

生产用重组哺乳动物细胞株的克隆筛选方法

徐睿瑶¹ 蔡洁行² 张玉彬^{1*}

(¹中国药科大学生命科学与技术学院, 南京 210009;

²上海药明康德新药开发有限公司生物制药与生物工艺部, 上海 200131)

摘要 克隆筛选是重组细胞株构建过程中的关键步骤。除了早期的克隆环, 有限稀释法、半固体培养法、流式细胞术和细胞分选是目前生物制药行业运用最为广泛的克隆筛选方法。该文综述了克隆筛选方法的原理、特点, 介绍了促进方法发展的其他技术如单细胞成像和自动化, 比较了不同克隆筛选方法的优缺点。针对如何选择合适的克隆筛选方法提出了建议, 为从事相关研究与生产领域的科研人员提供帮助。

关键词 克隆筛选; 有限稀释法; 半固体培养法; 流式细胞术和细胞分选; 单细胞成像; 自动化

Cloning Methods for Engineering Recombinant Mammalian Cell Line

Xu Ruiyao¹, Cai Jiexing², Zhang Yubin^{1*}

(¹School of Life Science & Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China;

²WuXi AppTec, Biologics & Bioprocess, Shanghai 200131, China)

Abstract Cloning plays an essential role in the development of recombinant cell line. Except cloning cylinders in early stage, limiting dilution cloning, semi-solid cultivation, flow cytometry and cell sorting are the most popular cloning methods in biopharmaceutical industry at present. This paper reviewed the principle and characteristic of these methods, introduced some new technologies which promote the development of cloning methods like single-cell imaging and automation and assessed the advantage and disadvantage of these methods. Some suggestions were given about how to make the best choice to facilitate researchers in this field.

Keywords cloning; limiting dilution cloning; semi-solid cultivation; flow cytometry and cell sorting; single-cell imaging; automation

生物制品是根据生物工程原理, 应用普通的或经生物技术改造的生物材料制备的用于预防、诊断和治疗人类疾病的药品。近年来, 生物制药行业的发展迅猛, 2013年全球生物制品市场的总产值为2 000.6亿美元, 预计2014年的总产值将达到2 340亿美元^[1]。2013年, 全球销售额前十的药物中生物药物占7个, 销售额百分比达到75.1%; 单抗类药物有6个, 其中修美乐是首个年度销售额突破百亿美元的药品。与化学药物相比, 生物药物具有明显的优势, 针对性

强、药效显著、安全性高, 而且能用于传统化学药难以治疗的疾病, 占据了药品市场的主导地位。

生物药物表达系统的宿主细胞有细菌(大肠杆菌)、酵母(酿酒酵母、甲醇酵母和毕赤酵母等)、哺乳动物细胞、昆虫杆状病毒、转基因动物和转基因植物等, 其中前三者经过长期的摸索和实践已经拥有纯熟的技术, 并在研发和生产中得到了广泛的应用。哺乳动物表达系统拥有完善的翻译后加工修饰体系, 所以能合成结构和功能复杂的蛋白, 表达的产物更接近于天然蛋白质。获美国食品和药物管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准的蛋白类生物药物中, 超过50%的产品使用哺乳动物表达系统^[2], 大部分生物药物是由中国仓鼠卵巢细胞(Chinese hamster ovary, CHO)、小鼠骨髓瘤细胞

收稿日期: 2015-01-27 接受日期: 2015-03-17

*通讯作者。Tel: 025-83271300, E-mail: yubinzhang66@yahoo.com

Received: January 27, 2015 Accepted: March 17, 2015

*Corresponding author. Tel: +86-25-83271300, E-mail: yubinzhang66@yahoo.com

网络出版时间: 2015-05-04 18:26

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20150504.1826.009.html>

(mouse myeloma-0, NS0)、杂交瘤细胞、人胚胎肾脏293细胞(human embryonic kidney 293, HEK293)及幼仓鼠肾细胞(baby hamster kidney, BHK)等工程细胞株生产的。以应用最广泛的CHO细胞株为例,通过对表达系统、细胞株和培养工艺的优化,补料分批培养(fed-batch)的单抗产量能达到8~10 g/L^[3]。Huang等^[4]在补料分批培养中使用具有明确化学成分的培养基,得到的单抗和融合蛋白产量在10~13 g/L。

