

• 基础研究 •

## 微孔板成像系统在高表达荧光蛋白单克隆细胞株筛选中的应用

沈链链<sup>1</sup>, 管强东<sup>1</sup>, 丁竞竞<sup>2</sup>, 熊建平<sup>1</sup>, 王 丽<sup>1</sup>, 吴 炜<sup>1,3,4\*</sup>

<sup>1</sup>南京医科大学公共卫生学院科研共享平台, <sup>2</sup>医学教育研究所, <sup>3</sup>生殖医学与子代健康全国重点实验室, <sup>4</sup>现代毒理学教育部重点实验室, 江苏 南京 211166

**[摘要]** 目的: 建立一种基于微孔板成像系统筛选稳定转染后高表达荧光蛋白的单克隆细胞株的筛选流程。方法: 利用慢病毒将绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)基因转至人支气管上皮细胞(human bronchial epithelial cell, HBE), 通过流式细胞术分选荧光信号强的单个细胞入96孔板。按照所建立的筛选流程, 通过4轮基于微孔板成像系统的成像与分析功能进行逐步筛选: 分选当天确认含单细胞的孔; 待大多数克隆团细胞数>20个时, 筛选出可形成克隆团的孔; 将筛选孔中的细胞消化并转移至新孔后, 进一步筛选出细胞平均荧光强度较高的孔; 待生长最快的细胞增殖4~8倍时, 筛选出细胞正常增殖的孔。稳定转染细胞持续培养, 培养条件同单克隆细胞。待单克隆细胞增殖至数量足够, 利用流式细胞术与荧光成像比较最终筛选所得单克隆细胞株与稳定转染细胞在荧光强度方面的差异。结果: 依照筛选流程, 依次筛选得到89个含单细胞的孔, 19个可形成克隆团的孔, 6个细胞平均荧光强度较高的孔, 以及3个细胞正常增殖的孔。流式细胞术结果显示: 与稳定转染细胞相比, 来源于这3个孔的单克隆细胞株的平均荧光强度提高了近9倍, GFP荧光信号强的细胞占比也显著提高。微孔板成像结果亦显示单克隆细胞株的GFP荧光强度明显高于稳定转染细胞。结论: 应用微孔板成像系统, 结合本研究所建立的筛选流程, 可逐步、高效地筛选出稳定转染后高表达荧光蛋白的单克隆细胞株。相比传统的显微镜观察或其他成像方法, 该方法操作简单、方便, 具备良好的推广应用价值。

**[关键词]** 单克隆细胞株; 荧光蛋白; 微孔板成像系统; 筛选

**[中图分类号]** Q503

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2026)02-213-08

**doi:** 10.7655/NYDXBNSN250751

## Application of a microplate imaging system in screening monoclonal cell strains with high fluorescent protein expression

SHEN Lianlian<sup>1</sup>, GUAN Qiangdong<sup>1</sup>, DING Jingjing<sup>2</sup>, XIONG Jianping<sup>1</sup>, WANG Li<sup>1</sup>, WU Wei<sup>1,3,4\*</sup>

<sup>1</sup>Research Sharing Platform, School of Public Health, <sup>2</sup>Institute of Medical Education Research, <sup>3</sup>State Key Laboratory of Reproductive Medicine and Offspring Health, <sup>4</sup>Key Laboratory of Modern Toxicology of Ministry of Education, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China

**[Abstract]** **Objective:** To establish a workflow using a microplate imaging system for screening monoclonal cell strains with high fluorescent protein expression after stable transfection. **Methods:** Human bronchial epithelial (HBE) cells were transfected with green fluorescent protein (GFP) gene using a lentiviral vector. Single cells with strong fluorescence were sorted by flow cytometry into a 96-well plate. According to the established screening protocol, four rounds of stepwise screening were performed using the imaging and analysis functions of the microplate imaging system: on the day of sorting, wells containing a single cell were identified; when the majority of clonal clusters contained more than 20 cells, wells with clonal clusters were selected; after trypsinization and transfer of cells from the selected wells to new wells, wells with cells exhibiting higher mean fluorescence intensity were identified; when rapidly proliferating cells expanded 4–8 fold, wells with cells exhibiting normal proliferation were selected. The stably transfected cells were continuously maintained under the same culture conditions as the monoclonal cells. When the monoclonal cells proliferated to an adequate number, flow cytometry and fluorescence imaging were used to compare the fluorescence intensity between the finally selected monoclonal cell strains and the stably transfected cells. **Results:** Following the screening protocol, 89 wells containing a single

**[基金项目]** 国家科技重大专项(2023ZD0507401); 江苏省大型科学仪器开放共享自主研究课题(TC2023A024)

\*通信作者 (Corresponding author), E-mail: wwu@njmu.edu.cn (ORCID: 0000-0002-0267-1284)

cell, 19 wells with clonal clusters, 6 wells with cells exhibiting higher mean fluorescence intensity, and 3 wells with normally proliferating cells were successively identified. Flow cytometric analysis demonstrated that the monoclonal cell strains from these three wells exhibited an approximately 9-fold increase in mean fluorescence intensity and a significant increase in the percentage of cells exhibiting strong GFP fluorescence, compared to the stably transfected cells. This improvement was corroborated by microplate imaging, which revealed markedly superior GFP fluorescence in the monoclonal cell strains. **Conclusion:** Using a microplate imaging system in combination with the established screening protocol enables stepwise and efficient screening of monoclonal cell strains with high fluorescent protein expression after stable transfection. Compared to traditional microscopy or other imaging methods, this approach is simpler, more convenient, and holds significant potential for broader application.

