 细胞市场在过去的五年中保持了年均增长率超过 10% 的强劲势头。随着生物技术的不断创新和制药企业对高质量药物需求的增加, 预计未来几年 CHO 细胞市场将继续保持快速增长。传统的 CHO 细胞筛选方法主要依赖于显微镜观察、流式细胞仪分析等手段, 这些方法虽然在一定程度上能够实现细胞的筛选和鉴定, 但存在明显的局限性。例如, 显微镜观察对操作人员的技能要求较高, 且筛选通量有限; 流式细胞仪虽然具有较高的通量, 但设备成本昂贵, 且对细胞的预处理过程较为繁琐。本研究寻求一种高效、准确、经济的 CHO 细胞筛选方法成为了研究的热点。

液滴微流控技术在近年来得到了广泛的关注和研究, 尤其在生物工程和细胞筛选领域展现出巨大的应用潜力。本文利用液滴微流控系统对 CHO 细胞进行高产筛选, 旨在提高细胞产物的生产效率。通过对实验结果的分析, 我们深入探讨了液滴微流控技术在 CHO 细胞筛选中的优势、挑战以及未来的发展方向。

首先, 液滴微流控技术为细胞筛选提供了高通量的平台。传统的细胞筛选方法通常需要在大量的培养皿或孔板中进行, 操作繁琐且效率低下。而液滴微流控技术能够在微小的液滴中培养并筛选细胞, 大大提高了筛选的通量和效率。在本研究中, 我们成功地利用该技术实现了对 CHO 细胞的快速筛选, 并得到了高产细胞株。这不仅节约了时间和资源, 还为后续的细胞培养和产物生产提供了更为可靠的细胞来源。。

其次, 液滴微流控技术的精确控制能力对于细胞筛选至关重要。通过精确控制液滴的大小、形状和流动速度, 我们可以实现对细胞生长环境的精细调控。在本研究中, 我们优化了细胞在液滴中的培养时间, 以寻求更加适合 CHO 细胞在液滴中的生存条件, 有助于更好地了解 CHO 细胞在液滴中的生长规律, 从而筛选出活性更高的细胞株。

然而，尽管液滴微流控技术在 CHO 细胞筛选中表现出诸多优势，但仍存在一些挑战需要克服。首先，液滴微流控系统的稳定性和可重复性需要进一步提高。由于液滴的生成和操控受到多种因素的影响，如流速、压力等，因此在实际应用中需要不断优化系统参数以保证实验结果的可靠性。其次，液滴微流控技术对于细胞的培养和筛选条件仍有一定的限制。例如，有些更高产的细胞可能需要培养 24h 以后才开始表达产物，然而 24h 后细胞的存活率大幅度下降，因此可能需要进一步改进液滴微流控系统的设计以适应其生长需求。

此外，还注意到液滴微流控技术在细胞筛选中的应用仍处于起步阶段，还有许多潜在的应用场景有待探索。比如随着人工智能和机器学习等技术的发展，我们可以利用这些技术对液滴微流控筛选过程中的大量数据进行挖掘和分析，以发现更多有价值的规律和信息。

综上所述，液滴微流控技术在 CHO 细胞筛选中具有显著的优势和潜力。通过不断优化系统设计和探索新的应用场景，有望利用该技术为生物制药领域带来更高效、更可靠的细胞筛选方法。然而，同时也需要关注到该技术面临的挑战和限制，并积极寻求解决方案以推动其在实际应用中的广泛推广和应用。

本文基于 FADS 技术对高产 CHO 细胞进行筛选，首先建立了 CHO 细胞筛选的液滴操作平台，每天可实现 10^5 个细胞筛选，然后采用一种利用绿色荧光蛋白传感器 eGFP 的筛选方法。

(1) 高产 CHO 细胞高通量筛选的液滴操作平台搭建。采用软光刻法制作液滴生成、注入和分选芯片，用于生成液滴，注入液滴，分选液滴。结果表明分选速度为 100 Hz，且对于胞内表达绿色荧光蛋白的 CHO 细胞的液滴，分选准确性在 99% 以上。