以单抗药物生产为例,工程细胞系的构建是药物生产过程的关键环节,它直接影响后续的细胞培养、纯化、方法学研究和制剂研究等。要获得生长能力强、表达水平高、产物质量合格和遗传稳定性好的工程细胞株,必须综合考虑如何选择宿主细胞、表达载体、筛选系统及克隆筛选方法^[5]。本文综述了目前生物制药行业认可的几种克隆筛选方法,对方法的原理和优缺点进行了阐述,并进行了综合比较,针对如何根据实际意愿选择合适的方法提出了自己的见解,希望给从事相关研究与生产领域的科研人员提供帮助。

1 克隆环

克隆环是比较简单易行的克隆挑取方法。用无菌硅脂或甘油密封克隆环,将选中的克隆密封在培养皿和克隆环底部,加入胰酶消化,最后将克隆转移至新的培养容器中。克隆环适用于实验室规模的贴壁细胞的单克隆挑取。

2 有限稀释法

有限稀释法(limiting dilution cloning, LDC)是一种通过梯度稀释以获得单克隆的方法。它的应用范围广,对于大多数细胞类型,如杂交瘤细胞、CHO细胞及干细胞等都有较好的克隆分离效果。LDC的操作过程大致分为接种(铺板)、筛选和扩增。接种的细胞液经过逐级稀释后加到96孔板中,每个孔所含的细胞个数理论上不大于1。

传统的LDC方法是在显微镜下观察细胞状态和接种情况,寻找只含有1个细胞的孔,并对细胞的生长情况进行后续的追踪。当孔中的细胞达到一定的汇合度后即可检测克隆表达量。结合生长状态和表达量,选择克隆进行扩增。由于传统的LDC是由肉眼观察接种的,不仅耗时耗力,而且存在人为误差。细胞在外面放置过久会影响细胞的生长状态甚

至引发污染。为了增大筛选到单克隆的可能性,至少要进行两轮实验。

自动化和成像技术的发展对于LDC方法的开发有着巨大的推动作用。和传统的手工操作相比,使用自动化工作站铺板不仅能节省时间,还能排除人为因素,降低污染几率。许多先进的单细胞成像设备,如Genetix公司的Clone Select Imager、Solentim公司的Cell Metric以及Roche公司的Cellavista等,可在克隆筛选的早期鉴定所选细胞是否为单克隆。Clone Select Imager可自动对细胞进行扫描和成像,快速扫描时间仅70 s,大大节省了克隆挑选的时间和人力。它还能监控细胞的生长状态和汇合度,对筛选的克隆进行快速详细的分析^[6]。由于接种当天的单细胞成像图片可作为单克隆的证据,只需进行一轮LDC即可完成克隆筛选。

LDC的优点有:操作简单,不需要特殊试剂;适用性强;结合图像技术能大大缩短细胞株构建周期,节约时间和资源。它也有不足之处,如接种的单细胞率低或标记的单细胞不能长成细胞群,导致最终的克隆形成率降低。经统计学计算,每孔细胞数 X 服从常数为 λ 的泊松分布: $P(X=k)=\lambda^k e^{-\lambda}/k!$, λ 表示每孔细胞数的均值, P 表示每孔细胞数为 k 的概率。为了尽可能提高接种的单细胞率, λ 的范围应落在0.4~0.8之间。合理地设计工作站铺板程序、优化铺板培养基和筛选培养基组分和浓度、适时地补充和更换培养基可以改善上述问题。在过去的十年间, LDC使用的基础培养基从有血清过渡到了无血清的阶段,避免了血清中的不明成分和易变物质对细胞的影响,降低了病毒、支原体等污染的概率。为了提高克隆形成率,除了基础培养基,还需要添加促进细胞生长的成分。针对不同的细胞,如何确定培养基的成分及各组分的浓度、比例,决定了是否能在最短的时间筛选到高表达的单克隆。

3 半固体培养法

将细胞以低密度接种在半固体培养基(琼脂、甲基纤维素等),当细胞生长成分离的集落后,采用手工或自动化挑取设备进行克隆的挑取。半固体培养基不仅可以固定细胞以形成可区分的集落,也能将分泌蛋白保留在细胞附近。

