

Transfection Experiment

Technology

转染实验技术

马文丽 主编 高媛 副主编



化学工业出版社

Transfection Experiment

Technology

转染实验技术

马文丽 主编 高媛 副主编



化学工业出版社



北航

C1637290

Q75-33
02

V88720810

图书在版编目 (CIP) 数据

转染实验技术/马文丽主编. —北京: 化学工业出版社, 2013. 1

(生物实验室系列)

ISBN 978-7-122-16221-2

I. ①转… II. ①马… III. ①转染-实验技术
IV. ①Q75-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2012) 第 311927 号

责任编辑: 傅四周 郎红旗 孟 嘉
责任校对: 陈 静

装帧设计: 关 飞

出版发行: 化学工业出版社 (北京市东城区青年湖南街 13 号 邮政编码 100011)

印 刷: 北京永鑫印刷有限责任公司

装 订: 三河市万龙印装有限公司

710mm×1000mm 1/16 印张 10 $\frac{1}{4}$ 字数 160 千字 2013 年 3 月北京第 1 版第 1 次印刷

购书咨询: 010-64518888 (传真: 010-64519686)

售后服务: 010-64518899

网 址: <http://www.cip.com.cn>

凡购买本书, 如有缺损质量问题, 本社销售中心负责调换。

定 价: 49.00 元

版权所有 违者必究

编写人员名单

(按姓名汉语拼音排序)

蔡翠霞	陈健	冯菁华	高媛
胡昇	胡宗	梁桑华	马文丽
王玲慧	王颖	吴兵平	杨青青
尹虹	尹莉	曾军	周晖

出版者的话

21 世纪是生命科学的世纪，这已成为人们的共识。

生命科学随着人类对自身和自然的认识、探索而萌芽，随着人类生产和科学实践的进步而发展。现代生命科学包括生物学、医学、农学等传统学科领域，以及生物学、生物技术与环境科学乃至社会科学等其他学科相互渗透、交叉而产生的新型学科体系。20 世纪后叶，现代生物科学尤其是分子生物学取得了一系列突破性成就，使得生命科学在自然科学体系中的位置发生了革命性的变化，成为 21 世纪的带头学科。人们对生命科学也寄予了无限的期望，希望能够解决人类社会所面临的人口膨胀、资源匮乏、疾病危害、环境污染和生态破坏等一系列重大问题。

回顾生命科学的发展历程，实验技术一直起着非常重要的促进作用。如 17 世纪 Leeuwenhoek 等人发明并应用显微镜技术，直接催生了“细胞学说”的建立和发展；1973 年 Cohn 和 Boyer 完成了 DNA 体外重组实验，标志着基因工程的肇始；1988 年 Kary Mullis 发明的 PCR 技术甚至使生命科学产生了飞跃性的发展。可以说，生命科学每时每刻离不开实验，实验是开启神奇的生命王国大门的钥匙。没有实验技术的不断进步，也就没有生命科学今天的巨大发展；同时，生命科学的发展又对实验技术提出了更高的要求，进一步刺激了后者的不断进步。生命科学正是在“实验催生和验证着基础理论，理论指导和发展了实验技术”的不断循环中从必然王国走向自由王国。

工欲善其事，必先利其器。为了有助于生命科学工作者更多地了解相关实验技术和仪器设备，更好地设计实验方案，更有效地开展实验过程，更合理地处理实验结果，化学工业出版社组织出版了《生物实验室系列》图书。系列图书在整体规划的基础上，本着“经典、前沿、实用，理论与技术并重”的原则组织编写，分批出版。

在题材上，系列图书涵盖综合实验技术和单项实验技术两个方面。其中综合实验技术既有以实验目的为题，如“蛋白质化学分析技术”，内容纵向覆盖多项实验技术；也有以某一生命学科领域的综合实验技术为题，如“发酵工程实验技术”、“生物化学实验技术”等。而单项实验技术则以深入介绍某一专项技术及其应用为主，在阐述其基本原理的基础上，横向介绍该项技