(2) 高产 CHO 细胞稳转文库的高通量筛选与液滴微流控系统筛选效果评价。以野生型 CHO 细胞为底盘细胞，转染目的基因后生成单细胞液滴，在经过 24h 的液滴环境培养，注入 senser 检测液滴中的蛋白表达，最后分选出荧光约为总液滴前 1% 比例的液滴。根据结果显示，将野生型细胞与高产细胞进行混合后分选，用于评价该体系的筛选效果，结果表明，经过液滴筛选后，高产细胞占比 0.1% 的情况下，富集倍数达到 800 倍，高产细胞占比 1% 的情况下，富集倍

数达到 90 倍，高产细胞占比 10%的情况下，富集率达到 100%。在文库中筛选的过程中，假阳性率从 60%降低为 0。

本研究通过构建稳转 CHO 细胞文库，对比液滴微流控筛选前后，提高了高产细胞在文库中的占比。本文建立的液滴生成、液滴注入、液滴分选的液滴操作流程。利用氟化油与细胞培养基之间的不相溶的特性，生成稳定大小的液滴，根据细胞在液滴中培养时间与存活率之间关系，确定在表达产物的前提下选择高存活率的时间段，将检测试剂注入液滴中，检测试剂与目标蛋白作用显现荧光，通过 DRREM cell 设备将荧光信号转化为电信号对高表达细胞进行筛选。。

本实验首次将绿色荧光蛋白结合 CHO 细胞进行液滴微流控筛选高产细胞，对比传统筛选方法，可免除 ELISA 筛选高产细胞这一环节，降低了药筛过程中假阳性细胞的存在。

综上所述，本课题是一项具有重要意义的研究课题。通过本研究的开展，筛选出具有高产特性的 CHO 细胞株，提高重组蛋白药物的生产效率和质量。同时，本研究还将为其他哺乳动物细胞表达系统的优化提供借鉴和参考。在未来的工作中。

参考文献

- [1] Walsh G .Biopharmaceutical benchmarks 2018[J].NATURE BIOTECHNOLOGY, 2018, 36(12):1136-1145.
- [2] Bhutani P , Joshi G , Raja N ,et al.U.S. FDA Approved Drugs from 2015 –June 2020: A Perspective[J].Journal of Medicinal Chemistry, 2021, 64(5).
- [3] Harcum S W , Lee K H .CHO Cells Can Make More Protein[J].Cell Systems, 2016.
- [4] Xu X, Nagarajan H, Lewis N E, et al. The genomic sequence of the Chinese hamster ovary (CHO)-K1 cell line[J]. Nature biotechnology, 2011, 29(8): 735-741.
- [5] Noh S M, Shin S, Lee G M. Cell line development for therapeutic protein production[J]. Cell culture engineering: Recombinant protein production, 2019: 23-47.
- [6] West A G, Fraser P. Remote control of gene transcription[J]. Human molecular genetics, 2005, 14(suppl_1): R101-R111.
- [7] Lee J S, Kildegaard H F, Lewis N E, et al. Mitigating clonal variation in recombinant mammalian cell lines[J]. Trends in biotechnology, 2019, 37(9): 931-942.
- [8] Lattenmayer C, Loeschel M, Schriebl K, et al. Protein-free transfection of CHO host cells with an IgG fusion protein: Selection and characterization of stable high producers and comparison to conventionally transfected clones[J]. Biotechnology and bioengineering, 2007, 96(6): 1118-1126.
- [9] Chusainow J, Yang Y S, Yeo J H M, et al. A study of monoclonal antibody-producing CHO cell lines: What makes a stable high producer[J]. Biotechnology and bioengineering, 2009, 102(4): 1182-1196.
- [10] Pilbrough W, Munro T P, Gray P. Intracloal protein expression heterogeneity in recombinant CHO cells[J]. PloS one, 2009, 4(12): e8432.
- [11] Lewis N E, Liu X, Li Y, et al. Genomic landscapes of Chinese hamster ovary cell lines as revealed by the Cricetulus griseus draft genome[J]. Nature biotechnology, 2013, 31(8): 759-765.
- [12] Zeyda M, Borth N, Kunert R, et al. Optimization of sorting conditions for the selection of stable, high-producing mammalian cell lines[J]. Biotechnology progress, 1999, 15(5): 953-957.