[Key words] monoclonal cell strain; fluorescent protein; microplate imaging system; screening

[J Nanjing Med Univ, 2026, 46(02): 213-220]

医学研究中,常使用荧光蛋白标记细胞,由于绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)对细胞基本无毒<sup>[1]</sup>,近二十余年来被广泛使用<sup>[2-3]</sup>。然而,外源基因整合至细胞基因组的效率存在差异,导致其在不同细胞中的表达水平不均<sup>[4]</sup>,即便是稳定转染的细胞,随着培养时间延长,其整体表达水平也可能逐渐下降。解决该问题的最佳方法是在转染后分离单细胞并挑选最优的单克隆细胞株<sup>[5-7]</sup>。

稳定转染后挑选的理想单克隆细胞株应满足以下条件:来源于单个细胞、增殖能力正常、平均荧光强度高,且高表达荧光蛋白的细胞占比高(即均一性好)。对多数细胞类型而言,从单个细胞增殖至足够流式细胞术检测的数量,通常需要至少1个月。在某些特殊情况下,为筛选最优细胞株甚至需使用多块96孔板。若依赖传统荧光显微镜观察并记录每孔细胞的增殖情况与荧光强度,不仅耗时耗力、易产生误差,且肉眼难以分辨较小的荧光强度差异,从而影响最优细胞株的筛选。

目前市场上已有专门为单克隆成像与筛选这一功能而设计的设备,如CloneSelect Imager细胞生长分析系统<sup>[8-9]</sup>、Cell Metric单克隆细胞追踪成像仪<sup>[10]</sup>和原位验证铺板(Verified In-situ Plate Seeding, VIPS)单克隆接种成像系统<sup>[11]</sup>等。然而,由于此类功能在一般科研项目中的使用频率有限,这类设备在高校中尚不普及。相比之下,微孔板成像系统或具备类似功能的高内涵分析系统<sup>[12-13]</sup>、活细胞工作站<sup>[14]</sup>等,凭借其高通量、多通道、全自动的图像采集与分析能力,广泛应用于细胞内物质代谢追踪及多靶点检测等领域,已成为许多高校公共实验平台中的常规设备。

基于此,本研究建立了一套基于微孔板成像系统的稳定转染后高表达荧光蛋白的单克隆细胞株筛选流程,并成功筛选出符合上述条件的单克

隆细胞株。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

人支气管上皮细胞(human bronchial epithelial cell, HBE)(ATCC公司,美国);DMEM培养基(赛默飞世尔(苏州)仪器有限公司);胎牛血清(上海达特希尔生物科技有限公司);胰酶(上海碧云天生物技术有限公司);磷酸盐缓冲盐溶液(phosphate buffered saline, PBS)(北京兰杰柯科技有限公司);三抗(青霉素、链霉素、庆大霉素)混合溶液、嘌呤霉素(北京索莱宝科技有限公司);慢病毒(上海吉凯基因医学科技股份有限公司);黑壁透明底96孔板(Corning公司,美国);SPARK CYTO微孔板成像系统(TECAN公司,瑞士);分选型流式细胞仪FACSAria Fusion及分析型流式细胞仪LSRFortessa(BD公司,美国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞培养与稳定转染细胞的构建

HBE细胞采用DMEM完全培养基(含10%胎牛血清、三抗)进行培养,培养环境为37℃、5%CO<sub>2</sub>。细胞贴壁后,取新鲜培养基并加入病毒、感染增强试剂培养细胞,16h后更换为完全培养基,感染后72h,用嘌呤霉素筛选构建稳定表达GFP的HBE细胞。筛选结束后使用不含嘌呤霉素的培养基培养。

#### 1.2.2 稳定转染细胞的单细胞分离

稳定转染细胞经流式细胞术进行单细胞分选,简要流程如下:消化并收集处于对数生长期的细胞,用PBS重悬后,使用BD FACSAria Fusion分选型流式细胞仪,设定单细胞分选模式,将高表达GFP的细胞分选至预先加入完全培养基(不含嘌呤霉素)的96孔板中。其中,D7孔设置分选50个细胞入

孔用于后续成像参数优化,其余95个孔均设置分选1个细胞入孔用于单克隆筛选。

### 1.2.3 微孔板成像系统操作

使用TECAN SPARK CYTO进行成像与分析。

①成像:使用“Fluorescence Imaging”功能进行荧光和明场成像,4倍物镜,全孔成像。预先使用D7孔预览图像并优化成像参数。②图像查看:通过分析软件打开自动生成的实验文件,可点击查看任意孔的全孔荧光和明场成像。③数据分析:成像结束后系统自动完成初步分析,数据导出至Excel表格。必要时可调整参数后重新分析。

