

真核转染

一些真核蛋白在原核宿主细胞中的表达不但行之有效而且成本低廉,然而许多在细菌中合成的真核蛋白或因折叠方式不正确,或因折叠效率低下,结果使得蛋白活性低或无活性。不仅如此,真核生物蛋白的活性往往需要翻译后加工,例如二硫键的精确形成、糖基化、磷酸化、寡聚体的形成或者由特异性蛋白酶进行的裂解等等,而这些加工原核细胞则无能为力。需要表达具有生物学功能的膜蛋白或分泌性蛋白,例如位于细胞膜表面的受体或细胞外的激素和酶,则更需要使用真核转染技术。由于 DNA 导入哺乳动物细胞有关技术方法的发展,使真核表达成为可能。

利用克隆化的真核基因在哺乳动物细胞中表达蛋白质,具有以下多种不同用途:

- (1) 通过对所编码的蛋白质进行免疫学检测或生物活性测定,确证所克隆的基因。
- (2) 对所编码的蛋白质须进行糖基化或蛋白酶水解等翻译后加工的基因进行表达。
- (3) 大量生产从自然界中一般只能小量提取到的某些生物活性蛋白。
- (4) 研究在各种不同类型细胞中表达的蛋白质的生物合成以及在细胞内转运的情况。
- (5) 通过分析正常蛋白质及其突变体的特性,阐明蛋白质结构与功能的关系。
- (6) 使带有内含子而不能在原核生物如酵母中正确转录为 mRNA 的基因组序列得到表达。
- (7) 揭示某些与基因表达调控有关的 DNA 序列元件。

DNA 转染技术现已变成研究基因功能和组分的重要工具,已发展了很多转染方法,并成功应用于转染各种细胞。目前广泛应用方法有磷酸钙共沉淀法、电穿孔法、病毒载体,以及阳离子脂质体介导转染法。

进行真核转染的一般程序:

克隆目的基因(经测序验证) — 准备真核表达载体 — 将目的基因插入表达载体中 — 转染 — 筛选 — 鉴定

下面以 pcDNA3 为载体, p16 为目的基因,介绍真核转染的实验操作。

一、试剂准备

- 1、HBS (Hepes-buffered saline): 876mg NaCl 溶于 90ml ddH₂O, 加入 1M Hepes, 调 pH 到 7.4, 补 ddH₂O 至 100ml, pH7.4, 滤过除菌。
- 2、核酸贮存液, 过滤除菌。
- 3、培养基: 含血清或不含血清的, 用于转染细胞的正常培养。

二、操作步骤

(一) 克隆目的基因

- 1、根据 GenBank 检索的目的基因序列, 设计扩增引物, 并在上、下游引物的 5'-端分别引入酶切位点 BamH I 和 Xho I, 行 RT-PCR。
- 2、回收特异性扩增片段, 连入 T 载体。
- 3、转化 DH5 α , 质粒制备。
- 4、酶切初步鉴定, 测序证实。

(二) 真核重组表达载体的构建:

pcDNA3 载体带有在大肠杆菌中复制的原核序列、便于挑选带重组质粒细菌的抗生素抗性基因, 以及表达外源 DNA 序列所必需的所有真核表达组件。

重组质粒与 pcDNA3 分别用 BamH I 和 Xho I 双酶切

回收插入片段和 pcDNA3 线性片段

T4 连接酶连接

转化 DH5 α

质粒制备

BamH I 和 Xho I 双酶切鉴定。

(三) 重组 pcDNA3 转染 SHG-44 细胞:

- 1、G418 筛选浓度测定: SHG-44 培养于 24 孔培养板→G418 分别用 100mg/L、200mg/L、300mg/L、400mg/L、500mg/L、600mg/L 加入, 各浓度 3 复孔, 设正常对照 3 复孔。以 10-14 天细胞全部死亡的浓度为筛选浓度, 结果为 200mg/L。
- 2、在转染实验前天接种细胞, 各种细胞的平板密度依据各种细胞的生长率和细胞形状而定。进行转染当天细胞应达到 60%-80%覆盖。一般要求, 6 孔培养皿 (35mm), 每孔 1-2ml 培养基 3×10^5 细胞。依据不同大小培养板调整每平方厘米的细胞数量。

