

质粒 DNA 转染注意事项

质粒的构建：启动子的选择

启动子的选择对于转染基因的有效表达是非常重要的。对于转染过程本身虽然无甚影响，但是对转染结果却有着微妙的影响。

启动子可分为 2 大类：诱导型启动子是比较精明的，平时歇着，一旦接到诱导信号指示就马上开工干活儿。而组成型启动子比较老实的，就是从头到尾不停干活从不闲着的那种——比如我们很熟悉的 CMV 启动子啊，SV40 啊，pMC1 啊，PGK 启动子啊等等。

获得高转染活性所需选择的启动子依赖于选用的细胞系和要表达的蛋白。CMV 启动子在大多数细胞类型中可以获得高表达活性。在 BHK-21 中，CMV 启动子活性比其他启动子如 SV40 和 RSV 都要高。但这三种病毒启动子在 T 细胞来源的细胞系，如 Jurkat 中组成表达水平较低。转染后在培养基中加入 PHA-L 和 PMA 可以激活 Jurkat 细胞中 CMV 启动子，而单 PMA 就足以激活 KG1 和 K562（人骨髓瘤白细胞）中的 CMV 启动子。SV40 启动子的表达在含有大 T 抗原（存在于 COS-1 和 COS-7）时会提高，因为大 T 抗原可以刺激染色体外的合成。

一个强悍的高表达组成型启动子是我们做表达所求之不得的，但是对于转染本身来说却不一定好——因为任何持续过高表达外源基因都可能带来某种程度的细胞毒性，影响细胞生长——如果外源基因本身对细胞生长有毒，那更完蛋了，你很可能筛不到转染成功的细胞株，更别提稳定转染了——因为过量表达本身可能已经害死了那个转染了的细胞，没转染的细胞又死于筛选压力。这种时候一个不那么“能干”的启动子可能更适合一些。如果你曾经遇到原因不明的转染失败案例，会不会是这个原因呢？过犹不及就是这个道理咯。

诱导型启动子对于转染来说，特别是稳定转染，可能是更好的选择。它使得目的基因的表达可以受到我们的调控——转染的时候不表达，筛选稳定表达株后再诱导表达，使得表达有毒性的基因或者精确分析表达产物的生物学效

应成为可能。多数诱导型启动子在接受某种信号后“打开开关”开始工作，也有的相反，在缺失某种信号后打开开关。Clontech 还有个诱导系统是“剂量依赖的”，就是说不单表达开关可控，表达量多少也可以通过诱导剂的量来调控。还有一种特殊的启动子很好玩——具有时序性或者组织特异性（空间特异性），会受到特定的元件调控，在一定的时间或者特定组织细胞中表达的，比如那个转基因山羊奶里用的只在泌乳期的乳腺细胞中表达的启动子——有人说这是组成型的，我觉得应该是诱导型的，只不过诱导的因素我们不知道罢了，这类启动子在不同的细胞中会有不同的表现，需要注意。诱导系统的问题主要是本底表达，表达量有限，以及诱导剂本身对细胞的影响和如何清除，不过这些都与转染无关。

转染 DNA 的启动子-增强子如果不被宿主细胞识别也会产生无法表达的“悲剧”，这是实验设计时需要注意的问题。不过现在利用现成试剂盒或者模拟国外已经成功的实验的居多，独立构建表达系统的极少，因而这种问题遇到的几率也几乎可以忽略不计。

目的基因

这个对于研究人员来说是目的，因而没有选择的余地。如果你的目的基因正好会影响选定细胞株的生长，甚至有毒，那最好选择一个诱导型的启动子，不然你可能总是转染不了。但是通常在实验之前我们不清楚我们研究的基因产物是否对选定的细胞有毒，所以正负对照很重要。当排除其他原因后转染总是失败，应当从根本上考虑原因。

质粒的大小和质量

线性化还是超螺旋会影响转染结果：超螺旋质粒的转染效率比线性 DNA 高得多，特别是瞬时转染。而线性化 DNA 转染的整合几率高。质粒太大了转染会困难一些。毕竟，相对致密、较小的外源异物被细胞内吞的几率要大一些。如果你的质粒正好比较大，又没有经验，选择特别注明可以转大质粒的

转染试剂成功几率会高一些。有的转染试剂还会提供一些促进 DNA 凝聚的成分，使得 DNA 形成转染复合物时更致密一些，更容易转染一些。

纯化质粒的质量无疑会影响转染效率。哺乳动物细胞总归是比大肠杆菌娇气，转染难度高些，因而要求的 DNA 纯度要更高些。早年要做转染真是大阵仗啊，光是提质粒做超离就令人皱眉。最令人头疼的是内毒素了。内毒素是革兰氏阴性菌细胞壁上特有的成分，主要是脂多糖中的类脂 A

（lipopolysaccharides），在细菌被裂解时被释放出来，由于其化学结构和特性，在质粒提取的过程中内毒素很容易混入质粒 DNA 中共同纯化出来。内毒素的存在会严重地影响转染效率，此外内毒素可能会激活造血细胞（例如 B 细胞、巨嗜细胞等）的非特异免疫反应，造成实验中的假阳性。所以质粒 DNA 转染时应尽量采用无内毒素污染的超纯质粒。幸好技术的进步令复杂的操作成为过去，多数实验室会选择使用转染级别的质粒纯化试剂盒纯化的质粒来转染。对于一些“耐受性高、容易操作的”细胞株，普通的 Kit 已经够了。对于一些对内毒素特别敏感的细胞，就要用“去内毒素”的质粒纯化 Kit 了。

质粒 DNA 的浓度和量

既然质粒纯化已经不成问题，初学者通常都不会在乎甚至愿意多加点 DNA，但是要注意的是，DNA 量过少固然转染效率不高，DNA 量过多同样会降低转染效率。有的初学者习惯按照说明书 123 地去操作而不求甚解，你“知其然”是否还“知其所以然”呢？DNA:转染试剂的比例的优化是非常重要的，特别是对于阳离子脂质体、多胺等带电荷的转染试剂来说，DNA-转染复合物所带的净电荷是由转染试剂和 DNA 的比例决定的，而转染复合物是否能更好地结合到带负电的细胞膜上，很大程度取决于这个净电荷。所以预实验需要按照说明书的要求，按一定比例混合适量的质粒 DNA 和转染试剂。有的转染试剂要求 DNA 的量多些，有的转染试剂效率高只要很少 DNA，比如 Effectene 只需要常规五分之一的 DNA。所以转染前最好能精确定量质粒。另外由于质粒本身的因素（比如目的基因产物是否有毒、启动子强弱等因素），单独 DNA 也会对细胞生长有一个基础的影响，所以同时做几组不同量的对

照实验进行优化是很有帮助的。另外值得注意的是，当细胞铺板密度较高时，需要的质粒 DNA 和转染试剂的量也会略微提高。