### 1.2.4 单克隆细胞株筛选流程

①筛选单细胞孔:单细胞分离当天,利用微孔板成像系统的成像功能,观察荧光成像和明场成像,筛选出有且仅有1个细胞的孔。②筛选生成克隆团的孔:待大多数能生成克隆团的孔已有较大的克隆团(>20个细胞)时,再次进行成像,筛选出具有明显克隆团的孔。③细胞消化传代:将筛选出的孔中的细胞分别消化、离心、重悬,并转移至新的96孔板对应的孔中继续培养。④筛选细胞荧光强度较强的孔:细胞转移至新孔(即上一个步骤)后,利用微孔板成像系统成像,并获取各孔细胞的平均荧光强度数据。将该数值从大到小排序,筛选出细胞平均荧光强度数值较高的孔。⑤筛选细胞正常增殖的孔:待增殖最快的细胞增殖至第1次消化传代后数量的4~8倍时,再次成像。对比第1次消化传代后的成像,以稳定转染细胞的增殖速度为参照,筛选出细胞增殖状态良好的孔,其中的细胞即为候选单克隆细

胞株。上述过程细胞培养基均不含嘌呤霉素。

### 1.2.5 单克隆细胞株的扩大培养与荧光强度验证

继续培养筛选出的细胞株,通过数次消化传代将其转移至新的孔或更大的孔或培养皿中培养。自分选后持续培养稳定转染细胞,培养条件与单克隆细胞一致(均不含嘌呤霉素)。待单克隆细胞增殖至细胞数足够时,对稳定转染细胞及单克隆细胞株,使用BD LSRFortessa流式细胞仪进行GFP荧光强度检测;将等量细胞接种于96孔板,利用微孔板成像系统再次进行明场与荧光成像,直观比较荧光信号强弱。

## 2 结果

### 2.1 筛选单细胞孔

分选完成后1~2 h,待细胞沉底后即利用微孔板成像系统成像,虽然分析软件能自动分析每孔内细胞数,但由于孔内可能有杂质,或者细胞形态稍有异常等原因,导致有些孔的细胞数量分析不准确,因此并不建议直接采用细胞数量分析结果,而以肉眼观察荧光成像、明场成像判读的细胞数为准。图1显示B4孔的成像,单个细胞明场成像效果虽没有荧光成像那样一目了然,但仔细观察可见,细胞与杂质仍有较大的区别,尚未贴壁的细胞圆且亮。从设定单细胞入孔的95孔中筛选出89个有且仅有1个细胞的孔。

### 2.2 筛选生成克隆团的孔

分选后14 d,大多数能生成克隆团的孔已有较大的克隆团(至少20个细胞),再次利用微孔板成像系统成像,从上述89孔中筛选出19个能生成克隆团的孔,图2显示B4孔的成像。

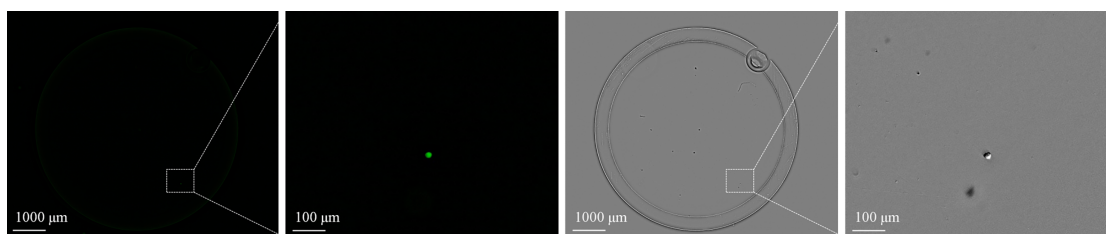


图1 含有单细胞的孔的荧光和明场成像

Figure 1 Fluorescence and bright-field imaging of a well containing a single cell

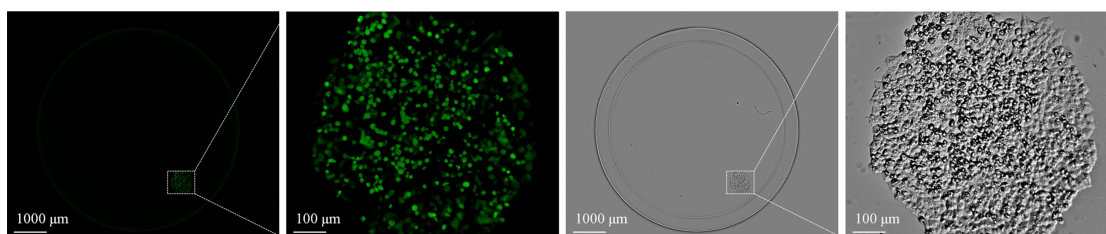


图2 含有克隆团的孔的荧光和明场成像

Figure 2 Fluorescence and bright-field imaging of a well containing a clonal cluster