传统的半固体培养法是在显微镜下使用移液器手工吸取,耗时耗力,不仅容易吸到相邻的克隆,

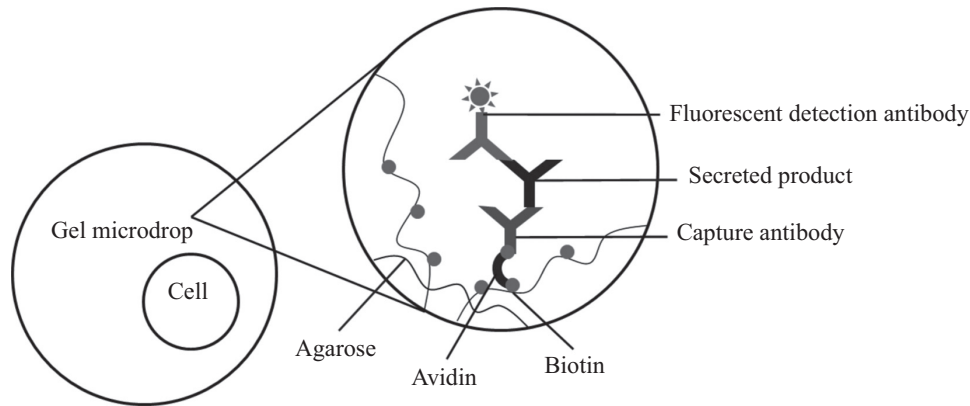


图1 凝胶微粒原理图(根据参考文献[8]修改)

Fig.1 Schematic representation of gel microdrop (modified from reference [8])

而且对细胞有一定的机械损伤。Genetix公司推出的蛋白表达细胞株筛选系统ClonePix FL很好地解决了上述问题。ClonePix FL有两种光源系统:白光光源系统负责监测群落的生长速度和挑选群落,荧光光源系统检测蛋白的表达量。在克隆挑取前对挑选的参数(荧光值、大小、不规则性、位置和邻近值等)进行设定,软件会对克隆的大小和表达水平进行标准化分析,并通过荧光、白光成像的多重分析选定和挑取最终克隆^[6]。ClonePix FL可以在0.5 h内挑取1块96孔板的克隆,节约了时间和人力。它还能追溯克隆的来源,保存挑取的高分辨率图像信息。类似的高通量仪器还有Aviso公司的CellCelector。值得一提的是,CellCelector的收集模式分为单细胞模式、刮取模式和甲基纤维素模式,操作者可以根据自己的期望和要求选择合适的模式。CellCelector的高CO₂和加热(37 °C)性能可以模拟细胞生长的环境,保证了细胞在最佳的环境中完成筛选过程。

半固体培养法使细胞在流动性低的培养环境下生长成分散的群落,一个群落代表一个克隆。自动化和成像技术的发展使得半固体筛选法具有更高的效率、选择性、灵敏度和灵活性。

必须注意的是,ClonePix FL需要等到细胞形成一定大小的群落才能进行克隆挑取;CellCelector虽然有单细胞收集模式,但是由于收集单细胞的玻璃毛细管价格昂贵,需要特殊的维护,比较常用的还是甲基纤维素模式。

4 流式细胞术和细胞分选(flow cytometry and cell sorting)联用方法

将待测的细胞经荧光染料(FITC、PE和PerCP

等)或荧光标记物特异性染色,用特定波长的激光束照射,激发荧光。前向角光散射(forward angle light scatter, FSC)和侧向角光散射(side angle light scatter, SSC)分别表征细胞的相对大小和内部颗粒度,相对荧光强度值能反映细胞目标的相对表达水平。根据这些特性,在混合的细胞群中可检测和选择性地分离出想要的克隆。流式细胞术和细胞分选可以与以下技术联用,建立特异性强、精确度高、快速及高通量的克隆筛选方法。