术在多个领域的应用，如“双向电泳技术”、“流式细胞术”等。

在内容上，系列图书主要有以下两个显著特点。一是强调先进性——除了系统介绍常用和经典实验技术以外，特别突出了当前该领域实验手段的新理论、新技术、新发展，为国内专业人员起到借鉴和引导作用。二是强调可操作性——对于每一项实验技术，系统介绍其原理方法、设备仪器和实验过程，让读者明了实验的目的、方案设计以及具体步骤和结果处理，以期起到实验指南的作用。

本系列图书坚持质量为先，开拓国内和国际两个出版资源。一方面，邀请国内相关领域兼具理论造诣和丰富实验室工作经验的专家学者编著；另一方面，时刻关注国际生命科学前沿领域和先进技术的进展，及时引进（翻译或影印）国外知名出版社的权威力作。

《生物实验室系列》图书的读者对象设定为国内从事生命科学及生物技术和相关领域（如医学、药学、农学）的专业研究人员，企业或公司的生产、研发、管理技术人员，以及高校相关专业的教师、研究生等。

我们殷切希望《生物实验室系列》图书的出版能够服务于我国生命科学的发展需要，同时热忱欢迎从事和关心生命科学的广大科技人员不仅对已出版图书提供宝贵意见和建议，也能对系列图书的后续题目设计贡献良策或推荐作者，以便我们能够集思广益，将这一系列图书沿着可持续发展的方向不断丰富品种，推陈出新。

谨向所有关心和热爱生命科学，为生命科学的发展孜孜以求的科学工作者致以崇高的敬意！

祝愿我国的科技事业如生命之树根深叶茂，欣欣向荣！

化学工业出版社
生物·医药出版分社

前 言

转染指真核细胞由于外源 DNA 掺入而获得新的遗传标志的过程。DNA 是分子生物学研究的主要对象，而转染技术不仅是进行 DNA 研究的有效手段，也是分子生物学实验技术中最基本、最重要的操作方法。随着转染技术的快速发展，它必将对现代分子生物学产生巨大的影响。熟练掌握转染技术是科研人员开展科研工作所必需。

《转染实验技术》是《生物实验室系列》图书之一。在本书的编写过程中，我们总结多年的科研实践经验，系统地介绍了目的基因获取、载体选择、多种转染方法以及转染技术的应用。在编写中我们力求内容准确且通俗易懂，语言流畅简练、深入浅出。本书读者对象定位于生物技术及相关专业师生，同时也可供相关科研人员参考。

本书在编写过程中，得到了化学工业出版社有关领导和编辑的鼎力支持和帮助，得到了其他科研机构的支持与鼓励，在此一并表示感谢。

限于编者的水平及时间关系，书中难免存在不足之处，敬请同行专家和使用本书的读者批评指正。

马文丽
2013 年 2 月于广州

目 录

第 1 章 转染实验技术概述	1
1.1 转染实验技术简介	1
1.1.1 转染实验技术的概念	1
1.1.2 外源基因转染真核细胞的目的、意义	1
1.2 转染实验技术的分类及原理	2
1.2.1 病毒感染法	2
1.2.2 非病毒感染法	3
1.3 转染实验技术的应用	5
1.4 新材料与新技术在转染实验技术中的应用	7
参考文献	8
第 2 章 目的基因的获取	9
2.1 目的基因概述	9
2.2 化学合成法获取目的基因	11
2.2.1 磷酸二酯法	12
2.2.2 磷酸三酯法	14
2.2.3 亚磷酸三酯法	15
2.2.4 寡核苷酸连接法	15
2.3 基因组文库钓取目的基因	17
2.4 cDNA 文库钓取目的基因	19
2.4.1 mRNA 的分离纯化(过程)	20
2.4.2 双链 cDNA 的体外合成	20
2.5 PCR 获取目的基因	24
2.5.1 PCR 扩增 DNA 的基本原理	24
2.5.2 PCR 扩增产物的克隆	26
2.5.3 PCR 技术在目的基因制备中的应用	27
2.6 RT-PCR 法获取目的基因	27
参考文献	28