### 2.3 筛选细胞荧光强度较强的孔

细胞转移至新孔后,再次成像。软件分析各孔内细胞平均荧光强度(图3),按照其数值由大到小排序,筛选出对应原单细胞分离微孔板(简称“原板”)B4、C6、F2、F3、G5、G11的6个孔。图4显示来源于原板B4孔的细胞转移至新孔的成像。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.45	0.32	0.16	0.23	0.40	0.15	0.21	0.17	0.15	0.20	0.22	0.31
B	0.47	0.42	0.32	0.20	0.38	0.46	0.09					

图3 各孔内细胞平均绿色荧光强度

Figure 3 Mean green fluorescence intensity of cells in each well

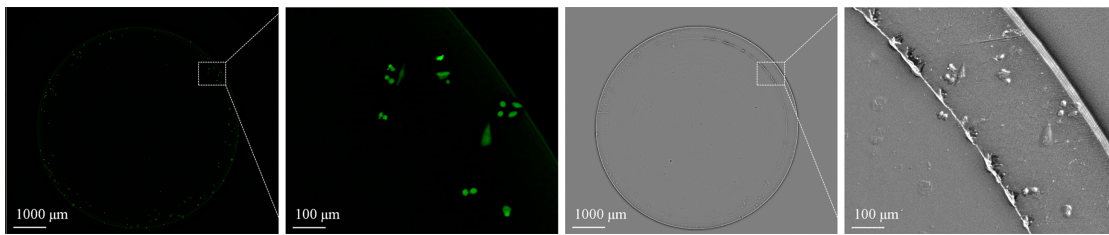


图4 克隆团细胞消化后在新孔培养的荧光和明场成像

Figure 4 Fluorescence and bright-field imaging of cells from a clonal cluster following trypsinization and transfer to a new well

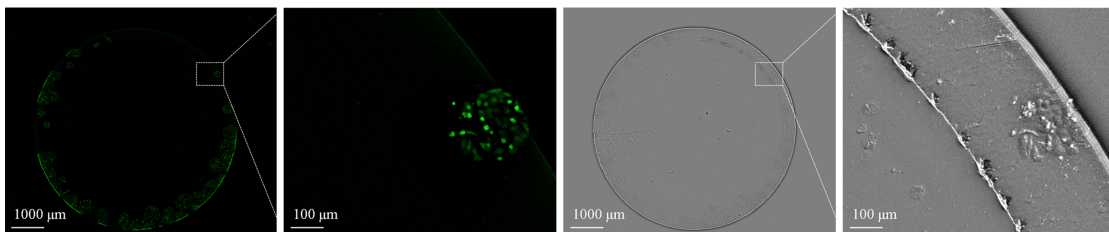


图5 能正常增殖的单克隆细胞的荧光和明场成像

Figure 5 Fluorescence and bright-field imaging of monoclonal cells which could proliferate normally

### 2.5 流式检测鉴定细胞株荧光强度

分选后48 d,单克隆细胞株细胞数达到流式细胞术检测要求。图6显示流式细胞术检测稳定转染细胞与筛选出的3个单克隆细胞株(细胞株1、2、3分别对应原板B4、F3、G5孔的细胞)的GFP信号,检测条件完全一致。3个单克隆细胞株的细胞GFP信号均值分别为16 214、13 866、16 900,相比稳定转染细胞的GFP信号均值1 597,数值提高了近9倍。3个单克隆细胞株中高表达GFP细胞的占比分别为99.8%、97.7%、99.4%,均远高于稳定转染细胞对应的数值15.7%。

### 2.6 荧光成像鉴定细胞株荧光强度

分选后57 d,将等数量的稳定转染细胞与单克隆细胞接种于96孔板,通过微孔板成像系统成像比较其荧光信号。由于在孔内细胞总数相近的前提下用荧光成像比较不同细胞样本的荧光强度更可

### 2.4 筛选细胞正常增殖的孔

首次消化传代后9 d,细胞增殖最快的孔已增殖至总数为消化传代后的4~8倍,再次成像。以稳定转染细胞的增殖速度为参照,从上一步筛选出的6个孔中进一步筛选出对应原板B4、F3、G5孔的细胞能正常增殖的3个孔。图5显示来源于原板B4孔的细胞成像。

信,但通过明场成像观察细胞不如荧光成像那样一目了然,分析软件自动计算各孔细胞汇合度,汇合度值可用于衡量细胞数变化<sup>[15]</sup>,稳定转染细胞与单克隆细胞在当前孔内的汇合度分别为43%、42%,因此可认为两孔内细胞数量相近。图7显示单克隆细胞株(以来源于原板B4孔的细胞株为例)的荧光信号强度显著高于稳定转染细胞。