4.1 凝胶微粒

凝胶微粒(gel microdrop, GMD)和流式细胞术结合的方法可以快速检测细胞群中单个细胞的蛋白分泌情况。图1描绘了该方法的基本原理:生物素化的琼脂糖凝胶通过链霉亲和素与生物素化的捕获试剂连接,细胞被包裹在里面;细胞分泌的分子在胞外与捕获试剂特异性结合;荧光标记的检测试剂和被捕获的分子互补结合,被固定在凝胶微粒中^[7]。因此,通过流式细胞术检测凝胶微粒的相对荧光强度可以预测产物的分泌情况,鉴定和分选单克隆细胞。

GMD可用于细菌、真菌、哺乳动物细胞等单细胞水平的筛选。GMD的制备和使用可根据细胞和分泌分子的不同进行设计,通用性强,灵活度高。常规的流式细胞荧光分选技术(fluorescence activated cell sorting, FACS)只能检测细胞表面的分泌物,而GMD可使分泌到胞外的分子阻留在GMD中,直接分析细胞的分泌特性^[9]。GMD的生物相容性好,筛选完的细胞可以继续培养。

GMD也有一些不足,如需要特殊的仪器来制备,需要针对不同的细胞进行方法开发^[10]。由于GMD的渗透性好,小部分分子可能会分泌到邻近的GMD中,

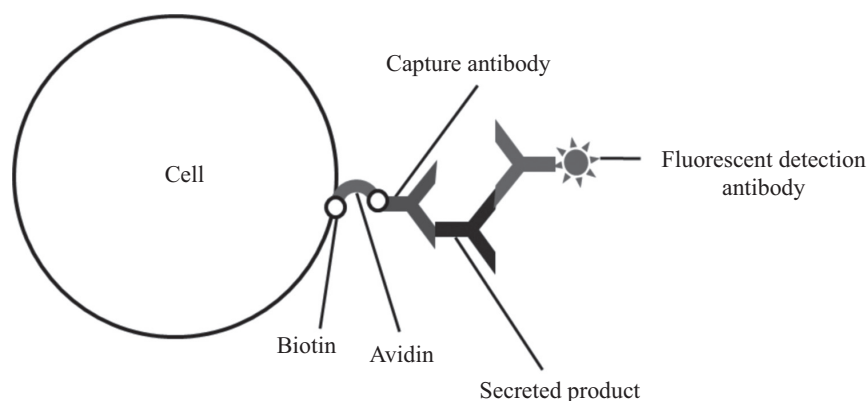


图2 亲和捕获表面展示原理图(根据参考文献[8]修改)

Fig.2 Schematic representation of affinity capture surface display (modified from reference [8])

导致出现假阳性结果^[11]。根据泊松分布制备的GMD中,单细胞率只有10%~15%^[12]。此外,GMD的直径一般为35~50 μm,分选时需要直径200 μm的喷嘴,一般的流式细胞仪没有相关配置^[13]。NS0等脆弱细胞的活性在去除凝胶包被的过程中有所降低^[14]。

4.2 亲和捕获表面展示

和GMD原理相似,如图2所示,亲和捕获表面展示(affinity capture surface display, ACSD)利用生物素和亲和素的结合,将分泌分子捕获在细胞表面,利用荧光标记试剂结合FACS技术对单细胞的分泌情况进行直接的定量测量。不同的是,ACSD用的是含有10%明胶的高黏度培养基,能够将分泌产物阻留在细胞表面,不会出现假阳性现象^[15]。

ACSD通用性强,制备所需的试剂便宜,不需要特殊的设备,过程简单,能够快速高通量地筛选想要的细胞。与GMD对FACS仪器的喷嘴大小要求相反,ACSD可以和任何标准配置的FACS联用。分选出的细胞可以立即培养,不需要做去膜处理^[13],也可以保持细胞的活性。

ACSD的饱和度比GMD低很多^[14],因此,检测限相对狭窄,不利于区分不同表达水平尤其是高表达的细胞。该方法需要根据不同的细胞和分泌分子而改动^[10]。

4.3 低温捕获法

GMD和ACSD是通过特殊的生物材料将细胞分泌的产物固定在细胞表面,然而,Andre等^[16]发现,融合蛋白FGF-2-GFP自发地聚集在细胞膜外表面的蛋白簇中,蛋白簇富含硫酸肝素糖蛋白。Brezinsky等^[17]建立的细胞表面标签系统也证实了目标融合蛋白和细胞表面的糖蛋白结合。单个细胞表面的蛋白

