



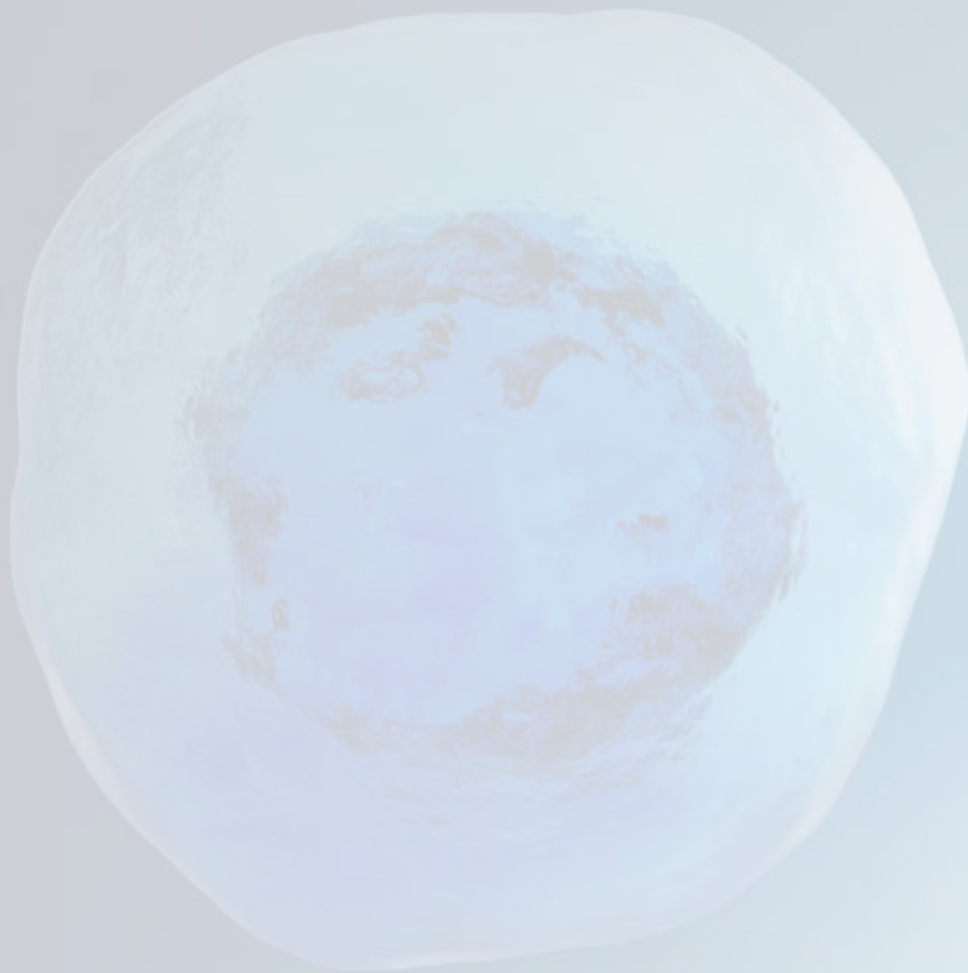
细胞培养基基础知识手册

掌握基本的细胞培养技术, 取得一致的
实验结果

 携手共进

The world leader in serving science

gibco



本文档中的信息如有更改, 恕不另行通知。

免责声明

THERMO FISHER SCIENTIFIC和/或其附属公司不对本文档提供任何明示或暗示的保证, 包括但不限于适销性、特定用途适用性或非侵权性的保证。在任何情况下, 无论是否以合同、侵权、担保, 抑或任何法规为依据, 或以任何其他特殊依据为基础, 对与本文档有关或因本文档引起的(包括但不限于对本文件的使用)特殊、偶然、间接、惩罚性、多重或后果性的损害, 在法律允许范围内, LIFE TECHNOLOGIES和/或其附属公司均不承担责任。

目录

1. 引言	1
手册目的	1
细胞培养简介	2
什么是细胞培养?	2
有限细胞系与连续细胞系	2
培养条件	2
冷冻保存	3
培养细胞的形态	3
细胞培养的应用	3
2. 细胞培养实验室	4
安全	4
生物安全等级	4
SDS	5
安全设备	5
个人防护装备 (PPE)	5
安全设备	5
细胞培养设备	6
基本设备	6
扩展设备	7
其他用品	7
细胞培养实验室	7
无菌工作区	7
细胞培养罩	7
细胞培养通风橱布局	9
培养箱	10
储存	10
冻存	11
细胞计数器	11
无菌技术	12
简介	12
无菌工作区	12
良好的个人卫生	12
无菌试剂和培养基	12
无菌操作	13
无菌技术检查清单	14

生物污染	15
简介	15
细菌	15
酵母	16
霉菌	16
病毒	17
支原体	17
交叉污染	18
使用抗生素	18
3. 细胞培养基本知识	19
细胞系	19
选择合适的细胞系	19
获取细胞系	20
培养环境	20
贴壁培养与悬浮培养	20
培养基	21
血清	22
细胞培养塑料耗材	23
pH值	25
CO ₂	25
温度	25
细胞形态学	26
哺乳动物细胞	26
哺乳动物细胞形态差异	26
293细胞形态	27
昆虫细胞	28
Sf21细胞形态	28
Sf9细胞形态	29
4. 细胞培养方法	30
培养细胞的维持指南	30
什么是传代培养?	30
何时进行传代培养	31
推荐用于普通细胞系的培养基	32
TrypLE解离酶	34

贴壁细胞传代	35
所需材料	35
贴壁细胞的传代方案	35
昆虫贴壁细胞传代注意事项	37
悬浮细胞传代	38
悬浮培养传代	38
悬浮培养容器	38
悬浮培养传代	39
悬浮细胞的传代方案	39
悬浮昆虫细胞传代注意事项	41
冷冻细胞	42
冷冻保存	42
冷冻保存指南	42
冻存培养基	43
所需材料	44
培养细胞冻存方案	44
解冻冻存细胞	45
解冻指南	45
所需材料	46
解冻冻存细胞	46
5. 转染基础知识	47
转染简介	47
什么是转染?	47
术语	47
应用	48
转染类型	49
瞬时转染	49
稳定转染	50
选择转染策略	51
基因输送技术	53
阳离子脂质体介导的输送	54
磷酸钙共沉淀	56
DEAE-右旋糖酐介导的输送	57
其他阳离子聚合物输送	58
病毒输送	59
电穿孔	61
其他物理输送方法	62

阳离子脂质体介导的转染	63
机理	63
阳离子脂质体转染试剂	64
病毒介导的基因转移	66
病毒载体的主要特点	66
常见病毒载体	67
Neon转染系统	69
稳定转染子的选择	71
用于真核细胞的选择性抗生素	71
报告基因分析	73
转染分析	73
基因调控分析	73
常用的报告基因	74
RNAi和非编码RNA研究	75
常用RNAi术语表	75
RNAi的工作原理	76
siRNA分析	76
miRNA分析	77
选择RNAi方法	78
6. 转染方法	79
转染效率的影响因素	79
细胞类型	79
细胞健康与活性	80
汇合	81
培养基	81
血清	82
抗生素	82
转染分子的类型	83
转染方法	83
转染方法的选择（非病毒）	84
连续细胞系	84
原代细胞与有限培养	85
病毒DNA输送系统的选择	86
哺乳动物细胞表达	86

质粒DNA转染指南	87
载体考虑因素	87
质粒DNA的质量	87
基因产物和启动子	88
对照	88
质粒DNA转染的优化	89
磷酸钙-DNA共沉淀法需考虑的因素	89
阳离子脂质体转染需考虑的因素	90
电穿孔法的考虑因素	93
稳定转染子的筛选	94
开始前	94
杀死曲线	94
筛选过程	95
RNAi策略的选择	96
siRNA与基于载体的RNAi 方法比较	96
非载体siRNA技术	97
siRNA转染	99
基于载体的RNAi	99
RNA转染指导原则	101
RNAi工作流程	101
RNA处理	102
转染效率	102
阳性对照	102
阴性对照	103
共转染	103
siRNA质量	104
siRNA的用量	104
转染试剂的体积	105
细胞密度	105
细胞在转染试剂/siRNA复合物中的暴露	105
转染过程中血清的存在	105
siRNA实验成功的技巧	106
siRNA转染优化	107
siRNA转染效率的影响因素	107

附录	108
故障排除	108
细胞培养和转染产物	109
细胞系	109
用于哺乳动物细胞培养的培养基	110
用于昆虫细胞培养的培养基	111
细胞培养血清产品	111
细胞培养塑料耗材	112
用于细胞培养的实验室试剂	113
抗生素和抗真菌剂	114
生长因子和纯化蛋白质	115
细胞计数仪	116
转染试剂	116
Neon转染系统	117
RNA干扰	117
3D细胞培养	118
类器官、球状体和3D细胞培养	118
3D服务	118
用于细胞培养的实验室设备	119
CO ₂ 培养箱	119
生物安全柜	119
离心机	119
其他资源	120
Gibco虚拟培训实验室	120
Gibco癌症基础知识	120
Gibco细胞培养大咖	120
哺乳动物和昆虫细胞培养物	120
细胞和组织分析	120
细胞生物学服务	121
安全技术说明书	121
分析证书	121
技术支持	121
有限产品质量保证	121
参考文献	122

1. 引言

手册目的

本“细胞培养基础知识手册”为“细胞培养基础知识教学视频”（可访问 [thermofisher.com/cellculturebasics](https://www.thermofisher.com/cellculturebasics) 获取）的补充。

手册和视频旨在介绍细胞培养基础知识。手册的前四章主要介绍细胞培养, 包括了解细胞培养业实验室要求、实验室安全、无菌技术、细胞培养的微生物污染等主题, 并提供培养细胞传代、冷冻和解冻的基本方法。手册的后两章主要介绍各种转染技术, 并为转染方法的选择, 质粒DNA、寡核苷酸和RNA的细胞转染实验, 体外和体内转染实验, 以及稳定转染细胞的筛选实验等提供通用指南。

手册和教学视频中提供的信息和指导原则适用于细胞系 (有限细胞系或连续细胞系), 不涉及原代培养和干细胞的实验和技术, 例如组织分离和解离、将细胞重编程为多能干细胞、或使干细胞分化为各种谱系的实验。



请注意, 尽管细胞培养实验的基础知识存在某些相似之处, 但细胞培养条件因细胞类型不同而各异。偏离某种细胞类型所需的培养条件可能导致细胞表现出不同的表型; 因此, 我们建议您熟悉您所使用的细胞系, 并严格遵循实验所用每种产品的说明进行操作。

细胞培养简介

什么是细胞培养？

细胞培养是指将细胞从动物或植物体内取出，然后在适宜的人工环境中生长的过程。细胞可以在培养前直接从组织中取出并通过酶或机械方法进行解离，也可以来源于已建立的细胞系或细胞株。

原代培养

原代培养是指细胞从组织中分离出来后，在适宜条件下增殖，直到它们占据所有可用的基质（即达到汇合状态）的培养阶段。在此阶段，必须通过将细胞转移到含有新鲜生长培养基的新容器中进行继代培养（即传代），以为其提供更多的继续生长空间。

细胞系

第一次传代培养后，原代培养物即被称为细胞系。来自于原代培养的细胞系寿命有限（即：有限细胞系；请参阅下文），随着细胞的传代，生长能力最强的细胞会占据优势，最终导致细胞群体在基因型和表型上达到一定程度的均一性。

细胞株

如果通过克隆或其他方法从培养物中阳性筛选出了细胞系的亚群，则该细胞系成为一个细胞株。与亲代细胞系起始时相比，细胞株通常会获得一些其他的遗传学改变。

有限细胞系与连续细胞系

正常细胞通常只能分裂有限的次数，随后就会丧失增殖能力，这是一种由遗传决定的事件，称之为衰老；此类细胞系被称为有限细胞系。但是，一些细胞系可以通过被称为转化的过程而变为永生化细胞系，该过程可以自发发生，也可以通过化学或病毒诱导而发生。当一个有限的细胞系经历转化并获得无限分裂的能力时，它就成为了一个连续细胞系。

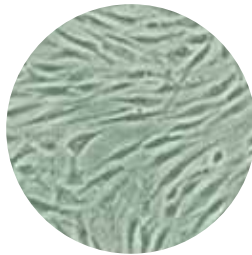
培养条件

各种细胞的培养条件相差很大，但是培养细胞的人工环境必须包括合适的容器，其中含有一定的基质或培养基，为细胞提供必需的营养物质（氨基酸、碳水化合物、维生素、矿物质）、生长因子、激素和气体（ O_2 、 CO_2 ），并调节生理化学环境（pH、渗透压、温度）。

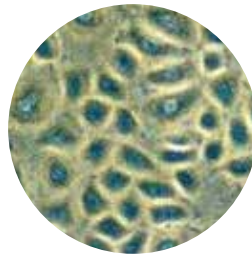
大多数细胞为贴壁依赖性细胞，必须附着于固体或半固体基质上培养（贴壁培养或单层培养），而另一些细胞则可在培养基中漂浮生长（悬浮培养）。

冷冻保存 如果传代时有多余的细胞, 则可使用适当的保护剂 (例如DMSO或甘油) 处理细胞, 并在-130°C以下的温度下保存 (冷冻保存), 直至使用。有关传代培养和冷冻保存细胞的更多信息, 请参阅“培养细胞保存指南”, 第30页。

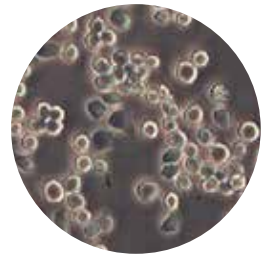
培养细胞的形态 根据细胞的形状和外观 (即形态), 可将其分为三大类。



成纤维 (或成纤维细胞样) 细胞 是双极或多极细胞, 呈细长的形状, 并附着在基质上生长。



上皮样细胞呈多边形, 尺寸更规则, 并附着在基质上分呈散在斑片状生长。



淋巴瘤细胞样细胞呈球形, 通常悬浮而不附着于表面生长。

细胞培养的应用 细胞培养是细胞和分子生物学所使用的一项重要技术, 为细胞正常生理和生化研究 (如代谢研究、衰老研究)、药物和毒性化合物对细胞的作用、以及致突变性和致癌性研究提供了上佳的模型系统。细胞培养还可用于药物筛选和开发, 以及生物化合物 (如疫苗、治疗性蛋白质) 的大规模生产。在这些应用中, 使用细胞培养的一大优势在于, 使用来源于同一克隆的一批细胞可获得稳定一致、可重复的结果。

2. 细胞培养实验室

安全

除大多数日常工作场所常见的安全风险（如电气和火灾危险）外，细胞培养实验室由于要操作和处理人或动物细胞和组织以及一些有毒、有腐蚀性或者有致突变性的溶剂和试剂，因而还具有一些特殊的危险。其中，最常见的一些危险包括：注射器针头或者其他污染锐器刺伤、液体泼溅到皮肤和粘膜上、经口吞入毒物以及吸入感染性气体挥发。

任何生物安全程序的基本目的都是为了减少或避免实验室工作人员和外部环境与潜在危害性生物物质的接触。细胞培养实验室中最重要的安全要素是严格遵守标准微生物学准则和技术。

生物安全等级

美国的生物安全法规和建议载于由疾病控制与预防中心（CDC）和美国国立卫生研究院（NIH）编写，由美国卫生与公共服务部颁布的《微生物学及生物医学实验室生物安全准则》中。该准则定义了四个递增的防护等级，分别为生物安全一级至四级，介绍了按照操作某一制剂时对应的危险等级应遵守的微生物学准则、应使用的安全设备以及应采取的设施安全措施。

生物安全一级（BSL-1）

BSL-1是大多数研究和临床实验室常用的基本防护等级，适用于已经明确鉴定的，不会在正常健康人体内引起疾病的活性微生物。

生物安全二级（BSL-2）

BSL-2适用于已知会通过吸入或经皮或粘膜暴露而引起不同严重程度人类疾病的中等风险生物因子。大多数细胞培养实验室应至少达到BSL-2级，但具体要求取决于所使用的细胞系以及开展工作的类型。

生物安全三级（BSL-3）

BSL-3适用于已知有可能通过气体挥发传播的本地或外来性生物因子，以及可能导致严重和潜在致命感染的生物因子。

生物安全四级（BSL-4）

BSL-4级适用于可通过气体挥发传播，对个人造成危及生命的不治之症的外源性生物因子。这些高致病风险的生物因子必须控制在高防护等级的实验室内。

有关生物安全等级指南的更多信息，请参阅《微生物学及生物医学实验室生物安全准则》第五版，可在[cdc.gov/labs/bmbi.html](https://www.cdc.gov/labs/bmbi.html)下载。

SDS 安全技术说明书 (SDS) 是一种包含特定物质属性信息的表格, 其中包括熔点、沸点和闪点等物理数据, 以及关于其毒性、反应性、健康影响、储存、处置、建议使用的防护装备和溢出处理的信息。

有关我们产品的 SDS, 可在 thermofisher.com/sds 上查阅。

安全设备 细胞培养实验室中的安全设备包括一级屏障, 如生物安全柜、封闭容器和其他用于消除或尽量减少危险物质暴露的工程控制设备, 以及通常与一级屏障一起使用的个人防护装备 (PPE)。生物安全柜 (即细胞培养通风橱) 是最重要的设备, 可限制许多微生物操作引起的感染性泼溅物或气体挥发。更多信息, 请参阅第7页的“细胞培养通风橱”部分。

个人防护装备 (PPE) 个人防护装备 (PPE) 在人员和危险源之间形成直接屏障, 包括个人防护用品, 如手套、实验外套和防护服、鞋套、防护靴、呼吸器、面罩、安全防护眼镜或护目镜。它们通常与生物安全柜和其他包含被处理制剂、动物或材料的设备配合使用。我们建议您参阅您所在机构的相关实验室指南来适当使用 PPE。

安全设备 以下建议仅为实验室安全规范指导原则, 不应将其视为完整的操作规范。请咨询您所在机构的安全委员会, 并遵守当地的实验室安全相关法规。

有关标准微生物实践和特定生物安全等级指导原则的更多信息, 请参阅 cdc.gov/labs/bmbl.html 网页上的《微生物学及生物医学实验室生物安全准则》, 第5版。

- 请始终穿戴适当的 PPE。手套被污染时, 应更换, 并将使用后的手套与其他被污染的实验室废物一起进行处置。
- 在操作可能具有危险的材料后和离开实验室之前, 请先洗手。
- 请勿在实验室中进食、饮水、吸烟、佩戴隐形眼镜、涂抹化妆品或存放供人类食用的食物。
- 请遵守所在机构关于安全处理锐器 (即针头、手术刀、移液器和破碎的玻璃器皿) 的准则。

安全(续)

- 请注意尽量减少气体挥发和泼溅。
- 在实验开始前和结束后, 都应对所有工作台面进行消毒。在任何可能具有感染性的材料溢出或溅出后, 均应立即使用适当的消毒剂进行消毒。即使未被污染, 也应定期清洁实验室设备。
- 在处理废弃物前, 应对所有培养物、储存物和其他可能具有感染性的材料进行消毒。
- 若发生了任何可能导致感染性物质泄漏的事件, 均应向相应人员(例如, 实验室主管、安全员)报告。

细胞培养设备

细胞培养实验室的具体要求主要取决于开展的研究类型; 例如, 专门从事癌症研究的哺乳动物细胞培养实验室的要求与专门研究蛋白质表达的昆虫细胞培养实验室的要求就存在很大差异。但是, 所有细胞培养实验室均有一个共同的要求, 即没有病原微生物(即无菌), 并且均有一些细胞培养必需的基本设备。

本节列出了大多数细胞培养实验室常用的设备和用品, 以及使工作更为高效、准确, 或可提高检测和分析范围的实用设备。请注意, 本清单并非无所不包; 任何细胞培养实验室的要求均取决于其开展的工作类型。

Basic equipment

- 细胞培养超净工作台(即层流超净台或生物安全柜)
- 培养箱(推荐使用湿式的CO₂培养箱)
- 水浴锅
- 离心机
- 冰箱和冰柜(-20°C)
- 细胞计数仪(例如Invitrogen™ Countess™ 3自动细胞计数仪或血细胞计数器)
- 倒置显微镜
- 液氮(N₂)冷冻柜或冻存容器
- 灭菌器(即高压灭菌器)

- 扩展设备**
- 抽吸泵（蠕动泵或真空泵）
 - pH计
 - 滚轮架（用于扩大单层培养的规模）
 - 共聚焦显微镜
 - 流式细胞仪
 - 生物反应器
 - 细胞培养小室

- 其他用品**
- 细胞培养容器（例如培养瓶、培养皿、多孔板）
 - 移液管和移液器
 - 注射器和针头
 - 废物容器
 - 培养基、血清和试剂
 - 细胞

细胞培养实验室

无菌工作区 细胞培养实验室的主要要求是需要保持一个仅限于细胞培养工作的无菌工作区。尽管最好使用单独的组织培养室，但在较大实验室中划出一定的细胞培养区同样可用于无菌操作、细胞培养、以及试剂和培养基的储存。提供无菌条件的最简单、经济的方法就是使用细胞培养通风橱（即生物安全柜）。

细胞培养罩 细胞培养通风橱提供了一个无菌工作区，同时可以抑制许多微生物学操作产生的感染性泼溅或气体挥发。细胞培养通风橱有三种，分别为I级、II级和III级，以满足各种研究和临床需求。

细胞培养通风橱的类别

I级细胞培养通风橱配合良好的微生物学技术，可为实验室人员和环境提供相当水平的保护，但此类通风橱无法防止培养物污染。它们的设计和气流特性类似于化学品通风橱。

II级细胞培养罩通风橱用于涉及BSL-1、2和3物质的工作，也为细胞培养实验提供所需的无菌环境。II级生物安全柜应用于处理潜在危险材料（例如，来源于灵长类动物的培养物、病毒感染培养物、放射性同位素、致癌或有毒试剂）。II级生物安全柜是目前最常见的细胞培养通风橱类型。

III级生物安全柜是气密性设备，可为人员和环境提供能达到的最高水平防护。在涉及已知人类病原体和其他BSL-4材料的工作中，需要使用III级生物安全柜。

细胞培养通风橱的气流特性

II级生物安全柜保持稳定的、单向的HEPA过滤气流从安全柜顶部吹到工作台面，从而保护工作环境免受灰尘和其他悬浮污染物的影响。

这些培养通风橱（即II级BSC）能为使用者和细胞培养物提供显著的保护。

超净工作台

水平层流或垂直层流“超净工作台”不是生物安全柜；这些设备将经HEPA过滤的气流从安全柜背面经由工作台面吹向使用者，这可能会使使用者接触到潜在的危险物质。这类设备仅能为产品提供保护。超净工作台可用于某些洁净操作（例如无菌设备或电子设备的无尘组装），但在操作细胞培养材料或药物配方，以及处理潜在感染性材料时，请勿使用超净工作台。

有关生物安全柜的选择、安装和使用的更多信息，请参阅《微生物学及生物医学实验室生物安全准则》第五版，可在[cdc.gov/labs/bmbli.html](https://www.cdc.gov/labs/bmbli.html)下载。

细胞培养通风橱布局

II级生物安全柜大小应足够一人使用，内外易于清洁，照明充足，使用舒适，且不会导致体位不便。保持细胞培养通风橱内的工作区域干净、整齐，所有物品均在直视范围内。对放置在细胞培养通风橱内的每件物品，用70%乙醇喷洒消毒，并擦拭干净。

细胞培养通风橱内物品的排列通常遵循以下右手使用习惯，在特定应用需要增加其他物品时，可做适当调整。

- 中心工作区域开阔、清晰，用于放置细胞培养容器
- 移液器置于右前方，玻璃移液管置于左侧，方便拿取
- 试剂和培养基在右后方，便于吸取
- 后部中间有放置一个小型容器，用于收集废液

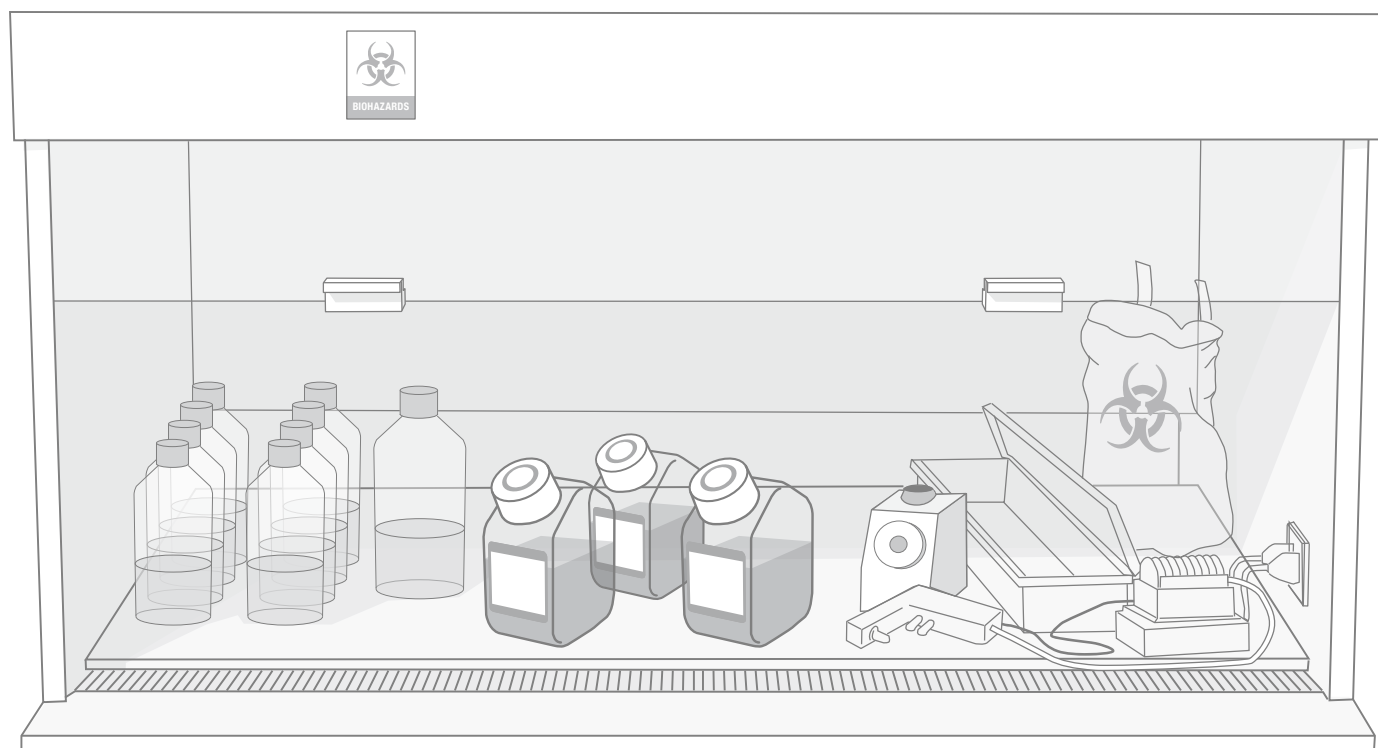


图2.1在II级BSC内“从洁净到脏污”工作的典型布局。左侧的洁净培养物（左）可在中央区进行接种；右侧的浅盘用于丢弃受污染的移液器，而生物危险品袋则可盛放其他受污染的材料。对于惯用左手的使用者而言，则可采取相反的排列。

细胞培养实验室(续)

培养箱 培养箱的用途是为细胞生长提供合适的环境,以模拟细胞所来源的体内条件。培养箱应足够大,有强制空气循环,并应将温度波动控制在 $\pm 0.2^{\circ}\text{C}$ 以内。不锈钢培养箱易于清洁并耐腐蚀,尤其适合于需要潮湿空气条件进行培养的情况。纯铜培养箱的清洁简便,提供了一种易于护理的替代方案。尽管细胞培养箱的无菌性要求不像生物安全柜那么严格,但还是应该经常清洁培养箱以降低细胞培养物的污染风险。

培养箱类型

培养箱有两大类,水套式和直热式 CO_2 培养箱。水套式培养箱属于较老的技术,但在断电情况下它最能保持箱内状态。直热式培养箱可提供自动高温灭菌选项,但必须专门证明其有效性。在任何情况下,都需要使用风扇进行主动空气循环,以确保整个环境保持一致,并在箱门打开后能够快速恢复。

储存 细胞培养实验室应设置多个区域分别用于存放液体(例如培养基和试剂)、化学品(例如药物和抗生素)、耗材(例如一次性移液器、培养容器和手套)、玻璃器皿(例如培养瓶和玻璃移液管)、专业设备以及组织和细胞。

