

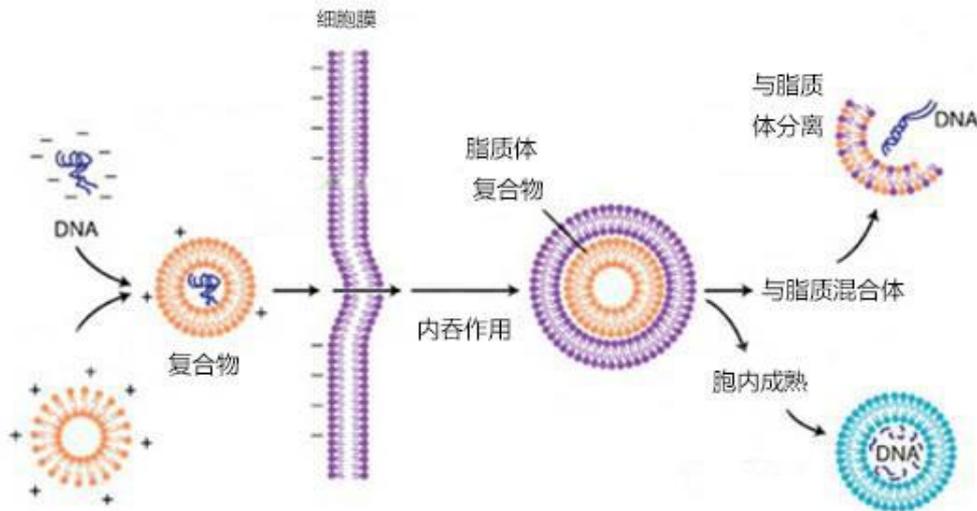
## 瞬时转染原理及实验步骤

哺乳动物细胞瞬时转染能在短期内快速表达高活性蛋白而被广泛应用。本文主要介绍了细胞瞬时转染的步骤、原理，及血球计数板对细胞计数的原理和方法。

哺乳动物细胞自身具有蛋白折叠和翻译后修饰的功能，获得的蛋白更具有天然活性。哺乳动物细胞生产蛋白的方式有两种：瞬时转染和稳定转染。瞬时转染的特点是短期快速表达，满足蛋白的小量制备。而稳定转染通过构建稳定细胞系能够满足蛋白的大量、长期生产。

瞬时转染是指将构建好的质粒通过某种方式导入到哺乳动物细胞内（主要指 HEK293 细胞），该质粒上的外源基因不整合到细胞自身的基因组上。随着细胞的生长分裂，外源基因会逐渐丢失。质粒在细胞内能够存在 3-4 天，此时间内，质粒外源基因在细胞内发生转录翻译，得到极为少量的蛋白。这一整个快速转染得到蛋白的过程就称为[瞬时转染表达](#)。

### 瞬时转染步骤



瞬时转染流程简图

### 细胞复苏

细胞复苏是将保存在液氮或 -80°C 冰箱中的细胞株解冻并重新培养的过程。细胞复苏的关键是快速。防止在解冻过程中，产生的水珠形成冰晶损伤细胞。细胞复苏一般步骤如下：

1. 预先加热水浴锅，温度至 37-40°C，并在离心管中准备好 10mL 培养基
2. 从液氮罐或冰箱中取出细胞，迅速放进预热的水浴锅中，镊子夹住冻存管晃动，使其受热均匀
3. 当冻存管内完全融化时，注意用酒精擦拭冻存管消毒，将液体倒入含有 10mL 培养基的离心管中
4. 离心 5min，去除上清，得到沉淀
5. 用培养基悬浮沉淀，并接种到培养瓶常规细胞培养