典型贴壁细胞平板密度

培养板大小	生长面积 (cm ²)	大约细胞数	培养基容积 (ml)
组织培养皿 (Φ 60mm)	28	6.6×10^5	5-6
6孔培养板 (Φ 35mm)	9.5	3×10^5	1-2
12孔培养板 (Φ 22.6mm)	4	1.3×10^5	0.5-1
24孔培养板 (Φ 8mm)	0.5	0.6×10^5	0.25-0.5

3、 SHG-44 细胞的转染：

(1) 转染当天，加入脂质体/ DNA 混合物之前的短时间内，更换 1ml 新鲜的有血清或无血清培养基。

(2) 准备不同比例的 DOSPER/ DNA 混合物，以确定每个细胞系的最佳比例。

① 溶液 A：用 HBS 稀释 DNA (pcDNA3、重组 pcDNA3) 各 1.5 μg 到总体积 50 μl (30 μg/ml)。② 溶液 B：用 HBS 稀释 6 μl 脂质体到终容积 50 μl (120 μg/ml)。③ 混合溶液 A 和 B，轻柔混合 (不要振荡)，室温孵育 15min，以便脂质体/DNA 混合物形成。

(3) 不要移去培养基，逐滴加入 100 μl 脂质体/DNA 混合物 (从培养孔一边到另一边)，边加边轻摇培养板。

(4) 37℃ 孵育 6hr。

(5) 6hr 后更换转染培养基，加入 2-3ml 新鲜生长培养基。

(6) 转染 24hr 后施加筛选压力，改用含 G418 的培养基培养。

4、 G418 筛选：在 G418 筛选浓度下持续培养 14 天后，挑出单克隆，扩大培

养，同时转染 pcDNA3 即 SHG-44-vect，并设对照组细胞即 SHG-44。

(一) 筛选结果鉴定：

(1) 基因组 DNA 提取→PCR 鉴定外源基因

(2) SHG-44-重组 pcDNA3 阳性细胞、SHG-44-vect 裂解→聚丙烯酰胺凝胶电泳→免疫印迹鉴定 P16 蛋白表达 (Western-blot)。

(3) 测定外源性基因对 SHG-44 细胞增殖的影响

①流式细胞仪分析：SHG-44、SHG-44-vect、SHG-44-重组 pcDNA3→单细胞悬液→70%酒精固定→裂解细胞→核糖核酸酶消化→碘化丙啶染色→上机分析 G1 期和 G2/M、S 期比例。

②细胞生长曲线测定：SHG-44、SHG-44-vect、SHG-44-重组 pcDNA3→5×10⁴/孔接种 24 孔培养板→24hr 后各自用苔盼蓝染色计数细胞→计算细胞生长抑制百分率。

③软琼脂克隆形成率分析：SHG-44、SHG-44-vect、SHG-44-重组 pcDNA3→10⁴ 细胞→0.3%低熔点琼脂糖培养→1-2 周后计数不可少于 50 个细胞的克隆数→计算克隆形成率抑制率。

三、注意事项

1、优化转染条件 (脂质体的用量、DNA 密度、细胞密度、脂质体和 DNA 混合孵育时间) 每种细胞和质粒均须进行。用于转染的核酸应高度纯化。为避免微生物污染，所用溶液滤过灭菌，以及随后的使用应在无菌条件下，这是细胞惯常的做法。但是，脂质体以及脂质体/ DNA 混合物无需滤过除菌。

2、预备脂质体/DNA 混合物必须在无血清下进行。但是在随后的脂质体/ DNA 与被转染细胞共孵育的过程中，血清又是培养基的一部分。

3、在转染之前更换培养基，可提高转染效率，但所用培养基必须 37℃ 预温。

脂质体/ DNA 混合物应当逐滴加入，尽可能保持一致，从培养皿一边到另一边，边加入边轻摇培养皿，以确保均匀分布和避免局部高浓度。