玻璃器皿、塑料和专业设备可在室温下存放在架子上和抽屉中。而所有培养基、试剂和化学品则必须按照标签上的说明进行储存。

某些培养基、试剂和化学品对光敏感。尽管它们可耐受光照条件下的正常实验使用,但不使用时应将其存放在黑暗条件下或用铝箔包裹起来。

冰箱

对于小型细胞培养实验室,家用冰箱(最好是没有自动除霜功能的冰箱)是在 $2\text{-}8^{\circ}\text{C}$ 下储存试剂和培养基的经济便利之选。对于大型实验室,专供细胞培养使用的冷藏室则更为合适。冰箱或冷藏室都应定期清洁以避免污染。

冰柜

大多数细胞培养试剂可在-5°C至-20°C下储存；因此，超低温冰柜（即-80°C冰柜）可用于储存大多数试剂。家用冰柜是一种更便宜的选择。虽然大多数试剂可以耐受自动除霜（即自解冻）冰柜中的温度波动，但某些试剂（例如抗生素和酶）应储存在无自动除霜功能的冰柜。

冻存

随着传代次数的增加，连续培养的细胞系很可能会出现遗传不稳定性；因此，必须准备细胞工作贮备，并将其进行低温储存（更多信息，请参阅“细胞冻存”，第42页）。请勿将细胞储存在-20°C或-80°C的冰柜中，因为细胞活率在此温度下会下降。

液氮储存系统目前主要有两大类：蒸汽相和液相储存系统，分别采用广口和细口储存容器。蒸汽相系统可降低冻存管将爆炸的风险，这对于储存生物危险性材料是必需的，而液相系统通常具有更长的静态维持时间，因此更经济。

窄颈容器的氮气蒸发速度较慢且更经济，但宽颈容器的操作更容易，且储存容量更大。

细胞计数器

细胞计数器对于定量分析细胞的生长动力学至关重要，当在实验室中培养两个或三个以上细胞系时，能提供很大的便利。

Countess 3自动细胞计数仪是一款小巧的台式仪器，表面很好清理，可置于细胞培养通风橱中。由于采用先进的机器学习图像分析算法，具有自动光强度调节、聚焦、捕获、计数和保存功能，使用标准的台盼蓝染色摄取技术可在不到一分钟的时间内精准地测量每份样本的细胞计数和存活率（活细胞、死细胞和全部细胞）。只需要插入带有细胞样品的玻片即可。一次性Countess细胞计数板可为您提供最大程度地提供便利性，可重复使用玻片来实现可持续性并节约成本。Countess 3自动细胞计数仪的上样量与常用的血球计数器血细胞计数仪的上样量相同，通常每份样本的典型细胞计数耗时不到一分钟，适用于多种真核细胞。

无菌技术

简介 细胞培养的成功在很大程度上取决于保护细胞免受细菌、真菌和病毒等微生物的污染。非无菌用品、培养基和试剂、带有微生物的空气悬浮微粒、不干净的培养箱以及工作台面都是生物污染的来源。

无菌技术的作用是在环境微生物和无菌的细胞培养之间提供一道屏障，它通过一套操作流程来降低上述来源的污染概率。无菌技术的组成要素包括：无菌工作区、良好的个人卫生、无菌试剂和培养基以及无菌操作。

无菌工作区 减少空气悬浮微粒和气体挥发（例如灰尘、孢子、脱落的皮屑、喷嚏）污染的最简单经济的方法是使用细胞培养通风橱。

- II级生物安全柜应正确设置，并放置于细胞培养的专用区域，避免来自于门、窗和其他设备的气流，区域内不能直接穿行。
- 工作台面应保持整齐，只放置特定实验所需的物品；不能用作储存区。
- 使用前后，应对工作台面进行彻底消毒，并定期清洁周围区域和设备。
- 日常清洁时，在工作前和工作期间，特别是在发生任何泼溅后，应使用70%乙醇擦拭工作台面。
- 在细胞培养通风橱中，不需要也不建议使用酒精灯。

细胞培养通风橱应始终处于运行状态，只有在长时间不使用时才将其关闭。

良好的个人卫生 在进行细胞培养前后均要洗手。除了保护您免受危险物质的侵害外，穿戴个人防护装备还可减少皮屑脱落以及衣服上的灰尘和污垢造成的污染。

无菌试剂和培养基 商品化试剂和培养基均经过严格的质量控制以保证其无菌，但它们在操作过程中可能被污染。请遵循以下指导原则进行无菌操作，避免污染。请始终使用适当的灭菌方法（如高压灭菌器、除菌过滤器）对实验室中配制的任何试剂、培养基或溶液进行灭菌。

无菌操作

- 请始终用70%乙醇擦拭双手和工作区。
- 将容器、培养瓶、培养板和培养皿放入细胞培养通风橱之前, 先用70%乙醇擦拭其外部。
- 不要直接从试剂瓶或培养瓶中倾倒培养基和试剂。
- 使用无菌玻璃或一次性塑料移液管和移液器操作液体时, 每只移液管只能使用一次, 以避免交叉污染。无菌移液管到使用时才能打开其包装。移液管应存放在工作区内。
- 试剂瓶和培养瓶使用后应盖上盖子, 多孔板应用胶带密封或放入可重复密封的袋中, 以防止微生物和悬浮污染物进入。
- 无菌培养瓶、试剂瓶和培养皿等到使用时才能打开盖子, 不得将其开放暴露在环境中。使用后, 应立即盖好盖子。
- 盖子取下后, 必须开口朝下放置在工作台面上。
- 必须使用无菌的玻璃器皿和其他设备。
- 进行无菌操作时, 不要交谈、唱歌或吹口哨。
- 尽可能快速地进行实验, 以降低污染风险。

无菌技术检查清单

下面的清单简单罗列了一些建议和方法,可指导您切实使用无菌技术。有关无菌技术的深入介绍,请参阅《动物细胞培养:基本技术和特殊应用指南》(Freshney, 2016年)。

工作区域	
II级生物安全柜设置是否正确?	
生物安全柜是否在没有气流和穿行的区域内?	
工作台面是否整齐, 并仅放置了实验的必需物品?	
开始工作前, 您是否使用70%乙醇擦拭了工作台面?	
您是否定期清洁和消毒了培养箱、冰箱、冰柜和其他实验室设备?	
个人卫生	
您洗手了吗?	
您穿戴个人防护装备了吗?	
如果您留长发, 是否已将其扎在了后面?	
您是否使用移液器操作液体?	
试剂和培养基	
实验室中的任何试剂、培养基和溶液是否都进行了恰当的灭菌处理?	
在将试剂瓶、培养瓶和培养板放到工作台面之前, 您用70%乙醇擦拭其外部了吗?	
所有的试剂瓶、培养瓶和其他容器在不使用时都盖上了盖子了吗?	
所有的培养板是否都储存在无菌的重复密封袋中?	
是否有试剂浑浊或被污染了? 试剂中有漂浮颗粒吗? 有难闻的气味或异常的颜色吗? 如果是, 您对它们进行了去污并丢弃吗?	
操作	
您操作时是否缓慢、谨慎、且注意无菌技术了?	
所有物品(包括移液器、瓶和培养瓶)放入细胞培养通风橱之前, 表面是否都用70%乙醇擦拭过了?	
您是否将盖子朝下放在工作区内?	
您是否使用无菌玻璃移液管或一次性无菌塑料移液管操作所有液体?	
无菌移液管是否只使用一次以避免交叉污染?	
您是否注意避免让移液器吸头接触到任何非无菌物质?	
发生泼溅时是否立即吸干, 并用70%乙醇擦拭该区域?	

生物污染

简介 细胞培养物污染往往是细胞培养实验室中最常见的问题,有时会造成非常严重的后果。细胞培养污染物可分为两大类,一类是化学污染物,如培养基、血清和水中的杂质,包括内毒素、增塑剂和洗涤剂,另一类是生物污染物,如细菌、霉菌、酵母、病毒和支原体,以及其他细胞系的交叉污染。虽然污染无法完全消除,但可以通过全面了解其来源并遵循良好的无菌技术来降低污染的发生频率和严重性。本节将概述主要的生物污染类型。

细菌 细菌是一大类普遍存在的单细胞微生物。细菌的直径通常只有几微米,其形状多样,如球状、杆状和螺旋状等。由于分布广泛、生长迅速和体积大小等特点,细菌以及酵母和霉菌是细胞培养中最常见的生物污染物。细菌污染在培养物感染后几天内就很容易被肉眼观察到;受感染的培养物通常会变得浑浊,有时表面会有一层薄膜。经常还会出现培养基的pH值突然下降的情况。在低倍显微镜下,细菌以细小颗粒的形式出现在细胞之间,在高倍显微镜下观察可以分辨出单个细菌的形状。下面的模拟图像显示了贴壁培养的293细胞被大肠杆菌污染。

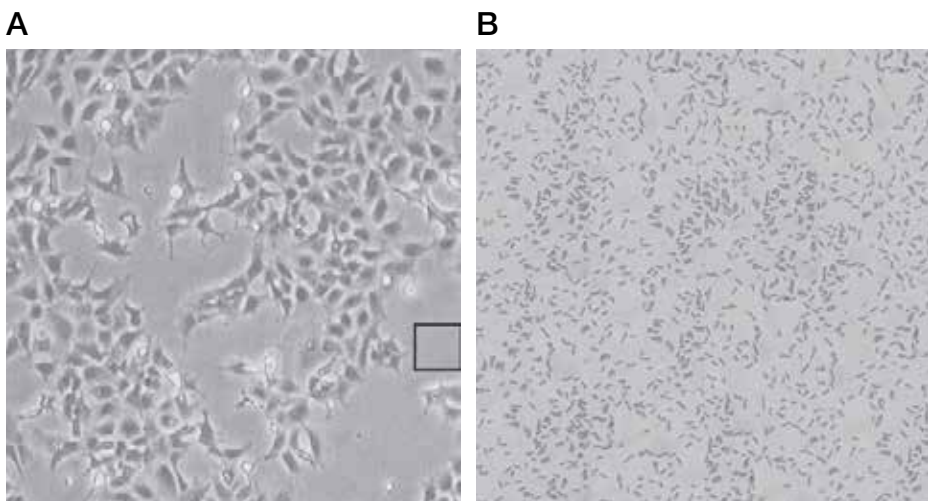


图2.2.被大肠杆菌污染的贴壁293细胞的模拟相差图像。在低倍显微镜下,贴壁细胞之间有一些发亮的微小颗粒,但单个细菌不易区分(图A)。进一步放大黑色正方形框出的区域后,可以显现出单个大肠杆菌细胞,这些细胞通常呈杆状,长约2 μm ,直径约0.5 μm 。图A中黑色正方形的边长为100 μm 。

生物污染(续)

酵母 酵母是真菌界中的单细胞真核微生物,大小从几微米(常见)到40 μm (罕见)不等。与细菌污染一样,被酵母污染的培养物会变得混浊,尤其是在污染的后期。被酵母污染的培养物,其pH值几乎没有变化,通常直到污染严重时,pH值才会升高。在显微镜下,酵母呈单个卵球形或球形颗粒,可能还会出芽产生更小的颗粒。下面的模拟图像显示了贴壁293细胞铺板24小时后被酵母感染的情况。

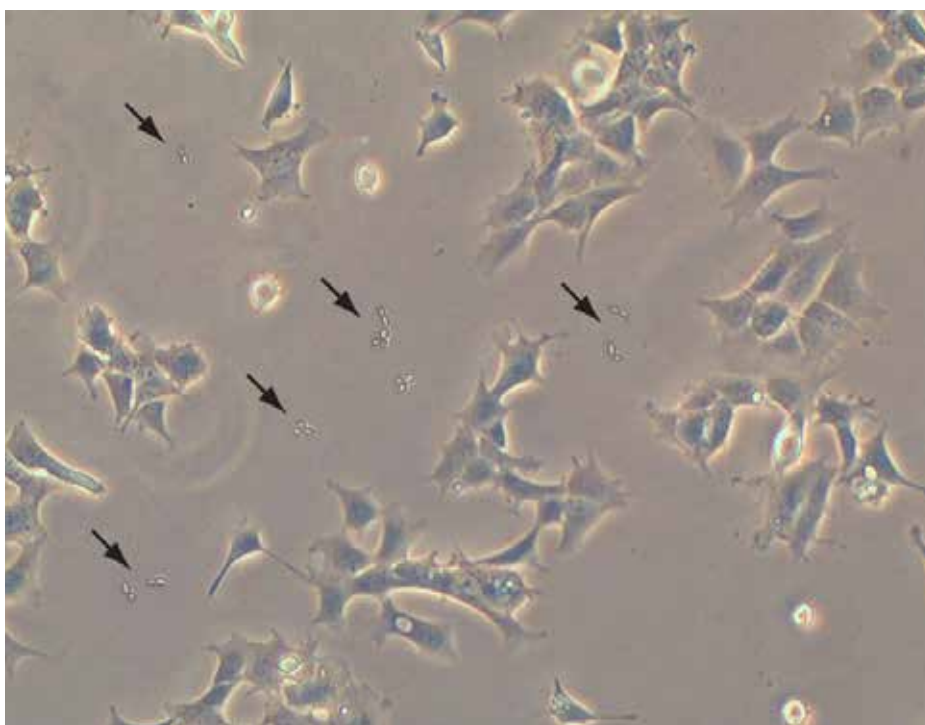


图2.3.被酵母污染的贴壁293细胞培养物的模拟相差图像。酵母细胞呈为卵球形颗粒,增殖时会出芽产生更小的颗粒。

霉菌 霉菌是真菌界的真核微生物,以多细胞丝状体生长,称为菌丝。这些多细胞丝状体构成的交联网络含有遗传性相同的细胞核,被称为集落或菌丝体。与酵母污染相似,培养物的pH值在污染的初期保持稳定,然后随着培养物感染程度加剧而迅速增加,并变得浑浊。在显微镜下,菌丝体通常呈细长的丝状体,有时呈密集的孢子团。许多种霉菌的孢子休眠阶段能够耐受极其恶劣和不宜生长的环境,当其遇到合适的生长条件时才会被激活。

病毒 病毒是一种微小的感染性病原体，利用宿主细胞的结构进行繁殖。它们的体积极小，难以在培养中被检测到，也难以从细胞培养实验室使用的试剂中去除。由于大多数病毒对宿主有非常严格的要求，因此，它们通常不会对宿主以外物种的细胞培养物产生不良影响。但被病毒感染的细胞培养物会对实验室人员造成严重的健康威胁，尤其是当实验室培养的是人类或灵长类的细胞时。要检测细胞培养物是否被病毒感染，可以使用电子显微镜观察、用抗体组合进行免疫染色、ELISA检测或是使用合适的病毒引物进行PCR扩增。

支原体 支原体是无细胞壁的简单细菌，被认为是最小的自我复制生物。由于支原体非常小（通常小于1 μm ），因此很难被检测到，除非它们达到了极高的密度，导致细胞培养物变质；在此之前，通常没有明显的感染迹象。一些生长缓慢的支原体可在培养物中持续存活，而不会导致细胞死亡，但它们可以改变培养体系中宿主细胞的行为和代谢。

慢性支原体感染的可能表现包括：细胞增殖率降低、饱和密度下降以及悬浮培养物凝集；但是，检测支原体污染的唯一可靠方法是通过使用荧光染色（例如Hoechst 33258染色）、ELISA、PCR、免疫染色、放射自显影或微生物测定法定期检测培养物。

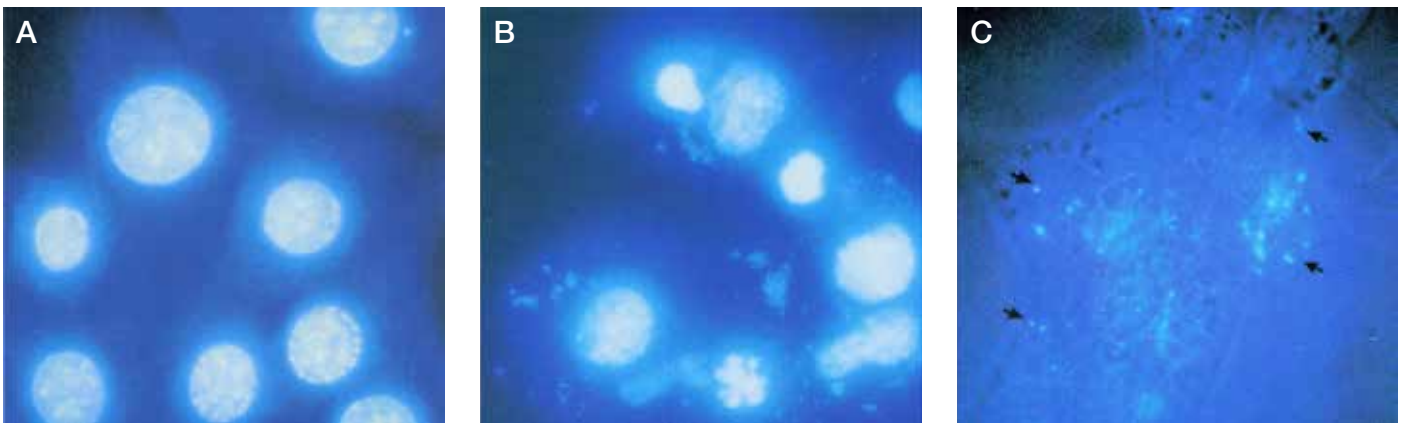


图2.4.无支原体细胞和支原体感染细胞的显微照片。使用Invitrogen™ MycoFluor™支原体检测试剂盒，按照试剂盒操作流程对培养物进行检测。(A) 在固定细胞中，MycoFluor试剂可进入细胞核，细胞核着色明显，但核外无荧光物质，表明培养物未被支原体污染。(B) 在被支原体感染的固定细胞中，MycoFluor试剂可对细胞核和支原体进行染色，但细胞核相对强烈的荧光会使细胞核上或细胞核周围的支原体显得模糊。然而，远离高亮度细胞核的支原体可被清晰地观察到。(C) 在活细胞中，MycoFluor试剂无法进入细胞核，但容易使细胞外结合的支原体染色。试剂盒中所用对照品的发射光谱，与按照操作流程进行染色的支原体的发射光谱非常一致，且强度均匀，便于研究人员区分染色的支原体和其他背景荧光，包括病毒、细菌，以及细胞自发荧光。上述图像使用365 nm激发光、100/1.3 Plan Neofluar™物镜以及450 ± 30 nm带通滤光片获得。

生物污染 (续)

交叉污染 虽然不如微生物污染普遍, 但许多细胞系与HeLa以及其他快速生长细胞系之间的广泛交叉污染已经是一个明确的问题, 会产生严重的后果。从值得信赖的细胞库中获取细胞系, 定期检查细胞系的特性, 并使用良好的无菌技术进行操作, 这些做法都将帮助您避免交叉污染。DNA指纹图谱分析、核型分析和细胞亚型分析可以确定细胞培养物中是否存在交叉污染。

使用抗生素 请勿在常规细胞培养中使用抗生素, 因为抗生素的连续使用会促进耐药菌株的生长, 并导致轻度污染持续存在。一旦将抗生素从培养基中去除, 就会发展成大规模污染。抗生素的持续使用还可能掩盖支原体感染和其他隐性污染。此外, 某些抗生素可能会与细胞发生交叉反应, 干扰正在研究的细胞过程。

抗生素只能作为对付污染的最后手段且只能短期使用, 并应尽快从培养物中去除。如果长期使用抗生素, 则应同时进行无抗生素培养, 作为检测隐性感染的对照。

3. 细胞培养基本知识

本节将介绍有关细胞培养的基础知识, 包括: 为实验选择合适的细胞系、用于细胞培养的培养基要求、贴壁培养与悬浮培养以及Thermo Fisher Scientific所提供的连续细胞系的形态。

请注意, 以下信息是细胞培养基础知识的介绍, 可作为您研究工作的起点。如需更多详细信息, 我们建议您查阅已出版的文献和书籍, 以及您所使用产品附带的手册和产品信息表。

细胞系

选择合适的细胞系

为自己的实验选择合适的细胞系时, 请注意以下标准:

- **种属:** 非人类和非灵长类动物细胞系的生物安全限制通常较少, 但是否需要使用种属特异性的细胞培养物, 则由所要开展的实验来最终决定。
- **功能特征:** 实验的目的是什么? 例如, 肝脏和肾脏来源的细胞系可能更适合用于毒性检测。
- **有限细胞系或连续细胞系:** 虽然选择有限细胞系会使您在表达正常功能方面具有更多的选择, 但是连续细胞系往往更容易扩增和维持。
- **正常或转化的细胞系:** 转化细胞系通常生长速度快, 接种效率较高, 并且可以连续培养, 培养基中需要的血清也较少, 但是由于遗传转化, 其表型已经发生了永生性变化。
- **生长条件和特性:** 您对细胞的生长率、饱和密度、克隆形成率以及悬浮生长能力有何要求? 例如, 要大量表达重组蛋白以获得高产量, 您可能应选择生长迅速且能够悬浮生长的细胞系。
- **其他标准:** 如果您使用的是有限细胞系, 您的细胞储备充足吗? 细胞系的特性是否明确? 需要自己进行验证吗? 如果您使用的是异常细胞系, 您是否有等效的正常细胞系可用作对照? 细胞系稳定吗?

如果不稳定, 那么这种细胞容易扩增以便为实验提供充足的冻存储备吗?

获取细胞系

您可以通过原代细胞建立自己的培养细胞系,也可选择从商业供应商或者非盈利性供应商(即细胞库)处购买已经建立的细胞系。声誉良好的供应商提供优质的细胞系,此类细胞系经仔细地完整性检测,可确保培养物无污染。建议不要从其他实验室借用培养物,因为它们有很高的污染风险。无论其来源如何,使用前均应确保所有新细胞系已经过支原体污染检测。

我们为您的细胞培养实验提供各种原代培养物、已建立的细胞系、试剂、培养基、血清和生长因子。附录包含Thermo Fisher Scientific提供的较常用的细胞系清单(请参阅第108页)。

培养环境

细胞培养的一大优势在于能够控制细胞繁殖的物理化学环境(即温度、pH值、渗透压、O₂和CO₂张力)和生理环境(即激素和营养浓度)。除温度外,培养环境由生长培养基控制。虽然细胞培养的生理环境不如其物理化学环境明确,但是通过更好地了解血清成分、确定增殖所需的生长因子以及更好地了解培养过程中的细胞微环境(即细胞间相互作用、气体扩散、细胞-基质相互作用),现在可以采用无血清培养基进行一些细胞系的培养。

贴壁培养与悬浮培养

目前,主要有两种基本的细胞培养体系,一种是使细胞在人工基质上单层生长(贴壁培养),另一种是使细胞在培养基中自由漂浮生长(悬浮培养)。除造血细胞系和其他一些细胞外,大多数脊椎动物细胞均具有贴壁依赖性,必须在合适的基质上培养,且该基质必须经过特殊处理,以便细胞附着和铺展(即经组织培养处理)。但是,许多细胞系也可采用悬浮培养。同样,大多数市售昆虫细胞系在单层或悬浮培养物中生长良好。悬浮培养细胞可在未经组织培养处理的培养瓶中培养,但随着培养物体积与表面积之比(通常为0.2-0.5 mL/cm²)的增加,阻碍了气体的充分交换,因此需要对培养基进行搅拌。这种搅拌一般通过磁力搅拌器或者旋转瓶实现。

细胞的后续实验往往决定了细胞培养的形式和培养基。除了经过标准组织培养处理和未经处理的表面外, 还使用了其他表面改良技术来获得预期的细胞培养结果。例如, 低细胞结合的表面处理可直接防止贴壁依赖性细胞附着在培养容器的表面, 从而在生成细胞球状体的悬浮培养物方面, 比未经处理的表面更具优势。将这种系统与旋转瓶相结合, 可以大规模生产球状体。

贴壁培养	悬浮培养
适合包括原代细胞在内的大多数细胞类型。	适用于已适应悬浮培养的细胞和其他一些无粘附性的细胞 (例如造血细胞)
需要定期传代, 但易于在倒置显微镜下进行目视检验	较易传代, 但需要每天进行细胞计数和存活率测定, 以遵循生长方式; 可将培养物稀释以刺激生长
采用酶法 (例如Gibco™ TrypLE™ Express、胰蛋白酶) 或机械方法解离细胞	无需通过酶法或机械方法解离细胞
细胞生长受到表面积限制, 从而可能限制细胞产量	细胞生长受到培养基中细胞浓度的限制, 易于扩大规模培养
需要使用经过组织培养处理的容器	可在未经组织培养处理的培养容器中进行培养, 但需要搅动 (如摇晃或搅拌) 以便进行充分的气体交换
可连续收获产物, 用于细胞学研究等多种研究应用	可批量收获产物, 用于批量生产等多种研究应用

培养基 培养基是培养环境中最重要的组成部分, 因为它为细胞生长提供了必要的营养、生长因子和激素, 并调节培养物的pH值和渗透压。

尽管最初的细胞培养实验使用从组织提取物和体液中获得天然培养基进行, 但对标准化和培养基质量的需求不断增长, 促进了化学成分确定的培养基的发展。培养基的三个基本类别分别是基础培养基、减血清培养基和无血清培养基, 三种培养基对血清添加的要求有所不同。

基础培养基
大多数细胞系在含有氨基酸、维生素、无机盐和碳源 (例如葡萄糖) 的基础培养基中生长良好, 但在这些基础培养基的配方中必须进一步添加血清。

减血清培养基
在细胞培养实验中, 减少血清不良影响的另一种策略是使用减血清培养基。减血清培养基是富含营养物质和动物源性因子的基础培养基配方, 可减少所需的血清量。

培养环境 (续)

无血清培养基

无血清培养基 (SFM) 通过用适当的营养和激素配方替代血清，避免了使用动物血清的问题。无血清培养基配方适用于许多原代培养物和细胞系，包括用于生产重组蛋白的中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞系、各种杂交瘤细胞系、昆虫细胞系 Sf9 和 Sf21 (草地贪夜蛾) 以及用作病毒生产宿主的细胞系 (例如 293、VERO、MDCK、MDBK 等)。使用无血清培养基的主要优势之一是，能够通过选择生长因子的适当组合使培养基对特定细胞类型具有选择性。下表列出了无血清培养基的优点与缺点。

优点	缺点
- 成分限定程度增加 - 性能更加稳定 - 更易于纯化和下游处理 - 生产率提高	- 对特定细胞类型培养基配方有所要求 - 试剂纯度要求更高 - 生长放缓

细胞培养基最佳实践方案

下面是一些简单的提示和技巧，可以帮助您确保细胞培养基保持最佳性能。

我们提供各种经典的基础培养基、减血清培养基和无血清培养基，以及生长

	如果细胞培养基已冷藏 (2-8°C)，请在使用前加热。
	细胞培养基保持避光储存。暴露于光线会使培养基中细胞生长所需的必需维生素降解。
	一旦您向细胞培养基添加 FBS 后，请将完全培养基放入冰箱 (2-8°C) 以保持性能。
	在 2-4 周内使用含添加剂的培养基，以减少污染几率和 pH 值变化的影响。

因子、添加剂、抗生素和试剂，供您进行细胞培养实验。附录包含 Thermo Fisher Scientific 提供的更常用的细胞培养产品。如需了解更多信息，请访问 thermofisher.com/mammaliancellculture。详情请访问 thermofisher.com/media 和 thermofisher.com/cultureagents。

血清 作为生长和附着因子、激素、脂质和矿物质的来源，血清对于在基础培养基中进行的细胞培养至关重要。此外，血清还调节细胞膜的通透性，且是脂质、酶、微量营养素和微量元素进入细胞的载体。尽管可以获得并利用其他动物血清 (例如马、兔、山羊、猪等)，但胎牛血清 (FBS) 仍然是使用最广泛的血清。

与小牛和成年牛血清相比, FBS含有少量的丙种球蛋白、较高水平的生长因子和较少的补体蛋白。这使得FBS非常适合于促进增殖细胞生长, 同时也降低了哺乳动物细胞在培养物中结合或裂解的可能性, 从而成为FBS优先于其他动物血清的合理理由。然而, 在培养基中使用血清存在一些缺点, 包括成本高, 标准化、特异性和差异性方面的问题, 以及对某些细胞培养物的不良影响, 例如刺激或抑制生长和/或细胞功能。如果血清的来源不可靠, 污染也会对成功的细胞培养实验构成严重威胁。我们的Gibco™产品(包括血清)经污染检测, 其质量、安全性、一致性和合规性均得到保证, 可提供多种血清, 以满足您从基础研究到专业检测的特定细胞培养需求。无论您需要具有最低病毒风险、最低内毒素水平的血清, 还是需要用于专业应用和检测的血清, Gibco产品都能提供卓越的价值。更多信息, 请访问 thermofisher.com/fbs。