细胞复苏后，生长一段时间，95%的细胞贴壁生长，细胞状态良好，说明细胞复苏成功。

## 瞬转步骤

以 Lipofectamine 转染试剂为例的操作流程，不同转染试剂参考说明书

1. 将复苏后常规培养的细胞按照  $1-3 \times 10^5$  接种到 6 孔板中，加入 2-4mL 的完全培养基，混匀放置在二氧化碳培养箱中 37°C 过夜
2. 无菌状态下配置如下溶液：
  - a 用 100ul 的无血清培养基稀释 2ug 的待转染的质粒
  - b 用 100ul 的无血清培养基稀释 25ul 的 Lipofectamine 转染试剂（血清的存在会影响细胞转染效率，因此要使用无血清培养基转染）
3. 将 ab 溶液混合并摇匀，室温下放置 30min 左右
4. 细胞培养至 80% 单层左右，用无血清培养基洗涤细胞 2 次，每孔加入 1mL 的无血清培养基，并将混合后的 ab 溶液逐滴加入到每孔，按十字方向轻摇混匀，二氧化碳培养箱中 37°C 培养 24 小时
5. 将转染液倒出，换为完全培养基继续培养，培养 3-4 天后检测蛋白表达量

## 转染检测

收集培养的细胞，采用超声或酶解的方法破碎细胞，离心得到上清。转染后的检测主要包括基因水平和蛋白水平的检测。针对基因水平，使用普通 PCR 或 RT-PCR 进行验证。蛋白水平，使用 western blot 检测。

## 细胞计数

细胞计数的原理就是测定单位体积内细胞的数量从而得到细胞总浓度，在细胞培养和测定细胞生长曲线的过程中广泛应用。本实验是采用血球计数板对细胞计数，步骤如下：

1. 将计数板的盖玻片洗净晾干，并消化细胞离心加入培养基悬浮细胞，制得细胞悬液
2. 稀释细胞悬液，按照一定的倍数

3. 盖玻片盖上计数板表面，移液器吸取 10ul 左右的细胞悬液从血球计数板的一方慢慢注入到计数板上
4. 盖玻片具有引流的功能，因此只需轻轻打入到板上孔中即可
5. 显微镜下观察细胞，按照要求计数该血球计数板上的细胞个数，计数方式如图所示



图 1 血球计数板正面

1/400mm<sup>2</sup>：表示计数室有 400 个小方格，每个小方格的面积是 1mm<sup>2</sup>

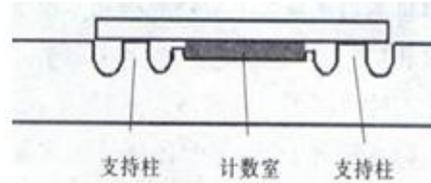


图 2 血球计数板剖面

计数室为阴影部分，计数室高度低于平面 0.10mm

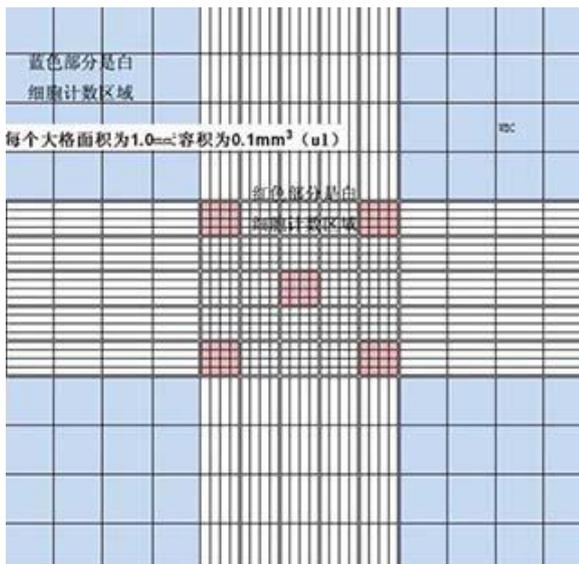


图 3 血球计数室表面

每个血球计数板有上下两个计数室（如图 1）  
 每个计数室分为九大格（如图 3）  
 其中最中间的方格分为 25 个中格，每个中格又被分为 16 个小格，因此计数室中一共有 400 个小格。每次计数时选取图 3 中红色部分计数，计数结果乘以 5 得到一个计数室中总的细胞个数

