

第一部分：质粒转染目的靶细胞

一、实验对象

1、细胞：目的靶细胞

二、实验材料与设备

| 名称 | 公司 | 货号 |
|------------------------|--------------|-----------|
| 质粒 | - | 定制 |
| Lipofectamine® 3000 | life (美国) | L3000001 |
| 0.25 %Trypsin-EDTA(1X) | Gibco (美国) | 25200-072 |
| 细胞培养板 (6孔板) | Corning (美国) | 3599 |

三、实验步骤

1) DNA 稀释与准备：6孔板细胞每孔推荐的 DNA 转染浓度是 2.5 µg/孔。

按照以下体系对 DNA 进行稀释。

| | 96 孔 | 24 孔 | 6 孔 |
|------------------------|--------|--------|--------|
| Opti-MEM® 培养基 | 5 µL | 25 µL | 125 µL |
| DNA (0.5–5 µg/µL) | 0.1 µg | 0.5 µg | 2.5 µg |
| P3000™ 试剂(2 µL/µg DNA) | 0.2 µL | 1 µL | 5 µL |

2) 按照以下体系对 Lipofectamine® 3000 进行稀释。

| | 96 孔 | 24 孔 | 6 孔 |
|---------------------|--------|--------|--------|
| Opti-MEM® 培养基 | 5 µL | 25 µL | 125 µL |
| Lipofectamine® 3000 | 0.3 µL | 1.5 µL | 7.5 µL |

3) 转染前一天, 接种适当数量的细胞至细胞培养板中, 使转染时的细胞密度能够达到 70~90%。

4) 对于每个转染样品, 按如下步骤准备 Lipofectamine® 3000-DNA 混和液:

a. 使用前, 取 7.5 μL Lipofectamine® 3000 转染试剂轻轻摇匀, 用 125 μL 不含血清的优化培养基 (Opti- MEM) 稀释, 涡旋振荡 2-3 s 充分混合试剂。

b. 用不含血清的 Opti- MEM (125 μL) 稀释 DNA (2.5 μg), 轻轻混和;

c. 尽快将 (a) 稀释好的 Lipofectamine® 3000 与上述 (b) 稀释好的 DNA 轻轻混和, 室温培养 5 min, 以形成 Lipofectamine® 3000-DNA 混和物。

5) 细胞在无血清培养基中进行转染, 可在转染复合物添加 8h 后更换为含血清培养基 (2 ml)。

6) 将培养板置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 的 CO_2 培养箱中培养至检测时间 48 小时至 72 小时。

7) 质粒表达效率检测: 采用 RT-PCR 法检测 mRNA 水平或 Western-blot 检测蛋白水平。

注: 不同培养容器中转染条件参见下表:

| | 96 孔板 | 24 孔板 | 6 孔板 |
|--------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 培养基体积 (μL) | 150 | 450 | 2000 |
| DNA 用量 (μg) | 0.1 μg | 0.5 μg | 2.5 μg |
| 稀释体积 (μL) | 5 | 25 | 125 |
| 转染试剂用量 (μL) | 0.3 | 1.5 | 7.5 |
| 稀释体积 (μL) | 5 | 25 | 125 |
| 总体积 (μL) | 180 | 550 | 2200 |

第二部分：RT-QPCR 检测

一、实验材料

细胞：目的靶细胞

二、实验试剂和仪器

所用试剂如下：

| 试剂名称 | 试剂来源 |
|----------------------------|------------------|
| SYBR Premix Ex Taq | TAKARA |
| Trizol | Invitrogen |
| Primescript RT reagent kit | TAKARA |
| DEPC treated water | 生工生物工程（上海）股份有限公司 |
| 氯仿 | 国药集团化学试剂有限公司 |
| BSA | Sigma |
| 胎牛血清 | GIBCO |
| DMSO | sigma |
| DMEM | GIBCO |
| 胰酶 | GIBCO |

仪器

| 仪器名称 | 仪器来源 |
|-----------------|----------------------|
| 稳压电泳仪 | Bio-Rad |
| Real-time PCR 仪 | Roche LC480 |
| 高速离心机 | Thermo |
| 核酸浓度测量仪 | Eppendorf photometer |
| 移液器 | Gilson |