细胞培养塑料耗材

细胞培养塑料表面

多年来, 许多不同类型的塑料已用于细胞培养和基于细胞的检测。包括聚对苯二甲酸乙二醇酯(PET)、高密度和低密度聚乙烯(PE)、聚氯乙烯(PVC)和聚丙烯(PP), 但目前实验室中最常用的塑料是聚苯乙烯(PS)。PS的低成本及其惰性化学性质使其成为一次性培养表面的最佳选择。

在其纯粹形式下, PS是疏水性的, 这非常适合悬浮细胞培养。但是, 除造血细胞系和其他一些细胞外, 大多数脊椎动物细胞均具有贴壁依赖性, 必须在表面上培养, 且该基质必须经过特殊处理, 以便细胞附着和铺展, 此类表面称为组织培养(TC)处理的表面或经细胞培养处理的表面。该处理过程包括将PS表面暴露于等离子体气体中, 等离子体气体会部分修饰和切割聚合物链, 留下含氧官能团, 如羟基和羧基。PS表面产生的负电荷使其更具亲水性, 并改善了贴壁依赖性细胞的附着情况。

通过对表面进行包被, 可以进一步优化PS表面的特性, 例如使用多肽(如多聚-D-赖氨酸或PDL)、蛋白质(如胶原)或多糖。PDL是一种化学合成的聚阳离子细胞外基质(ECM), 可帮助介导细胞膜和表面的负电荷, 从而促进细胞附着到经TC处理的塑料上。

培养环境 (续)

ECM蛋白质 (如胶原蛋白) 为某些类型的细胞 (在经TC处理的常规表面上生长有困难) 的附着和生长提供了附着框架。I型胶原适用于内皮细胞、上皮细胞、肌肉细胞和肝细胞。IV型胶原是基底膜的主要组成成分, 为细胞提供更具生理相关性的生长条件。

细胞培养容器

培养皿: 细胞培养皿是一次性的浅容器, 专门设计用于支持培养细胞的生长和繁殖。有多种尺寸 (单孔或多孔) 可供选择, 通常由PS或聚碳酸酯制成, 从而可实现无失真显微镜观察。通常配有盖子, 以提供持续的气体交换, 同时提供环境保护。与培养瓶相比, 使用培养皿时, 从转染的细胞群中选择单个菌落要更为容易。

培养瓶: 根据应用的不同, 可采用未经处理、经TC处理或用其他材料处理的细胞培养瓶。培养瓶大小为12.5 cm²到300 cm²不等, 可以是直颈, 也可以是弯颈。弯颈具有多个优点, 包括使操作人员更容易接触到整个生长表面, 有助于防止培养基接触到盖子, 并允许从培养瓶中倒出培养基且减少滴落。

滚瓶: 滚瓶是为疫苗工业规模生产、单克隆抗体和生物治疗等应用而开发的, 由PS或聚对苯二甲酸乙二酯 (PETG) 制成。与培养瓶相比, 滚瓶具有更大的生长表面, 能够使培养基在细胞上缓慢而稳定地混合, 并有助于增加培养基与表面的接触。

孔板: 细胞培养板的孔数从4个到384个不等, 可一次用于多种培养。根据应用的不同, 细胞培养板有未经处理、经TC处理或用其他材料处理的培养板。对于TC板, 仅处理孔的底部, 保持壁的疏水性。经TC处理的孔板可为细胞附着和生长提供一致且相容的表面。

培养腔室玻片: 培养腔室玻片由一个可拆卸的培养基腔室组成, 该腔室与一个经过处理用于贴壁细胞培养的玻片相连。它使您可以在单个显微镜载玻片上进行接种、培养、固定和染色。一些培养腔室玻片具有模拟PDL涂层特性的经化学修饰的生长表面。

试管: 有多种用于培养、离心或储存细胞的试管。经TC处理的试管可用于培养, 而锥形离心管可用于从样本储存到细胞分离等各种应用。

有关更多信息, 请访问 thermofisher.com/cellcultureplastics

pH值 大多数正常的哺乳动物细胞系都能在pH值为7.4的环境中生长良好, 而且不同细胞株间差异极小。但是, 目前发现有些转化细胞系在轻度偏酸性的环境 (pH 7.0-7.4) 中生长较好, 而有些正常的成纤维细胞系更适合在轻度偏碱性的环境 (pH 7.4-7.7) 中生长。Sf9和Sf21等昆虫细胞系在pH值为6.2的环境中生长情况最佳。

CO₂ 生长培养基可控制培养物的pH值, 为培养细胞pH值的变化提供缓冲作用。通常, 这种缓冲作用通过添加有机 (例如HEPES) 缓冲液或者CO₂-HCO₃⁻ (碳酸氢盐) 缓冲液实现。培养基的pH值取决于溶解态CO₂与HCO₃⁻间的精密平衡, 因此, 空气中CO₂含量的变化会改变培养基的pH值。为此, 使用含CO₂-HCO₃⁻缓冲液的培养基时必须使用外源性CO₂, 特别是使用开放式培养皿培养细胞或者需要在高浓度条件下进行细胞系培养时。虽然大多数研究人员通常使用的是空气中CO₂浓度为5-7%培养基, 但是4-10%浓度的CO₂适用于大多数细胞培养实验。然而, 每种培养基均具有其推荐的CO₂张力和碳酸氢盐浓度, 以便达到适当的pH值和渗透压; 更多信息, 请参阅培养基生产商提供的说明书。

温度 细胞培养的最佳温度主要取决于分离来源的细胞宿主的体温, 此外也部分受到解剖部位体温差异的影响 (例如皮肤温度可能低于骨骼肌的温度)。与温度过低相比, 细胞培养时温度过高是更为严重的问题; 因此, 往往将培养箱的温度设定为略低于最佳温度的温度。

- 大多数人类和哺乳动物细胞系在36°C至37°C下具有最佳生长状态。
- 在27°C下培养是昆虫细胞的最佳生长条件; 它们在较低温度和27-30°C之间的温度下生长较慢。高于30°C时, 昆虫细胞的存活率降低, 即使温度恢复到27°C, 细胞也无法恢复。
- 禽类细胞系需要38.5°C才能实现最大程度的生长。尽管这些细胞在37°C时也可以进行培养, 但它们的生长速度更慢。
- 源自冷血动物 (例如两栖动物、冷水性鱼类) 的细胞系可在15°C至26°C这一较宽的温度范围内生长。



请注意, 每种细胞类型的细胞培养条件各不相同。偏离特定细胞类型所需培养条件, 可能导致异常表型的表达乃至细胞培养彻底失败等后果。因此, 我们建议您熟悉您感兴趣的细胞系, 并严格遵循实验所用每种产品的随附说明进行操作。

细胞形态学

定期检查培养细胞的形态（即其形状和外观），对于成功进行细胞培养实验至关重要。除确认细胞的健康状态外，每次处理细胞时都要用肉眼和显微镜检查细胞，这可以使您及早发现任何污染迹象，并在污染扩散到实验室周围其他培养物之前加以控制。

细胞变质的迹象包括细胞核周围的颗粒化、细胞与基质的解离以及细胞质空泡形成。变质迹象可能由多种原因引起，包括培养物的污染、细胞系的衰老或培养基中存在有毒物质，也可能仅出现需要更换培养基的迹象。任由变质过度发展将导致不可逆转的后果。

哺乳动物细胞

哺乳动物细胞形态差异

大多数哺乳动物培养细胞可以根据其形态分为三个基本类别。

- 成纤维（或成纤维细胞样）细胞为双极或多极，形状细长。其附着在基质上生长。
- 上皮样细胞呈多边形，尺寸更规则，并以离散空斑形式附着在基质上生长。
- 淋巴母细胞样细胞呈球形，通常悬浮生长而不附着于表面。

除以上列出的基本类别外，某些细胞还表现出特定于其在宿主中特殊作用的形态特征。

- 神经元细胞以不同的形状和大小存在，但大致可分为两个基本的形态类别，I型具有长轴突，用于长距离传递信号；II型则无轴突。一个典型的神经元从细胞体发出具有许多分支的细胞延伸，该延伸被称为树突树。神经元细胞可分为单极或假单极、双极和多极；其中单极或假单极的树突和轴突发自同一突起；双极的轴突和单个树突位于胞体（包含细胞核的细胞中心部分）的相对两端；多极具有两个以上的树突。

293细胞形态

293细胞系是使用原代人胚肾建立的永生细胞系，其经剪切的人5型腺病毒DNA转染而来。在该细胞系中表达的腺病毒基因能够使细胞产生非常高水平的重组蛋白。我们提供293细胞系的几种变体，包括适用于在无血清培养基中进行高密度悬浮培养的变体。有关更多信息，请访问我们网站上的哺乳动物细胞培养页面。

下面的相差图像显示健康293细胞在贴壁培养（图3.1）和悬浮培养（图3.2）中80%融合度时的形态。请注意，在处于对数期时，应在哺乳动物细胞贴壁培养物达到融合之前对其进行传代（参见“何时进行传代培养”，第31页）。

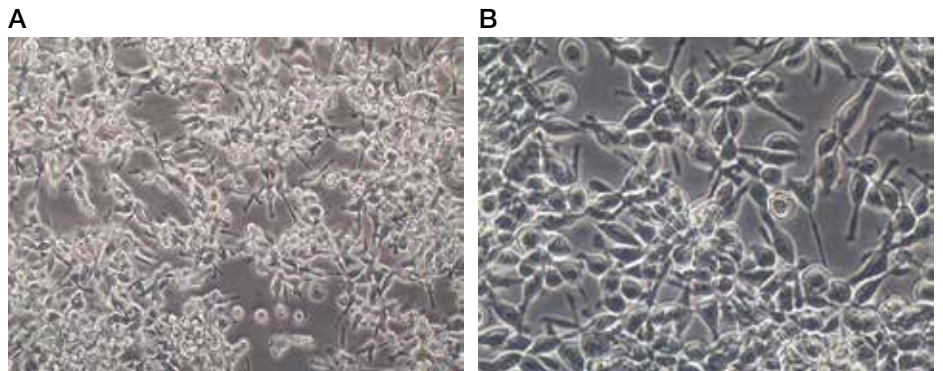


图3.1.贴壁培养的健康293细胞的相差图像。以 5×10^4 活细胞/ cm^2 的接种密度，将细胞平铺在Gibco™ 293 SFM II培养基中，并置于 37°C 、含5% CO_2 的湿润空气的培养箱中，以单层生长。铺板4天后，使用（A）10x和（B）20x物镜获得的图像。

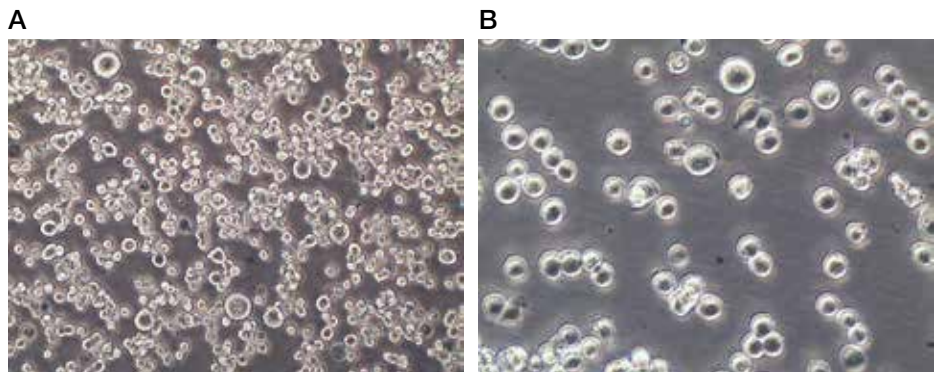


图3.2.悬浮培养的健康293F细胞的相差图像。以 2×10^5 活细胞/mL的接种密度，在含Gibco 293 SFM II培养基的摇瓶中开始培养，并置于 37°C 、含5% CO_2 的湿润空气的培养箱中生长。将细胞按1:3的比例稀释，接种4天后使用（A）10x和（B）20x物镜获得的图像。

昆虫细胞

Sf21细胞形态 Sf21细胞 (IPLB-Sf21-AE) 是从草地贪夜蛾 (秋夜蛾) 分离得到的卵巢细胞。其呈球形, 大小不等, 外观有些许颗粒。可将Sf21细胞解冻并直接用于悬浮培养, 以快速扩增细胞储液、杆状病毒储液的繁殖和重组蛋白的生产。因为Sf21细胞牢固地附着在表面, 其可以用作转染或空斑试验应用的单层。

下图显示了悬浮培养 (图3.3) 和贴壁培养 (图3.4) 中健康Sf21昆虫细胞的汇合形态。注意, 当昆虫细胞汇合时, 应对其进行传代培养 (见“何时进行传代培养”, 第31页)。

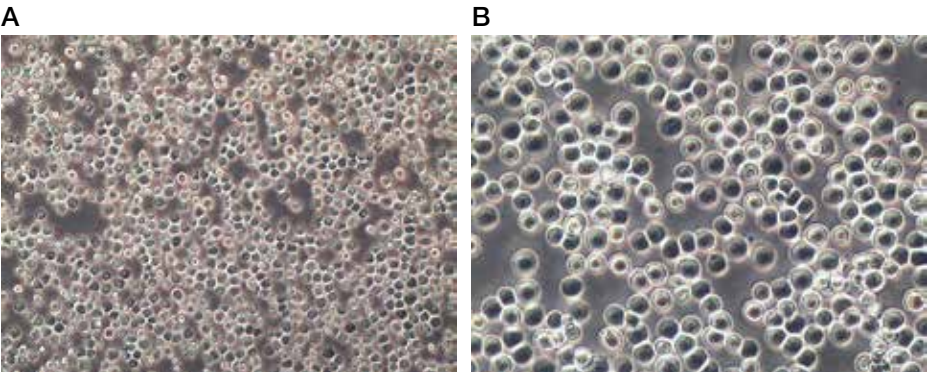


图3.3. 悬浮培养的健康Sf21昆虫细胞的相差图像。以 3×10^6 活细胞/mL的接种密度, 在含Gibco™ Sf-900 II SFM培养基的摇瓶中开始培养, 并保存在28°C、非湿润、环境空气调节培养箱中。接种3天后, 使用 (A) 10x和 (B) 20x物镜获得的图像。

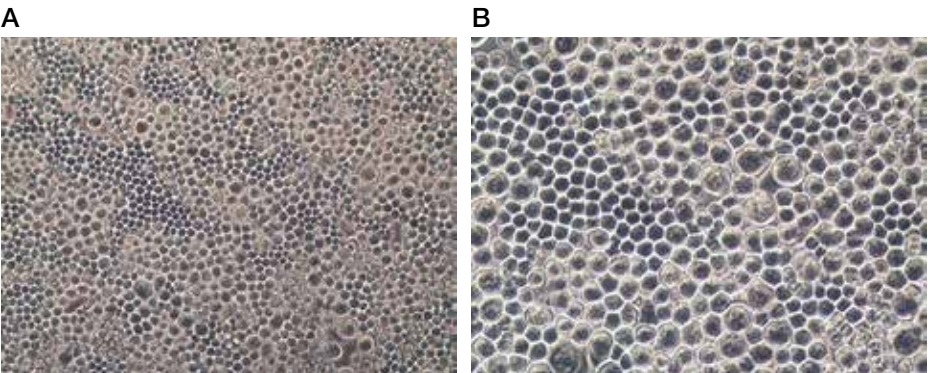


图3.4. 在Gibco™ 293 SFM II培养基中以贴壁单层生长的Sf21昆虫细胞的相差图像。以 5×10^4 活细胞/ cm^2 的接种密度, 将细胞平铺在T-25培养瓶中, 并在28°C、非湿润、环境空气调节培养箱中以单层生长。接种7天后, 当培养物汇合时, 使用 (A) 10x和 (B) 20x物镜获得的图像。

Sf9细胞形态

Sf9昆虫细胞系是衍生自草地贪夜蛾亲本细胞系IPLB-Sf-21-AE的克隆分离株，其是杆状病毒表达系统（例如，Invitrogen™ Bac-to-Bac™和Bac-N-Blue™表达系统）重组蛋白表达的适宜宿主。尽管在以前昆虫细胞一直使用T型培养瓶和添加血清的基础培养基在固定系统中培养，但昆虫细胞一般并非贴壁依赖性细胞，可以轻松地进行悬浮培养。

下图显示了悬浮培养和贴壁培养中健康Sf9昆虫细胞的形态。Sf9细胞牢固地附着于表面，其较小而规则的尺寸使其非常容易形成单层和空斑。

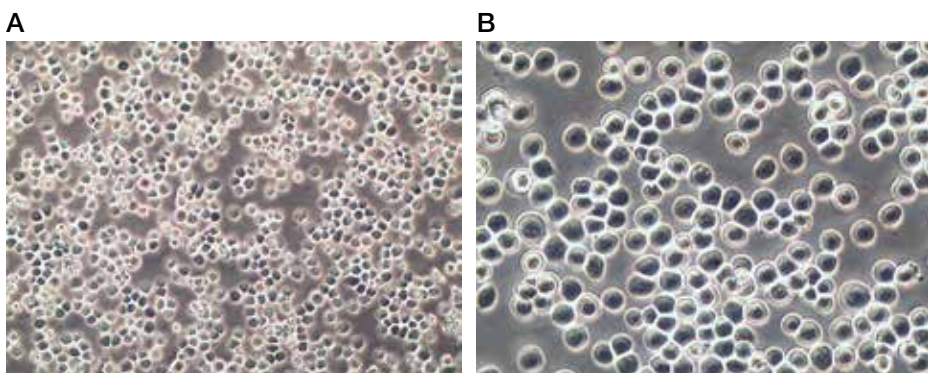


图3.5.悬浮培养的健康Sf9昆虫细胞的相差图像。以 3×10^5 活细胞/mL的接种密度，在含Sf-900 II SFM培养基的摇瓶中开始培养，并保存在28°C、非湿润、环境空气调节培养箱中。接种3天后，使用(A) 10x和(B) 20x物镜获得的图像。

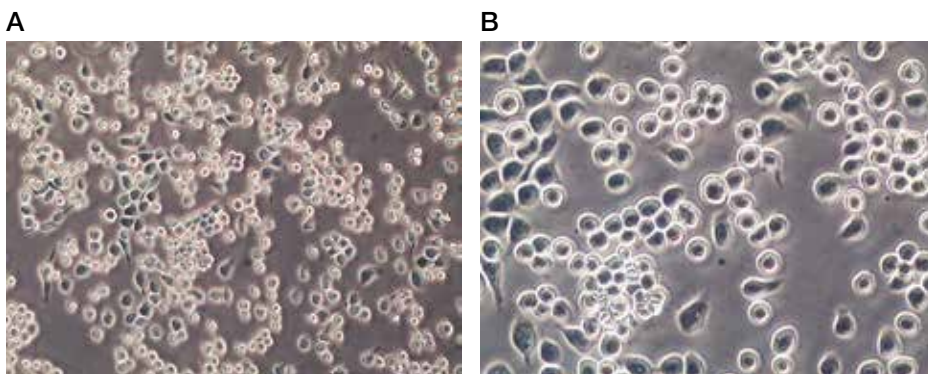


图3.6.贴壁培养的健康Sf9昆虫细胞的相差图像。以 5×10^4 活细胞/cm²的接种密度，在含Sf-900 II SFM的T型培养瓶中接种，并保存在28°C、非湿润、环境空气调节培养箱中。接种3天后，使用(A) 10x和(B) 20x物镜获得的图像。

4. 细胞培养方法



本节提供培养细胞的常规传代培养、解冻和冷冻的指导原则和一般步骤。请注意，每种细胞类型的细胞培养条件各不相同。偏离特定细胞类型所需培养条件，可能导致异常表型的表达乃至细胞培养彻底失败等后果。因此，我们建议您熟悉您感兴趣的细胞系，并严格遵循实验所用每种产品的随附说明进行操作。

培养细胞的维持指南

什么是传代培养？

传代/继代培养，是指去除培养基并将细胞从原培养物转移到新鲜的生长培养基中，通过这一操作使细胞系或细胞株进一步繁殖。

接种后，培养细胞的生长从延滞期进入对数生长期，该时期细胞呈指数增殖。当贴壁培养的细胞已占据所有可用基质、没有可用扩增空间，或者悬浮培养的细胞已超过培养基所能支撑的能力，无法进一步生长时，细胞增殖速度就会大大降低或完全停止（图4.1）。为了使培养物细胞密度维持在最佳水平，以便细胞继续生长并刺激进一步增殖，必须将培养物分成若干部分，并添加新鲜培养基。

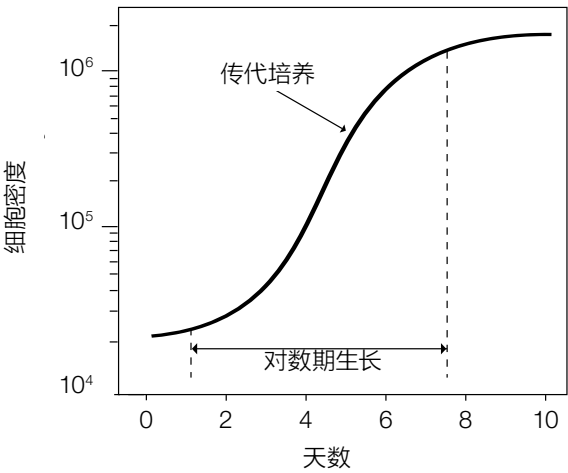


图4.1 培养细胞增长模式特征。半对数图显示细胞密度与培养所用时间的关系。培养细胞通常以标准生长模式增殖。接种培养物后的第一个生长阶段是延滞期，此阶段细胞生长缓慢，处于适应培养环境、为快速生长做准备的状态。滞后期之后是对数期（即“对数式”期）此阶段细胞呈指数增殖，消耗生长培养基中的营养。当所有生长培养基均被耗尽（即，一种或多种营养物耗尽）或当细胞已占据所有可用基质时，细胞进入静止期/平台期，此时增殖速度降低或完全停止。

何时进行传代培养

对于贴壁培养和悬浮培养而言,判断是否需要传代培养的标准大致相同;但是,在哺乳动物细胞系和昆虫细胞系之间则存在一些差异。

细胞密度

- **哺乳动物细胞:** 应在贴壁培养的细胞处于对数期时,在其达到汇合之前进行传代。正常细胞在达到汇合状态时会停止生长(接触抑制),并且重新接种后需要更长的时间才能恢复。转化细胞即使达到汇合状态后也能继续增殖,但在经过大约两次倍增后通常就会变质。类似地,悬浮细胞应在处于对数生长期时,在其达到汇合状态之前进行传代。达到汇合状态时,悬浮细胞会聚集成团块,转动培养瓶时培养基会变得浑浊。
- **昆虫细胞:** 应在昆虫细胞处于对数期时,达到汇合状态前进行传代。牢固贴壁的昆虫细胞可在达到汇合状态时传代,虽然此时细胞更容易从培养容器上解离下来,但是如果反复将昆虫细胞在密度超过汇合的状态下传代,细胞的倍增次数会减少,活力会降低,贴壁能力也会下降。另一方面,在达到汇合状态之前,对贴壁培养的昆虫细胞进行传代需要更大的机械力,才能使细胞从单细胞层中脱离。反复在达到汇合状态前传代,会导致细胞倍增次数减少,活力降低,健康度较差。

培养基耗竭

- **哺乳动物细胞:** 生长培养基pH值降低通常表明乳酸积聚,而乳酸是细胞代谢的副产物。乳酸有细胞毒性,低pH值环境也是细胞培养不利条件。pH值改变的速度通常取决于培养体系中的细胞浓度,细胞浓度越高,培养基耗竭的速度越快。如果发现pH值迅速降低(>0.1-0.2 pH单位),同时细胞浓度增大,则应对细胞进行传代培养。
- **昆虫细胞:** 培养昆虫细胞所用的生长培养基通常比哺乳动物细胞培养基的酸度大。例如,用于培养Sf9细胞的TNM-FH和Grace培养基的pH值为6.2。与哺乳动物细胞培养过程不同,昆虫细胞生长时培养基的pH值逐渐升高,但通常不超过6.4。然而,与哺乳动物细胞相同的是,昆虫细胞达到较高密度后,生长培养基的pH值将开始下降。

培养细胞的维持指南(续)

传代培养时间表

严格按照预定时间表进行细胞传代可确保细胞行为的重复性, 便于您监测其健康状况。从某一接种密度开始逐渐调整细胞接种密度, 直到达到适合该细胞的稳定生长速度和产量。细胞偏离该确定的生长模式通常表示细胞健康状况不佳(例如: 变质、污染)或者培养体系的某一组分功能异常(例如: 未达到最佳温度, 培养基过于陈旧)。我们强烈建议您保存保留详细的细胞培养记录, 记录加料和传代时间、所用培养基种类、解离方法、分种率、形态学观察结果、接种浓度、产量和抗生素用法。

最好按照传代时间安排开展实验和其它非常规操作(如更换培养基种类)。如果您的实验安排与常规传代时间安排不吻合, 则应确保当细胞仍处于滞后期或达到汇合状态、停止生长时, 不进行传代。

推荐用于普通细胞系的培养基

许多哺乳动物连续细胞系均可采用相对简单的培养基(如添加了血清的MEM培养基)进行培养, 而采用MEM培养基培养的细胞同样也可采用DMEM或Gibco™培养基199进行培养。但是, 当表达特定功能时, 可能需要更复杂的培养基。通常, 有关为某种细胞类型选择合适培养基的信息可在已发表文献以及从细胞来源机构或细胞库获得。

如果无法找到关于您的细胞该选择何种培养基的信息, 您可根据经验选择生长培养基和血清, 或者测试几种不同的培养基, 以获得最佳结果。通常, 贴壁细胞培养最好从MEM培养基开始, 悬浮细胞培养最好从RPMI 1640培养基开始。下列条件, 可作为建立新的哺乳动物细胞培养的指南。

用于昆虫细胞培养的生长培养基(例如: TNM-FH和Grace培养基)通常比哺乳动物细胞培养基酸度大。

哺乳动物细胞培养				
细胞系	细胞类型	种属	组织	培养基*
293	成纤维细胞	人	胚肾	MEM, 10% FBS
3T6	成纤维细胞	小鼠	胚胎	DMEM, 10% FBS
A549	上皮细胞	人	肺癌	F-12K, 10% FBS
A9	成纤维细胞	小鼠	结缔组织	DMEM, 10% FBS
AtT-20	上皮细胞	小鼠	垂体瘤	F-10, 15%马血清和2.5% FBS
BALB/3T3	成纤维细胞	小鼠	胚胎	DMEM, 10% FBS
BHK-21	成纤维细胞	仓鼠	肾	GMEM, 10% FBS; 或MEM, 10% FBS和NEAA
BHL-100	上皮细胞	人	乳腺	McCoy's 5A, 10% FBS
BT	成纤维细胞	牛	陀螺状细胞	MEM, 10% FBS和NEAA
Caco-2	上皮细胞	人	结肠癌	MEM, 20% FBS和NEAA
Chang	上皮细胞	人	肝	BME, 10% calf serum
CHO-K1	上皮细胞	仓鼠	卵巢	F-12, 10% FBS
Clone 9	上皮细胞	大鼠	肝	F-12K, 10% FBS
Clone M-3	上皮细胞	小鼠	黑色素瘤	F-10, 15%马血清和2.5% FBS
COS-1、COS-3 、COS-7	成纤维细胞	猴	肾	DMEM, 10% FBS
CRFK	上皮细胞	猫	肾	MEM, 10% FBS和NEAA
CV-1	成纤维细胞	猴	肾	MEM, 10% FBS
D-17	上皮细胞	犬	骨肉瘤	MEM, 10% FBS和NEAA
Daudi	淋巴母细胞	人	来自淋巴瘤患者的血液	RPMI 1640, 10% FBS
GH1、GH3	上皮细胞	大鼠	垂体瘤	F-10, 15%马血清和2.5% FBS
H9	淋巴母细胞	人	T细胞淋巴瘤	RPMI 1640, 20% FBS
HaK	上皮细胞	仓鼠	肾	BME, 10% calf serum
HCT-15	上皮细胞	人	结直肠腺癌	RPMI 1640, 10% FBS
HeLa	上皮细胞	人	宫颈癌	MEM, 10% FBS和NEAA (悬浮, S-MEM)
HEp-2	上皮细胞	人	喉癌	MEM, 10% FBS
HL-60	淋巴母细胞	人	早幼粒细胞白血病	RPMI 1640, 20% FBS
HT-1080	上皮细胞	人	纤维肉瘤	MEM, 10% HI FBS和NEAA
HT-29	上皮细胞	人	结肠癌	McCoy's 5A, 10% FBS
HUVEC	内皮细胞	人	脐带	F-12K, 10% FBS和100 µg/mL肝素
I-10	上皮细胞	小鼠	睾丸肿瘤	F-10, 15%马血清和2.5% FBS
IM-9	淋巴母细胞	人	来自骨髓瘤患者的骨髓	RPMI 1640, 10% FBS
JEG-2	上皮细胞	人	绒毛膜癌	MEM, 10% FBS
Jensen	成纤维细胞	大鼠	肉瘤	McCoy's 5A, 5% FBS
Jurkat	淋巴母细胞	人	淋巴瘤	RPMI 1640, 10% FBS
K-562	淋巴母细胞	人	髓细胞性白血病	RPMI 1640, 10% FBS
KB	上皮细胞	人	口腔癌	MEM, 10% FBS和NEAA
KG-1	原始粒细胞	人	来自红白血病患者的骨髓	IMDM, 20% FBS
L2	上皮细胞	大鼠	肺	F-12K, 10% FBS
LLC-WRC 256	上皮细胞	大鼠	肉瘤	培养基199, 5%马血清
McCoy	成纤维细胞	小鼠	未知	MEM, 10% FBS
MCF7	上皮细胞	人	乳腺癌	MEM, 10% FBS, NEAA和10 µg/mL胰岛素
WI-38	上皮细胞	人	胚肺	BME, 10% FBS
WISH	上皮细胞	人	羊膜	BME, 10% FBS
XC	上皮细胞	大鼠	肉瘤	MEM, 10% FBS和NEAA
Y-1	上皮细胞	小鼠	肾上腺肿瘤	F-10, 15%马血清和2.5% FBS
昆虫细胞培养				
Sf9, Sf21	秋夜蛾 (草地贪夜蛾)	蛹卵巢		TNM-FH, 10% FBS; 或Gibco Sf-900 II SFM (无血清) 或Sf-900 III SFM (无血清)
High Five (BTI-TN-5B1-4)	粉纹夜蛾 (拟尺蠖)	卵巢		TNM-FH, 10% FBS; 或Express Five SFM (无血清)
Schneider 2 (S2), D.Mel-2	果蝇 (黑腹果蝇)	胚胎		Schneider果蝇培养基, 10%热灭活FBS

