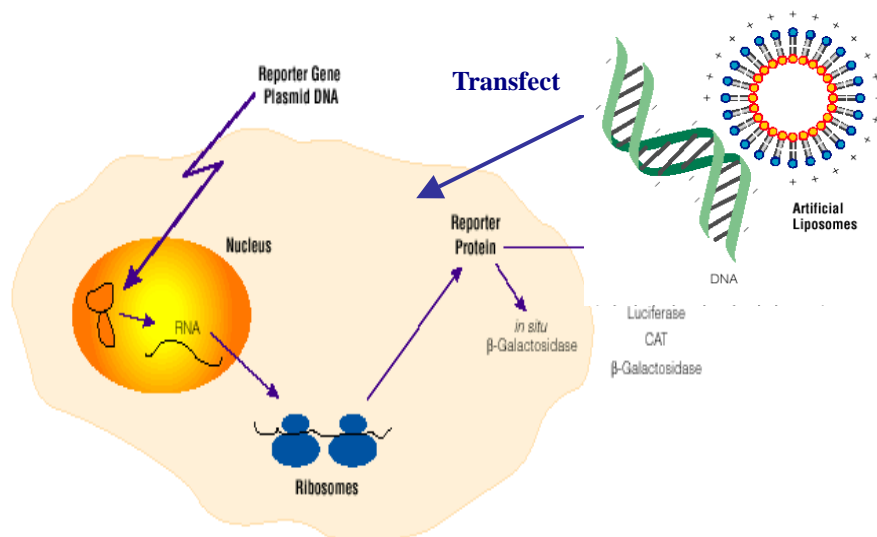


细胞转染实验

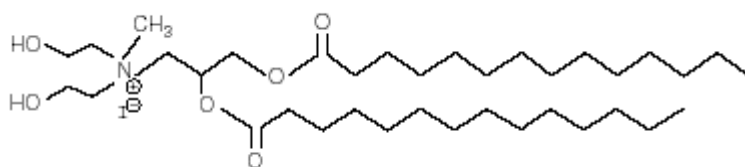
一. 实验原理



上图所示是脂质体介导转染的示意图，它显示了外源质粒进入细胞的一般过程。

外源基因进入细胞主要有四种方法：电击法、磷酸钙法和脂质体介导法和病毒介导法。电击法是在细胞上短时间暂时性的穿孔让外源质粒进入；磷酸钙法和脂质体法是利用不同的载体物质携带质粒通过直接穿膜或者膜融合的方法使得外源基因进入细胞；病毒法是利用包装了外源基因的病毒感染细胞的方法使得其进入细胞。但是由于电击法和磷酸钙法的实验条件控制较严、难度较大；病毒法的前期准备较复杂、而且可能对于细胞有较大影响；所以现在对于很多普通细胞系，一般的瞬时转染方法多采用脂质体法。

利用脂质体转染法最重要的就是防止其毒性，因此脂质体与质粒的比例，细胞密度以及转染的时间长短和培养基中血清的含量都是影响转染效率的重要问题，通过实验摸索的合适转染条件对于效率的提高有巨大的作用。



上图是本次实验采用的脂质体中阳离子组分的结构的示意图。

二. 实验材料与器材

1) 材料

293T 细胞

MyoD 表达质粒和 EGFP 表达质粒

DMEM 培养基

链霉素/青霉素（双抗）

FCS（小牛血清）

PBS（磷酸盐缓冲溶液）

胰酶/EDTA 消化液

转染试剂（TransFast）

2) 器材

20ul/200ul/1ml 微量移液器和 Tip 头

酒精灯

废液缸

血球计数板

涡旋振荡器

恒温水浴箱

台式离心机

35mm 培养皿

转染管

15ml 离心管

观察用倒置显微镜

荧光显微镜和 CCD

三. 实验步骤

细胞传代

(1) 试验准备：200ul/1ml Tip 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 0.8X10⁶ 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。

细胞转染

1) 转染试剂的准备

- A. 将 400ul 去核酸酶水加入管中，震荡 10 秒钟，溶解脂状物。
- B. 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。

- 5) 将混合液在室温放置 10—15 分钟。
- 6) 吸去培养板中的培养基，用 PBS 或者无血清培养基清洗一次。
- 7) 加入混合液，将细胞放回培养箱中培养一个小时。
- 8) 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。

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 0.8X10⁵ 个细胞/35mm 培养皿将细胞重新放入培养皿中。
- 3) 在正常条件下培养 24 小时后按照染色要求条件固定。

闪晶生物专业提供细胞转染服务

核酸不能自动进入细胞，需要协助才能穿过细胞壁的物理屏障进入能够进行表达或复制的胞内位点。电流能够可逆地击穿细胞膜形成瞬时的水通路或膜上小孔促使 DNA 分子进入胞内，这种方法就是电穿孔。电穿孔的主要应用优势是适用的细胞范围广，不论真核细胞还是原核细胞都能被有效转染。当遇到某些脂质体转染效率很低或无法转入时建议用电穿孔法转染。

服务内容：

1. 转染目的载体确认细胞转染效率
2. 转染目的载体后进行相关检测实验

服务说明：

客户提供信息：

1. 一般情况下细胞的转染效率达到 50%，我们才可以成功进行后续检测实验。如果在 25%~40%，可以进行 G418 瞬时筛选，低于 25%也可以做 G418 的稳定筛选，大部分情况下我们都会建议用大流式细胞仪进行筛选，此方法既快速又方便，而且可以得到 100%的阳性细胞，一般经过大流式筛选的细胞做后续基因水平或蛋白水平检测都可以得到理想的结果。
2. 如客户提供细胞系转染效率达到 50%，我们可以顺利快速进行实验，约 1~2 个工作日就可完成此实验。如客户提供细胞系转染效率低于 50%，我们就要进行 1~2 个工作日的 G418 的筛选实验，转染效率低于 25%，无论做 G418 的稳定筛选还是大流式筛选实验时间都将推后 2~3 个工作日。

我们提交结果：

1. 提供转染荧光照片及转染效率
2. 提供所有实验步骤及相关结果
3. 提供优质转染目的载体样品用于检测实验

详情可以访问如下网页：

<http://www.shinegene.org.cn/service/cell.html>



Shanghai ShineGene Molecular Bio-tech Co.,Ltd.

Add: Floor 2, Building A, 328#, Wuhe Road, Shanghai 201109,

Tel: +86-21-54460832

Fax: +86-21-54460831

E-mail: shinegene@vip.163.com

Website: www.synthesisgene.com