- [13]Capecchi M R. Altering the genome by homologous recombination[J]. Science, 1989, 244(4910): 1288-1292.
- [14]Borth N, Zeyda M, Katinger H. Efficient selection of high-producing subclones during gene amplification of recombinant Chinese hamster ovary cells by flow cytometry and cell sorting[J]. Biotechnology and bioengineering, 2000, 71(4): 266-273.
- [15]Ritter A, Nuciforo S, Schulze A, et al. Fam60A plays a role for production stabilities of recombinant CHO cell lines[J]. Biotechnology and bioengineering, 2017, 114(3): 701-704.
- [16]Yang W, Zhang J, Xiao Y, et al. Screening strategies for high-yield Chinese hamster ovary cell clones[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2022, 10: 858478.
- [17]Kumar N, Borth N. Flow-cytometry and cell sorting: an efficient approach to investigate productivity and cell physiology in mammalian cell factories[J]. Methods, 2012, 56(3): 366-374.
- [18]Hinterkörner G, Brugger G, Müller D, et al. Improvement of the energy metabolism of recombinant CHO cells by cell sorting for reduced mitochondrial membrane potential[J]. Journal of biotechnology, 2007, 129(4): 651-657.
- [19]Sleiman R J, Gray P P, McCall M N, et al. Accelerated cell line development using two-color fluorescence activated cell sorting to select highly expressing antibody-producing clones[J]. Biotechnology and bioengineering, 2008, 99(3): 578-587.
- [20]Aharoni A, Amitai G, Bernath K, et al. High-throughput screening of enzyme libraries: thiolactonases evolved by fluorescence-activated sorting of single cells in emulsion compartments [J]. Chemistry and Biology, 2005, 12(12): 1281-1289.
- [21]F Ma, Yuan X, Huang C, et al. An Improved Single Cell Ultrahigh Throughput Screening Method Based on In Vitro Compartmentalization [J]. Plos One, 2014, 9(2): e89785.
- [22]Alexis A, Michael R. Ultrahigh-Throughput Improvement and Discovery of Enzymes Using Droplet-Based Microfluidic Screening [J]. Micromachines, 2017, 8(4): 128.
- [23]林炳承, 秦建华. 图解微流控芯片实验室 [J]. 北京: 科学出版社, 2008

- [24]Chiu F, Stavrakis S. High-throughput droplet-based microfluidics for directed evolution of enzymes [J]. ELECTROPHORESIS, 2019, 2860-2872.
- [25]AdamSciambi, Abate A R. Accurate microfluidic sorting of droplets at 30 kHz [J]. Lab on a Chip, 2014, 15(1): 47-51.
- [26]Sjostrom S L, Bai Y, Huang M, et al. High-throughput screening for industrial enzyme production hosts by droplet microfluidics [J]. Lab on a Chip, 2014, 14(4): 806-13.
- [27]Ouriel, Ca en, Simon, et al. High-throughput multiplexed fluorescence-activated droplet sorting [J]. Microsystems and Nanoengineering, 2018, (4): 33.
- [28]Baret J C, Miller O J, Taly V, et al. Fluorescence-activated droplet sorting (FADS): efficient microfluidic cell sorting based on enzymatic activity [J]. Lab on a Chip, 2009, 9(13): 1850-1858
- [29]Chiu F, Stavrakis S. High-throughput droplet-based microfluidics for directed evolution of enzymes [J]. ELECTROPHORESIS, 2019, 2860-2872.
- [30]Yang W, Zhang J, Xiao Y, et al. Screening strategies for high-yield Chinese hamster ovary cell clones[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2022, 10: 858478.
- [31]Harraghy N, Calabrese D, Fisch I, et al. Epigenetic regulatory elements: recent advances in understanding their mode of action and use for recombinant protein production in mammalian cells[J]. Biotechnology journal, 2015, 10(7): 967-978.
- [32]Mcgraw C E , Peng D , Sandoval N R .Synthetic biology approaches: the next tools for improved protein production from CHO cells[J].Current Opinion in Chemical Engineering, 2020, 30:26-33.
- [33]Guo X , Wang C , Wang T Y .Chromatin-modifying elements for recombinant protein production in mammalian cell systems[J].Critical Reviews in Biotechnology, 2020(5):1-9.
- [34]Romanova N, Noll T. Engineered and natural promoters and chromatin - modifying elements for recombinant protein expression in CHO cells[J]. Biotechnology Journal, 2018, 13(3): 1700232.
- [35]Lanza A M , Kim D S , Alper H S .Evaluating the influence of selection markers on obtaining selected pools and stable cell lines in human cells[J]. Biotechnology Journal, 2013, 8(7):811-821.