三、实验方法：

1) Trizol 法抽提细胞中的总 RNA

a) 吸尽细胞培养瓶中的培养基,按照每 10 cm² 细胞加入 1 ml TRIZOL,用移液器上下吹打细胞,使细胞全部溶解,然后将细胞吸至 1.5 ml 离心管

- b) 将样品在室温下静置 5-15 min, 使核酸蛋白复合物完全分离
- c) 每管加入 0.2 ml 氯仿盖上盖子, 剧烈摇匀 15 s, 然后室温静置 3 min
- d) 4 °C 12000 g 离心 15 min, RNA 溶解在上层的水层里边, 体积大约为 50%
- e) 将无色层转移到 1.5 ml 的离心管
- f) 向其中加入 0.5 ml 异丙醇, 室温放置 10 min (miRNA 抽提可延长至 2 h)
- g) 4 °C 12000 g 离心 10 min, 移除上清, 底部会有白色的 RNA
- h) 加入无 RNA 酶的水配制 75% 的酒精, 放在漩涡仪上漩涡 20 s, 然后 7500 g 离心 5 min,
- i) 移除上清, 空气中静置 5-10 min, 待底部 RNA 刚好变无色
- j) 加入 20 μ l 无 RNA 酶的水, 60 °C 水浴或者金属浴 15 min
- k) 进行反转录或者放在 -70 °C 保存

2) cDNA 的合成

在 0.2ml 的 Ep 管内, 按照 TAKARA 反转录试剂盒说明书配制反应液, 体系为:

| | |
|--------------------------------|------------------|
| 5X primerscript buffer | 2 μ l |
| primerscript RT Enzyme mix I | 0.5 μ l |
| Oligo dT primer (50 μ M) * | 0.5 μ l |
| Random 6 mers (100 μ M) * | 0.5 μ l |
| total RNA | 500 ng |
| Rnase free H ₂ O | up to 10 μ l |

反转录条件为:

37°C 15min

注:*标记引物为目的基因的反转录引物

3) Real-time PCR

通过 qPCR 检测细胞样品中目的基因和内参基因的表达量, 根据 qPCR 反应曲线得到各样品目的基因和内参基因的 Ct 值(threshold cycle number. 阈值循环数), 采用 $2^{-\Delta \Delta Ct}$ 的方法进行相对定量。使用 QIAGEN 公司 RT² Profiler PCR Array Data Analysis 系统进行数据分析, 比较不同细胞中基因的相对表达情况。
 $\Delta \Delta Ct = (\text{待测样品的目的基因的 ct 平均值} - \text{待测样本的内参基因的 ct 的平均}) - (\text{对照样品的目的基因的 ct 的平均值} - \text{对照样本的看家基因的 ct 的平均值})$

目的基因的检测用引物序列(见实验结果报告):

| primer 名称 | 引物序列 5'to 3' |
|-----------|--------------|
|-----------|--------------|

| | |
|--|--|
| | |
| | |

内参基因的检测用引物序列(5'-3')：

| primer 名称 | 引物序列 5'to 3' |
|-----------|--------------|
| | |
| | |

PCR 体系中各组分的体积如下：

| 组分 | 体积 |
|---------------------|-------------|
| 超纯水 | 4.4 μ l |
| 2 \times SYBR Mix | 5 μ l |
| 上游引物 (10 μ M) | 0.2 μ l |
| 下游引物 (10 μ M) | 0.2 μ l |
| 模板 | 0.2 μ l |
| 总体系 | 10 μ l |

PCR 反应条件：

| | | | |
|--------|---|--------|-----------|
| 预变性 | 95 $^{\circ}$ C | 10 min | |
| PCR 循环 | 95 $^{\circ}$ C | 15 s | 40 cycles |
| | 60 $^{\circ}$ C | 60 s | |
| 融解曲线 | 60 $^{\circ}$ C \rightarrow 95 $^{\circ}$ C | | |

四、实验结果：

实验结果整理