## 3 讨论

分离单细胞可用极限稀释法、流式单细胞分选等完成。相对而言,极限稀释法虽然较温和,但该方法预估只有1/3的孔含有单细胞<sup>[9]</sup>,因而成功率较低<sup>[16]</sup>。而流式分选具有高通量、分选速度快的优势<sup>[17]</sup>,与极限稀释法相比省时、省力,而且可以分离荧光强的单细胞,近年来被广泛使用于多个科学研究领域<sup>[18]</sup>。若流式细胞仪性能良好且操作规范,

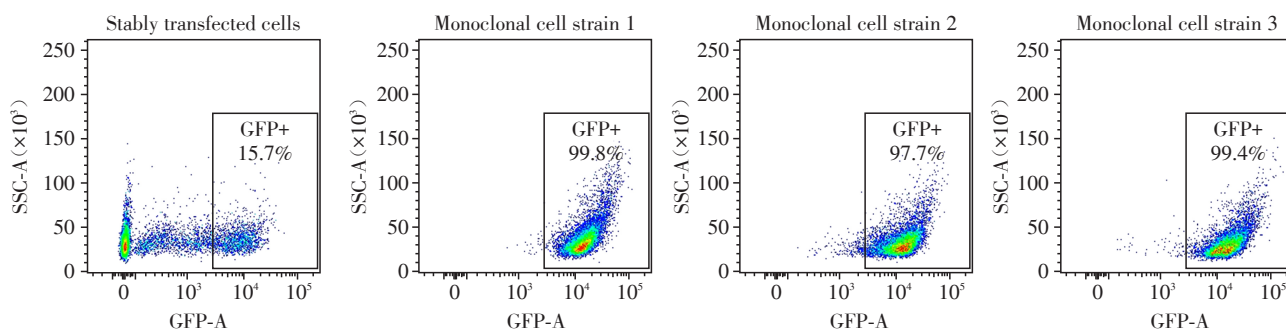


图6 流式细胞术检测稳定转染细胞和单克隆细胞的GFP

Figure 6 Flow cytometric analysis of GFP in stably transfected cells and monoclonal cells

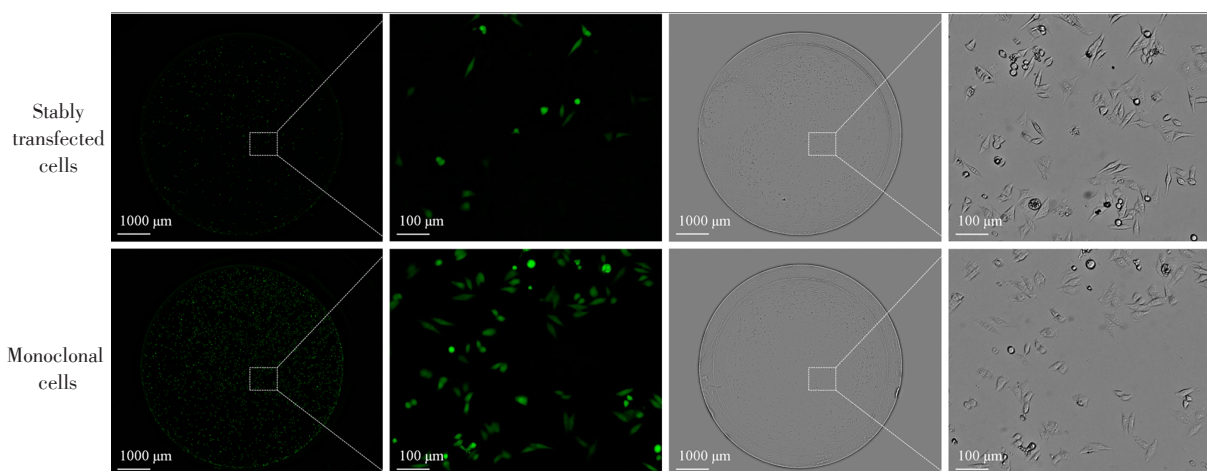


图7 稳定转染细胞与单克隆细胞的荧光和明场成像

Figure 7 Fluorescence and bright-field imaging of stably transfected cells and monoclonal cells

经单细胞分选后入孔的多为荧光较强的细胞,荧光较弱或无荧光细胞误入孔的概率较低,因此通常仅凭荧光成像即可确认孔内细胞数。但以下情况下需辅以明场观察:①孔内存在自发荧光杂质;②采用非流式分选获得单细胞,需排除含弱荧光或无荧光细胞入孔的可能性。若明场成像仍难以区分细胞或杂质,可于3~5 d后再次成像,通过观察其是否发生分裂进行判断,无分裂迹象的通常为杂质或失活细胞。在单克隆细胞株的筛选过程中,单细胞分离后准确判断孔内是否为单细胞是一个关键难点。传统荧光显微镜观察不仅耗时耗力,且易出现误判。本研究采用TECAN SPARK CYTO微孔板成像系统,实现了对整块96孔板的全孔快速成像,通过荧光成像(必要时结合明场成像)精准判定细胞数量,高效筛选出确为单细胞的孔,显著提高实验效率。

本研究未将单细胞分离当日的微孔板成像系统分析的单细胞荧光强度作为筛选依据,主要基于以下原因:细胞分选入孔对细胞造成较大压力与损伤,包括:①细胞在经历流式分选时需承受一