- [36]Noh S M, Sathyamurthy M, Lee G M. Development of recombinant Chinese hamster ovary cell lines for therapeutic protein production[J]. Current opinion in chemical engineering, 2013, 2(4): 391-397.
- [37]Yeo J H M, Ho S C L, Mariati M, et al. Optimized selection marker and CHO host cell combinations for generating high monoclonal antibody producing cell lines [J]. Biotechnology journal, 2017, 12(12): 1700175.
- [38]Grindes L, Florimond C, Ribault S, et al. Weak promoters to drive selection marker expression: Improvement of cell line development process for therapeutic protein production in CHO-K1 cells[J]. Journal of Biotechnology, 2023, 369: 43-54.
- [39]Harraghy N, Calabrese D, Fisch I, et al. Epigenetic regulatory elements: recent advances in understanding their mode of action and use for recombinant protein production in mammalian cells[J]. Biotechnology journal, 2015, 10(7): 967-978.
- [40] Westermann L, Li Y, Göcmen B, et al. Wildtype heterogeneity contributes to clonal variability in genome edited cells[J]. Scientific Reports, 2022, 12(1): 18211.
- [41]Ritter A, Voedisch B, Wienberg J, et al. Deletion of a telomeric region on chromosome 8 correlates with higher productivity and stability of CHO cell lines[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2016, 113(5): 1084-1093.
- [42]Pourcel L, Buron F, Arib G, et al. Influence of cytoskeleton organization on recombinant protein expression by CHO cells[J]. Biotechnology and bioengineering, 2020, 117(4): 1117-1126.
- [43]Chakrabarti L, Chaerkady R, Wang J, et al. Mitochondrial membrane potential-enriched CHO host: A novel and powerful tool for improving biomanufacturing capability[C]. MAbs, 2022: 2020081.
- [44]Grindes L, Florimond C, Ribault S, et al. Weak promoters to drive selection marker expression: Improvement of cell line development process for therapeutic protein production in CHO-K1 cells[J]. Journal of Biotechnology, 2023, 369: 43-54.
- [45]Hamaker N K, Lee K H. Site-specific integration ushers in a new era of precise CHO cell line engineering[J]. Current opinion in chemical engineering, 2018, 22: 152-160.
- [46]Knight T J , Turner S , Jaques C M ,et al.Selection of CHO host and recombinant cell pools by inhibition of the proteasome results in enhanced pr

- oduct yields and cell specific productivity[J].Journal of biotechnology, 2021, 337:35-45.
- [47]Meleady P, Meleady. Heterologous Protein Production in CHO Cells[J],2017
- [48]Accelerated clone selection for recombinant CHO CELLS using a FACS-based high-throughput screen.[J].Biotechnology Progress, 2010, 23(2).
- [49]Modulation of protein properties in living cells using nanobodies[J].Nature Structural & Molecular Biology, 2010, 17(1):133-138.
- [50]Tihanyi B, Nyitray L. Recent advances in CHO cell line development for recombinant protein production[J]. Drug Discovery Today: Technologies, 2020, 38: 25-34.
- [51]Kalkan A K , Palaz F , Sofija S ,et al.Improving recombinant protein production in CHO cells using the CRISPR-Cas system.[J].Biotechnology advances, 2023:, 108115.
- [52]] Lee J S, Kildegaard H F, Lewis N E, et al. Mitigating clonal variation in recombinant mammalian cell lines[J]. Trends in biotechnology, 2019, 37(9): 931-942.
- [53]Hu S Y , Liao C H , Lin Y P ,et al.Zebrafish eggs used as bioreactors for the production of bioactive tilapia insulin-like growth factors[J].Transgenic Research, 2011, 20(1):73-83.
- [54]Otte,Kerstin,Handrick,et al.The art of CHO cell engineering: A comprehensive retrospect and future perspectives[J].Biotechnology Advances: An International Review Journal, 2015, 33(8):1878-1896.
- [55]Kestur S , Dantara D , Narayanan V .SHARC: A streaming model for FPGA accelerators and its application to Saliency[C]//Design, Automation & Test in Europe.IEEE, 2011.
- [56]千爱君,萧耿苗,李壮,等.重组人糖蛋白激素 $\beta 5/\alpha 2$ 融合蛋白在 CHO-S 细胞中的表达纯化及功能活性分析[J].中国药理学通报,2024,40(02):390-396.
- [57]朱中奎,申璐,唐万琴,等.2 型糖尿病患者接种重组 CHO 细胞乙型肝炎疫苗的免疫原性观察[J].中国疫苗和免疫,2023,29(06):620-623.
- [58]邓小莺,王俊娜,马翻斯,等.稳定表达猪流行性腹泻病毒 S 蛋白 Flp-In-(TM) CHO 细胞系的构建[J/OL].中国动物传染病学报,1-8[2024-04-03].
- [59]苏贤德,陆建胜,胡伟伟,等.生产抗 Tim3 单抗 CHO 细胞 N-1 灌流高密度培养工艺研究[J].药物生物技术,2023,30(05):464-469.