含量与细胞分泌的蛋白数量有着显著的相关性^[18-19]。用荧光标记的试剂直接对细胞膜染色,表面荧光强度作为重要的筛选标准,可用来表征单细胞蛋白的分泌情况。经验证,该方法在较低的温度(如4 °C)下荧光强度很稳定,因此被称为低温捕获法^[20-21]。

报告基团的引入拓展了该方法的适用范围。非荧光报告蛋白CD20是一种正常情况下在CHO细胞不表达的蛋白,将目的蛋白基因和CD20基因通过内部核糖体进入位点(internal ribosome entry site, IRES)连接,两者同时转录在一条mRNA上,分开翻译^[22]。用抗CD20的荧光标记抗体检测CD20的表达量,从而预测目的蛋白的表达量。

低温捕获法在杂交瘤细胞、CHO、NS0、毕赤酵母的克隆筛选和分离中都有成功的运用^[23]。该方法能在克隆筛选早期预测摇瓶中克隆的表达水平,这比检测细胞上清的蛋白含量更快速和准确^[22]。与GMD和ACSD相比,该方法更加简单。细胞表面标记与FACS联用可以缩短筛选周期,减小工作量。

然而,不是所有细胞的表面蛋白含量和分泌量都具有显著的相关性,且该方法对细胞的蛋白传递能力有严格的要求,细胞膜表面的蛋白含量需要达到一定水平才能保证检测的准确度^[17]。

4.4 荧光蛋白共表达

以绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)为代表的荧光蛋白家族是完全由基因编码的荧光探针,可用于基因表达的研究^[24]。GFP不需要借助其他底物和辅酶,在特定波长的激光激发下自身就能发光。将GFP或其衍生物的基因和目的基因一起编入双顺反子表达载体,GFP的荧光强度与表达量成良好的线性关系^[25]。GFP的表达量间接反映

了目的蛋白的表达量,因此,荧光报告物的强度和目的蛋白的产量有着良好的相关性。

随着流式细胞术的发展,GFP等自体荧光蛋白作为报告物得到了更广泛的应用:(1)当目的产物是抗体时,不同的荧光蛋白(绿色荧光蛋白和黄色荧光蛋白)分别与抗体的重链和轻链基因通过IRES相连,共转染进细胞,如果细胞表达了抗体重链和轻链,则会发出两种荧光^[26];(2)分裂型GFP报告系统将两个GFP片段的基因分别与抗体重链和轻链基因编码在两个载体上,当细胞同时表达两个载体时,两个GFP片段折叠组装成完整的GFP分子,能够发出绿色荧光^[27];(3)GFP还可与金属硫蛋白组成筛选标记MTGFP,该复合物与目的蛋白基因共表达,既能够可视化检测细胞的表达水平,又能提高克隆的筛选效率^[28]。

GFP可用于多种细胞,适用范围从微生物直到哺乳动物细胞。GFP的表达对细胞的生长和代谢没有影响^[29],蛋白本身对细胞无毒^[28]。荧光蛋白(fluorescent protein, FP)不需要特殊的准备过程和辅因子,通过荧光强度直观地筛选出高表达克隆。相较于单荧光系统,多荧光系统的适用性更广泛,精确度更高。不同突变体(蓝色荧光蛋白和黄色荧光蛋白等)的出现促成了多荧光报告系统发展。然而,新型的分裂型GFP报告系统有着更明显的优势:片段的互补对比多荧光筛选的准确性高;双色荧光系统只能分别完成对抗体重、轻链的相对定量,而分裂型GFP系统可用于抗体的定量分析^[27]。

GFP的表达水平受到多种因素的限制,比如启动子和细胞类型,需针对具体情况充分考虑该方法的可行性。另外,GFP不能出现在最终产品中,需要通过纯化除去。

5 方法比较

转染后的细胞间存在着基因型的差异,可能的原因有基因重组时出现了基因缺失,或是外源修饰时发生了基因沉默等^[3]。即使基因型相同的细胞在生长特性、表达水平和产品质量等方面也会有差异,而这种细胞间的固有差异是不可避免的。美国FDA规定,生产重组药物的工程细胞株必须来源于同一个细胞。因此,找到筛选分离单细胞和验证单克隆性的方法是克隆筛选过程中亟待解决的问题。在转染后的细胞群中,细胞的分布遵循泊松分布规律,大