* BME: Eagle基础培养基; DMEM: DMEM改良基础培养基; FBS: 胎牛血清; GMEM: Glasgow最低必需培养基; IMDM: Iscove改良的DMEM; MEM: 最低必需培养基; NEAA: 非必需氨基酸溶液; TNM-FH: 粉纹夜蛾培养基-Hink配方 (即: 含添加剂的Grace昆虫培养基)。

培养细胞的维持指南（续）

推荐用于普通细胞系的培养基

贴壁细胞传代的第一步是通过酶或机械方法将细胞从培养容器表面解离下来。下表列出了各种细胞解离程序。

程序	解离剂	应用
摇脱	轻轻震动或摇动培养容皿，或者用移液器充分搅拌。	松散贴壁的细胞、有丝分裂的细胞
刮	细胞刮刀	对蛋白酶敏感的细胞系；可能损伤部分细胞
酶解	胰蛋白酶	紧密贴壁细胞
	胰蛋白酶和胶原酶	高密度培养时，培养层形成多层的结构，尤其是成纤维细胞
	分散酶	使形成完整、汇合片层的表皮细胞从培养皿表面脱离下来，而不将细胞解离
	TrypLE解离酶	紧密贴壁细胞；直接替代胰蛋白酶；需要使用非动物源性试剂的领域

TrypLE解离酶

Gibco™ TrypLE™ Express和TrypLE™ Select酶是利用微生物生产的细胞解离酶，其动力学性质和裂解特异性均与胰蛋白酶类似。虽然TrypLE酶可直接替代胰蛋白酶用于细胞解离操作，无需更改实验流程，但是我们建议您开始时应优化解离的孵育时间。由于TrypLE酶是一种重组真菌胰蛋白酶样蛋白酶，适用于需要使用非动物源性试剂的领域。下表将TrypLE Express和TrypLE Select酶与胰蛋白酶进行了比较。有关更多信息，请访问thermofisher.com/triple。

TrypLE Express和TrypLE Select酶	胰蛋白酶
完全非动物和人类来源的衍生组分	猪源性或牛源性
室温下稳定	室温下不稳定
无需血清抑制	需血清抑制
无需胰蛋白酶灭活剂	需要胰蛋白酶灭活剂

贴壁细胞传代

以下实验方案介绍了贴壁培养哺乳动物细胞传代的一般流程。请注意昆虫细胞与哺乳动物细胞传代的一些关键步骤有所不同。有关更多信息, 请参见下一页的“昆虫细胞传代培养注意事项”。

我们建议您在进行细胞系传代时, 严格按照实验中所用每种产品的随附说明进行操作, 偏离特定细胞类型所需培养条件, 可能导致异常表型的表达乃至细胞培养彻底失败等后果。

所需材料

- 含贴壁细胞的培养容器
- 经组织培养表面处理的培养瓶、孔板、培养皿
- 完全生长培养基, 预热至37°C
- 15 mL的一次性无菌试管
- 37°C培养箱, 含5% 二氧化碳的湿润空气
- 不含钙、镁或酚红的平衡盐溶液, 例如杜氏磷酸盐缓冲盐水 (DPBS)
- 解离试剂, 例如胰蛋白酶或TrypLE Express酶, 不含酚红
- 用于测定活细胞计数和总细胞计数的试剂和设备 (例如, Countess3自动细胞计数仪)

贴壁细胞的传代方案

所有与细胞接触的溶液和设备必须无菌。请始终使用正确的无菌技术, 并在生物安全柜中操作。

1. 从培养容器中取出并丢弃已废细胞培养基。
2. 使用不含钙和镁的平衡盐溶液洗涤细胞 (每10 cm²培养表面积约2 mL)。向培养容器附着细胞层的对侧缓慢添加洗涤液, 以避免干扰细胞层, 并来回摇动数次培养容器。

注意: 洗涤步骤会去除任何抑制试剂解离作用的痕量血清、钙和镁。

3. 从培养容器中取出并丢弃洗涤液。

贴壁细胞传代(续)

4. 向培养瓶一侧添加预热的解离试剂, 例如胰蛋白酶或TrypLE酶; 使用足够的试剂覆盖细胞层(每10 cm²约0.5 mL)。轻轻摇动容器以完全覆盖细胞层。
5. 将培养容器在室温下孵育约2分钟。请注意, 实际孵育时间随所用细胞系而异。
6. 在显微镜下观察细胞是否解离。如果细胞脱离不到90%, 则继续孵育几分钟, 每30秒检查解离状况。您也可以轻轻摇晃培养容器以加速细胞解离。
7. 当≥ 90%的细胞已解离时, 倾斜培养容器至少一段时间, 使细胞排出。添加相当于2倍体积(解离试剂体积的两倍)的预热完全生长培养基。通过几次移液, 从细胞层表面分离培养基。
8. 将细胞转移到一个15 mL的锥形管中, 并以200 × g离心5-10分钟。请注意, 离心速度和时间因细胞类型而异。
9. 将细胞团块重悬在最小体积的预热完全生长培养基中, 取出样品进行计数。
10. 使用血细胞计数仪、细胞计数仪、台盼蓝拒染法或Countess 3自动细胞计数仪, 测定细胞总数和活细胞百分比。如有必要, 向细胞中添加生长培养基以达到所需的细胞浓度, 并重新计数细胞。
11. 将细胞悬浮液稀释至细胞系的推荐接种密度, 并将适当体积的细胞移液至新的细胞培养容器中, 然后将细胞放回培养箱。

注意: 如果使用培养瓶, 在将其放回培养箱之前, 如您使用的不是带透气盖的透气培养瓶, 请先打开瓶盖, 以便进行适当的气体交换。

昆虫贴壁细胞传代注意事项

尽管昆虫细胞传代培养的一般步骤与哺乳动物细胞相同, 但这些培养体系的一些关键要求不尽相同。为获得最佳效果, 请始终遵循在实验中您所用每种产品的随附说明。

- 昆虫细胞在对数期传代。然而, 如果您的昆虫细胞贴壁能力很强, 您可在其达到汇合状态或刚刚脱离培养瓶底部时进行传代。细胞更容易脱离。
- 细胞密度低于汇合状态的20%时, 细胞生长会受到抑制。对数期收集的细胞是最健康的。
- 昆虫细胞培养时, 不建议进行二氧化碳交换。
- 将昆虫细胞保存在27°C的非湿润环境中。可将细胞避光保存在室温条件下的试验台上或抽屉里。但是, 还是推荐27°C的受控环境进行培养。
- 使用昆虫细胞专用的培养基。
- 在无血清条件下, 昆虫细胞会非常紧密地附着于基质上, 需要额外的力才能解离。要使这些细胞脱离, 您可能需要借助手腕的快速运动来摇动培养瓶。为避免污染, 在执行此步骤前请务必拧紧瓶盖。

注意: 我们不建议剧烈摇动培养瓶, 因为这可能会损伤细胞。

悬浮细胞传代

以下方案描述了哺乳动物悬浮细胞传代的一般步骤。请注意昆虫细胞与哺乳动物细胞传代的一些关键步骤有所不同。有关更多信息，请参见“昆虫悬浮细胞传代注意事项”，第41页。

为了传代细胞系，我们建议您严格按照实验中所用每种产品的随附说明进行操作。偏离特定细胞类型所需培养条件，可能导致异常表型的表达乃至细胞培养彻底失败等后果。

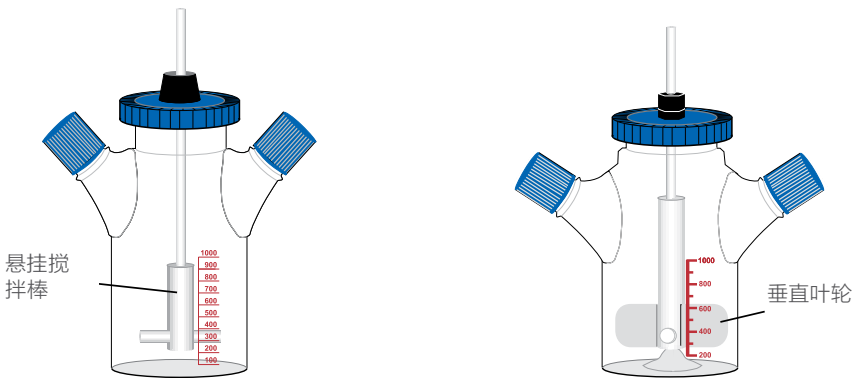
悬浮培养传代

悬浮细胞传代比贴壁细胞传代复杂程度略低。因为细胞已经悬浮在生长培养基中，所以无需进行酶处理即可将其从培养容器表面解离下来，整个过程更快，对细胞的损伤更小。在悬浮培养中不进行生长培养基的更换；相反，每2-3天喂养一次细胞，直到细胞达到汇合状态。这可以通过如下方法实现：直接稀释培养瓶中的细胞并使其继续扩增，或通过从培养瓶中取出一部分细胞并将剩余细胞稀释至适合细胞系的接种密度。通常，传代后的延滞期比贴壁培养所观察到的更短。

悬浮培养容器

悬浮培养物可以保存在未经组织培养处理的无菌培养瓶中；但是，专门为悬浮细胞培养设计的转瓶（即搅拌瓶）可以进行更好的气体交换并允许培养更大体积的细胞。还可能使用置于架子上的旋转滚瓶，以搅拌悬浮培养物。

转瓶有两种基本设计：通过悬挂搅拌棒组件或垂直叶轮搅拌（即搅动）培养基。垂直叶轮可实现更好的通气。为适当通气，旋转瓶中培养物的总体积不应超过旋转瓶标示体积的一半（例如，500 mL旋转瓶中的培养物不得超过250 mL）。



悬浮培养传代

- 含悬浮细胞的培养容器
- 不带挡板的摇瓶或转瓶 (参见上页“悬浮培养容器”)
- 完全生长培养基, 预热至37°C
- 37°C培养箱, 5% CO₂的湿润空气
- 磁力搅拌器 (如果使用旋转瓶)、滚轮架 (如果使用滚瓶) 或振荡平台 (如果使用传统培养瓶或皮氏培养皿)
- 用于测定活细胞计数和总细胞计数的试剂和设备 (例如, Countess3自动细胞计数仪)

悬浮细胞的传代方案

所有与细胞接触的溶液和设备必须无菌。请始终使用正确的无菌技术, 并在生物安全柜中操作。在细胞达到汇合状态之前处于对数生长期时传代。达到汇合状态时, 悬浮细胞会聚集成团块, 转动培养瓶时培养基会变得浑浊。传代前的最大推荐细胞密度因细胞系而异; 有关详细信息, 请参见对应细胞产品单页或手册。

摇瓶中的细胞培养

以下方案是在振荡培养箱中使用摇瓶, 哺乳动物细胞悬浮传代培养的一般步骤。有关详细方案, 请参见特定细胞产品插页。

注意: 确保摇瓶没有挡板 (即, 设计用于搅拌的培养瓶底部的凹槽), 因为影响振荡频率。

1. 当细胞准备好传代时 (即, 在达到汇合状态前的对数生长期), 从振荡培养箱中取出培养瓶, 并使用无菌移液管从培养瓶中取出少量样品。如果细胞在取样前已经沉淀, 则旋转培养瓶使细胞均匀分布在培养基中。
2. 使用Countess 3自动细胞计数仪或血细胞计数仪、细胞计数仪和台盼蓝拒染法, 测定样品中细胞总数和活细胞百分比。
3. 计算需要添加的培养基体积, 将培养基稀释至推荐接种密度。
4. 以无菌方式, 向培养瓶中加入适量的预热培养基。如需要, 您可以将培养物分为若干小份, 加入多个培养瓶。

5. 将培养瓶盖拧松一整圈, 以便进行适当的气体交换(或使用透气盖), 然后将培养瓶放回振荡培养箱中。振荡速度取决于细胞系。

注意: 为最大限度地减少摇瓶培养物中细胞碎片和代谢副产物废物的蓄积, 以 $100 \times g$ 的速度轻轻离心细胞悬浮液5-10分钟, 并每3周(或按需)将细胞团块重悬于新鲜的生长培养基中。

旋转瓶中的细胞培养

以下方案是使用转瓶进行哺乳动物细胞悬浮传代培养的一般步骤。有关详细方案, 请参见特定细胞产品插页。

请注意, 细胞对物理剪切很敏感。确保叶轮旋转自如, 且不会接触容器壁或底部。叶片顶部应略高于培养基, 以确保培养物充分通气。调整旋转器机制, 使叶片远离容器的侧面和底部。下表列出了不同旋转瓶尺寸所需培养基的最低体积。

旋转瓶尺寸	培养基最低体积
100 mL	30 mL
250 mL	80 mL
500 mL	200 mL

我们不建议直接在大于500 mL的转瓶中直接开始旋转培养。我们建议从已经验证的小体积转瓶开始逐步扩大培养规模。

1. 当细胞准备好传代时(即, 在达到汇合状态前的对数生长期), 从振荡培养箱中取出培养瓶, 并使用无菌移液管从培养瓶中取出少量样品。如果在取样前细胞已经沉淀, 则旋转培养瓶使细胞均匀分布在培养基中。
2. 使用Countess3自动细胞计数仪或血细胞计数仪、细胞计数仪和台盼蓝拒染法, 测定样品中细胞总数和活细胞百分比。
3. 计算需要添加的培养基体积, 将培养基稀释至推荐接种密度。

4. 以无菌方式, 向培养瓶中加入适量的预热培养基。如需要, 您可以将培养物分为若干小份, 加入多个培养瓶。
5. 将转瓶一侧的盖拧松一整圈, 以便进行适当的气体交换, 然后将培养瓶放回培养箱中。旋转器速度取决于细胞系和叶轮类型。确保旋转器速度保持在推荐值范围内, 以免剪切应力损坏细胞。

注意: 为最大限度地减少旋转瓶培养物中细胞碎片和代谢副产物废物的蓄积, 以 $100 \times g$ 的速度轻轻离心细胞悬浮液5-10分钟, 并每3周(或按需)将细胞团块重悬于新鲜的生长培养基中。

悬浮昆虫细胞传代注意事项

尽管昆虫细胞传代培养的一般步骤与哺乳动物细胞相同, 但这些培养体系的一些关键要求不尽相同。为获得最佳效果, 请始终遵循在实验中您所用昆虫细胞系的随附说明。

- 悬浮培养细胞时, 无需更换培养基。常规传代培养需要去除细胞悬浮液, 并添加足以将培养物稀释至适当密度的培养基(参见特定的细胞产品插页)。添加新鲜培养基足以补充细胞营养。
- 昆虫细胞培养时, 不推荐进行二氧化碳交换。
- 将昆虫细胞保存在 27°C 的非湿润环境中。可将细胞保存在室温条件下的试验台或抽屉中; 但是, 推荐将操作温度控制在 27°C 左右。
- 使用专门为昆虫细胞培养而配制的培养基。
- 使用表面活性剂减少剪切。0.1% Gibco™ Pluronic™ F-68表面活性剂建议用于旋转器昆虫培养, 因为它可以减少由于叶轮作用力对细胞膜造成的剪切力损伤。

注意: Sf-900 II SFM和Express Five SFM已含有表面活性剂。

- 某些昆虫细胞系可能需要调整以适应悬浮培养。

有关更多信息, 请参见特定的细胞系产品插页或手册。

冷冻细胞

冷冻保存 连续培养的细胞系容易发生遗传漂变；有限细胞系必定会衰老；所有细胞培养物都容易受到微生物污染；即使是运营状态最佳的实验室也可能出现设备故障。由于已建立的细胞系是一种宝贵资源，并且其更换昂贵且耗时，将其冷冻以进行长期储存至关重要。

传代时若有少量富余细胞，应尽快将其作为种细胞储备进行冻存及保管，不得用于常规实验用途。利用冻存的种细胞储备可以制作及补充工作细胞储备。如果工作细胞储备耗尽，冷冻保存的可用作制备新鲜，这样与初始冷冻时相比传代次数增加最少。

冷冻保存培养细胞的最佳方法是在含有二甲基亚砜 (DMSO) 等冷冻保护剂的情况下，将其储存在完全培养基的液氮中。冷冻保护剂可降低培养基的凝固点，同时可降低冷却速度，从而大大降低了晶体形成的风险，因为晶体会损伤细胞并导致细胞死亡。

注意：二甲基亚砜能促进有机分子进入组织。处理含有二甲基亚砜的试剂时，应选择适用于此类材料的设备和做法，以免面临危险。遵守地方法规，废弃处置试剂。

冷冻保存指南 对于冷冻保存细胞系以备将来使用，遵循以下指南至关重要。与其他细胞培养步骤一样，为了获得最佳结果，我们建议您严格遵循细胞系的随附说明。

- 冷冻保存培养细胞时，确保尽可能保存高浓度和低传代数的细胞。请确保冷冻前细胞的存活率不低于90%。请注意，最佳冷冻条件取决于所用细胞系。
- 使用温度受控冷冻箱或冷冻容器（例如：Thermo Scientific™ Mr. Frosty™ 梯度降温盒）以约每分钟1°C的速度降低温度，缓慢冷冻细胞。
- 请始终使用推荐的冻存培养基。冻存培养基应含有冷冻保护剂，如二甲基亚砜或甘油（参见“什么是传代培养？”，第30页）。
- 将冷冻细胞储存在-70°C以下；在-50°C以上，冷冻细胞开始变质。

- 请始终使用无菌冻存管储存冷冻细胞。可将含有冷冻细胞的冻存管浸入液氮或液氮上方的气相中储存 (参见下文安全注意事项)。
- 请始终穿戴个人防护设备。
- 所有与细胞接触的溶液和设备必须无菌。请始终使用适当的无菌技术, 并在生物安全柜中操作。



安全注意事项

生物危险性材料**必须**储存在液氮上方的气相中。将密封的冻存管储存在气相中可消除爆炸风险。如果您使用液相储存, 请注意玻璃和塑料冻存管的爆炸危险, 并始终佩戴面罩或护目镜。

冻存培养基

冷冻保存细胞时, 请始终使用推荐的冷冻培养基。冻存培养基应含有冷冻保护剂, 例如二甲基亚砜或甘油。您也可以使用特殊配方的冷冻保存完全培养基, 例如 Gibco™ Recovery™ 细胞培养冻存培养基或 Synth-a-Freeze™ 冻存培养基。

Recovery 细胞培养冻存培养基是一种用于哺乳动物细胞培养的即用型冻存完全培养基, 含有优化比例的胎牛血清和牛血清, 以提高细胞存活率和细胞解冻后的回收。

Synth-a-Freeze 冻存培养基是一种化学成分明确的无蛋白无菌、且含 10% 二甲基亚砜的冻存培养基, 适用于除黑素细胞以外的多种干细胞和原代细胞类型的冷冻保存。

有关更多信息, 请访问 thermofisher.com/freezingmedia.

冷冻细胞 (续)

所需材料

- 含有对数生长期培养细胞的培养容器
- 完全生长培养基
- 冷冻保护剂, 例如二甲基亚砜 (留用于细胞培养的瓶子; 仅能在层流净化罩中打开) 或冷冻培养基, 如Synth-a-Freeze冻存培养基或Recovery细胞培养冻存培养基
- 15或50 mL的一次性无菌锥形管
- 用于测定活细胞计数和总细胞计数的试剂和设备 (例如, Countess 3自动细胞计数仪)
- 无菌低温冻存瓶
- 温度受控冷冻装置或异丙醇冻存室盒
- 液氮储存容器

为冻存贴壁细胞, 除上述材料外, 您需要:

- 不含钙、镁或酚红的平衡盐溶液, 例如杜氏磷酸盐缓冲盐水 (DPBS)
- 解离试剂, 例如胰蛋白酶或TrypLE Express酶, 无酚红

培养细胞冻存方案

以下方案是冻存培养细胞的一般步骤。有关详细方案, 请参见特定细胞产品插页。

1. 制备冷冻培养基, 在2-8°C下储存, 直至使用。请注意, 合适的冷冻培养基取决于细胞系种类。
2. 对于贴壁细胞, 请按照传代培养过程中使用的操作, 将细胞从组织培养容器中轻轻解离下来。将细胞重悬在该细胞类型所需的完全培养基中。
3. 使用血细胞计数仪、细胞计数仪、台盼蓝拒染法或Countess3自动细胞计数仪, 测定细胞总数和活细胞百分比。根据所需的活细胞密度, 计算所需的冻存培养基体积。
4. 以大约100-200 × g的速度, 将细胞悬浮液离心5-10分钟。在不干扰细胞团块的情况下, 无菌倾析上清液。

注意: 离心速度和持续时间因细胞类型而异。

5. 将细胞团块重悬于特定细胞类型的推荐存活细胞密度的冻存培养基中。
6. 将细胞悬浮液等分至低温冻存管中。等分时, 要经常轻轻混合细胞以保持细胞悬浮液均匀。
7. 在温度受控冷冻装置中冻存细胞, 每分钟温度降低约1°C。另一种方法是, 将含有细胞的冻存管放置在异丙醇冻存盒中, 并储存在-80°C下过夜。
8. 将冷冻细胞转移到液氮中, 并储存在液氮上方的气相中。

解冻冻存细胞

解冻指南

解冻过程对冻存细胞有压力, 使用良好的技术迅速操作, 可以确保在该过程中细胞更高的存活率。与其他细胞培养操作一样, 为获得最佳结果, 我们建议您严格遵循细胞和其他试剂的随附说明。

- 在37°C的水浴中快速解冻冻存细胞(<1分钟)。
- 使用预热的生长培养基缓慢稀释解冻的细胞。
- 以高密度铺板解冻的细胞, 优化回收率。
- 始终使用适当的无菌技术, 并在生物安全柜中操作。
- 请始终穿戴个人防护装备, 包括面罩或护目镜。解冻时, 储存在液相中的冷冻小瓶存在爆炸风险。
- 一些冷冻培养基中含有二甲基亚砜, 其能促进有机分子进入组织。处理含有二甲基亚砜的试剂时, 应选择适用于此类材料的设备和做法, 以免面临危险。

解冻冻存细胞(续)

所需材料

- 装有冻存细胞的冻存管
- 完全生长培养基, 预热至37°C
- 一次性无菌离心管
- 37°C的水浴
- 70%乙醇
- 经组织培养处理的培养瓶、孔板、培养皿

解冻冻存细胞

以下方案是冻存细胞解冻的一般步骤。有关详细方案, 请参见特定细胞产品插页。

1. 从液氮储存中取出装有冷冻细胞的冻存管, 并立即将其放入37°C的水浴中。
2. 通过在37°C水浴中轻轻旋转冻存管, 快速解冻细胞(<1分钟), 直至管中只剩下少量冰。
3. 将管子转移到生物安全柜中。打开前, 使用70%乙醇小心擦拭冻存管外部。
4. 将解冻的细胞逐滴滴入离心管中, 管中预置了细胞系所需的适量预热完全生长培养基。
5. 以大约200 × g的速度, 将细胞悬浮液离心5-10分钟。实际离心速度和持续时间因细胞类型而异。
6. 离心后, 检查上清液的澄清度和完整团块的可见性。在不干扰细胞团块的情况下, 无菌倾析上清液。
7. 轻轻地将细胞重悬于完全生长培养基中, 然后将其转移到适当的培养容器和推荐培养环境中。

注意: 适当的烧瓶大小取决于冻存管中的冻存细胞数量, 培养环境因细胞和培养基类型而异。

5. 转染基础知识

本章提供转染概述, 包括各种转染技术的一般信息以及根据您的细胞系和实验需要选择适当的转染方法。有关细胞DNA和RNA转染的指南、转染实验成功的考虑因素和实验工作流程, 请参见第79页“转染方法”章节。

有关更多信息, 请访问 thermofisher.com/transfectionbasics

转染简介

什么是转染?