第3章 基因表达载体的选择	29
3.1 基因表达载体概述	29
3.2 基因表达载体分类	31
3.3 基因表达载体的遗传标记	32
3.4 常用原核基因表达质粒载体	34
3.5 常用真核基因表达质粒载体	38
3.6 病毒型表达载体	42
3.6.1 噬菌体载体	43
3.6.2 反转录病毒载体	49
3.6.3 腺病毒载体	52
3.7 可表达融合蛋白的载体	54
3.7.1 谷胱甘肽 S-转移酶 (GST) 融合蛋白载体	54
3.7.2 pMAL TM 融合蛋白表达载体	56
3.8 基因表达载体的改造	57
3.8.1 报道基因的改造	57
3.8.2 启动子的研究	57
3.8.3 大容量载体	57
参考文献	58
第4章 重组子的构建与鉴定	59
4.1 限制性内切酶	59
4.2 黏断连接方法及重点技术	60
4.2.1 单酶切位点的连接	60
4.2.2 双酶切位点的连接	61
4.2.3 同工异源酶及同尾酶酶切位点的连接	62
4.3 平端连接方法及重点技术	62
4.4 酶切位点的改造和连接	63
4.4.1 黏断切口转化为平端切口的连接	63
4.4.2 人工接头的设计及人工黏断切口的制备	63
4.4.3 酶切位点的化学修饰	64
4.5 重组子的筛选与鉴定	64
4.5.1 表型水平筛选	65
4.5.2 分子水平鉴定	66
参考文献	68

第 5 章 化学转染方法将重组体导入真核细胞	69
5.1 磷酸钙共沉淀法	69
5.1.1 磷酸钙共沉淀法原理	69
5.1.2 转染试剂、材料	69
5.1.3 仪器设备	70
5.1.4 操作步骤	70
5.1.5 注意事项及影响因素	72
5.2 DEAE-葡聚糖法转染	73
5.2.1 DEAE-葡聚糖法转染原理	73
5.2.2 转染试剂	73
5.2.3 仪器设备	74
5.2.4 操作步骤	74
5.2.5 操作注意事项	74
5.3 脂质体介导的转染	75
5.3.1 脂质体介导的转染原理	75
5.3.2 转染试剂	77
5.3.3 仪器设备	77
5.3.4 操作步骤	77
5.3.5 操作注意事项	78
5.4 纳米材料介导的转染	78
5.4.1 纳米材料介导的转染原理	79
5.4.2 转染试剂	79
5.4.3 仪器设备	79
5.4.4 操作步骤	79
5.4.5 操作注意事项	81
参考文献	81
第 6 章 物理转染方法将重组体导入真核细胞	82
6.1 显微注射法转染	82
6.1.1 显微注射法原理	83
6.1.2 转染试剂	83
6.1.3 仪器设备	83
6.1.4 操作步骤	84
6.1.5 操作注意事项	85

6.2 电穿孔法转染	86
6.2.1 电穿孔法转染原理	86
6.2.2 转染试剂	87
6.2.3 仪器设备	88
6.2.4 操作步骤	89
6.2.5 操作注意事项	89
6.3 基因枪转染	90
6.3.1 基因枪技术的发展历史	90
6.3.2 基因枪介导的转染原理和设备	90
6.3.3 转染试剂: 微弹载体、DNA 微载体	92
6.3.4 操作步骤	93
6.3.5 操作注意事项	94
6.3.6 基因枪技术作为新兴的转移基因的优点	94
6.3.7 基因枪的发展趋势	94
参考文献	95
第7章 病毒转染方法将重组体导入真核细胞	96
7.1 病毒转染系统概述	96
7.2 包装细胞概述	96
7.3 高浓度病毒原液的收集及滴度测定方法	97
7.3.1 高浓度病毒原液收集	97
7.3.2 病毒滴度测定方法	97
7.4 病毒转染的辅助系统	98
7.4.1 转染试剂	98
7.4.2 细胞状态	98
7.4.3 转染方法	98
7.4.4 载体构建	100
7.5 腺病毒介导的转染	100
7.5.1 腺病毒介导的转染原理	100
7.5.2 转染试剂	101
7.5.3 仪器设备	104
7.5.4 操作步骤	105
7.5.5 操作注意事项	112
7.6 反转录病毒介导的转染	112

