

细胞转染操作方法

转染，是将外源性基因导入细胞内的一种专门技术。随着基因与蛋白功能研究的深入，转染目前已成为实验室工作中经常涉及的基本方法。转染大致可分为物理介导、化学介导和生物介导三类途径。电穿孔法、显微注射和基因枪属于通过物理方法将基因导入细胞的范例；化学介导方法很多，如经典的磷酸钙共沉淀法、脂质体转染方法、和多种阳离子物质介导的技术；生物介导方法，有较为原始的原生质体转染，和现在比较多见的各种病毒介导的转染技术。

理想细胞转染方法，应该具有转染效率高、细胞毒性小等优点。病毒介导的转染技术，是目前转染效率最高的方法，同时具有细胞毒性很低的优势。但是，病毒转染方法的准备程序复杂，常常对细胞类型有很强的选择性，在一般实验室中很难普及。其它物理和化学介导的转染方法，则各有其特点。

需要指出的一点，无论采用哪种转染技术，要获得最优的转染结果，可能都需要对转染条件进行优化。影响转染效率的因素很多，从细胞类型、细胞培养条件和细胞生长状态，到转染方法的操作细节，都需要考虑。

一、细胞传代

1. 试验准备：200ul/1mlTip 头各一盒(以上物品均需高压灭菌)，酒精棉球，废液缸，试管架，微量移液器，记号笔，培养皿，离心管。
2. 弃掉培养皿中的培养基，用 1ml 的 PBS 溶液洗涤两次。
3. 用 Tip 头加入 1ml Trypsin 液，消化 1 分钟(37°C, 5%CO₂)。用手轻拍培养瓶壁，观察到细胞完全从壁上脱落下来为止。
4. 加入 1ml 的含血清培养基终止反应。
5. 用 Tip 头多次吹吸，使细胞完全分散开。

6. 将培养液装入离心管中，1000rpm 离心 5min。
7. 用培养液重悬细胞，细胞计数后选择 0.8×10^6 个细胞加入一个 35mm 培养皿。
8. 将合适体积完全培养液加入离心管中，混匀细胞后轻轻加入培养皿中，使其均匀分布。
9. 将培养皿转入 CO₂ 培养箱中培养，第二天转染。

二、细胞转染

1. 转染试剂的准备

- ① 将 400ul 去核酸酶水加入管中，震荡 10 秒钟，溶解脂状物。
- ② 震荡后将试剂放在 - 20 摄氏度保存，使用前还需震荡。

2. 选择合适的混合比例(1: 1 - 1: 2/脂质体体积: DNA 质量)来转染细胞。在一个转染管中加入合适体积的无血清培养基。加入合适质量的 MyoD 或者 EGFP 的 DNA，震荡后在加入合适体积的转染试剂，再次震荡。

3. 将混合液在室温放置 10-15 分钟。
4. 吸去培养板中的培养基，用 PBS 或者无血清培养基清洗一次。
5. 加入混合液，将细胞放回培养箱中培养一个小时。
6. 到时后，根据细胞种类决定是否移除混合液，之后加入完全培养基继续培养 24 - 48 小时。

三、第二次细胞传代

1. 在转染后 24 小时，观察实验结果并记录绿色荧光蛋白表达情况。
2. 再次进行细胞传代，按照免疫染色合适的密度 0.8×10^5 个细胞/35mm 培养皿将细胞重新转入培养皿中。
3. 在正常条件下培养 24 小时后按照染色要求条件固定。

转染方法	原理	主要应用	特点
DEAE - 葡聚糖法	带正电的 DEAE-葡聚糖与核酸带负电的磷酸骨架相互作用形成的复合物被细胞内吞	瞬时转染	相对简便、重复比磷酸钙好，但对细胞有一定的毒副作用，转染时需除血清且一般只用于 BSC-1，CV-1，COS 细胞系
磷酸钙法	磷酸钙 DNA 复合物吸附细胞膜被细胞内吞	稳定转染， 瞬时转染	不适用于原代细胞 (所需的 DNA 浓度较高)，操作简便但重复性差，有些细胞不适用 细胞建议用 CSCL 梯度离心，转染是拷贝数较多
阳离子脂质体法	带正电的脂质体与核酸带负电的磷酸基团形成复合物，然后脂质体上剩余的电核与细胞膜上的唾液酸残基的负电核结合；另一种解释是通过细胞是内吞作用而被进入细胞。(若 DNA 浓度过高, 中和脂质体表面电核, 而降低了与细胞的结合能力)	稳定转染， 瞬时转染， 所有细胞	使用方法简单，可携带大片段 DNA，通用于各种类型的裸露 DNA 或 RNA，能转染各种类型的细胞，没有免疫原性。虽在体外基因转染中有很高的效率，但在体内，能被血清清除，并在肺组织内累积，诱发强烈的抗炎反应，导致高水平的毒性，这在很大程度上限制了其应用
阳离子聚合物	带正电的聚合物与核酸带负电的磷酸基团形成带正电的复	稳定转染， 瞬时转染，	除了具有阳离子脂质体的转染效率高，操作简单，适用范围广，重复

		合物后与细胞表面带负电的蛋白多糖相互作用，并通过内吞作用进入细胞。	所有细胞	性好等特点外，还具有在体内，转染效率高，细胞毒性低等特点，是新一代的转染试剂。
病毒介导法	逆转录病毒 (RNA)	通过病毒中膜糖蛋白和宿主细胞表面的受体相互作用而进入宿主细胞，之后反转录酶启动合成 DNA 并随机整合到宿主基因组中	稳定转染， 特定宿主细胞	可用于难转染的细胞、原代细胞，体内细胞等，但携带基因不能太大 (<8kb)，细胞需处分裂期，需考虑安全因素
	腺病毒(双链 DNA)	先和细胞表面的受体结合，继而在 αv 整合素介导下被细胞内吞	瞬时转染， 特定宿主细胞	可用于难转染的细胞，需考虑安全因素
Biolistic 颗粒传递法（基因枪粒子轰击法）		将 DNA 用显微重金属颗粒沉淀，再将包被好的颗粒用弹道装置投射入细胞，DNA 在胞内逐步释放，表达	瞬时性转染，稳定转染	可用于：人的表皮细胞，纤维原细胞，淋巴细胞系以及原代细胞
显微注射法		用显微操作将 DNA 直接注入靶细胞核	稳定转染， 瞬时转染	转染细胞数有限，多用于工程改造或转基因动物的胚胎细胞
电穿孔法		高脉冲电压破坏细胞膜电位，DNA 通过膜上形成的小孔导	稳定转染， 瞬时转染，	适用性广，除了质粒外，还可转染大的基因组 (>65kb) 但细胞致死率

	入	所有细胞	高，DNA 和细胞用量大， 需根据 不同细胞类型优化电穿孔实验条件， 拷贝数较少 1-20
--	---	------	---