广义上讲, 转染是采用除病毒感染外的方法将核酸 (DNA或RNA) 人工导入细胞的过程。采用各种化学、生物或物理方法导入外源性核酸以改变细胞特性, 从而实现细胞基因功能和蛋白质表达研究。

转染后, 导入的核酸可以瞬时性地存在于细胞内, 只表达一段时间且不复制, 或者可以稳定地整合至受体基因组内, 随着宿主基因组的复制而复制 (参见“转染类型”, 第49页)。

术语

各种基因输送系统的术语与该领域的技术进展步调一致, 并进一步区分不同的方法和细胞类型。

转染

转染通常是指将核酸输送到真核细胞, 或者更具体地, 输送到动物细胞。术语“转染”一般用来表示原核生物感染病毒或噬菌体中病毒核酸的摄取, 导致成熟病毒颗粒的感染和产生。但该术语现在的含义包括将外源性核酸人工导入细胞内。

转化

转化通常用来描述细菌、非动物真核细胞和植物细胞中非病毒DNA转移。但是, 转化还可以指引起动物细胞表型发生永久性改变的特定事件或一系列事件, 造成遗传不稳定性以及发展为癌症状态。从这个意义上讲, 转化可能源于转化病毒的感染或基因转染, 也可能在外来刺激物 (如离子辐射或化学致突变源) 刺激下产生。因此, 在描述外源性遗传物质导入时, 应避免将该术语用于动物细胞。

转染简介(续)

转导

转导用于描述病毒介导的DNA转移。但是,术语“转染”也可以表示细胞的病毒核酸(从真核细胞病毒或噬菌体中分离)感染。

应用

转染的两个主要目的是生成重组蛋白,或特异性地增强或抑制转染细胞中的基因表达。因此,转染是一种功能强大的分析工具,可用于基因或基因产物的功能和调控研究,用于生成转基因生物,并可用作基因治疗方法。

基因表达

转染最常通过使用质粒载体或mRNA在培养细胞(或动物模型)中表达目的蛋白。利用真核细胞中的蛋白表达可以生成经过适当折叠和翻译后修饰的重组蛋白。另外,将带有可检测的标记物及其他修饰的蛋白质导入细胞,可用于启动子和增强子序列或蛋白-蛋白相互作用的研究。

此外,根据转染策略的不同,转染还可用于多种形式的生物生产。例如,导入重编程转录因子可以生成诱导多能干细胞(iPSC)。另一方面,稳定转染提供了不同治疗分子的生物生产方法。

基因抑制

转染的另一个常用用途是通过RNA干扰(RNAi)抑制特定蛋白质的表达。在哺乳动物细胞中,利用内源性表达的非编码RNA的机制,以来源于双链RNA(dsRNA)前体的microRNA(miRNA)的形式,合成RNAi。前体被加工成成熟miRNA,成为RNA诱导的沉默复合物(RISC)的一部分,抑制互补靶mRNA的翻译。

载体系统表达miRNA前体或短发夹RNA(shRNA)前体,它们通过内源性机制分别生成miRNA或shRNA,然后抑制基因表达。利用这些系统可以实现重组体的稳定转染,并允许前体分子的诱导型表达。

化学合成的短/小分子干扰RNA(siRNA)还可以整合形成RISC,通过靶向互补(降解)mRNA诱导基因沉默。siRNA修饰有助于防止脱靶效应,还可以确保dsRNA的活性链整合至RISC中。

转染类型

将核酸导入细胞的生物、化学和物理方法有很多种。并非所有方法都均适用于所有的细胞类型和实验应用, 不同方法的转染效率、细胞毒性、对正常生理学的影响和基因表达水平各异。但是, 所有转染策略均可分为两大类, 其中一些导入核酸在细胞中存在一段时间(瞬时转染), 而另一些则长时间存在于细胞中, 并被传递至转染细胞的子代(稳定转染)。

瞬时转染

在瞬时转染中, 导入核酸只在细胞中存在一段时间, 且未整合至基因组。因此, 在细胞分裂过程中, 瞬时转染的遗传物质不会传递至下一代, 而是会在环境因素影响下丢失或在细胞分裂过程中被冲淡。但是, 在其存在于细胞期间, 高拷贝数的转染遗传物质会引起蛋白质的高水平表达。

根据使用的重组体的不同, 瞬时表达的转基因可以在1至7天内检出, 但瞬时转染的细胞一般在转染后24至96小时即可收获。基因产物分析需要提取RNA或蛋白质进行酶活性分析或免疫分析。最佳时间间隔取决于细胞类型、研究目标、导入基因特定的表达特性, 以及报告基因达到稳态所需的时间。但在数天内, 大部分外源性DNA会在核酸酶作用下降解或被细胞分裂冲淡; 一周后便无法再测出。

使用超螺旋质粒DNA进行瞬时转染的效率最高, 因为它能被细胞更高效地摄取。siRNA、miRNA、mRNA甚至蛋白质也可用于瞬时转染, 但与使用质粒DNA一样, 这些大分子需要达到高质量和相对高纯度(参见“影响转染效率的因素”, 第79页)。在转染DNA进入细胞核转录的同时, 转染RNA仍保留在胞浆内, 它可在转染(mRNA)后几分钟内表达或与mRNA结合, 使靶基因的表达沉默(siRNA和miRNA)(参见“RNA转染指导原则”, 第101页)。

转染类型(续)

稳定转染 在稳定转染中, 外源性DNA被整合至细胞基因组中, 或者作为附着体质粒存在。与瞬时转染不同, 稳定转染可使外源性DNA长期存在于转染细胞及其子代细胞中。因此, 稳定转染可以使导入基因在多代细胞中永久性地表达, 适用于重组蛋白生产和外源性DNA表达的下游或长期效应分析。但是, 通常只有单个或几个拷贝的外源性DNA被整合至稳定转染细胞的基因组中。正因如此, 稳定转染基因的表达水平一般低于瞬时转染基因的表达水平。

由于外源性DNA被稳定整合至基因组中的概率相对较低, 成功完成稳定转染既需要高效DNA导入和筛选含有DNA的细胞的方法。筛选稳定表达转染DNA的细胞的最可靠方法之一是在用于转染的DNA重组体中纳入选择标记物, 然后在短暂的恢复期后, 对细胞施加适当的选择压力(参见“稳定转染子的选择”, 第94页)。

常用的选择标记物是传递对各种筛选药物抗性的基因, 或是可以补偿转染细胞系中缺陷必需基因的基因。使用选择性培养基进行培养时, 未转染的细胞或瞬时转染的细胞最终都会死亡, 而表达足够水平的抗生素抗性基因或能够补偿必需基因缺陷的细胞则可以存活。

在某些情况下, 还可以将转染细胞中的表型或形态变化用作可筛选的特性。例如, 采用源于牛乳头状瘤病毒的载体转染小鼠C127细胞, 会产生形态学变化(Sarver等人, 1981)。

尽管相比双链DNA, 细胞对单链DNA的摄取量较低, 但它将DNA整合至宿主基因组中的能力却是最佳的(见“影响转染效率的因素”, 第79页)。通常, 稳定转染仅限于DNA载体, 但使用选择性DNA载体制备短发夹转录物, 可亦可将siRNA和miRNA稳定导入细胞内(参见“载体介导的RNAi”, 第100页)。但是, RNA分子本身无法用于稳定转染。

选择转染策略

您的实验时间和最终目标决定您应该选择瞬时转染还是稳转染。瞬时转染细胞一般在转染后24-96小时收集, 常用于研究基因或基因产物的短期表达效应, 执行RNA干扰(RNAi)介导的基因沉默, 或快速生成少量重组蛋白。mRNA瞬时转染可以更快地提供结果; 因为mRNA在胞浆中表达, 无需转移到细胞核, 无需转录, 转染数分钟后即可在部分系统中表达转染mRNA。

相比之下, 当需要长期基因表达或转染细胞需要在多项实验中使用, 则更多地选择稳定转染。由于将DNA载体整合至染色体中的概率较低, 细胞的稳定转染更麻烦、更具挑战性, 需要选择性筛选和克隆分离。因此, 稳定转染通常用于大规模的蛋白质生产、长期药理学研究、基因治疗或长期基因调控机制研究。

随着转染试剂的问世, 尽管哺乳动物细胞的瞬时转染已可用于经过适当折叠和翻译后修饰(当表达细菌细胞重组蛋白时则不适用)的重组蛋白的生产, 表达毫克至克级重组蛋白则主要依赖于建立稳定的细胞系。最近, 采用悬浮培养的HEK293和CHO细胞进行大规模的瞬时转染, 可以获得大量重组蛋白, 且无需经过麻烦的稳定细胞系建立过程。研究人员使用目的载体和悬浮培养的CHO或HEK293细胞, 利用瞬时转染进行重组蛋白表达, 可在3至7天内生成毫克/升级正确折叠和糖基化的重组蛋白。

Gibco™ Expi293™和Gibco™ ExpiCHO™表达系统是瞬时表达技术的一次巨大进步, 可在哺乳动物细胞中实现快速且高产量的蛋白生产。此经优化和充分集成的完整系统包含Gibco™高密度细胞、Gibco™表达培养基、基于阳离子脂质体的Gibco™转染试剂, 结合使用优化转染增强剂。其所有组分协同作用, 生成的蛋白产量较传统培养系统更高, Expi293表达系统的表达水平达到1g/L, ExpiCHO表达系统的表达水平达到3g/L。有关详细信息, 请访问thermofisher.com/exp293或thermofisher.com/expicho。

转染类型 (续)

临床生物治疗药物通常使用稳定的高表达转染子生产, 因为其可以在极大规模的生产中实现批次间一致性和低成本。然而, 在许多药物研发过程中, 利用瞬时转染方法快速筛选蛋白重组体具有一定优势, 可在不到一周内同时评估不同的候选分子。许多情况下, 在进行瞬时转染的同时, 会构建更加资源密集型的稳定细胞系, 后者可能需要三个月以上才能完成。

瞬时转染	稳定转染
转染DNA未整合至基因组, 但仍残留在细胞核内	转染的DNA整合至基因组
转染的遗传物质不会传递至子代; 遗传改变并非永久性的	转染的遗传物质可以稳定地传递至下一代; 遗传改变是永久性的
无需选择	需要选择性筛选, 以分离稳定的转染子
DNA载体和RNA均可用于瞬时转染	仅DNA载体可用于稳定转染; RNA本身无法稳定地被导入细胞内
高拷贝的转染遗传物质可以实现高水平的蛋白质表达	单个或低拷贝数的稳定整合DNA可以实现较低水平的蛋白质表达
一般在转染后24-96小时内收集细胞	需要2-3周筛选稳定转染的集落
一般不适用于采用诱导型启动子的载体研究	适用于采用诱导型启动子的载体研究

细胞膜由磷脂双分子层和镶嵌蛋白组成, 并带有净负电荷。因此, 大分子, 例如同样带有负电荷的DNA和RNA的磷酸骨架, 是无法穿过细胞膜的。为了让核酸穿过细胞膜, 研究人员开发出了各种技术, 每种技术都使用了不同的方法——从使用化学物质和包被核酸的载体分子进行中和到使用物理方法在细胞膜上开孔, 将DNA直接运输到细胞内。

目前可用的转染技术大致可分为三类: 1) 使用载体分子中和带负电荷的核酸或向其传递正电荷的化学方法, 2) 采用已经过遗传学改造的病毒将非病毒基因转移至细胞内的生物学方法 (又称为转导), 以及3) 直接将核酸输送入细胞质或细胞核内的物理方法。然而, 没有一种方法可适用于所有细胞和所有实验。应根据您的细胞类型和实验要求选择理想方法, 所选方法应具有高转染效率、低细胞毒性、对正常生理的影响最小, 并且使用简单且可重复 (Kim和Eberwine, 2010)。

基因输送技术

技术	优点	缺点
化学基因输送方法		
阳离子脂质体介导的输送	- 快速简单的实验方案 - 商品化且可重复的结果 - 高效率 and 表达性能 - 适用于各种细胞系和高通量筛选 - 可用于输送DNA、RNA和蛋白质 - 对包装核酸无大小限制 - 适用于瞬时和稳定的蛋白质生产 - 可用于核酸的体内输送	- 需要进行优化——一些细胞系对阳离子脂质体敏感 - 一些细胞系不可用于阳离子脂质体的转染 - 血清会干扰复合物的形成，降低转染效率 - 培养基中无血清可能会增加细胞毒性
磷酸钙共沉淀	- 价格低廉且易于获得 - 适用于瞬时和稳定的蛋白质生产 - 高效率（取决于细胞系）	- 需要小心制备试剂——磷酸钙溶液对pH、温度和缓冲液盐浓度的变化敏感 - 可重复性不佳 - 细胞毒性，尤其是原代细胞 - 由于培养基的高磷酸浓度，不可与RPMI结合使用 - 不适用于动物体内基因转移
DEAE-右旋糖酐	- 相对简单的技术 - 可重复的结果 - 价格低廉	- 对一些细胞类型具有化学细胞毒性 - 仅限于瞬时转染 - 转染效率低，尤其是原代细胞
由其他阳离子聚合物（例如，聚凝胺、PEI、树状高分子）输送	- 通常在血清中稳定，且对温度不敏感 - 高效率（取决于细胞系） - 可重复的结果	- 对一些细胞类型具有细胞毒性 - 不可生物降解（树状高分子） - 仅限于瞬时转染
生物学基因输送方法		
病毒输送	- 最高效的基因输送方法（在原代细胞中的转导效率为80-90%） - 适用于难以转染的细胞类型 - 可用于核酸的体内输送 - 可用于构建稳定细胞系（逆转录病毒载体）或瞬时表达（腺病毒载体）	- 转染细胞系必须包含病毒受体 - 插入片段大小有限（大部分病毒载体约10 kb，非病毒载体约100 kb） - 生成重组病毒具有技术挑战性且耗时 - 生物安全问题（潜伏性疾病激活、免疫原性反应、细胞毒性、插入突变、细胞的恶性转化）
物理基因输送方法		
电穿孔	- 原理简单 - 优化后可获得可重复的结果 - 无需载体 - 对细胞类型和条件的依赖性较低 - 优化后可以快速转染大量细胞	- 需要特殊仪器 - 需要优化电脉冲和磁场强度参数 - 需要大量细胞操作 - 可观察到高毒性水平 - 死亡率高，需要更多细胞 - 不可逆地损伤细胞膜并裂解细胞
基因枪（微粒轰击）	- 对细胞类型和条件的依赖性较低 - 可用于核酸的体内输送 - 方法简单，结果可靠 - 对可输送基因的大小和数量无限制 - 主要用于基因疫苗接种和农业应用领域	- 需要昂贵的仪器 - 对样本造成物理损伤 - 死亡率高，需要更多细胞 - 需要制备微粒 - 研究应用成本相对较高 - 效率一般低于电穿孔或病毒或脂质介导的导入
直接显微注射	- 对细胞类型和条件的依赖性较低 - 可实现单细胞转染 - 方法简单，结果可靠 - 对可输送基因的大小或数量无限制 - 无需载体	- 需要昂贵的仪器 - 技术要求高且费力（一次一个细胞） - 经常导致细胞死亡
激光介导的转染（光转染）	- 可用于输送DNA、RNA、蛋白质、离子、葡聚糖、小分子和半导体纳米晶体 - 可应用于非常小的细胞 - 可实现单细胞转染或同时完成大量细胞的转染 - 无需载体 - 高效率 - 适用于各种细胞系	- 需要昂贵的激光显微镜系统 - 需要贴附细胞 - 技术要求高

基因输送技术(续)

阳离子脂质体介导的输送

阳离子脂质体介导的转染是将外源性遗传物质导入细胞的最常用方法之一。尽管第一代脂质转染试剂采用人工脂质体包裹核酸, 然后与细胞膜融合, 吸收其内容物 (Fraley等人, 1980), 新型的阳离子脂质体试剂可通过带负电荷的核酸与带正电荷的合成脂质体试剂头基间的静电作用, 自发形成浓缩的核酸, 即阳离子脂质体试剂复合物。细胞通过内吞作用摄取复合物, 然后释放至胞浆。一旦进入细胞, 转染DNA转移至细胞核内, 通过未知的机制表达, 而RNA或反义寡核苷酸则省去了易位步骤, 仍保留在胞浆内 (见“阳离子脂质体介导的转染”, 第63页)。

阳离子脂质体介导的转染的优势是能够高效地转染各种细胞系, 适用于高通量筛选, 并且能够导入各种大小的DNA、RNA和蛋白质。此外, 该方法既可用于稳定表达, 也可用于瞬时表达, 与其他化学方法不同的是, 它可以实现动物和人体内DNA和RNA转移。阳离子脂质体介导的转染的主要缺点是, 转染效率取决于细胞类型和培养条件, 需要根据每种细胞类型和转染试剂优化转染条件 (见“阳离子脂质体介导的转染考虑因素”, 第90页)。

我们提供多种阳离子脂质体介导的转染试剂, 可将DNA、RNA、siRNA或寡核苷酸高效导入各种类型的细胞内, 包括Invitrogen™ Lipofectamine™ 3000转染试剂。Lipofectamine 3000试剂利用最先进的脂质纳米微粒技术, 可以实现卓越的转染效率和可重复的结果, 适用于各种难以转染的细胞类型, 提高了细胞活性 (thermofisher.com/3000)。有关如何为您的应用选择合适转染试剂的更多信息, 请参见第64页的“阳离子脂质体转染试剂”。

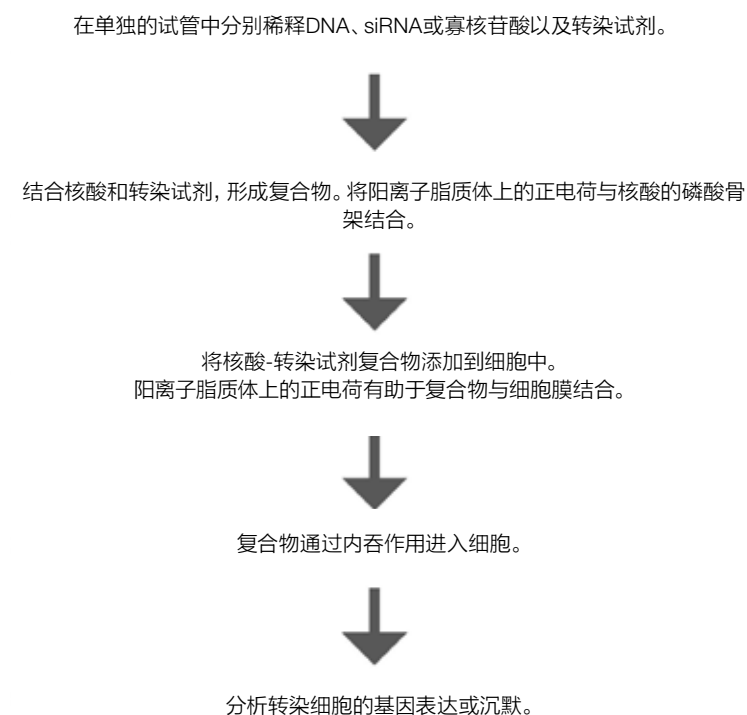


图5.1.阳离子脂质体介导的转染工作流程。

基因输送技术(续)

磷酸钙共沉淀 磷酸钙共沉淀的组分可轻松获取且价格低廉, 因此自20世纪70年代初问世至今 (Graham和van der Eb, 1973), 一直是一种常用的转染方法。此外, 该技术易于掌握, 对许多类型的培养细胞均有效, 并且可用于各种类型培养细胞的瞬时和稳定转染。但是, 磷酸钙共沉淀对pH、温度和缓冲液盐浓度的轻微变化十分敏感, 因此该方法容易出现差异, 且对许多类型的细胞培养物 (尤其是原代细胞) 具有细胞毒性。此外, 它不适用于动物体内的核酸转移, 与其他化学转染方法相比 (例如脂质体介导的转染), 转染效率相对较低。

磷酸钙共沉淀的原理是将DNA与氯化钙在磷酸盐缓冲液中混合, 生成磷酸钙-DNA共沉淀, 然后分散到培养细胞中。磷酸钙可促进共沉淀物中浓缩DNA与细胞表面相结合, DNA通过内吞作用进入细胞。在添加DNA-氯化钙溶液时使磷酸盐缓冲液换气有助于确保形成的沉淀最佳, 这点至关重要, 因为DNA团块无法高效地贴附或进入细胞。

将DNA与氯化钙混合, 并采取一定的控制措施, 将其加入磷酸盐缓冲液中。

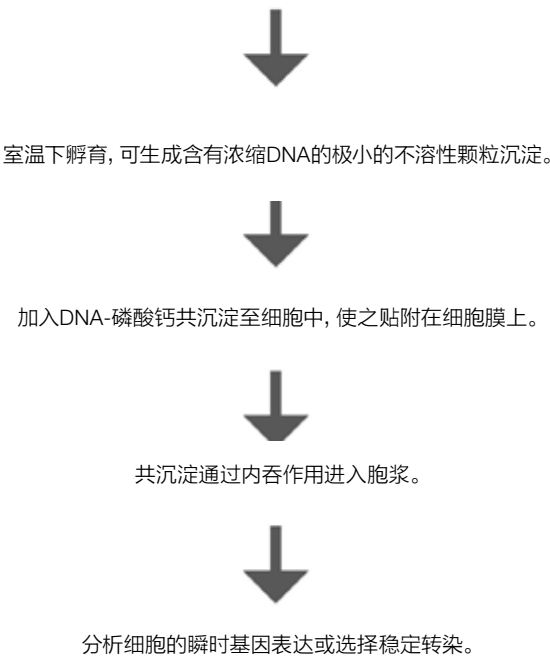


图5.2.磷酸钙共沉淀工作流程。

DEAE-右旋糖酐介导的输送

二乙氨基乙基 (DEAE) -右旋糖酐是糖聚合物右旋糖酐的一种聚阳离子衍生物,它是第一批用于将核酸转移至哺乳动物培养细胞内的化学试剂之一 (Vaheri和Pagano, 1965)。阳离子型DEAE-右旋糖酐分子与带负电荷的核酸骨架紧密连接,形成的核酸-DEAE-右旋糖酐复合物带有净正电荷,它可贴附在细胞膜上,通过内吞作用或在DMSO或甘油诱导的渗透压休克作用下进入胞浆。

DEAE-右旋糖酐法的优点在于其相对简单、可重复且成本低,缺点包括对多种细胞类型具有细胞毒性和低转染效率(原代细胞一般低于10%),且在转染过程中需要使用减血清培养基。此外,该方法仅限于瞬时转染,不适用于建立稳定的细胞系。

将核酸与DEAE-右旋糖酐溶液在转染培养基或磷酸盐缓冲液中混合。



通过聚合物与核酸磷酸盐骨架之间的静电作用形成核酸-DEAE-右旋糖酐复合物。



将核酸-DEAE-右旋糖酐复合物添加到细胞内,通过静电作用贴附在细胞表面。



使用DMSO或甘油形成渗透压休克,诱导核酸-DEAE-右旋糖酐复合物的摄取。



冲洗细胞,去除复合物并孵育,实现基因表达。



分析细胞的瞬时基因表达。

图5.3 DEAE-右旋糖酐介导的转染工作流程。

基因输送技术(续)

其他阳离子聚合物输送 用于基因输送的其他阳离子聚合物包括阳离子多肽及其衍生物(例如, 聚赖氨酸、聚鸟氨酸)、线性或支化合成聚合物(例如, 聚凝胺、聚乙烯亚胺)、基于多糖的输送分子(例如, 环糊精、壳聚糖)、天然聚合物(例如, 组蛋白、胶原蛋白)以及活化和非活化的树状高分子。

阳离子聚合物不同于阳离子脂质体, 它们不含疏水基团, 可完全溶于水。尽管阳离子聚合物的转染效率和细胞毒性差异巨大, 但所有阳离子聚合物的作用方式均相同, 即通过形成核酸-聚合物的复合物, 在静电作用下贴附在细胞膜上, 然后通过内吞作用被细胞摄取。在聚合物上结合细胞靶向的配体或细胞核定位信号, 可以提升摄取效率。

与DEAE-右旋糖酐相比, 阳离子聚合物可提供更高的稳定性、重复性更佳的结果以及更高的转染效率; 其主要限制仍在于细胞毒性及仅可用于瞬时转染研究。更高分子量(MV)的阳离子聚合物通常不容易生物降解, 且细胞毒性高于低分子量聚合物, 但由于它们的聚合物-核酸电荷比更高, 因此转染效率更高。但是, 通过将生物可降解的小分子聚合物交联形成较大的聚合物结构, 可以降低大分子量聚合物的高毒性。

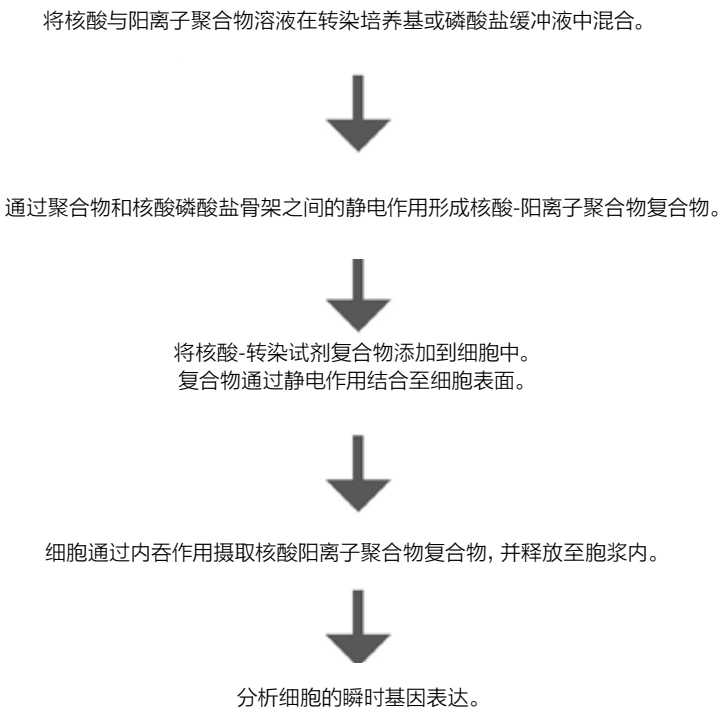


图5.4 阳离子聚合物介导的转染工作流程。

病毒输送

对于难以采用脂质体介导进行转染的细胞类型, 则通常使用病毒载体。病毒介导的转染又称为转导, 它为难以转染的细胞类型提供了一种方法, 可用于蛋白质过表达或抑制, 是临床研究中最常用的方法 (Glover等人, 2005; Pfeifer和Verma, 2001)。腺病毒、肿瘤逆转录病毒和慢病毒载体已广泛应用于哺乳动物细胞培养和体内的基因输送。其他众所周知的病毒基因转移范例包括杆状病毒和牛痘病毒载体。有关各种病毒输送系统的更多信息, 请参见“病毒介导的基因转移”, 第66页。

病毒可以整合至宿主基因组中, 从而能够实现持续的基因表达, 且其在体内转染的效率较高, 因此病毒是临床实验中用于基因导入的首选系统。但它们也有诸多缺点, 包括免疫原性和细胞毒性、载体生产存在技术挑战且耗时费力、因生物安全要求带来的高成本、低包装容量 (大部分病毒载体约为10 kb, 而非病毒载体约为100 kb) 以及病毒载体制备的感染力差异 (Glover等人, 2005; Kim和Eberwine, 2010; Vorburger和Hunt, 2002)。

基因输送技术(续)

病毒输送(续) 转导实验方案一般包括携带转基因的重组病毒的改造、重组病毒颗粒在包装细胞系中的扩增、扩增病毒颗粒的纯化和滴定, 以及目的细胞的继发感染。尽管原代细胞和细胞系的转导效率很高(约90-100%), 但只有携带病毒特异性受体的细胞可以被病毒感染。还必须注意, 病毒扩增使用的包装细胞系需要采用非病毒转染方法转染。

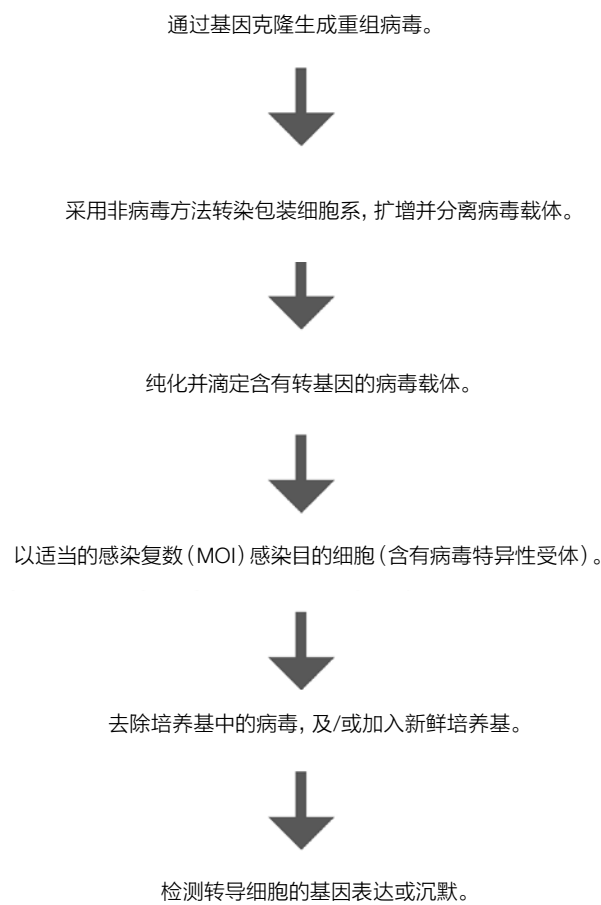


图5.5.病毒输送的工作流程。

电穿孔

电穿孔是一种物理转染方法，其利用电脉冲在细胞膜上形成临时孔，使核酸等物质可以通过这些孔进入细胞。这是一种将外源性核酸高效导入许多细胞类型（包括细菌和哺乳动物细胞）的方法。

电穿孔的过程很简单。将宿主细胞和选定的分子悬浮在导电溶液中，在混合物周围形成闭合电路。释放电脉冲（优化电压，仅持续几微秒至1毫秒）至细胞悬液。这会破坏细胞膜的磷脂双分子层，并在细胞膜上形成临时孔。同时，细胞膜上的电压升高，使带电荷的分子（如DNA）以类似于电泳的方式经临时孔穿过细胞膜（Shigekawa和Dower, 1988）。

电穿孔的主要优点在于，其适用于所有细胞类型的瞬时和稳定转染。此外，由于电穿孔简单且快速，一旦确定好最佳电穿孔条件，即可在短时间内转染大量细胞。电穿孔的主要缺点在于，高电压脉冲引起的大量细胞死亡，仅部分细胞膜可以成功修复，因此相比化学转染方法，需要使用更多细胞。采用更现代化的仪器（例如Invitrogen™ Neon™转染系统），使电脉冲平均分布于细胞内，在电穿孔室中维持稳定的pH值，可以克服细胞高死亡率的问题，但仍需要对脉冲和场强参数进行优化，以平衡电穿孔效率和细胞存活率（请参见“Neon转染系统”，第69页）。

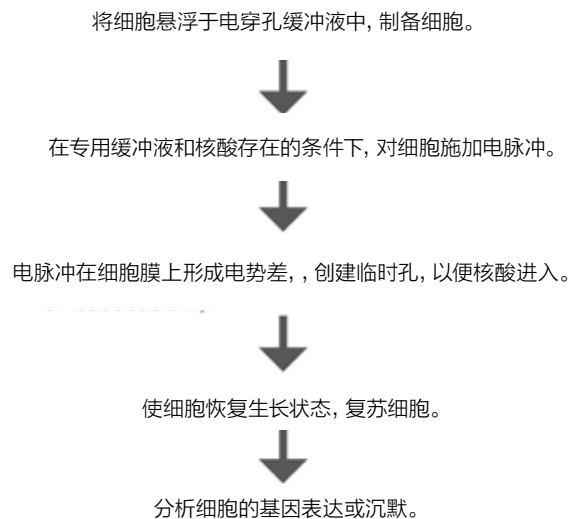


图5.6.电穿孔工作流程。

基因输送技术(续)