部分细胞的表达量在平均水平,而少部分细胞的表达量高于平均水平。为了找到满足条件的高表达细胞株,需要进行大量的筛选工作。为了解决上述问题,需要结合现有资源、所筛选的细胞类型和目的药物,寻找最合适的克隆方法。

克隆筛选是细胞株构建中至关重要的环节。除去适用于贴壁筛选的克隆环法,有限稀释法、半固体培养法、流式细胞术和细胞分选都在生产用细胞株的筛选中有广泛的应用。下面从工作效率、单克隆率、筛选周期、细胞类型、所用试剂及克隆表达水平等方面综合评价三种方法。

5.1 工作效率

三种方法都可使用自动化设备:有限稀释法可利用自动化工作站进行稀释和铺板工作;半固体培养法使用Clonepix FL和CellCelector等克隆挑取设备,按照事先设定好的程序和参数自动完成克隆的筛选和挑取;流式细胞仪的商业化产品如Becton-Dickinson公司的FACS、Beckman-Coulter公司的EPICS系列等都能自动鉴定和分选想要的克隆。有限稀释法的铺板速度是50 s/块96孔板;半固体培养法挑取克隆的速度是30~50 min/块96孔板;流式细胞术和细胞分选的检测速度是1 000~5 000细胞/s,大型机器能达到100 000细胞/s,分选速度大于1 000细胞/s。自动化设备大大节约了时间和人力。另外,除了凝胶微粒法需要专业人员外,其他方法都比较容易操作。但是,自动化仪器的价格都比较昂贵。

5.2 单克隆率

有限稀释法、流式细胞术和细胞分选能在单细胞水平对克隆进行筛选,而且能通过拍照证明所选的克隆源于一个细胞。Genetix公司也给出了使用Clonepix系列仪器挑取克隆的单克隆率计算公式:单克隆率= $[1-0.25 \times \pi \times (d_1+d_2)^2 \times (n-1) / (0.25 \times \pi \times D^2)] \times 100\%$,其中, d_1 和 d_2 分别为两个挑取克隆群落的直径, n 为克隆个数, D 为培养孔的直径^[30]。这是一个统计学公式,由接种密度和克隆大小的关系得出细胞的单克隆率。假设挑取的克隆直径为0.4 mm,六孔板直径为35 mm,一个孔挑取25个克隆,那么单克隆率为99.75%。如果进行两轮筛选,单克隆率会提高到99.98%。