定的压力<sup>[9]</sup>,且喷嘴尺寸越小,细胞所受压力越大;②目前广泛采用电荷式分选方式,包含细胞的液滴需经历充电、偏转等步骤<sup>[19-20]</sup>,可能影响细胞状态;③液滴高速撞击收集装置的液面可能导致细胞破裂<sup>[21]</sup>。因此,细胞在应激状态下可能出现自发荧光增强<sup>[22]</sup>,活性不高的细胞在分选过程中甚至直接死亡<sup>[23]</sup>,而死细胞也可能产生自发荧光<sup>[24]</sup>。此外,单细胞制备过程中也不排除产生自发荧光的可能<sup>[25]</sup>。因此,分选入孔后即刻测得的荧光强度并不能真实反映细胞稳定状态下的蛋白表达水平。

关于第1次消化传代时机,不宜过早进行,否则细胞数量不足,消化传代过程易导致细胞损失甚至全部丢失。本研究选择将第1次消化传代后(而非消化前)由软件分析获得的各孔细胞平均荧光强度作为关键筛选指标,原因在于:为实现图像分析软件对细胞的精确分割,细胞应以较低密度均匀铺板<sup>[26]</sup>。消化传代前细胞通常聚集成团,软件识别细胞误差较大,细胞平均荧光强度计算可信度低;而消化传代后细胞分散、间隔清晰,软件识别细胞准

确性较高,据此计算的细胞平均荧光强度更具参考价值。值得注意的是,即使是单克隆细胞株,不同株系的转染效率与表达水平仍可能存在较大差异<sup>[27-28]</sup>,因此从中筛选最优株系十分必要。本方法在细胞第1次消化并重新铺板后,软件基于相对准确的细胞数计算得到细胞平均荧光强度,用户进行择优筛选,有效剔除了弱荧光细胞株,大幅提高了筛选效率与可靠性。

相比传统荧光显微镜,微孔板成像系统在筛选高表达荧光蛋白单克隆细胞株方面具有显著优势:①整板一次性成像,自动化完成整板96孔的图像采集;②图像查看便捷,点击任意孔即可查看全孔明场、荧光成像,避免错漏;③数据分析能力强,软件可自动分析每孔的细胞数量与平均荧光强度,灵敏度高、重复性好,远胜于肉眼观察。

综上所述,本研究成功建立了一套基于微孔板成像系统筛选稳定转染后高表达荧光蛋白单克隆细胞株的方法。与专用于克隆观察的仪器相比,微孔板成像系统在高校中更为普及,因而具备更高的实用性与推广价值。该方法充分结合成像与数据分析功能,每一步操作目标明确、流程简洁,在显著节省人力的同时,确保最终筛选获得的细胞符合单细胞来源、高荧光强度及正常增殖能力等多重要求。由于稳定转染后筛选的单克隆细胞株具有更持久、更稳定的表达特性,本研究方法在相关科研工作中具有广泛的应用前景。

#### 致谢:

感谢TECAN公司酶标应用工程师程立和南京科麟得科学仪器有限公司技术支持李娟对本研究的技术指导。

#### Acknowledgements:

We thank CHENG Li, Application Scientist at Tecan\_China, and LI Juan, Technical Support Specialist at Nanjing Cleande Scientific Instrument Co., Ltd., for their valuable technical guidance throughout this study.

#### 利益冲突声明:

全体作者声明没有利益冲突

#### Conflict of Interests:

The authors declare no conflict of interests.

#### 作者贡献声明:

沈链链负责实验设计、实验操作、提供基金支持、撰写初稿;管强东参与实验操作;丁竞竞负责数据分析、查阅文献;熊建平参与实验设计;王丽参与实验操作;吴炜负责实验设计、提供基金支持、审阅、修订论文。

#### Author's Contributions:

SHEN Lianlian was responsible for experimental design, experimental operations and fund support, as well as writing the

initial draft of the article; GUAN Qiangdong participated in experimental operations; DING Jingjing was responsible for data analysis and literature review; XIONG Jianping participated in experimental design; WANG Li participated in experimental operations; WU Wei was responsible for experimental design, fund support and reviewing/revising the article.