其他物理输送方法

除电穿孔外的其他物理基因输送方法包括基因枪、直接显微注射和激光介导的转染。尽管这些物理方法采用的工具各不相同,但均可通过细胞膜穿透将核酸直接转移至胞浆或核内,无需使用化学物质或病毒。

简言之,基因枪又称为微粒轰击,其采用发射设备(即“基因枪”)将包裹有核酸的显微重金属颗粒(通常为金或钨)高速射入受体细胞内。基因枪可用于体外和体内分裂及非分裂细胞的瞬时转染,常用于基因疫苗和农业应用(Klein等人,1992;Ye等人,1990;Burkholder等人,1993)。尽管该技术可靠且快速,但需要昂贵的设备,会对样本造成物理损伤,且死亡率较高,需要使用大量细胞。

直接显微注射利用精细的注射针将核酸送入胞浆或核内,一次只能输送一个细胞;因此,该方法仅限于间接体内应用,如将基因转移至卵母细胞内,构建转基因动物,或输送人工染色体(Capecchi,1980;Capecchi,1989;Telenius等人,1999)。尽管直接显微注射的效率接近100%,但其对技术要求很高,且极其费力,常会引起细胞死亡。因此,该方法不适用于需要对大量细胞进行转染的研究。

激光介导的转染又称为光转染、激光转染或光穿孔,其采用激光脉冲瞬间透化细胞膜(Shirahata等人,2001;Schneckenburger等人,2002)。当激光在细胞膜上形成小孔时,培养基和胞液之间的渗透压差异可促进培养基中核酸或其他物质(离子、小分子、蛋白质、半导体纳米晶体等)进入细胞。激光介导的转染的优点包括高转染效率,以及能够在细胞的任何位置开孔。但是,该方法需要昂贵的激光显微镜系统,并且需要细胞贴附于基质上。

除上述方法外,其他物理输送技术则利用流体压力、超声或磁场驱动裸露核酸或核酸-颗粒复合物进入受体细胞。

阳离子脂质体介导的转染

机理 特殊设计的阳离子脂质体（如Lipofectamine转染试剂）可促进DNA和siRNA进入细胞（Chesnoy和Huang, 2000; Hirko等人, 2003; Liu等人, 2003）。阳离子脂质体的基本结构包括带正电荷的头基和一个或两个碳氢链。带电荷的头基可以调控脂质与核酸的磷酸骨架之间的相互作用，促进DNA凝集。通常，阳离子脂质体由中性的共脂质体或辅助脂质体形成，然后挤压或微流化，形成单层脂质体结构，在水中带有正的表面电荷。

脂质体的正表面电荷介导核酸与细胞膜之间的相互作用，使脂质体/核酸转染复合物与带负电荷的细胞膜融合。一般认为，转染复合物通过内吞作用进入细胞。内吞作用是指特定区域的细胞膜通过形成膜结合/细胞内囊泡摄取DNA-脂质体复合物的过程。复合物一旦进入细胞，必须逃离胞内体通路，通过扩散至胞浆，进入细胞核进行基因表达。在转染的早期，阳离子脂质体通过介导DNA凝集和DNA-细胞相互作用促进了转染。

采用阳离子脂质体试剂进行输送的原理不同于之前使用中性脂质体进行转染的原理。采用阳离子脂质体试剂时，DNA溶液并非特意包裹在脂质体内；而是带负电荷的DNA与带正电荷的脂质体自发结合，形成DNA-阳离子脂质体试剂复合物。

传统的转染方法（如磷酸钙共沉淀、DEAE-右旋糖酐、聚凝胺和电穿孔）存在DNA输送效率低、重复性差、具有细胞毒性、操作不便等问题。相反，阳离子脂质体试剂介导的转染具有前所未有的高转染效率，适用于各种真核细胞。此转染方法操作简单，可确保一致的可重复性结果。此外，采用阳离子脂质体试剂能成功转染其他方法无法转染的多种细胞系。

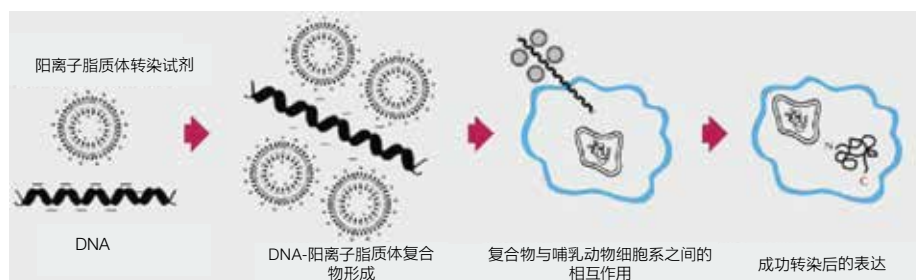


图5.7.阳离子脂质体介导的输送机制。

阳离子脂质体介导的转染（续）

阳离子脂质体转染试剂 阳离子脂质体介导的输送是一种快速、简单且可重复的方法，可以方便地将DNA、RNA、siRNA或寡核苷酸导入真核细胞。此方法可以高效转染多种细胞类型，包括贴壁细胞、悬浮细胞和昆虫细胞，以及原代培养细胞。在选择转染试剂时，您必须考虑您想要导入的载体（DNA、RNA或蛋白质），以及您想要转染的细胞类型，因为您选择的转染试剂对转染结果产生极大的影响。

下表列出了Thermo Fisher Scientific提供的各种阳离子脂质体转染试剂的主要特点和应用。有关各转染试剂的更多信息以及针对各细胞系的优化转染实验方案，请访问 thermofisher.com/transfection。

转染试剂	载体	主要特点和应用
应用范围极广的试剂		
Lipofectamine 3000	   	• 可使质粒和RNAi共转染达到最高效率和表达结果 • 即便在低剂量下亦可获得高转染效率 • 适用于各种细胞类型，包括贴壁细胞和悬浮细胞 • 转染之前或之后均无需进行冲洗步骤 • 可将复合物添加到培养于含血清培养基的细胞中 • 推荐用于癌细胞、难转染细胞和基因编辑应用
Lipofectamine 2000	   	• 可使质粒或RNAi转染达到较高的效率和表达结果 • 适用于各种细胞类型，包括贴壁细胞和悬浮细胞 • 适用于耐受性好的细胞 • 转染之前或之后均无需进行冲洗步骤 • 可将复合物添加到培养于含血清培养基的细胞中 • 转染时最好达到>90%的汇合度 • 高通量
Lipofectamine 2000 CD	   	• 性能与Lipofectamine 2000试剂相同，经过认证，不含动物源性成分（“CD”=化学成分确定）

图例					
符号	解释	符号	解释	符号	解释
	质粒DNA，用于蛋白质、shRNA和miRNA表达		非编码RNA，用于RNAi基因表达抑制		共转染，用于RNAi载体和siRNA共转染
	质粒DNA，用于蛋白质表达		mRNA，用于蛋白质表达		寡核苷酸，用于基因表达的反义抑制
					CRISPR-Cas9，用于蛋白质输送

转染试剂	载体	主要特点和应用
RNA试剂		
Lipofectamine RNAiMAX		• 推荐用于Stealth RNAi和Silencer Select siRNA、Dicer酶切siRNA库、mirVana miRNA模拟物和抑制剂、mRNA和snRNA的瞬时转染 • 所需RNAi浓度低, 基因抑制效果更好, 非特异性效应极少 • 加入10倍浓度范围的转染试剂, 细胞毒性无明显变化 • 适用于多种细胞类型 • 高通量 • 只需较少的RNAi即可获得最高的抑制效果 • 体外转染
Lipofectamine MessengerMAX		• 在神经元 (> 2倍) 和各种原代细胞类型中的转染效率最高 • 使用Cas9 mRNA提升了基因编辑结果 • 更快速的蛋白表达, 无基因组整合风险
InvivoFectamine 3.0		• 通过系统输送, 在体内高效转染siRNA • 高效的mRNA、蛋白质和功能抑制 • 低毒性, 易于使用
Oligofectamine		• 反义寡核苷酸转染 • 高通量 • 高特异性, 无毒性 • 适合低汇合度细胞 (转染时达30-50%汇合)
蛋白生产试剂		
Lipofectamine CRISPRMAX		• 首个优化的脂质纳米颗粒转染试剂, 用于转染CRISPR-Cas9蛋白 • 经验证的裂解效率, 在20多种细胞类型中进行检验, 包括iPSC、mESC、N2A、CHO、A549、HCT116、HeLa、HEK293和多种其他类型 • 细胞毒性低——启动实验所需的细胞较少 • 高通量友好型——96孔的理想转染解决方案 • 易于扩大规模——高通量实验的理想转染解决方案
ExpiFectamine 293		• 转染高密度293悬浮细胞培养物用于生物生产 • 转染增强剂可提高性能和蛋白质表达水平, 产量较适用于高密度293细胞培养物的其他转染试剂高2至10倍 • 稳定且可重复的转染结果 • 将转染规模从不足1 mL扩大至超过10 L, 同时可获得相同的单位体积蛋白产量
FreeStyle MAX		• 适用于快速、大规模的哺乳动物瞬时蛋白表达, 可用于生物生产 • 高蛋白产量, 可达毫克级 • 适合悬浮CHO细胞的瞬时转染, 也可用于HEK293细胞
293fectin		• 与FreeStyle 293表达系统配合使用, 用于瞬时蛋白生物生产 • 适合悬浮培养的FreeStyle 293-F细胞
Optifect		• 适合低汇合度细胞 (转染时< 70%汇合) • 适用于对转染试剂敏感的细胞系
Cellfectin		• 适合昆虫细胞的转染, 包括S2、Sf9、Sf21和High Five细胞
DMRIE-C试剂		• 适合悬浮细胞的转染, 包括CHO、淋巴和Jurkat细胞系

病毒介导的基因转移

对于难以采用脂质体介导进行转染的细胞类型，则通常使用病毒载体。病毒介导的转染又称为转导，它为难以转染的细胞类型提供了一种方法，可用于蛋白质过表达或抑制，是临床研究中最常用的方法（Glover等人，2005；Pfeifer和Verma，2001）。病毒转导的主要优点之一在于，该过程可以在活体内（体内）或培养细胞（体外）中进行，基因输送效率达95-100%。

病毒载体的主要特点

病毒载体可根据其特定的应用量身定制，但必须遵守下列主要特性。

- **安全性：**病毒载体有时来源于病原性病毒，应对其进行适当的修饰，使病毒操作的风险最小化。通常需要敲除对病毒复制至关重要的部分病毒基因组，使病毒高效感染细胞并导入病毒载体，但应防止在无辅助病毒存在的情况下生成新的病毒粒子，提供缺失的关键蛋白质。但目前病毒载体使用的安全问题是插入突变，病毒DNA染色体异位整合会破坏肿瘤抑制基因的表达或激活原癌基因，从而引起细胞的恶性转化（Glover等人，2005）。
- **低毒性：**病毒载体应尽量不对其感染的细胞的生理学造成影响。这对于需要体内基因导入的研究尤为重要，因为如果载体被视为外来入侵者，则生物体将发挥免疫应答作用（Nayak和Herzog，2009）。
- **稳定性：**一些病毒具有遗传不稳定性，会迅速重新排列基因组。这会对使用病毒载体的操作的可预测性和可重复性产生不利影响。因此，通常避免使用不稳定的载体。
- **细胞类型特异性：**大部分病毒载体被设计成能感染尽可能多的细胞类型。但有时相反的情况更为可取。可以修饰病毒受体，使病毒靶向特定种类的细胞。该病毒修饰方法称为假型化。
- **选择性：**病毒载体应包含可选择的标记物，如特定的抗生素抗性，从而可以分离出摄取了病毒载体的细胞。

常见病毒载体

腺病毒是一种具有广泛细胞嗜性的DNA病毒,可以瞬时转导几乎所有哺乳动物细胞类型。腺病毒通过结合柯萨奇病毒/腺病毒受体(CAR)进入靶细胞(Bergelson等人, 1997)。腺病毒与CAR结合后,通过整合素介导的内吞作用被内化,然后主动运输至细胞核内,其DNA可在细胞核内游离表达(Hirata和Russell, 2000)。尽管腺病毒载体适用于多种细胞类型的瞬时转染,但对于一些难以转染的细胞系(如非分裂细胞)及稳定表达应用,则首选慢病毒载体。腺病毒的包装容量为7-8 kb。

逆转录病毒是一种正链RNA病毒,能稳定地将其基因组整合至宿主细胞染色体内。当病毒包被上具有广泛嗜性的包膜(如水疱性口炎病毒糖蛋白(VSV-G)),形成假型病毒,则这些病毒几乎可以进入所有类型的哺乳动物细胞。但是,大部分逆转录病毒依靠细胞分裂过程中核膜的破裂感染细胞,因此需要细胞复制方可完成转导。逆转录病毒的其他缺点包括可能引起插入突变并激活潜伏性疾病。与腺病毒类似,逆转录病毒可以携带约8 kb的外源性基因。

慢病毒是逆转录病毒家族的一个亚群;因此,它们可以整合至宿主细胞基因组中,实现稳定、长期的表达(Anson, 2004)。与其他逆转录病毒不同,慢病毒采用活化的细胞核输送途径转导非分裂、终末分化的细胞群体(如神经元和造血细胞),是一种用途更广泛的工具。

腺相关病毒能够转导广泛的分裂和非分裂细胞类型,但同时需要感染一种辅助病毒(如腺病毒或疱疹病毒),才能在包装细胞中产生重组病毒粒子。这会导致难以获得不含辅助病毒的高质量病毒储液。此外,腺相关病毒的最大包装容量仅为4.9 kb。另一方面,腺相关病毒在大多数细胞类型中表现出低免疫原性,并且它们能够整合至人类染色体的特定区域内,从而避免了插入突变。

病毒介导的基因转移 (续)

适用于蛋白质过表达的其他病毒载体系统包括基于杆状病毒、牛痘病毒和单纯疱疹病毒载体。尽管杆状病毒一般感染昆虫细胞，重组杆状病毒可以作为基因转移载体，在各种哺乳动物细胞中用于重组蛋白的瞬时表达。此外，杆状病毒载体中还包含显性选择标记物，从而可以提取出稳定表达重组基因的细胞系 (Condreay 等人, 1999)。利用牛痘病毒载体可以将较大的DNA片段导入各种哺乳动物细胞中。但是，感染牛痘病毒的细胞会在一或两天内死亡，因此该系统仅限用于瞬时蛋白生产。单纯疱疹病毒是一类可用于神经元感染的双链DNA病毒。

病毒系统	大小	DNA插入片段大小	最高效价 (颗粒/mL)	感染	表达	缺点
腺病毒	36 kb (dsDNA)	8 kb	1×10^{13}	分裂和非分裂细胞	瞬时	引起强烈的抗病毒免疫应答
逆转录病毒	7–11 kb (ssRNA)	8 kb	1×10^9	分裂细胞	稳定	插入突变潜能
慢病毒	8 kb (ssRNA)	9 kb	1×10^9	分裂和非分裂细胞	稳定	插入突变潜能
腺相关病毒	8.5 kb (ssDNA)	5 kb	1×10^{11}	分裂和非分裂细胞	稳定; 位点特异性整合	需要辅助病毒帮助复制; 难以生成纯的病毒储液
杆状病毒	80–180 kb (dsDNA)	No known upper limit	2×10^8	分裂和非分裂细胞	瞬时或稳定	哺乳动物宿主有限
牛痘病毒	190 kb (dsDNA)	25 kb	3×10^9	分裂细胞	瞬时	潜在的细胞病变效应
单纯疱疹病毒	150 kb (dsDNA)	30–40 kb	1×10^9	分裂和非分裂细胞	瞬时	在潜伏性感染过程中无基因表达

Neon转染系统

Neon转染系统是由Thermo Fisher Scientific提供的第二代台式电穿孔设备, 它以电子移液器吸头作为电穿孔室, 可对包括原代和永生化造血细胞、干细胞和原代细胞在内的各种哺乳动物细胞进行高效转染。电穿孔室的设计可以使电流均匀分布于细胞内, 在电穿孔室中维持稳定的pH值, 减少离子形成和热量产生, 相比传统的比色皿型电穿孔系统具有更高的细胞活性和转染效率。

Neon转染系统可将核酸、蛋白和siRNA导入包括原代细胞和干细胞在内的各种哺乳动物细胞, 具有很高的细胞活性。该转染方法适合各种细胞培养类型(60 mm培养皿、6孔、48孔和24孔培养板), 使用10或100 μL 体积的样品, 每次反应最少只需 1×10^4 个或最多 5×10^6 个细胞。

Neon转染系统所用转染试剂盒适合包括原代细胞和干细胞在内的各种哺乳动物细胞, 因此无需针对各细胞类型确定最佳缓冲液。此外, Neon转染设备已预先编制了一套24孔优化实验方案, 可根据核酸/siRNA和细胞类型优化反应条件, 也可根据具体细胞类型编制实验方案, 储存在Neon转染设备数据库中, 最多可储存50套方案。此外, 还可从thermofisher.com/neon上轻松下载优化的实验方案, 最大限度地提高许多常用细胞类型的转染效率。

Neon转染系统 (续)

采用Neon转染系统成功转染的细胞类型*					
血液/免疫细胞					
人BC-1细胞	人Jiyoye细胞	人Raji细胞	人SKW6.4细胞	人HL-60细胞	人巨噬细胞
人BJAB细胞	人K-562细胞	人Ramos细胞	人RPMI8226细胞	人NAMALWA细胞	人KG-1细胞
人IM-9细胞	人LCL细胞	人树突状细胞	人RS4-11细胞	人PBMC细胞	人CCRF-CEM细胞
人SCID.adh细胞	人U-937细胞	人Jurkat细胞	小鼠RAW 264.7细胞	小鼠MPC-11细胞	小鼠Ramos细胞
小鼠RBL-2H3细胞	小鼠BW5147 (T200-A) 5.2细胞	小鼠M1细胞	小鼠EL4细胞	小鼠P815细胞	
结缔组织					
人HOS细胞	人MH7A细胞	人BJ细胞	人HT-1080细胞	人U-2 OS细胞	人IMR-90细胞
人Saos-2细胞	人类新生儿皮肤成纤维细胞Gibco	人WI-38细胞	小鼠胚胎成纤维细胞 (MEF)	小鼠NIH/3T3细胞	小鼠PA317细胞
小鼠L-929细胞	小鼠3T3-L1细胞	猴COS-7细胞	猴Vero细胞	马胚胎皮肤成纤维细胞 (NBL-6)	
上皮细胞					
人T24细胞	人ChangX-31细胞	人HEK293细胞	人ARPE-19细胞	人COLO 201细胞	人HCT 116细胞
人253J细胞	人HT-29细胞	人HCT15细胞	人RKO细胞	人SW480细胞	人WiDr细胞
人293A细胞	人J82细胞	人RT4细胞	人Hep G2细胞	人Hep3B细胞	人BT-20细胞
人乳腺上皮细胞Gibco	人SK-HEP-1细胞	人SNU-387细胞	人HCC1937细胞	人Hs-578T细胞	人MCF7细胞
人MDA-MB-231细胞	人SK-BR-3细胞	人T-47D细胞	人SK-OV-3细胞	人DU 145细胞	人MCF-ADR细胞
人LNCaP细胞	人A549细胞	人PANC-1细胞	人BxPC-3细胞	人NCI-H23细胞	人PC-3细胞
人TSU-Pr1细胞	人BEAS-2B细胞	人NCI-H69细胞	人HN3细胞	人G-361细胞	人ARO细胞
人HeLa细胞 (ATCC)	人FRO细胞	人Calu-3细胞	人MEWO细胞	人NPA细胞	人A-431细胞
人C-33细胞	小鼠P19细胞	大鼠GH3细胞	大鼠NRK细胞	大鼠PC-12细胞	大鼠H-4-II-E细胞
中国仓鼠CHO-K1细胞	中国仓鼠CHO DG44细胞	仓鼠BHK-21细胞	犬MDCK细胞		
内皮细胞					
人内皮细胞Gibco	人HUVEC细胞	小鼠b-END.3细胞			
肌肉细胞					
人主动脉平滑肌细胞Gibco	小鼠C2C12细胞	大鼠L6细胞	大鼠心肌细胞		
神经/胶质细胞					
人T98G细胞	人U-87 MG细胞	人SK-N-MC细胞	人SH-SY5Y细胞	小鼠GT1-1细胞	小鼠GT1-7细胞
小鼠胶质细胞	大鼠皮层星形胶质细胞Gibco	大鼠原代皮层神经细胞Gibco	大鼠星形细胞	大鼠胶质前体细胞Gibco	大鼠原代海马神经细胞Gibco
大鼠HiB5细胞	大鼠C6胶质细胞	大鼠SCN2.2细胞	大鼠F-11细胞		
分泌细胞					
人SW-13细胞	人SV40 MES 13细胞				
干细胞					
人间充质干细胞 (hMSC)	人BGO1V胚胎干细胞	人H9胚胎干细胞	人神经干细胞Gibco	人脂肪干细胞 (ADSC)	小鼠胚胎干细胞
大鼠神经干细胞Gibco					

*有关使用本表所列细胞类型的优化Neon转染实验方案的信息, 请访问 thermofisher.com/neon

稳定转染子的选择

成功完成稳定转染需要高效DNA输送和筛选获得DNA的细胞的方法。尽管转染效率因细胞类型的不同而异, 不论使用的是线性还是环状DNA, 在104个转染细胞中只有大约一个细胞可以稳定整合DNA。使用线性DNA时整合效率最高。

筛选稳定表达转染DNA的细胞最可靠的方法之一是在用于转染的DNA重组体或共转染至细胞的独立载体中加入选择标记物, 然后经过短暂的恢复期后, 对细胞应用适当的选择压力。当共转染载体上表达选择标记物时, 携带目的基因的载体与携带筛选标记物的载体的摩尔比应在5:1到10:1的范围内, 以确保包含选择标记物的细胞也含有目的基因。

常用的选择标记物是可传递对各种筛选药物抗性的基因或可以补偿转染细胞系中缺陷必需基因的基因。使用选择性培养基培养时, 未转染的细胞或瞬时转染细胞都将会死亡, 而表达一定水平的抗生素抗性基因或可以补偿必需基因缺陷的细胞则可以存活。

用于真核细胞的选择性抗生素

我们提供高质量的选择试剂, 完善了其可选真核表达载体产品系列。Gibco™ Geneticin™ (G418硫酸盐)、Zeocin™、潮霉素B、嘌呤霉素和杀稻瘟菌素是最常用于稳定细胞转染的选择性抗生素。这些抗生素提供了满足您研究需要的独特解决方案, 如双重选择和快速、稳定的细胞系建立。

Geneticin选择性抗生素

Geneticin试剂又称为G418硫酸盐, 常用于筛选哺乳动物、植物或酵母细胞。Geneticin试剂纯度更高, 意味着其使用浓度较其他G418产品低15-30%; 因此, 存活的克隆集落生长更快速, 而且细胞更健康。

Zeocin选择性抗生素

Zeocin试剂对哺乳动物细胞系、酵母、昆虫细胞和细菌有效。Shc^{ble}基因可使细胞获得对Zeocin试剂的抗性, 防止表达蛋白质的细胞中结合Zeocin试剂并出现细胞DNA剪切。用于筛选时的浓度范围为50至2,000 µg/mL (一般为300 µg/mL), 具体浓度取决于细胞类型。

稳定转染子的选择 (续)

潮霉素B选择性抗生素

潮霉素B是一种氨基糖苷类抗生素, 可干扰80S核糖体的易位并导致误译, 从而抑制蛋白质的合成。由于其作用方式与Geneticin或Zeocin试剂不同, 因此潮霉素B可用于双重筛选实验。大肠杆菌潮霉素抗性基因(hyg或hph)会使细胞产生潮霉素B抗性。筛选浓度范围为100至1,000 $\mu\text{g/mL}$ (一般为200 $\mu\text{g/mL}$), 使用时应依据各细胞系进行优化。

二盐酸嘌呤霉素选择性抗生素

Gibco™嘌呤霉素盐酸盐是一种源于白黑链霉菌的氨基核苷类抗生素, 是原核细胞和真核细胞的翻译抑制剂。链霉菌中的嘌呤霉素-N-乙酰基转移酶基因(pac)使细胞获得抗性。嘌呤霉素作用迅速, 低抗生素浓度时即可导致细胞迅速死亡, 在不到一周的时间里即可生成稳定的抗嘌呤霉素细胞系。其浓度为2-5 $\mu\text{g/mL}$ 时对哺乳动物贴壁细胞敏感, 而浓度低至0.5-2 $\mu\text{g/mL}$ 时即可对悬浮细胞有效。

杀稻瘟菌素S盐酸盐选择性抗生素

杀稻瘟菌素是从灰色产色链霉菌中提取的核苷类抗生素, 它是一种强效翻译抑制剂, 对原核细胞和真核细胞均有效。土曲霉的bsd基因产物会使细胞产生抗性。该试剂通常在浓度达50 $\mu\text{g/mL}$ 时对大肠杆菌菌株有效, 而浓度低至2-10 $\mu\text{g/mL}$ 时即可对哺乳动物细胞有效。对杀稻瘟菌素敏感的细胞会迅速死亡, 只需较低的抗生素浓度, 在不到一周的时间里即可获得稳定的抗杀稻瘟菌素哺乳动物细胞系。

报告基因分析

报告基因是其产物可用于转染后分析的基因, 可用作转染细胞筛选的标记物, 用于基因表达调控研究, 或用作转染效率标准化的对照品。

理想的报告基因应是研究使用的细胞中不存在的基因, 或可以与该基因的天然形式轻松区分, 检测方便, 且具有较广的线性检测范围。另外, 报告基因的存在不应影响转染细胞的正常生理学和基本健康。

报告基因呈组成型表达, 或者可被外来干预 (如在 β -半乳糖苷酶系统中导入IPTG) 诱导。一般在转染1-3天后进行报告基因分析, 但分析的最佳时间应根据经验确定。

转染分析

选择标记物可保护生物体不受选择性试剂影响, 这些选择性试剂通常会杀死生物体或干扰其生长, 而用于转染子筛选的报告基因则可以轻松鉴别出包含报告基因的细胞。上述用途的报告基因一般可在其自身启动子的调控下表达, 与导入的目的基因无关, 因此, 即便目的基因只在特定条件下表达或者其所在的组织难以获取, 亦可利用报告基因来筛选成功转染的细胞。

报告基因还可用作转染的对照。例如, 通过比较所有实验中使用的报告基因的表达水平, 可以对不同实验的转染效率进行标准化。

基因调控分析

报告基因分析对于基因表达调控研究具有不可估量的价值, 包括顺式作用因子 (基因调控元件) 和反式作用因子 (转录因子或外源性调控因子)。此外, 报告基因系统可以使通路特异性、组织特异性或发育调控基因启动子用作特异性事件或过程的生物标记物。

在这些分析中, 可检测的报告基因可用作待研究基因编码区的替代物。报告基因重组体包含一个或多个待分析的基因调控元件、报告基因序列和功能mRNA转录所需的序列。

将报告基因重组体导入细胞后, 可以通过直接分析报告蛋白质的酶活性监测报告基因的表达水平。

报告基因分析(续)

常用的报告基因

可诱导可鉴别特性的常用报告基因通常包括荧光和化学发光蛋白。

表达绿色荧光蛋白(GFP)的细胞可在紫外光照射下发出绿色荧光。需要采用专门的显微镜观察单个细胞。此外还有黄色和红色荧光蛋白可供选择,一次可检测多个基因。它常用于检测基因表达。

荧光素酶用作实验试剂时通常是指北美萤火虫荧光素酶,尽管还有来源于其他种属的萤火虫的重组荧光素酶产品可供选择。荧光素酶可以催化其底物(一般为荧光素),根据荧光素酶基因的不同,产生黄绿光或蓝光荧光。由于荧光素酶的生物发光无需激发光,几乎不会出现自发荧光,可以实现无本底荧光。

GUS分析(使用 β -葡萄糖苷酸酶)是一种出色的单细胞检测方法,无需复杂设备即可将细胞染成蓝色。但缺点是细胞在此过程中会被杀死。它常用于植物科学。

蓝-白斑菌落筛选可用于细菌和真核细胞。细菌lacZ基因编码 β -半乳糖苷酶。加入含有特定半乳糖苷(如X-gal)的培养基后,表达该基因的细胞将X-gal转变为蓝色,肉眼即可观察到。

