

# 实验原理



# 细胞复苏及冻存

细胞冻存及复苏的基本原则是慢冻快融。细胞冻存是将细胞置于 $-196^{\circ}\text{C}$ 液氮中低温保存，可以最大限度的保存细胞活力。当细胞冷到零度以下，细胞器脱水，细胞中可溶性物质浓度升高，并在细胞内形成冰晶。如果缓慢冷冻，可使细胞逐步脱水，细胞内不致产生大的冰晶相反，结晶就大，大结晶会造成细胞膜、细胞器的损伤和破裂。目前细胞冻存多采用二甲基亚砷作保护剂，能提高细胞膜对水的通透性，DMSO与水分子结合，可使冰点下降，加上缓慢冷冻可使细胞内的水分渗出细胞外，减少细胞内冰晶的形成，从而减少细胞的损伤。复苏细胞应采用快速融化的方法，这样可以保证细胞外结晶在很短的时间内即融化，防止小冰晶形成大冰晶，避免由于缓慢融化使水分渗入细胞内形成胞内再结晶对细胞造成损伤。



# 细胞传代

细胞在培养瓶长成致密单层后，已基本上饱和，为细胞能继续生长，同时也将细胞数量扩大，就必须进行传代。传代培养也是一种将细胞种保存下去的方法。同时也是利用培养细胞进行各种实验的必经过程。悬浮型细胞直接分瓶就可以，而贴壁细胞需经消化后才能分瓶。体外培养的原代细胞或细胞株要在体外持续地培养就必须传代，以便获得稳定的细胞株或得到大量的同种细胞，并维持细胞种的延续。培养的细胞形成单层汇合以后，由于密度过大生存空间不足而引起营养枯竭，将培养的细胞分散，从容器中取出，以1:2或1:3以上的比率转移到另外的容器中进行培养，即为传代培养。

# 细胞转染

外源基因进入细胞主要有四种方法：电击法、磷酸钙法、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液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。

# 细胞G418筛选

外源基因表达在宿主细胞中成功表达，需要将外源基因稳定转染至宿主细胞，进入细胞的外源基因80%的可以得到瞬时表达，极少数以非同源性重组整合进细胞染色体，但只有整合到表达区的基因才会表达，而且整合到不同的染色体区段的外源基因的表达量也是不同的。由于摄取、整合、表达外源基因是小概率事件，因此需要通过新表型筛选稳定转染体，常用抗生素抗性基因作为筛选标记。而G418 是一种氨基糖类抗生素，其结构与新霉素相似，它通过影响80S核糖体功能而阻断蛋白质合成，对原核和真核等细胞都有毒性。细菌T<sub>n</sub>5 转座子序列（neo抗性基因）携带的氨基糖苷磷酸转移酶可以将G418转变成无毒形式，当neo基因被整合进真核细胞基因组合适的地方后，则能启动neo基因编码的序列转录为mRNA，从而获得抗性产物氨基糖苷磷酸转移酶的高效表达，使细胞获得抗性而能在含有G418的选择性培养基中生长。G418的这一选择特性，已在基因转移、基因敲除、抗性筛选以及转基因动物等方面得以广泛应用。

# 插入基因检测

对插入基因检测，需要按照目的基因设计特异性引物，利用特异性引物以细胞基因组为模版进行扩增，若扩展出来的产物中含有目的基因就表明基因组中插入了目的基因。其中扩展采用PCR扩展技术，其是一种选择性扩增DNA或RNA的方法，其基本原理是依据体内细胞分裂中的DNA半保留复制机理，以及在体外dNTP分子于不同温度下双链和单链可以互相转变的性质，人为地控制体外合成系统的温度，以促使双链DNA变成单链DNA；单链DNA与人工合成的引物退火，以及在dNTP存在下，耐高温的DNA聚合酶使引物沿单链模板延伸成为双链DNA。

PCR反应分3步：①变性：通过加热使DNA 双螺旋的氢键断裂，双链解离形成单链DNA；②退火：当温度突然降低时，由于模板分子结构较引物要复杂得多，而且反应体系中引物DNA量大大多于模板DNA，使引物和其互补的模板在局部形成杂交链，而模板DNA双链之间互补的机会较少。③延伸：在DNA聚合酶和4种dNTP底物及Mg<sup>2+</sup>存在的条件下，5'→3'的聚合酶催化以引物为起始点的DNA链延伸反应，以上3步为一个循环，每一循环的产物可以作为下一个循环的模板，数小时之后，介于两个引物之间的特异性DNA片段得到了大量复制，数量可达 $2 \times 10^{6 \sim 7}$ 拷贝。

# 插入基因拷贝数检测

插入基因拷贝数的检测，采用荧光定量PCR法进行检测，其原理是PCR扩增时在加入一对引物的同时加入一个特异性的荧光探针，该探针为一寡核苷酸，两端分别标记一个报告荧光基团和一个淬灭荧光基团。探针完整时，报告基团发射的荧光信号被淬灭基团吸收；刚开始时，探针结合在DNA任意一条单链上；PCR扩增时，Taq酶的5'端-3'端外切酶活性将探针酶切降解，使报告荧光基团和淬灭荧光基团分离，从而荧光监测系统可接收到荧光信号，即每扩增一条DNA链，就有一个荧光分子形成，实现了荧光信号的累积与PCR产物形成完全同步，或者使用荧光染料SYBR。SYBR可以结合到双链DNA上面，当体系中的模板被扩增时，SYBR可以有效结合到新合成的双链上面，随着PCR的进行，结合的SYBR染料越来越多，被仪器检测到的荧光信号越来越强，从而达到定量的目的。

# ELISA法检测表达产物水平

ELISA法采用抗原与抗体的特异反应将待测物与酶连接，然后通过酶与底物产生颜色反应，用于定量测定。测定的对象可以是抗体也可以是抗原。在这种测定方法中有3种必要的试剂：①固相的抗原或抗体（免疫吸附剂）②酶标记的抗原或抗体（标记物）③酶作用的底物（显色剂）测量时，抗原（抗体）先结合在固相载体上，但仍保留其免疫活性，然后加一种抗体（抗原）与酶结合成的偶联物（标记物），此偶联物仍保留其原免疫活性与酶活性，当偶联物与固相载体上的抗原（抗体）反应结合后，再加上酶的相应底物，即起催化水解或氧化还原反应而呈颜色。其所生成的颜色深浅与欲测的抗原（抗体）含量成正比。这种有色产物可用肉眼、光学显微镜、电子显微镜观察，也可以用分光光度计（酶标仪）加以测定。其方法简单，方便迅速，特异性强。



# Western Blot 法检测表达产物水平

此方法通过电泳区分不同的组分，并转移至固相支持物，通过特异性试剂（抗体）作为探针，对靶物质进行检测，蛋白质的Western印迹技术结合了凝胶电泳的高分辨率和固相免疫测定的特异敏感性等多种特点，可检测到低至1~5ng（最低可到10-100pg）中等大小的靶蛋白。