5.3 筛选周期

图3比较了三种方法的细胞株构建过程。半固体培养基法从克隆筛选到亚克隆表达大约需要11~12周,比另外两种方法多用一个月时间。

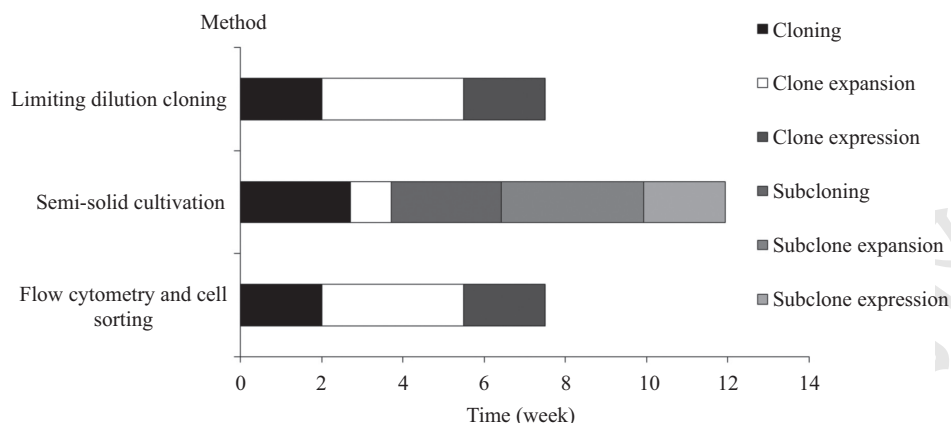


图3 三种克隆筛选方法的细胞株构建过程

Fig.3 Cell line developing processes of three clone selection methods

5.4 细胞类型

有限稀释法和半固体培养法适用于大多数哺乳动物细胞的筛选。脆弱细胞的分选尽量避免用流式细胞术。

5.5 试剂

根据美国FDA的要求, 药物生产的过程中尽量不要加入动物来源的物质。流式细胞术和细胞分选法可以选择是否使用外源抗体。半固体培养法必须使用外源抗体。

5.6 克隆表达水平

克隆筛选的早期可以通过荧光值的高低预测克隆的表达水平。流式细胞术通过分选时细胞表面的荧光值预测克隆的表达水平。有限稀释法根据培养1~3 d的细胞上清的蛋白检测值对克隆进行排名。经统计学分析, 克隆的蛋白检测值排名与最终表达量的关系不显著。半固体培养法检测的是细胞在半固体培养基中培养了10~14 d积累而来的表达量。值得一提的是, ClonePix系列仪器能够从低表达的细胞群中筛选出高表达的克隆, 因此受到国外一些大型制药公司的青睐。Merck和MedImmune也开发了FACS和单细胞成像技术结合的克隆筛选方法^[3]。

6 结论

有限稀释法适用范围广, 不含动物来源物质, 成本低; 流式细胞术和细胞分选工作效率高, 筛选通量大。这两种筛选方法的筛选周期短, 但是单细胞率和成克隆率有待提高。半固体培养法虽然筛选周期略长, 单克隆性证据不如另两种方法充分, 但筛选的克隆表达水平高。三种方法各有优缺点, 克隆筛

选时要根据实际情况选择最合适的方法。如果考虑生产周期, 前两种方法能缩短一半的时间, 大大节约了药物研发的时间成本。若站在单克隆性的角度上, 相较于通过概率计算得出的单克隆率, 部分研究者更愿意相信清晰可靠的单细胞成像图片, 这也是前两种方法的优势。当然, 要想得到表达量高的克隆, 使用半固体法更为稳妥。

参考文献 (References)

- Highsmith J. Biologic therapeutic drugs technologies and global markets. BBC Research Published: January 2015. Report Code: BIO079C.
- Zhu J. Mammalian cell protein expression for biopharmaceutical production. *Biotechnol Adv* 2012; 30(5): 1158-70.
- Alvin K, Ye J. Generation of cell lines for monoclonal antibody production. *Methods Mol Biol* 2014; 1131: 263-71.
- Huang Y, Hu W, Rustandi E, Chang K, Yusuf-Makagiansar H. Maximizing productivity of CHO cell-based fed-batch culture using chemically defined media conditions and typical manufacturing equipment. *Biotechnol Prog* 2010; 26(5): 1400-10.
- 刘伯宁. 治疗性单抗与抗体产业关键技术. *中国生物工程杂志 (Liu Boning. Key technologies in therapeutic monoclonal antibody and antibody industry. China Biotechnology)* 2013; 33(5): 132-8.
- ClonePix FL——独一无二的全自动高效蛋白表达细胞株筛选系统. *基因快讯(ClonePix FL—unique full-automatic highly-efficient protein-expressed cell line selection system. Gene Express)* 2008; 2: 13-5.
- Gray F, Kenney JS, Dunne JF. Secretion capture and report web: Use of affinity derivatized agarose microdroplets for the selection of hybridoma cells. *J Immunol Methods* 1995; 182(2): 155-63.
- Browne SM, Al-Rubeai M. Selection methods for high-producing mammalian cell lines. *Trends Biotechnol* 2007; 25(9): 425-32.
- Weaver JC, Bliss JG, Harrison GI, Powell KT, Williams GB. Microdrop technology: A general method for separating cells by function and composition. *Methods* 1991; 2(3): 234-47.
- Carroll S, Al-Rubeai M. The selection of high-producing cell