RNAi和非编码RNA研究

RNA干扰 (RNAi) 是一种功能强大的细胞生物学基础研究工具, 可在各种细胞类型中通过抑制基因表达研究蛋白质功能。以前该技术仅限于部分实验室使用, 如今, RNAi已成为基因功能研究的基本工具。

RNAi是蛋白质抑制研究、表型分析、功能恢复、通路分析、体内抑制和药物靶点发现的主要工具。

常用RNAi术语表

RNAi

核糖核酸干扰 (由Fire和Mello等人, 1998年首次使用)。

siRNA

siRNA, 即短干扰RNA, 长度为21-25 bp, 3' 末端带有两个突出的核苷酸, 是长双链RNA (dsRNA) 被RNAi通路中的Dicer酶切割成的双链RNA分子。将合成的siRNA导入哺乳动物细胞内可产生RNA干扰。另外, siRNA也可来源于内源性前体。

shRNA

短发夹RNA, 又称为短干扰发夹。可以采用基于载体的shRNA将siRNA导入细胞, 实现稳定的基因沉默。采用Pol III型强启动子控制靶序列的转录, 形成长度可变的发夹和环, 然后通过细胞siRNA机制进行处理。shRNA一旦进入细胞, 可以通过RNAi下调具有互补序列的基因的表达。

miR RNAi

表达microRNA的载体, 用于RNAi。miRNA是19-23 nt的单链RNA, 其单链前体转录本含有碱基不完全配对的发卡结构。miRNA在沉默复合物中的功能与RISC类似 (参见下文)。

Chemically modified siRNA

具有化学修饰的siRNA分子。

RISC

RNA诱导沉默复合物 (RISC) 是一种由蛋白质和siRNA组成的核酸酶复合物, 可以靶向剪切与RISC复合物中与siRNA互补的内源性mRNA。

RNAi和非编码RNA研究(续)

脱靶效应

导入siRNA或D-siRNA库后, 出现一个或多个非特异性靶基因沉默的现象。这种效应既可能来自于siRNA反义链, 也可能来自正义链。

RNAi的工作原理

有两类小RNA分子在RNAi中起作用。第一类是人工合成的短片段干扰RNA (siRNA), 它可以靶定并切割目标基因的mRNA, 有效地抑制特定基因表达。第二类是microRNA (miRNA) 分子, 是天然存在的单链RNA, 长度为19-22个核苷酸, 它通过结合靶mRNA的3' 非翻译区 (UTR), 抑制其翻译, 从而实现基因沉默 (Ambros, 2004)。有关RNAi的更多信息, 请访问thermofisher.com/rnai。

siRNA分析

有多种方式可诱导RNAi: 化学合成、RNAi载体和体外剪切 (下图5.8)。在哺乳动物细胞中, 短片段dsRNA (siRNA) 可以启动靶细胞mRNA的特异性降解。在此过程中, siRNA的反义链成为多蛋白复合物或RNA诱导沉默复合物 (RISC) 的一部分, 然后识别相应的mRNA并在特定位点进行剪切。随后引起降解, 并最终导致蛋白表达缺失。有关siRNA分析的更多信息, 请访问thermofisher.com/sirna。

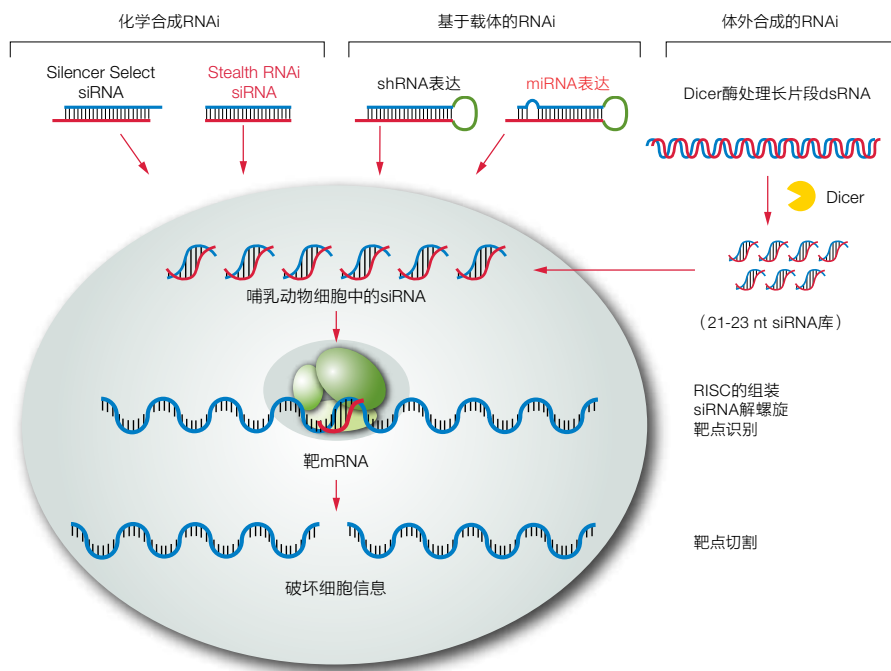


图5.8.哺乳动物细胞中的RNAi方法。

miRNA分析

RNA聚合酶II和III转录含有miRNA的基因, 在RNA酶III Drosha的作用下生成较长的初级转录本miRNA (pri-miRNA), 获得长度为70至90 bp的发夹结构 (pre-miRNA)。Pre-miRNA发夹结构被转移至细胞质, 在核酸内切酶Dicer的作用下进一步加工为短双链miRNA, 长度为19-22个核苷酸。miRNA双链可被RNA诱导沉默复合物 (RISC) 识别, RISC是一种多蛋白核酸酶, 且两条链其中一条 (即引导链) 可以帮助该蛋白复合物识别其同源mRNA转录本。RISC-miRNA复合物通常与靶mRNA的3' UTR作用, 且作用区域的序列同源性低, 它们可以抑制蛋白质合成, 但其机制尚未完全清楚 (图5.9)。

植物miRNA可以通过精确或几乎精确的互补碱基配对与靶mRNA序列结合, 直接剪切并降解mRNA (Rhoades等人, 2002; Chen, 2005)。与RNA干扰 (RNAi) 机制类似, 靶mRNA上磷酸二酯键的剪切发生在第10和第11个碱基之间 (Elbashir等人, 2001)。但迄今为止研究的几乎所有动物的miRNA都未与其mRNA靶点完美互补, 并可以在抑制蛋白质合成的同时维持mRNA靶点的稳定性 (Ambros, 2004)。研究表明, 转录本可能受多个miRNA的调控, 单个miRNA可能靶向多个转录本。研究显示, 多达三分之一的人类基因可能由miRNA调控 (Lim等人, 2003)。尽管已经在各种生物体中发现了数以百计的miRNA, 但关于其细胞功能仍知之甚少。miRNA的一些独特物理属性, 包括体积小、缺乏多聚腺苷酸尾巴及易与序列同源性低的mRNA靶点结合, 这增加了miRNA的研究难度。有关miRNA分析的更多信息, 请访问thermofisher.com/mirna。

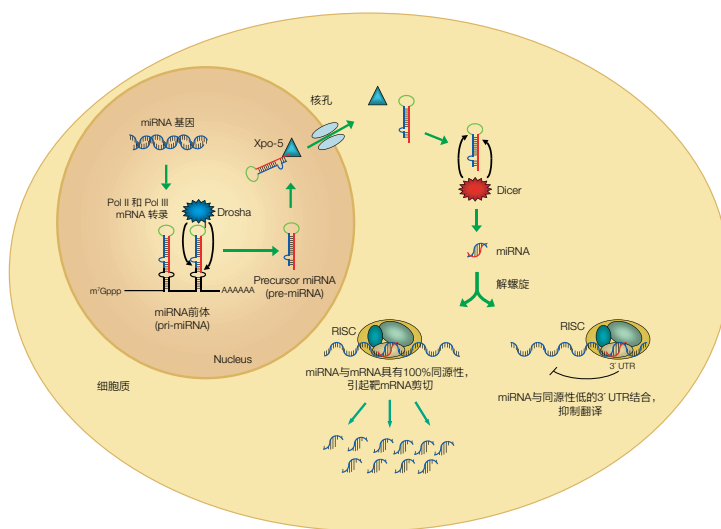


图5.9.miRNA的产生与功能。在RNA聚合酶II和III作用下生成microRNA转录本, 经RNA酶III Drosha (细胞核) 和Dicer (细胞质) 处理后, 获得19-22个核苷酸的miRNA双链。其中一条链参与形成RISC复合物, 调控蛋白质表达。

RNAi和非编码RNA研究 (续)

选择RNAi方法 siRNA或miRNA均可调控RNAi (RNA干扰) 过程。两种方法均由Dicer酶在细胞内完成, 并形成RISC复合物 (RNA诱导沉默复合物)。但是, 两者之间存在些许差异。

siRNA是外源性双链RNA, 可以通过化学合成后直接转染至细胞内, 或者将表达短发夹RNA (shRNA) 的载体导入细胞, 在细胞内生成, 其中短发夹RNA是siRNA的前体。而miRNA为单链, 来源于RNA上内含子中的内源性非编码RNA。但shRNA形成功能siRNA与基因组编码的miRNA, 都可以通过调节mRNA稳定性、翻译和染色质结构进行细胞基因表达调控 (Hutvagner和Zamore, 2002)。

siRNA和miRNA之间的另一差异在于, siRNA一般可与动物体内的mRNA靶点实现完全匹配且特异性地结合, 而miRNA无法实现完全匹配, 从而抑制许多非靶mRNA序列的翻译。但在植物中, miRNA更易形成完全匹配, 诱导mRNA剪切, 而不仅仅是抑制翻译。

siRNA和miRNA均可通过RNA诱导的转录沉默 (RITS), 在表观遗传学方面发挥作用。同样地, 鉴于它们在基因表达调控方面的作用, 二者也都是重要的治疗靶点。

	siRNA	miRNA
来源	天然存在于植物和低等动物中, 但是否天然存在于哺乳动物体内目前尚不清楚	天然存在于植物和动物中
结构	双链	单链
长度	21-22 nt	19-25 nt
与靶mRNA的互补性	100%完全匹配; 因此, siRNA可以抑制特定的基因, 几乎无脱靶现象	不精确; 因此, 单个miRNA可靶向多达数百种mRNA
机制	调控与其有相同序列的基因表达	由生成miRNA的基因表达, 但调控的基因 (mRNA) 并非只有表达miRNA的基因
作用	剪切mRNA	抑制mRNA翻译
功能	在无抗体或细胞免疫系统的动植物中发挥基因沉默保护机制	基因 (mRNA) 调节因子 (抑制剂)
用途	siRNA作为基因沉默的工具, 几乎每个分子生物学实验室都会用到。一些siRNA还会用于临床治疗试验	可用作药物靶点或药物制剂。另外, miRNA的表达水平可用作潜在的诊断和生物标志物工具

*本表改编自Mack, 2007。

6. 转染方法

本节提供了有关质粒DNA、寡核苷酸和RNA转染细胞，体外和体内转染培养液制备以及转染细胞选择的有用信息和一般指导原则。



请注意，转染实验的基本原理大致相同，但不同种类的细胞，转染条件存在巨大差异。因此，我们建议您应熟悉自己使用的细胞系及适合它的转染方法，实验中严格遵守每个产品的操作说明。

转染效率的影响因素

转染是否成功受许多因素的影响：转染方法的选择、细胞系的健康和活性、细胞传代次数、汇合度、所用核酸的质量和数量以及培养基中是否含有血清，这些都会影响转染实验的结果。虽然可以通过优化转染条件，实现高转染效率，但必须注意的是，无论使用何种转染方法，都不可避免地会引起部分细胞死亡。

细胞类型

转染实验中细胞类型的选择可能看似简单，但也是常被忽略的关键因素。由于不同细胞类型对给定的转染试剂或方法反应各异，因此选择合适的细胞类型及实验设计，是取得最优结果的必要条件。

使用实验室已经建立好的连续细胞系更易操作，但并非是体内模拟的最佳选择，因为它们在传代中会存在多种遗传改变。但是，如果转染实验是为了大规模生产重组蛋白，则细胞系是否代表体内环境就并不重要，只要细胞系能够表达足量正确折叠和翻译后修饰的重组蛋白即可。例如，将目的载体瞬时转染Expi293表达培养基中悬浮培养的Expi293F细胞，研究人员可得到1 g/L以上经正确折叠的糖基化重组蛋白。

另一方面，由于原代培养更能模拟天然组织，因此，也常用于转染。但是，它们的生长潜力和寿命有限，且难以培养。使用原代培养时，必须维持同源性较高的细胞群体（例如，应富集神经培养物中的神经元，抑制胶质细胞的生长），并尽快使用细胞。

转染效率的影响因素 (续)

此外, 在设计转染实验时, 还应考虑细胞类型的生物学特性。例如, 一些启动子在不同细胞类型中的功能不同, 部分细胞类型不适用于特定的转染技术。

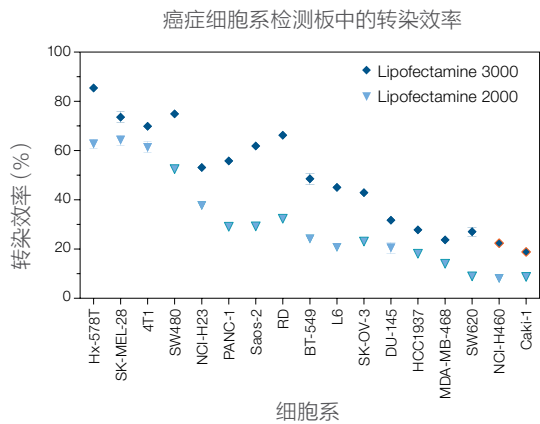


图6.1.不同细胞系的转染效率差异。采用Lipofectamine 2000试剂和Lipofectamine 3000试剂将表达GFP的质粒转染至17种细胞系中, 按照各试剂的推荐实验方案, 在24孔板中进行转染, 每孔质粒用量为0.5 µg。转染48小时后分析GFP表达。重复检测3次, 数据点显示平均转染效率±标准差。

细胞健康与活性

转染前的细胞活性和整体的健康状态是影响转染结果的重要因素。一般而言, 转染之前, 应至少有90%的细胞为活细胞, 且传代复苏时间应足够。我们强烈建议在转染前至少24小时传代细胞, 以确保细胞能够恢复, 并在转染时处于最佳生理学状态。

实验室中永生化细胞系的细胞培养会随时间的变化而改变, 这会导致转染细胞的行为出现变化。过度传代可能会对转染效率以及细胞群体的转基因表达水平产生不利影响。我们一般推荐使用复苏后传代次数低于30次的细胞。复苏新鲜的冻存细胞, 建立低传代数培养物用于转染实验, 可以提高转染后细胞的活性。为获得最佳的可重复性, 可以将低传达数的细胞分装冻存, 在需要时复苏。复苏新细胞后, 可传代3或4次。

由于污染会极大地改变转染结果, 应定期对细胞培养物和培养基进行生物污染检测 (参见“生物污染”, 第15页), 被污染的培养物和培养基不得用于转染。如果细胞已被污染或细胞健康受到影响, 则应弃去细胞, 重新接种未污染的冻存细胞。

汇合 为获得最佳的转染效果, 应遵循常规传代操作, 每周传代一次或两次, 待细胞几乎完全汇合后再继续传代。不要使细胞维持在汇合状态超过24小时。

细胞转染的最佳密度取决于细胞类型、应用和转染技术, 应根据转染细胞系的不同, 确定最佳密度。在不同的实验中保持标准的接种方案可以确保转染时细胞能够达到最佳汇合度。采用阳离子脂质介导的转染, 转染时贴壁细胞达到70-90%汇合, 悬浮细胞达到 5×10^5 到 2×10^6 个细胞/mL, 可以获得最佳结果。

确保在细胞转染时未达到完全汇合或处于静止期, 因为分裂状态的细胞相比静止状态的细胞更容易摄取外源性核酸。细胞密度过高会引起接触抑制, 导致核酸摄取不佳或转染基因表达下降。但是, 细胞数量太少会使细胞间缺乏接触, 从而导致细胞生长不佳。在这种情况下, 增加培养细胞的数量可以提高转染效率。

同样, 正处于分裂期的细胞系可以更高效地转导病毒载体。在非分裂细胞中转导病毒载体时, 需要增加MOI (感染复数) 以获得最佳的转导效率并提高重组蛋白的表达水平。

培养基 不同的细胞或细胞类型对培养基、血清和添加剂有着极其特定的要求, 根据细胞类型和转染方法选择最适合的培养基是转染实验的关键, 这类信息通常可通过发表的文献以及提供细胞的机构或者细胞库获得。如果无法找到关于您的细胞该选择何种培养基的信息, 则必须根据经验确定。

必须使用新鲜的培养基, 尤其是当其中有些组分不稳定, 因为当培养基缺少重要组分和必需添加剂会影响细胞生长。

有关细胞培养基的信息, 请参阅第32页的“推荐用于普通细胞系的培养基”, 或访问我们的网站 (thermofisher.com/media)。一些细胞系和原代细胞可能需要特殊的包被材料 (例如, 多聚赖氨酸、胶原蛋白、纤连蛋白) 贴附培养板, 以获得最佳的转染结果。

转染效率的影响因素(续)

血清 一般而言, 培养基中加入血清会促进DNA的转染。但是, 在进行阳离子脂质体介导的转染时, 必需在没有血清的情况下形成DNA-脂质体复合物, 因为一些血清蛋白会干扰复合物的形成。请注意, 在血清存在时, 阳离子脂质体试剂和DNA的最佳用量可能会发生变化; 因此, 当使用含血清的转染培养基时, 应优化转染条件。

转染RNA至细胞时, 我们建议在无血清的情况下进行转染操作, 以避免出现RNA酶污染。大多数细胞在无血清培养基中可以维持健康数小时。

血清的质量对细胞生长及转染结果产生很大的影响。因此, 必须控制不同品牌甚至不同批次血清的差异性, 以获得最佳结果。若血清经测试细胞使用良好, 应一直使用相同的血清, 以避免结果出现差异。我们的产品(包括血清)均经过污染检测, 可确保其质量、安全性、一致性和合规性。

抗生素 一般而言, 您可以使用含有抗生素的培养基进行瞬时转染。然而, 由于阳离子脂质体试剂增加了细胞通透性, 这也会使更多抗生素进入细胞, 从而引起细胞毒性并降低转染效率。因此, 我们不推荐在转染培养基中添加抗生素。另外, 接种细胞时不加抗生素, 这样在转染前便无需冲洗细胞。

进行稳定转染时, 不能使用含青霉素和链霉素的选择性培养基, 因为这些抗生素是Geneticin选择性抗生素的竞争抑制剂。构建稳定细胞系时, 在转染后48-72小时再添加选择性抗生素, 这样可使细胞有时间表达抗性基因。

如果使用不含血清的培养基, 则应减少抗生素的用量, 以保持细胞健康。

转染分子的类型

质粒DNA是最常用的转染载体。质粒DNA载体的拓扑结构(线性或超螺旋)和大小会影响转染效率。采用超螺旋质粒DNA进行瞬时转染可以获得最高的效率。在稳定转染中,细胞对线性DNA的摄取水平低于超螺旋DNA,但它将DNA整合至宿主基因组中的效果最佳。

尽管其他大分子(如寡核苷酸、RNA、siRNA和蛋白质)也可以转染至细胞中,但在使用其他大分子时,需要对质粒DNA的转染条件进行优化。

转染方法

将核酸导入细胞的方法有很多种,包括各种生物学、化学和物理方法。但是,并非所有方法都适用于所有细胞类型和实验应用,它们在转染效率、细胞毒性、对正常生理学的影响、基因表达水平等方面存在明显差异。所以应根据您的细胞类型和实验要求选择理想的方法,并且该方法应具有高转染效率、低细胞毒性、对正常生理的影响最小、易于使用和可重复。有关各种转染方法的概述和比较,请参阅“基因输送技术”,第54页。

转染方法的选择（非病毒）

选择转染方法时, 应考虑您想要输送的载体 (DNA、RNA或蛋白质) 以及要转染的细胞类型。使用下表选择Thermo Fisher Scientific提供的各种阳离子脂质体转染试剂和Neon转染系统。有关各转染方法的更多信息, 以及针对各细胞系的优化转染实验方案, 请访问 thermofisher.com/transfection.

连续细胞系 连续细胞系具有无限增殖潜能, 且较原代或有限细胞系更容易操作。但是, 由于这些细胞已经过遗传转化获得永生, 因此其培养特性可能无法反应在体内的真实状态。

转染方法	载体	贴壁细胞		悬浮细胞
		易转染	难转染	
Lipofectamine 3000试剂	   	• • • •	• • • •	• •
Lipofectamine 2000试剂	   	• • •	• •	•
Lipofectamine RNAiMAX试剂	 	• • • •	• • • •	• •
Lipofectamine CRISPRMAX试剂		• • • •	• • •	• •
Lipofectamine MessengerMAX试剂		• • • •	• • • •	
InvivoFectamine 3.0试剂	 	N/A	N/A	体内
Neon电穿孔	   	• • • •	• • • •	• • • •

图例

符号	解释	符号	解释	符号	解释
	质粒DNA, 用于蛋白质、shRNA和miRNA表达		mRNA, 用于蛋白质表达		非编码RNA, 用于RNAi基因表达抑制
	共转染, 用于RNAi载体和siRNA共转染		CRISPR-Cas9, 用于蛋白质输送		

原代细胞与有限培养

原代细胞是直接从组织中分离出来并在适当条件下培养增殖的细胞。因此，它们的形态和生理学特性更接近体内状态。但是，它们通常比连续细胞系更难培养和转染。

第一次传代培养后，原代培养物即被称为细胞系。来自原代培养的细胞系寿命有限（即：有限细胞系），随着细胞的传代，生长能力最强的细胞会占据优势，最终导致细胞群体在基因型和表型上达到一定程度的均一性，并且它们的表型会处于原代细胞和连续细胞系之间。这些细胞较原代细胞更易操作，尤其是在生成稳定转染的克隆时。

转染方法	载体	神经元细胞	干细胞	血细胞	其他
Lipofectamine 3000试剂	   	...	...	..	...
Lipofectamine 2000试剂	   	...	..	.	..
Lipofectamine RNAiMAX试剂	 	...	...	..	...
Lipofectamine CRISPRMAX试剂		...	...	...	
Lipofectamine MessengerMAX试剂		...	...		..
Invivofectamine 3.0试剂	 	N/A	N/A	体内	
Neon电穿孔	   	...	...	...	...

图例

符号	解释	符号	解释	符号	解释
	质粒DNA，用于蛋白质、shRNA和miRNA表达		mRNA，用于蛋白质表达		非编码RNA，用于RNAi基因表达抑制
	共转染，用于RNAi载体和siRNA共转染		CRISPR-Cas9，用于蛋白质输送		

病毒DNA输送系统的选择

目前有多种可选的病毒输送系统，能满足您的特殊需求。我们提供各种病毒载体系统，可以将核酸转染入哺乳动物和昆虫细胞，用于蛋白质表达和RNAi研究。

哺乳动物细胞表达

Invitrogen™ ViraPower™ 表达系统使用复制缺陷型病毒颗粒，以确保安全且高效地导入表达载体，用于在各种哺乳动物细胞中的组成型或诱导型高表达。适用于 ViraPower 系统的载体有很多，它们提供了各种克隆方法（Invitrogen™ TOPO™ 或 Gateway™ 克隆，或 GeneArt™ 遗传组装）和启动子选择（组成型或诱导型），您可以根据细胞系或动物模型进行实验优化。

- Invitrogen™ ViraPower™ 慢病毒表达试剂盒可在分裂和非分裂细胞（例如干细胞、原代神经元细胞）中稳定表达蛋白质，是长期基因表达分析和功能分析研究的理想选择。
- Invitrogen™ ViraPower™ HiPerform™ 慢病毒表达试剂盒通过在病毒载体中引入旱獭转录后调控元件（WPRE）和 HIV-1 整合酶基因的中央聚嘌呤区（cPPT）序列，改进了现有慢病毒系统，分别提升了基因表达和慢病毒整合至宿主基因组中的效率。试剂盒有两种类型：高准确度滴度试剂盒，可精确控制每个细胞的拷贝数；及快速滴定试剂盒，适用于高通量筛选研究。
- Invitrogen™ ViraPower™ HiPerform™ T-REx™ Gateway™ 载体试剂盒将 Invitrogen™ ViraPower™ HiPerform™ 和 T-REx™ 慢病毒技术与 Gateway™ 克隆技术相结合，可促进目的基因在分裂或非分裂哺乳动物细胞中基于慢病毒、可调控的高表达。该系统包括一种对照质粒以及两种基于 pLenti 的表达载体（一种用于诱导表达目的基因，另一种用于表达 Tet 阻遏物）。
- Invitrogen™ ViraPower™ 腺病毒 Gateway™ 表达试剂盒可在含巨细胞病毒（CMV）或其他选择启动子的分裂和非分裂的哺乳动物细胞中进行高水平瞬时表达的理想选择。Invitrogen™ ViraPower™ 腺病毒系统采用 Gateway 技术，可以快速、简单、准确地克隆目的基因。

有关 ViraPower 表达系统以及本文未提及的其他表达系统的更多信息，请访问 thermofisher.com/proteinexpression。

病毒系统	瞬时表达		稳定表达			
	分裂细胞	非分裂细胞	分裂细胞	神经细胞	生长阻滞细胞	接触抑制细胞
腺病毒	•	•				
逆转录病毒	•		•			
慢病毒	•	•	•	•	•	•

质粒DNA转染指南

经典的转染技术最初用来将质粒DNA导入细胞中,而质粒DNA仍然是目前最常用的转染载体。将含有重组基因和调控元件的DNA质粒转染至细胞内,可用于研究基因功能和调控、基因产物突变分析和生物化学特性、基因表达对细胞健康和周期的影响,以及适用于纯化和下游应用的蛋白质的大规模生产。

载体的大小和拓扑结构(线性或超螺旋)、质粒DNA的质量以及启动子的选择是影响质粒DNA转染效率的主要因素。

载体考虑因素

采用高度超螺旋DNA进行瞬时转染的效率高于线性DNA,这可能是因为环状DNA较线性DNA片段不易被外切酶降解,(McLenachan等人,2007; von Groll等人,2006)。原子力显微镜分析显示,阳离子脂质体试剂会分别与环状和线性DNA形成极为不同的复合结构:环状DNA可以观察到紧密的球形或柱形结构,而线性质粒则呈珠链样结构。另外阳离子脂质体介导的环状质粒转染可能是通过内吞作用进入细胞,与线性DNA进入细胞的方式有较大的区别并且效率较高(von Groll等人,2006)。

对稳定转染,线性DNA的转染效率更高,因为它更易整合至宿主细胞的基因组。尽管线性DNA被细胞摄取的效率较低,但因更容易发生重组,整合至宿主染色体生成稳定转化体的可能性更高。

在阳离子脂质体介导的转染中,尽管细胞摄取率相当,但较大质粒的核输送效率低于较小的质粒。使用质量或摩尔浓度相等但大小不同的载体可以观察到上述现象,说明质粒的核输送可能会受到细胞内运输速度的限制,较小的质粒可以快速通过细胞质,躲避降解作用和细胞防御机制(Lukacs等人,2000; McLenachan等人,2007)。

质粒DNA的质量

质粒DNA的纯度和质量是转染必要的成功因素之一。使用不含苯酚、氯化钠和内毒素的最高纯度的质粒DNA可获得最佳的结果。因为污染物会致死细胞,盐会干扰脂质体复合物的形成,从而降低转染效率。

内毒素, 即脂多糖, 通常是在质粒制备的裂解步骤中释放出的, 并且与质粒DNA共纯化。与质粒DNA共存的内毒素会使原代细胞和其他敏感细胞的转染效率显著下降。我们推荐使用Invitrogen™ PureLink™ HiPure质粒试剂盒 (Mini, Midi, Maxi, Mega和Giga) 分离DNA, 为转染提供最高质量的DNA。有关更多信息, 请访问 thermofisher.com/nap。尽管采用氯化铯梯度离心也能得到高度纯度的DNA, 但该过程耗时费力。DNA-脂质复合物或DNA溶液过度涡旋振荡会产生剪切作用, 尤其是对较大的分子, 从而会影响转染效率。DNA稀释溶液中的EDTA浓度不应超过0.3 mM。

基因产物和启动子

启动子的选择取决于宿主细胞系、需要表达的蛋白质类型和期望的表达水平。许多研究者使用强启动子CMV, 因为它可以在各种细胞类型中实现最高的转录活性。另一个用于哺乳动物细胞的高水平蛋白表达的强启动子是人类延伸因子-1 α (EF-1 α)。但是, 将过强的启动子用于有潜在毒性的基因表达, 会在质粒DNA的瞬时转染中引起一定的问题。所以对有潜在毒性的基因产物, 建议使用弱启动子。