#### [参考文献]

- [1] BAILEY C G, TAIT A S, SUNSTROM N A. High-throughput clonal selection of recombinant CHO cells using a dominant selectable and amplifiable metallothionein-GFP fusion protein[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2002, 80(6): 670-676
- [2] HUNT L, JORDAN M, DE JESUS M, et al. GFP-expressing mammalian cells for fast, sensitive, noninvasive cell growth assessment in a kinetic mode[J]. *Biotechnol Bioeng*, 1999, 65(2): 201-205
- [3] 胡换仪,汪建中,刘昌锦,等. 绿色荧光蛋白的真核表达及其单克隆抗体制备[J]. *中国畜牧兽医*, 2022, 49(1): 328-337  
HU H Y, WANG J Z, LIU C J, et al. Eukaryotic expression of green fluorescent protein and preparation of its monoclonal antibody [J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2022, 49(1): 328-337
- [4] 穆业腾,郭冲,胡楠楠,等. 免疫检查点TIGIT慢病毒表达载体的构建和稳定表达TIGIT细胞系的建立[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2022, 48(5): 1341-1347  
MU Y T, GUO C, HU N N, et al. Construction of immune checkpoint TIGIT lentivirus expression vector and establishment of cell line stably expressing TIGIT [J]. *Journal of Jilin University (Medicine Edition)*, 2022, 48(5): 1341-1347
- [5] 鞠境,冯娇娇,李仲. 稳定表达小鼠PNPLA7的Huh7细胞系的构建[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2016, 36(7): 863-867  
JU J, FENG J J, LI Z. Establishment of Huh7 cell line stably expressing murine PNPLA7 protein [J]. *Journal of Nanjing Medical University (Natural Sciences)*, 2016, 36(7): 863-867
- [6] 李玲霞,张旭辉,令小东,等. 稳定表达小反刍兽疫病毒N蛋白的THP-1细胞系的建立与应用[J]. *中国兽医科学*, 2025, 55(4): 456-462  
LI L X, ZHANG X H, LING X D, et al. Establishment and application of THP-1 cell line with stable expression N protein of peste des petits ruminants virus [J]. *Chinese Veterinary Science*, 2025, 55(4): 456-462
- [7] 李欣悦,金月,蔡秀. 重组人淋巴细胞激活基因3慢病毒载体的构建及其在小鼠成纤维细胞中的稳定表

- 达[J]. 中国热带医学, 2025, 25(3): 328-332  
LI X Y, JIN Y, CAI X. Recombinant human LAG3 lentiviral vector and its stable expression in mouse fibroblast cells [J]. *China Tropical Medicine*, 2025, 25(3): 328-332
- [8] SHI S P, CONDON R G G, DENG L, et al. A high-throughput automated platform for the development of manufacturing cell lines for protein therapeutics [J]. *J Vis Exp*, 2011(55): e3010
- [9] TEJWANI V, CHAUDHARI M, RAIT, et al. High-throughput and automation advances for accelerating single-cell cloning, monoclonality and early phase clone screening steps in mammalian cell line development for biologics production [J]. *Biotechnol Prog*, 2021, 37(6): e3208
- [10] 梁权伟, 关一民. 基于微流控芯片和细胞检测的单细胞分离方法[J]. *传感器与微系统*, 2025, 44(3): 76-79, 83  
LIANG Q W, GUAN Y M. Single-cell isolation method based on microfluidic chip and cell detection [J]. *Transducer and Microsystem Technologies*, 2025, 44(3): 76-79, 83
- [11] 谢涛, 彭秀娥, 孙青, 等. 单克隆接种/成像设备VIPS在CHO工程细胞株单克隆筛选中的应用[J]. *中国生物制品学杂志*, 2023, 36(12): 1497-1502  
XIE T, PENG X E, SUN Q, et al. Application of monoclonal inoculation/imaging equipment VIPS in monoclonal screening of CHO engineered cell lines [J]. *Chinese Journal of Biologicals*, 2023, 36(12): 1497-1502
- [12] 高鹏霞, 龚梦强, 李治, 等. 高内涵筛选技术在有毒物质筛查及毒性评价中的应用[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2024, 38(9): 710-720  
GAO P X, GONG M Q, LI Z, et al. Applications of high content screening technique in toxic substance detection and toxicity evaluation [J]. *Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology*, 2024, 38(9): 710-720
- [13] 李星雨, 王婧, 陈思凯, 等. 高内涵筛选技术在中药作用机制及物质基础研究中的应用进展[J]. *中药药理与临床*, 2024, 40(4): 121-128  
LI X Y, WANG J, CHEN S K, et al. Application progress of high-content screening in research on action mechanism and material basis of traditional Chinese medicine [J]. *Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica*, 2024, 40(4): 121-128
- [14] 陈应炉, 宋晓乐, 雷继刚, 等. 人脂肪间充质干细胞条件培养基冻干粉促进皮肤成纤维细胞迁移、细胞外基质合成和抑制巨噬细胞炎症[J]. *中国医药生物技术*, 2020, 15(5): 460-468  
CHEN Y L, SONG X L, LEI J G, et al. Human adipose-derived mesenchymal stem cells conditioned medium lyophilized powder promote skin fibroblast migration, extracellular matrix synthesis and inhibit macrophage inflammation [J]. *Chinese Medicinal Biotechnology*, 2020, 15(5): 460-468
- [15] 石颖慧, 王铁山, 王焯, 等. 加入脾氨肽口服液培养的人肺癌细胞系A549增殖凋亡及线粒体膜电位、活性氧簇表达观察[J]. *山东医药*, 2023, 63(30): 6-10  
SHI Y H, WANG T S, WANG X, et al. Observation on proliferation, apoptosis, mitochondrial membrane potential, and expression of reactive oxygen species in human lung cancer cell line A549 cultured with spleen aminopeptide oral solution [J]. *Shandong Medical Journal*, 2023, 63(30): 6-10
- [16] 孙克盛, 顾浩宇, 宋凤, 等. 单细胞分离技术在法医学中的应用研究进展[J]. *中国法医学杂志*, 2024, 39(3): 339-348  
SUN K S, GU H Y, SONG F, et al. Progress in single cell isolation techniques in forensic science [J]. *Chinese Journal of Forensic Medicine*, 2024, 39(3): 339-348
- [17] 陈晓燕, 林惠珠, 阳莉, 等. MoFlo Astrios EQS型超高速流式分选仪的管理和使用优化[J]. *中国医学装备*, 2022, 19(7): 186-189  
CHEN X Y, LIN H Z, YANG L, et al. Optimization of management and use of MoFlo Astrios EQS ultra-high-speed flow cytometry sorter [J]. *China Medical Equipment*, 2022, 19(7): 186-189
- [18] 郭婷婷, 吴永强, 孟文彤. Moflo Astrios EQ超高速流式分选系统的使用调节与维护[J]. *中国医学装备*, 2021, 18(6): 201-204  
GUO T T, WU Y Q, MENG W T. Use, adjustment and maintenance of Moflo Astroios EQ sorting flowcytometry [J]. *China Medical Equipment*, 2021, 18(6): 201-204
- [19] 黄莹莹, 邢月婷, 孟晓瑜, 等. 离心参数对流式分选后样本的影响研究[J]. *中国细胞生物学报*, 2021, 43(10): 2001-2008  
HUANG Y Y, XING Y T, MENG X Y, et al. Study on the influence of centrifugal parameters on the samples sorted by flow cell sorting [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2021, 43(10): 2001-2008
- [20] 张坤, 闫畅, 田新朋. 微生物单细胞分离方法研究进展[J]. *生物技术通报*, 2023, 39(9): 1-11  
ZHANG K, YAN C, TIAN X P. Research progress in microbial single cell separation methods [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2023, 39(9): 1-11
- [21] 阮楚晋, 郑小伟, 王丽, 等. 基于流式细胞仪高通量分选的深海微生物单细胞培养[J]. *微生物学报*, 2021, 61(4): 816-827  
RUAN C J, ZHENG X W, WANG L, et al. Isolation of