7.6.1	反转录病毒介导的转染原理	112
7.6.2	转染试剂	115
7.6.3	仪器设备	116
7.6.4	操作步骤	116
7.6.5	操作注意事项	118
参考文献		119
第8章 转染成功细胞的选择		120
8.1	遗传报道基因系统	120
8.1.1	报道基因系统概述	120
8.1.2	报道基因的分类及使用选择	122
8.1.3	报道基因技术的前景展望	123
8.1.4	常见的报道基因	124
8.2	报道基因的同位素分析法	127
8.2.1	放射性同位素的基本性质	128
8.2.2	射线的防护	128
8.3	报道基因的非同位素分析法	129
8.3.1	酶联免疫法 (ELISA)	129
8.3.2	荧光法	133
8.3.3	免疫组织化学染色法	133
参考文献		135
第9章 转染技术的应用		137
9.1	转基因动物及基因敲除动物	137
9.1.1	转基因动物的定义	137
9.1.2	制备转基因动物的方法	137
9.1.3	基因敲除动物	138
9.2	转基因植物	139
9.2.1	转基因植物的定义	139
9.2.2	常用的植物转基因方法	139
9.2.3	转基因植物的主要应用方向	140
9.3	基因制药	140
9.3.1	基因制药概述	140
9.3.2	基因工程药物生产的基本过程	141
9.3.3	基因制药技术的主要应用	141

9.4 基因治疗	142
9.4.1 遗传性疾病的基因治疗	142
9.4.2 肿瘤基因治疗	143
9.4.3 其他疾病的基因治疗	143
9.5 RNA 干扰治疗	143
9.5.1 在骨病治疗中的应用	144
9.5.2 在神经系统疾病中的应用	144
9.5.3 在肿瘤治疗中的应用	145
9.5.4 在抗病毒治疗中的应用	145
9.5.5 在皮肤病治疗中的应用	145
参考文献	146

第 1 章 转染实验技术概述

1.1 转染实验技术简介

1.1.1 转染实验技术的概念

受到自然界中大肠杆菌经常相互分享它们的遗传物质的启发，人类发明了将 DNA/RNA 导入培养细胞的技术，即转染实验技术，这是分子生物学的又一个重要的里程碑。转染实验技术又叫基因转染技术 (gene transfection, gene transfer, gene delivery)，是采用一定的方法和途径将外源分子如 DNA、RNA 等导入特定的细胞，并表达目的基因，产生特定功能的蛋白质分子。外源基因或 DNA 整合到宿主细胞基因组中并得以传递给子代与表达，称为稳定转染 (stable transfection)。外源基因或 DNA 被转染进入宿主细胞但不整合进入宿主细胞基因组且有瞬时表达，称为不稳定转染 (unstable transfection)。两个或多个基因或 DNA 同时转染靶细胞称为共转染 (cotransfection)。通过转染而表达外源基因的受体细胞称为转染子 (transfectant)。转染实验技术是基因功能研究、基因治疗、基因免疫的理论和技術基础，也是研究基因表达调控、突变分析等的常规工具。正是因为这种技术的不断进步，我们可以在各种哺乳动物细胞中进行各种克隆化基因的表达，从而达到不同的目的。比如，生产制备大量经过真核特有的翻译后加工的活性蛋白；研究表达蛋白的结构和生化特性；研究基因表达的调控机理；调控基因的表达等。转染技术的广泛使用，不仅促进了人们对外源基因在哺乳动物细胞中的表达等方面的认识，并且在方法学上促进了该领域及相关领域的发展。

1.1.2 外源基因转染真核细胞的目的、意义

随着分子生物学技术的不断发展，在真核表达质粒的研究中，为便于检测目的基因的表达情况或研究外源基因的其他功能，常把真核表达质粒在体外转染到一些哺乳动物细胞，通过目的基因在体外培养细胞中的表达来研究