- [60] 苏影,张炜坚,万宇翔,等.CHO 细胞强化流加培养过程理性设计与建立[J].中国生物工程杂志,2023,43(10):20-31.
- [61] 徐静,余垚,Tan Kee Wee.过量表达 CHO 细胞内源性糖基化酶对抗体五聚甘露糖修饰的影响[J].中国医药生物技术,2023,18(04):319-327.

参与新产品开发证明

安徽工程大学研究生部：

贵校 2021 级生物与医药专业周捷同学于 2022 年至 2023 年间参与本公司与清华大学合作的“高产重组蛋白 CHO 细胞高通量液滴筛选系统搭建”项目。周捷同学在研期间不断攻坚克难，基于清华大学已有的生物传感器与液滴微流控技术平台，成功搭建可用于高产重组蛋白 CHO 细胞高效筛选的高通量液滴微流控系统，可将后续高产重组蛋白单克隆细胞株得率提高到 100%。该系统显著提升了高产蛋白 CHO 单克隆细胞株的开发效率，展现出巨大的应用潜能。

以上成果对本公司底盘细胞及蛋白产品的开发起到重要作用。

特此证明！

本证明仅用于安徽工程大学研究生部学术成果等登记。

单位名称：北京碧澄生物科技有限公司



致谢

时光荏苒，岁月如梭。随着这篇硕士毕业论文的完成，我的在安徽工程大学研究生生涯也即将画上句号。站在这个人生的重要节点，我深感激动与不舍。在此，我要向所有给予我帮助、支持和鼓励的人表示衷心的感谢。

首先，我要感谢张翀老师、薛正莲老师、邢新会老师。三位老师在三年里给予了我极大的帮助，引领我在学习和人生的道路。在论文的选题、开题、撰写和修改过程中，始终给予我耐心的指导和帮助，使我的论文得以顺利完成。不仅让我在学术上有所收获，更让我懂得了如何做人、如何做事。在此，致以最崇高的敬意和最衷心的感谢。

其次，我要感谢我的家人。在我研究生生涯中，他们始终是我坚实的后盾。他们无私的付出、无尽的关爱和坚定的支持，让我能够全身心地投入到学习和研究中。他们的期望和鼓励，是我不断前行的动力。在此，我要向我的家人表示最真挚的感谢和最深情的祝福。

同时，我还要感谢王怡老师、李爽师兄和周雯萱师姐。在研究生阶段，一起度过了许多难忘的时光。在论文撰写过程中，他们也给予了我许多宝贵的建议和支持。在此，我要向他们表示衷心的感谢和美好的祝愿。

此外，我还要感谢课题组为我们提供了良好的学术氛围和丰富的学术资源。图书馆的资料、实验室的设备以及各位老师的指导，都为我的研究提供了极大的便利。在这里，我不仅学到了专业知识，更学会了如何独立思考、如何解决问题。我深感自己是多么幸运，能够在这样一个优秀的学术环境中成长。在论文的写作过程中，我还参考了许多国内外学者的研究成果。他们的研究为我提供了宝贵的启示和借鉴。在此，我要向他们表示衷心的感谢。同时，我也要感谢论文评阅老师和答辩委员会的各位专家。他们的宝贵意见和建议，使我的论文更加完善和成熟。在未来的日子里，我将继续努力学习、不断进步，为实现自己的人生目标而努力奋斗。我期待着在新的征程中，能够再次遇到那些给予我帮助、支持和鼓励的人，与他们共同创造更加美好的明天。再次感谢所有关心、帮助和支持我的人！愿我们都能在未来的岁月里，收获更多的成功和幸福！