- deep-sea microorganisms by flow cytometry-based high-throughput cell sorting and single cell cultivation [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2021, 61(4): 816-827
- [22] SURRE J, SAINT-RUF C, COLLIN V, et al. Strong increase in the autofluorescence of cells signals struggle for survival[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 12088
- [23] 吴佳瑜, 邱琳. 高活性小鼠大脑单细胞制备及流式细胞分选[J]. *中国细胞生物学学报*, 2024, 46(2): 268-273
- WU J Y, QIU L. Isolation and flow cytometry sorting of high-activity single-cell from mouse brain [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2024, 46(2): 268-273
- [24] 王丽贤, 张玥, 夏海容, 等. 微生物流式分选的单细胞样品制备及存活率提高的方法优化[J]. *微生物学通报*, 2023, 50(11): 5068-5083
- WANG L X, ZHANG Y, XIA H R, et al. Preparation of single cell suspension and survival rate improvement of microorganisms in fluorescence-activated cell sorting [J]. *Microbiology China*, 2023, 50(11): 5068-5083
- [25] 陈家欢, 李丹丹, 孙艳, 等. 传统与光谱流式细胞仪对自发荧光样本检测的比较[J]. *基础医学与临床*, 2023, 43(5): 809-816
- CHEN J H, LI D D, SUN Y, et al. Comparative investigation for auto-fluorescence sample detection by evaluating conventional and spectral flow cytometers performance [J]. *Basic and Clinical Medicine*, 2023, 43(5): 809-816
- [26] 李秀英, 黄钢. 高内涵成像及其在细胞表型研究中的应用[J]. *电子显微学报*, 2020, 39(4): 451-455
- LI X Y, HUANG G. High-content imaging and its application in the study of cell phenotype [J]. *Journal of Chinese Electron Microscopy Society*, 2020, 39(4): 451-455
- [27] 刘燕飞, 那雷, 王晓钧. 稳定表达 Cas9 蛋白的 HeLa 细胞系的建立[J]. *中国预防兽医学报*, 2020, 42(9): 893-898
- LIU Y F, NA L, WANG X J. Establishment of a HeLa cell line stable expressing Cas9 protein [J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2020, 42(9): 893-898
- [28] 陈秋勇, 孙志华, 陈如敬, 等. pAPN 过表达 Vero 细胞系构建及其对 PEDV 复制的影响[J]. *中国兽医学报*, 2025, 45(2): 181-186
- CHEN Q Y, SUN Z H, CHEN R J, et al. Establishment of Vero cell line overexpressing pAPN gene and its effect on porcine epidemic diarrhea virus replication [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2025, 45(2): 181-186
- (收稿: 2025-07-04; 修回: 2025-10-29; 录用: 2025-11-11)  
(本文编辑: 戴王娟)