其生物学功能。常用的表达系统主要分为两类：一类是采用真核表达载体转染 DNA 的瞬时表达系统或稳定表达系统；另一类是采用病毒载体的表达系统。病毒载体虽然具有高转染率、能够持续稳定地表达外源基因的特点，但因为病毒载体需整合到转染细胞的染色体中才能够使外源基因得以表达，所以具有致癌、致畸的危险。安全性较差这一缺陷已成为限制病毒载体广泛应用的主要原因。真核表达质粒是一种核酸，它不同于病原体，在自然状态下没有感染性，以附加体的形式存在于被转染的靶细胞的胞体内，不被体外培养的细胞吸附，当细胞增殖时独立地表达外源基因。它不需要整合于转染细胞的染色体内，因而具有安全性高的优点。

1.2 转染实验技术的分类及原理

根据载体的不同，转染可以分为病毒感染法和非病毒感染法两大类，其中非病毒感染法又可分为化学转染法和物理转染法。病毒感染法具有较高转染效率，但易产生不良反应等缺陷限制了其应用。非病毒转染法具有低细胞毒性、低免疫原性、生物相容性好、可以生物降解等优点，且不受基因大小的限制，具有很好的应用前景，但转染效率不高是其主要瓶颈。另外，根据不同的实验目的，常规转染技术还可分为两大类：一类是瞬时转染，一类是稳定转染（永久转染）。前者外源 DNA/RNA 不整合到宿主染色体中，因此一个宿主细胞中可存在多个拷贝数，产生高水平的表达，但通常只持续几天，多用于启动子和其他调控元件的分析。一般来说，超螺旋质粒 DNA 转染效率较高，在转染后 24~96 h 内（依赖于各种不同的构建）分析结果，常常用到一些报告系统如荧光蛋白、 β 半乳糖苷酶等来帮助检测。后者也称稳定转染，外源 DNA 既可以整合到宿主染色体中，也可能作为一种游离体存在。尽管线性 DNA 比超螺旋 DNA 转入量低，但整合率高。外源 DNA 整合到染色体中概率很小，通常需要通过一些选择性标记，如氨丙基转移酶（APH，新霉素抗性基因）、潮霉素 B 磷酸转移酶（HPH）、胸苷激酶（TK）等反复筛选，得到稳定转染的同源细胞系。

1.2.1 病毒感染法

病毒感染法就是借助病毒高效感染细胞的机制，将病毒衣壳内的核酸换成克隆的目的基因，从而将目的基因高效运送到特定的细胞中的方法。

感染,是区别于常规转染的另一种将外源基因导入哺乳动物细胞的方法。感染需要将目的基因克隆到特定的病毒体系中,经过包装细胞的包装得到“经过改造的”病毒,再进行感染。其优点是感染效率特别高,特别是有些难以转染的原代细胞、活体细胞;缺点则是易产生不良反应,操作时要注意安全。

在病毒感染法中常用的病毒体系包括以下几类。

(1) 反转录病毒 常用的反转录病毒载体从小鼠白血病病毒(MLV)改造而来,可使目的基因整合至靶细胞基因组,实现稳定表达,但只能转导处于分裂期的细胞;可以高效地将目的基因整合到染色体上而得到稳定表达,但其能装载的核酸大小有限。

(2) 腺病毒 有一个中等大小的基因组(平均36kb),适合容纳大片段基因,与反转录病毒载体相比,腺病毒载体能有效地将外源基因转到各种靶细胞或组织中。载体容易构建和操作。宿主范围广,感染性强,可经不同途径进入不同组织,能感染分化后的非分裂期细胞。在Ad生活周期中,其基因不整合到宿主细胞中,无插入突变激活癌基因的危险,外源基因能游离地表达。缺点是不能整合稳定表达,只是游离地瞬时表达。

(3) 慢病毒 以I型人免疫缺损病毒(HIV-1)为代表,研究表明,以HIV-1为基础构建的这类慢病毒载体具有可感染非分裂细胞、目的基因整合至靶细胞基因组长期表达、免疫反应小等优点,适于体内基因治疗,有望成为理想的基因转移载体。