- lines using flow cytometry and cell sorting. *Expert Opin Biol Ther* 2004; 4(11): 1821-9.
- 11 Powell KT, Weaver JC. Gel microdroplets and flow cytometry rapid determination of antibody secretion by individual cells within a cell population. *Biotechnology (N Y)* 1990; 8(4): 333-7.
- 12 Weaver JC, McGrath P, Adams S. Gel microdrop technology for rapid isolation of rare and high producer cell. *Nat Med* 1997; 3(5): 583-5.
- 13 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. *Biotechnol Bioeng* 2001; 71(4): 266-73.
- 14 Holmes P, Al-Rubeai M. Improved cell line development by a high throughput affinity capture surface display technique to select for high secretors. *J Immunol Methods* 1999; 230(1/2): 141-7.
- 15 Manz R, Assenmacher M, Pflugert E, Miltenyit S, Radbruch A. Analysis and sorting of live cells according to secreted molecules, relocated to a cell-surface affinity matrix. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92(6): 1921-5.
- 16 Engling A, Backhaus R, Stegmayer C. Biosynthetic FGF-2 is targeted to non-lipid raft microdomains following translocation to the extracellular surface of CHO cells. *J Cell Sci* 2002; 115(18): 3619-31.
- 17 Brezinsky SC, Chiang GG, Szilvasi A, Mohan S, Shapiro RI, MacLean A, *et al.* A simple method for enriching populations of transfected CHO cells for cells of higher specific productivity. *J Immunol Methods* 2003; 277(1/2): 141-55.
- 18 McKinney KL, Dilwithf R, Belfort G. Manipulation of heterogeneous hybridoma cultures for overproduction of monoclonal antibodies. *Biotechnol Prog* 1991; 7(5): 445-54.
- 19 Cherlet M, Kromenaker SJ, Srienct F. Surface IgG content of murine hybridomas: Direct evidence for variation of antibody secretion rates during the cell cycle. *Biotechnol Bioeng* 1995; 47(5): 535-40.
- 20 Pichler J, Hesse F, Wieser M, Kunert R, Galosy SS, Mott JE. *et al.* A study on the temperature dependency and time course of the cold capture antibody secretion assay. *J Biotechnol* 2009; 141(1/2): 80-3.
- 21 Bandaranayake AD, Almo SC. Recent advances in mammalian protein production. *FEBS Lett* 2014; 588(2): 253-60.
- 22 DeMaria CT, Cairns V, Schwarz C, Zhang J, Guerin M, Zuena E, *et al.* Accelerated clone selection for recombinant CHO cells using a FACS-based high-throughput screen. *Biotechnol Prog* 2007; 23(2): 465-72.
- 23 Song M, Raphaelli K, Jones ML, Aliabadi-Zadeh K, Leung KM, Crowley D, *et al.* Clonal selection of high producing, stably transfected HEK293 cell lines utilizing modified, high-throughput FACS screening. *J Chem Technol Biotechnol* 2001; 86: 935-41.
- 24 Chudakov DM, Lukyanov S, Lukyanov KA. Fluorescent proteins as a toolkit for *in vivo* imaging. *Trends Biotechnol* 2005; 23(12): 605-13.
- 25 Meng YG, Liang J, Wong WL, Chisholm V. Green fluorescent protein as a second selectable marker for selection of high producing clones from transfected CHO cells. *Gene* 2000; 242(1/2): 201-7.
- 26 Sleiman RJ, Gray PP, McCall MN, Codamo J, Sunstrom NA. Accelerated cell line development using two-color fluorescence activated cell sorting to select highly expressing antibody-producing clones. *Biotechnol Bioeng* 2008; 99(3): 578-87.
- 27 Kim YG, Park B, Ahn JO, Jung JK, Lee HW, Lee EG. New cell line development for antibody-producing Chinese hamster ovary cells using split green fluorescent protein. *BMC Biotechnol* 2012; 12: 24.
- 28 Bailey CG, Tait AS, Sunstrom NA. High-throughput clonal selection of recombinant CHO cells using a dominant selectable and amplifiable metallothionein-GFP fusion protein. *Biotechnol Bioeng* 2002; 80(6): 670-6.
- 29 Gubin AN, Reddy B, Njoroge JM, Miller JL. Long-term, stable expression of green fluorescent protein in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 236(2): 347-50.
- 30 Ahmed BO, Burke J, Mann C, Jiang S, Klottrup K. Using ClonePix System to assess monoclonality. www.genetix.com. 2009.