(4) 痘病毒 能装载大片段DNA,又能感染大多数哺乳动物细胞,可是仅限于瞬时表达。

(5) 杆状病毒 受限于只能感染昆虫细胞。

1.2.2 非病毒感染法

1.2.2.1 化学转染法

化学转染法是应用阳离子多聚物(如聚赖氨酸)、两亲性化合物(如脂质体)以及非有机化合物(如磷酸钙)凝聚带负电荷的核酸形成复合物,结合到细胞膜表面,通过内吞或膜融合作用进入胞内。主要方法如下。

(1) 阳离子多聚物 二乙氨基葡聚糖(DEAE-dextran)和聚凝胺、多聚-L-赖氨酸(PLL)、壳聚糖、聚乙烯亚胺(PEI)等。阳离子多聚物转染的共同原理是:生理pH条件下把DNA凝聚成复合物,附着在细胞膜上被内吞进入细胞内,复合物的形成可以防止DNA被DNase降解。阳离子多

聚物和阳离子脂质最大的区别在于其不含疏水部分而且完全溶于水，并可以方便地进行化学修饰，如改变相对分子质量、构象（线状或分枝状）及偶联配体等。

(2) 阳离子脂质体 人工合成，无抗原性，可生物降解，用作核酸递送操作简单，重复性好，适用的细胞类型广，相对于传统的磷酸钙沉淀法转染效率高。阳离子脂质体的主要缺点是对细胞的毒性，主要表现为细胞聚集，贴壁性差。另外，转染的效率易受血清中的脂肪与脂蛋白以及细胞外基质中的带电成分（如硫酸软骨素等）的干扰。为达到最高转染效率，需要优化的条件主要是：转染细胞的密度；核酸纯度；脂质体的浓度、核酸的浓度以及脂质体/核酸复合物和细胞的孵育时间；培养细胞所用的培养基与血清等^[1]。

(3) 磷酸钙 DNA 可以和磷酸钙形成共沉淀附着于细胞表面，通过内吞作用进入多种培养的哺乳动物细胞。磷酸钙试剂实验室即可配制，无毒性，可生物降解，用于转染具有方法简单、成本低廉的优点。缺点是相对于病毒载体，转染效率非常低（10%~15%）；难以用于体内转染研究；由于每次形成的磷酸钙/DNA 沉淀大小不同，实验重复性差；需要的 DNA 量较大。此外，用磷酸钙或 DEAE 转染哺乳动物细胞时，可引起转染片段突变（每个基因突变率约 1%）。磷酸钙转染效率受到诸多因素的影响，例如：沉淀颗粒的形态、大小和质量；沉淀和细胞孵育的时间；钙离子浓度、DNA 浓度、缓冲液 pH 以及细胞类型等。磷酸钙转染效率低的主要原因是形成的微粒体积太大（直径平均值大于 300 nm），磷酸钙/DNA 复合物穿过细胞膜的速度太慢^[2]。

1.2.2.2 物理转染方法

(1) 电穿孔 当细胞被置于非常高的脉冲电场中，细胞膜就能可逆地形成瞬时的水通道或小孔，使外部分子得以进入细胞内，这一现象被称为电穿孔。电穿孔技术适用的细胞类型广泛，包括细菌、酵母、植物和动物细胞。而且它还能作为注射方法（称为电注射），把各种外源物质引入活细胞。与其他常用的导入外源物质的方法相比，电穿孔具有很多优点：①不必像显微注射那样使用玻璃针，不需要技术培训和昂贵的设备，可以一次对成百万的细胞进行注射；②与用化学物质或病毒法进行转导相比，电穿孔几乎没有生物或化学副作用；③因为电穿孔是一个物理方法，较少依赖细胞类型，因而应用广泛，对大多数细胞类型，用电穿孔法，基因的转移效率比化学方法高得多。应用电穿孔技术不需要购买昂贵的设备，但是在一般情况下，高电场