毒性基因产物也是稳定转染细胞筛选问题之一。对于组成型启动子, 当抗性基因的表达危害细胞健康时, 表达该基因的细胞会丧失生长优势, 从而无法获得稳定转染的克隆。此时, 可以使用诱导型启动子控制基因表达的时序, 从而实现稳转细胞的筛选。诱导型启动子一般需要在有诱导物分子 (如金属离子、代谢产物或激素) 的条件下才能发挥作用, 但是一些诱导型启动子可以以相反的方式发挥功能, 即在无特定分子存在的情况下诱导基因表达。

细胞类型特异性启动子也很常用, 如用于昆虫细胞表达的多角体蛋白基因启动子。文献检索是确定哪种启动子最适合您的细胞系或应用的最佳工具。

对照

无论使用何种转染方法, 都必须有对照, 以检查细胞健康状况, 确定所使用的转染方法是否有效, 并鉴别插入片段是否存在问题。阴性对照 (无DNA, 无转染试剂) 可以保证细胞生长处于最佳条件。阳性对照 (使用成熟的转染方法同时进行转染) 可确定所使用的转染方法是否有效。另外, 还应有一对照转染不含目的基因的质粒, 确定插入片段是否存在问题。

质粒DNA转染的优化

对于任何转染过程, 第一步最关键的都是优化转染条件。为了使外源DNA更好的导入细胞, 每种细胞类型都需要找到与之匹配的转染条件, 即便是极其类似的细胞类型亦存在较大的条件差异。

因此, 优化转染效率最重要的是根据细胞类型选择适合的转染方案。一旦选择了合适的转染方法, 即可使用报告基因瞬时表达分析系统优化转染条件, 即在不同条件下转染报告基因, 通过分析报告基因的产物监测转染效率。

本节将对磷酸钙转染、使用Neon转染系统进行的电穿孔转染和阳离子脂质体转染的优化提供以下指导建议。

磷酸钙-DNA共沉淀法需考虑的因素

影响磷酸钙转染效率的主要因素是磷酸钙-DNA共沉淀中DNA的用量、细胞与共沉淀一同孵育的时间以及甘油或DMSO休克的使用和持续时间。

磷酸钙转染中的总DNA用量一般为每个10 cm培养皿10-50 μg , 将其溶于450 μL 无菌水和50 μL 2.5 M CaCl_2 , 但在实际质粒制备时还需根据所用的细胞和培养基具体情况具体分析。对于一些细胞系, 在每个10 cm的培养皿中加入10-15 μg DNA, 会导致细胞过度死亡和DNA摄取率降低; 而对有的细胞系, 尤其是原代细胞, 则需要更高浓度的DNA。所以在使用新的质粒和细胞系进行转染前, 应先测试确定最佳的DNA使用浓度。

细胞与DNA-磷酸钙沉淀最适孵育时间也因细胞类型不同而异。一些生长顽强的细胞类型, 如HeLa、NIH/3T3和BALB/c 3T3, 可以通过孵育16小时, 实现高效转染, 因为这种条件下会致死一些敏感性细胞。

对中试实验, 可采用不同DNA用量、孵育时间以及甘油或DMSO休克, 可了解各细胞类型是否耐受长期的磷酸钙沉淀, 以及是否应使用甘油休克。在得到中试实验结果后, 可更精细地调整实验参数, 进行进一步优化。例如, 如果按下图所示使用10%甘油使细胞休克3分钟可以提高转染效率, 则可以同时对不同时间的甘油休克或使用10-20% DMSO休克进行实验。

培养皿 (10 cm)	报告基因质粒 (μg)	孵育 (hr)	甘油震荡 (min)
1	5	6	—
2	10	6	—
3	15	6	—
4	20	16	—
5	25	16	—
6	30	16	—
7	5	6	3
8	10	6	3
9	15	6	3
10	20	16	3
11	25	16	3
12	30	16	3

图6.2. 磷酸钙共沉淀法转染优化的中试实验范例。

阳离子脂质体转染需考虑的因素

影响阳离子脂质体介导的DNA转染成功与否的主要因素有：DNA用量、转染试剂与DNA的比例、脂质-DNA复合物的孵育时间以及加入复合物时的细胞密度。应根据每种细胞类型和载体组合，对上述因素进行系统性的优化，一旦确定优化条件则应在所有实验中保持不变，以保证结果的可重复性。

为获得最佳结果，请遵循试剂生产商提供的实验优化方案。我们为所有转染试剂提供实验优化方案。关于更多信息，请访问 thermofisher.com/transfection。

DNA用量

DNA最佳用量取决于转染质粒的特性（如启动子、质粒大小、复制起始点）、待转染细胞的数量、培养皿的大小和所使用的目标细胞系。在许多受测细胞类型中，相对少量的DNA可以被细胞高效摄取并表达。事实上，在一些细胞类型中进行特定的阳离子脂质体制备，较高的DNA浓度会出现抑制作用。此外，如果使用编码有毒蛋白质的质粒或使用过多高表达的质粒，也会出现细胞毒性。

质粒DNA转染的优化(续)

转染试剂与DNA的比例

转染复合物的总电荷数取决于转染试剂与DNA的比例。其中阳离子脂质体表面带正电荷,既能与核酸的磷酸根通过静电作用形成脂质体-DNA复合物,也能被表面带负电荷的细胞膜所吸附。

转染试剂与DNA的最佳比例与细胞类型密切相关。实验初始阶段,可在质粒DNA浓度保持不变的条件下,改变转染试剂的用量(如1:1、3:1和5:1的体积质量比)。另外,也可以保持固定的比例,改变质粒的用量。

孵育时间

细胞与转染复合物的最佳孵育时间取决于所用的细胞系和转染试剂。一般而言,转染效率随脂质体试剂-DNA复合物孵育时间的延长而提高,但孵育时间过长会引起毒性作用,所以需要在一定时间的孵育后离心或使用新鲜培养基稀释,最大程度地减小细胞毒性的影响。不过,升级后的转染试剂(如Lipofectamine 3000试剂)对细胞的作用更温和,转染后无需去除复合物或进行稀释(有关更多信息,请访问thermofisher.com/3000)。

当使用需要添加或更换培养基的阳离子脂质体试剂时,应改变加入复合物后的孵育时间(如30分钟到4小时,甚至过夜),并在此过程中监测细胞形态,尤其是在使用无血清培养基培养细胞时,因为在此条件下一些细胞系会失去活性。

细胞密度

细胞密度也会影响最终的转染效率。要实现转染并最终完成蛋白质生产,需要使DNA在细胞核内沉积,这主要取决于有丝分裂过程中细胞膜的溶解和重建,要求细胞必须处于分裂期。

对于贴壁细胞,通常细胞汇合度为80%时可以获得最高效率,但实验方案推荐的范围一般为40-90%。对于悬浮细胞,我们建议在转染前一天接种细胞,以确保细胞在转染过程中处于最佳的生理状态。总之,细胞最佳密度主要取决于细胞类型和转染试剂毒性,应根据实际经验确定。

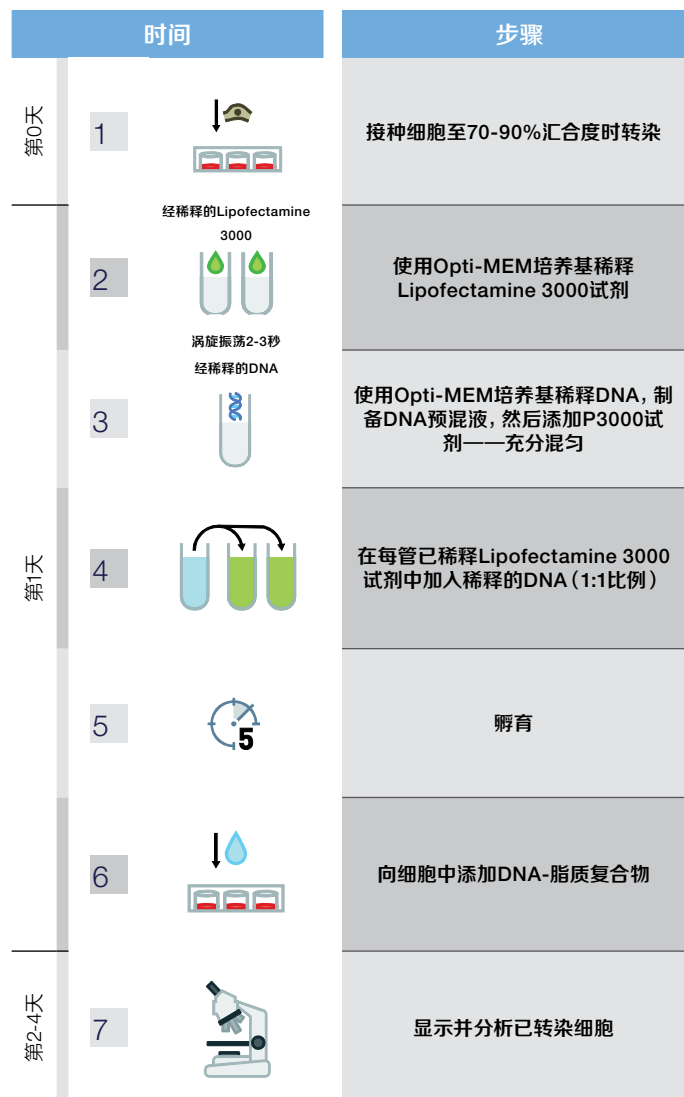


图6.3. 举例：使用Lipofectamine 3000转染试剂的实验方案

质粒DNA转染的优化(续)

电穿孔法的考虑因素

电穿孔法主要取决于三个电参数的组合: 脉冲电压、脉冲宽度和脉冲数量。或许是由于电转不属于化学方法, 它受DNA浓度的影响较小; 但需要的细胞和DNA量是磷酸钙转染的近5倍。一般而言, 每 10^7 个细胞转1-5 μg DNA即可, 此时DNA用量和细胞摄取量呈良好的线性关系。

优化电穿孔参数的目的是找到可以使细胞保持40-80%存活率的脉冲。脉冲宽度由电源的电容决定, 其变化范围取决于产生脉冲的电源电子元件。如果发现细胞死亡过多, 可下调电容, 缩短脉冲宽度。

将细胞置于冰上操作通常可以提高细胞存活率, 从而提高效率, 尤其是在功率较高引起发热的情况下(Potter等人, 1984)。但是, 也有一些细胞系在室温下以低电压/高电容进行电穿孔, 可以获得更高的转染效率(Chu等人, 1991)。

对Neon转染系统, 它已预先设定了18孔和24孔的优化实验方案, 可以在数天内对多种贴壁和悬浮细胞系的电参数进行优化。另外, 也可通过参考有关Neon转染系统对特定细胞系的已有实验数据, 具体请登录在thermofisher.com/neon查看。

稳定转染子的筛选

采用含有选择标记物（如抗生素抗性基因）的质粒进行瞬时转染，从中筛选出稳定转染的细胞。另外，应使用不含选择标记物的DNA转染细胞，作为阴性对照。

开始前

- 确保您使用的细胞系可以从单个分离细胞形成细胞集落，而对于一些需要相互接触才能生长的细胞，可以使用适应性或条件培养基。
- 选择合适的选择标记物（参见第71页的用于真核细胞的选择性抗生素）。
- 根据您的细胞类型选择合适的转染方案。
- 建立剂量反应曲线（杀死曲线），确定您细胞类型的筛选条件（Ausubel等人, 1995）。

杀死曲线

应根据每种细胞类型，以及在每次使用新批次的选择性抗生素时建立杀死曲线。

1. 以大约1:5至1:10的比例（取决于细胞类型和转染后的细胞密度）将汇合细胞分别接种至含有不同浓度的抗生素的培养基中。
2. 孵育细胞10天，每4天（或根据需要）更换一次选择性培养基。
3. 采用合适的方法（如Countess 3自动细胞计数仪、血球计数器或台盼蓝计数）检测培养皿中的活细胞数。
4. 绘制活细胞数与抗生素浓度图，建立杀死曲线，确定杀死未转染细胞所需的最适选择性抗生素浓度。

稳定转染子的筛选

筛选过程

1. 采用合适的方法转染细胞。如果是在单独的载体中加入选择标记物, 则使用含有目的基因的质粒与含有选择标记物的质粒的摩尔比为5:1至10:1。

注: 请使用含选择标记物但不含目的基因的载体进行实验对照。转染后, 如果含对照质粒的细胞形成集落, 但含目的基因质粒的细胞未形成集落, 则表示目的基因可能对细胞致死。另外, 如果转染失败或培养物被污染, 则应重新转染。

2. 转染四十八小时后, 以不同稀释比例的 (如1:100、1:500) 将细胞传代至选择性培养基中。由于处于汇合、非生长状态的细胞对抗生素具有抗性, 因此要实现高效筛选, 应使用处于半汇合状态的细胞。可在软琼脂或96孔板中筛选悬浮细胞进行单细胞克隆。
3. 随后的两周, 每3至4天 (或根据需要) 更换新鲜的选择性培养基。

注: 因为高密度的悬浮细胞会耗尽重要的可溶性生长因子, 降低细胞活性和系统效率, 因此需要频繁更换培养基。

4. 在第二周, 监测存活的“岛状”细胞。根据细胞类型的不同, 具有抗药性的克隆可在2-5周内出现。转染阴性对照质粒的细胞应在3-9天后死亡。
5. 使用克隆环或无菌牙签分离较大的健康集落 (500-1,000个细胞), 继续在选择性培养基中培养 (有关悬浮培养物的克隆分离, 请参见 (Freshney,1993))。
6. 将抗性集落中的单细胞转接至96孔板内, 确认它们可以生长出抗性集落。注意请确保每个孔只含一个细胞。

RNAi策略的选择

常用的两种RNAi导入方法是脂质体转染和病毒转导。确定使用哪种方式取决于所研究的细胞类型，以及希望瞬时还是稳定抑制。最常见的是使用Invitrogen™ Silencer™ Select siRNA或Stealth RNAi™ siRNA进行瞬时转染，它使用的是阳离子脂质体试剂，因为该试剂适用于各种常用的细胞系（请参见第97页的非载体siRNA技术）。

对于难以用脂质体转染的细胞类型，则通常使用病毒载体（参见第99页的载体介导的RNAi）。腺病毒载体在许多细胞类型的瞬时转染效果都很好。而对于稳定RNAi表达或对难转染的细胞系（如非分裂细胞）进行转导，慢病毒载体则更为适合。确定最佳RNAi转染条件的另一种方法是使用我们的转染优化服务，即在病毒载体和非病毒载体输送试剂方面拥有丰富的专业知识，可以测试各种输送参数。

siRNA与基于载体的RNAi 方法比较

siRNA和基于载体的RNAi均可高效地获得功能性失活表型。一般而言，大多数研究人员会选择siRNA，因为siRNA可以快速上手，除了基本的细胞培养技术以外，无需特殊准备。但是，研究人员选择siRNA或基于载体的RNAi的原因也有很多种。

研究人员一般都希望获得尽可能高的转染效率。RNAi应用尤其如此，因为未转染成功的细胞将继续表达靶向抑制的基因，从而提高本底表达水平。

对于许多疾病模型而言，原代细胞是最理想的细胞类型。但是，采用商品化的阳离子脂质体转染试剂无法实现高效转染，所以此时应选择含可表达RNAi序列载体的病毒转染法。该方法适用于难转染的细胞、原代细胞和非分裂细胞。另外，病毒转染法还可用于建立具有诱导型RNAi表达的稳定细胞系，或者组织特异性启动子表达RNAi序列。

细胞类型	瞬时表达		稳定表达
	(< 7天)	(> 7天)	
生长迅速的贴壁细胞 (A549, HeLa)	Silencer Select siRNA或Stealth RNAi siRNA的脂质体转染	RNAi载体的脂质体转染或腺病毒导入	RNAi载体的脂质体转染或慢病毒导入
生长迅速的悬浮细胞 (THP-1)	Silencer Select siRNA或Stealth RNAi siRNA的脂质体转染或电转	RNAi载体的脂质体转染或腺病毒导入	RNAi载体的脂质体转染或电转或慢病毒导入
原代细胞 非分裂细胞	siRNA或RNAi载体的脂质体转染或电转		慢病毒导入

RNAi策略的选择 (续)

非载体siRNA技术

对于瞬时抑制实验, 采用化学合成的非载体方法进行RNAi转染相比基于载体的方法具有明显的优势。因为非载体实验一般更易设计和操作, 可以获得更高水平的瞬时抑制。此外, 目前RNAi设计的改进可增加实现高水平抑制的可能性, 并且只需检测少数RNAi分子。因此, 使用合成RNA双链是最常用的RNAi实验方法。

合成siRNA

用于哺乳动物细胞基因抑制的传统RNAi方法通常使用由两个未经修饰的21-mer寡核苷酸退火形成的RNA双链得到短/小干扰RNA (siRNA)。Invitrogen™ Silencer™ Select siRNA和Stealth RNAi™ siRNA采用专利的化学修饰改善传统双链, 可获得更好的RNAi结果。如需了解更多信息, 请登录thermofisher.com/sirna。

Silencer Select siRNA适用于RefSeq数据库中所有人、小鼠和大鼠基因靶点。这种siRNA采用了高效且经广泛测试的算法设计, 可实现效价和特异性的最大化。每条siRNA均遵照最严格的质量标准合成, 并提供全部序列信息。

Stealth RNA siRNA分子是经化学修饰、长度为25-mer的平末端双链, 它可以被RNA诱导的沉默复合物(RISC)所识别, 从而介导对靶基因的抑制。其专利的化学修饰使Stealth RNAi siRNA能够克服体内实验的诸多障碍, 确保其在体内实验中的高效稳定。

Silencer Select siRNA是最适合体外研究的siRNA, 有各种形式可供选择, 包括预制产品和定制文库, 简化了筛选实验。它们与其他siRNA (修饰和未修饰) 相比, 效价高100倍, 可获得更高比例的“中靶”表型。

miRNA模拟物和抑制剂

miRNA功能分析的方法与蛋白编码基因所使用的相似。用miRNA模拟物转染培养的细胞, 有助于鉴定功能获得性表型; 用Invitrogen™ miRNA抑制剂进行下调或抑制实验, 能用来鉴定功能丧失性表型。上调和下调的组合使用可用于鉴定被特定miRNA调控的基因和细胞的过程。

- Invitrogen™ Pre-miR™ miRNA前体是化学修饰的双链小分子RNA, 与siRNA类似但不相同, 可用于模拟内源性成熟miRNA。
- Invitrogen™ mirVana™ miRNA模拟物是化学修饰的双链小分子RNA, 可以模拟内源性miRNA, 并能够通过上调miRNA活性实现miRNA功能分析。这些分子通过专利的化学修饰灭活星号链, 因此特异性较上一代产品更高。mirVana miRNA模拟物可以单独或作为文库提供。
- Invitrogen™ Anti-miR™ miRNA抑制剂是化学修饰的单链核酸, 可用于特异性地结合并抑制内源性miRNA。
- Invitrogen™ mirVana™ miRNA抑制剂是化学修饰的单链小分子RNA, 可用于特异性地结合并抑制内源性miRNA分子, 并能够通过下调miRNA活性实现对miRNA的功能分析。在最低的miRNA抑制剂浓度下(存在miRNA模拟物), 可以提供最高的体外抑制效价。mirVana miRNA抑制剂可单独或作为文库提供。

由于这些合成分子的体积较小, 较载体更易转染, 能在与siRNA类似的条件下导入细胞。与miRNA表达载体不同, 它们能用于剂量反应研究。

注: Pre-miR miRNA前体并非发夹结构, 不可与pre-miRNA混淆。

	Pre-miR前体	mirVana miRNA模拟物	Anti-miR抑制剂	mirVana miRNA抑制剂
功能	模拟内源性miRNA	模拟内源性miRNA	抑制内源性miRNA	抑制内源性miRNA
实验目的	功能获得(体内或体外)	功能获得(体内或体外)	功能丧失(体内或体外)	功能丧失(体内或体外)
序列数据库	100%覆盖miRBase v15*	100%覆盖miRBase v19**	100%覆盖miRBase v15*	100%覆盖miRBase v19**
模型系统	体外	体外和体内	体外	体外和体内
包括的属种	人	人、小鼠、大鼠(其他种属: 使用定制工具)	人	人、小鼠、大鼠(其他种属: 使用定制工具)
定制设计工具	GeneAssist miRNA搜索及设计工具	GeneAssist miRNA搜索及设计工具	GeneAssist miRNA搜索及设计工具	GeneAssist miRNA搜索及设计工具
miRNA文库	预先设计或定制文库	预先设计或定制文库	预先设计或定制文库	预先设计或定制文库
备注说明	全新设计, 脱靶效应最小化	新一代化学试剂可实现最低的脱靶效应	通过化学修饰提供高效率	新一代化学试剂可实现最高的效率

*1,090种不同的人源序列。

**2,019种不同的人源序列。

RNAi策略的选择 (续)

siRNA转染 采用siRNA转染试剂可以将siRNA轻松导入细胞内。siRNA分子进入哺乳动物细胞后参与合成RNA诱导沉默复合物 (RISC)。在siRNA反义链的引导下, RISC可以降解目的mRNA, 抑制其翻译, 然后通过分析检测RNAi活性。一般同时设置对照, 对RNAi结果进行比较。

RNAi的成功取决于导入适量的siRNA, 达到最好的预期结果, 但要做到精确十分困难。siRNA脱靶效应会导致细胞死亡, 并影响实验数据分析。研究人员一直致力于寻找更好的siRNA设计和导入方法。

转染方法	载体	转染效率	转染效率	说明
Lipofectamine RNAiMAX试剂	 	极佳	极佳	最高效地siRNA/miRNA转染试剂可实现高效的基因抑制
Lipofectamine 3000试剂	   	极佳	极佳	最高效的通用型试剂, 适用于各种细胞类型, 包括难转染的细胞
Lipofectamine 2000试剂	   	高	高	高效的通用型试剂, 适用于各种常见细胞类型
Neon电穿孔法	   	最佳	良好	适合所有细胞系

图例

符号	解释	符号	解释	符号	解释	符号	解释
	DNA, 用于蛋白质、shRNA和miRNA表达		mRNA, 用于蛋白质表达		非编码RNA, 用于RNAi基因表达抑制		共转染, 用于RNAi载体和siRNA共转染

基于载体的RNAi 对于采用脂质体难转染的细胞类型 (如难转细胞、原代细胞和非分裂细胞), 通常可使用含RNAi表达框的病毒载体。另外, 病毒导入也可用于建立具有诱导型RNAi表达的稳定细胞系, 或者组织特异性启动子表达RNAi序列。腺病毒载体适用于多种细胞类型的瞬时转染, 但对于分裂和非分裂细胞的稳定转染, 则首选慢病毒。

Invitrogen™ BLOCK-iT™腺病毒RNAi 表达系统通过构建并导入复制缺陷型腺病毒, 在绝大多数分裂或非分裂哺乳动物细胞类型和动物模型中瞬时表达shRNA, 用于RNAi分析。它的主要优点是Gateway重组技术可简化腺病毒载体的克隆和构建, 避免了其他腺病毒载体所需的繁琐耗时的处理、筛选和多次转化。

Invitrogen™ BLOCK-iT™慢病毒RNAi表达系统可以构建并导入经过改造的shRNA和miRNA至分裂和非分裂哺乳动物细胞中, 包括原代和难以转染的细胞。该系统可不进行筛选用于瞬时RNAi分析, 或者使用适当的抗生素筛选, 用于生成稳定的细胞系, 进行长期基因抑制研究。

Invitrogen™ BLOCK-iT™慢病毒Pol II miR RNAi表达系统将Invitrogen™ BLOCK-iT™ Pol II miR RNAi和ViraPower™慢病毒技术相结合, 可以构建并稳定转染经过改造的miRNA至非分裂细胞、原代细胞和难以转染的细胞中。表达载体中的Pol II启动子可实现多个miRNA的顺反子共表达, 用单个载体对多个靶点进行抑制, 该过程适用于多种通路组分或剪接变异体的抑制, 或者利用基因抑制构建合成表型。

BLOCK-iT慢病毒Pol II miR RNAi表达系统 (带EmGFP) 可提供BLOCK-iT慢病毒Pol II miR RNAi表达系统具备所有组件和优点, 另外还可以利用共表达顺反子EmGFP轻松实现表达追踪。ViraPower HiPerform版本的表达载体含有mRNA稳定元件 (WPRE) 和细胞核导入序列 (cPPT), 可以获得5倍的病毒滴度。

Invitrogen™ BLOCK-iT™可诱导H1慢病毒RNAi系统是一套完整的慢病毒系统, 可在几乎任何细胞类型中用于长期诱导型或组成型shRNA的表达。利用四环素操纵子 (TetO2) 序列调控长期诱导型, 可对包括必需基因在内的各种基因在不同时间的研究以及功能丧失实验; 它提供了一种极佳的控制系统, 可用于检测基因功能恢复过程中表型的变化。

病毒系统	何时使用
腺病毒RNAi导入	- 高水平的瞬时shRNA表达 - 高效导入至各种类型的人源细胞 - 动物模型研究
慢病毒RNAi导入	- 各种细胞系中的RNAi稳定表达, 特别是非分裂细胞, 包括干细胞、淋巴细胞和神经元 - 诱导型或组成型shRNA或miR RNAi表达 - 动物模型研究

RNA转染指导原则

RNA转染是经典转染技术的一个分支, 可以将RNA导入至细胞内。RNA转染的目的类似于质粒转染, 即将mRNA导入细胞内, 表达编码蛋白, 并研究基因功能和调控。siRNA适用于RNAi研究, 检测基因抑制的效果。两种方法的主要区别在于, RNA仅适用于瞬时转染。

RNAi工作流程 下图显示了siRNA设计和合成完成后的RNAi实验流程。进行RNAi实验时, 确保已准备好下列材料:

- 转染/电转试剂和实验方案
- 评估抑制及其他RNAi效果的分析方法
- 阳性和阴性对照siRNA
- 两条或两条以上靶向目的基因的siRNA

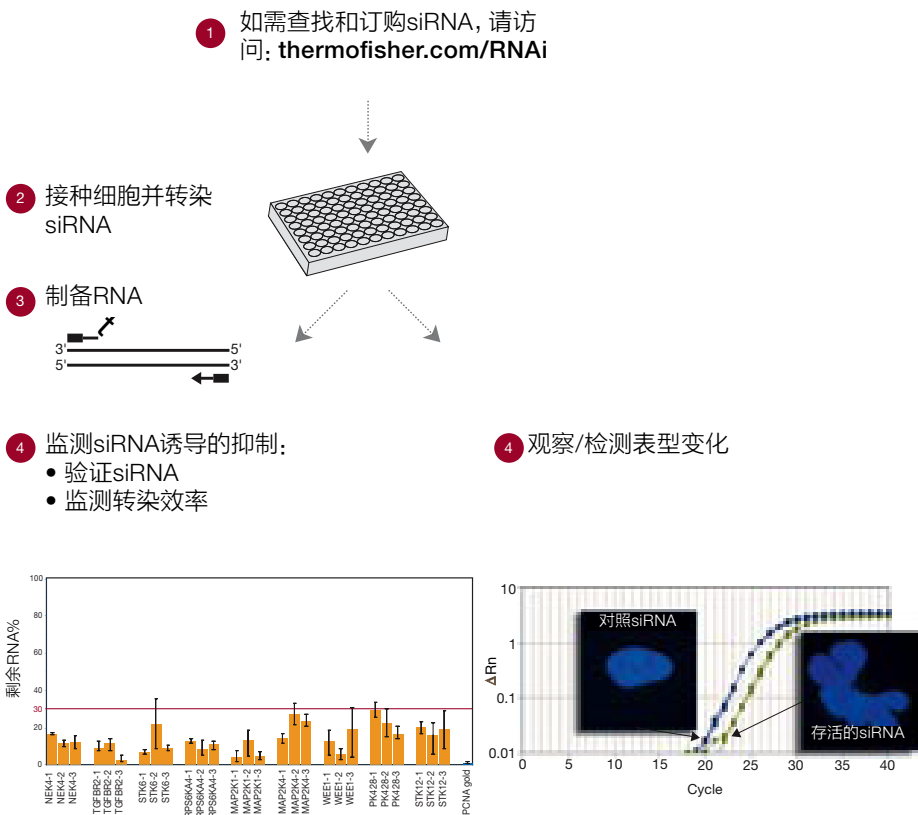


图6.4. siRNA设计和合成完成后的RNAi实验流程

RNA处理 RNA寡核苷酸在操作过程中极易受到外源性核糖核酸酶的作用而降解。

- 处理RNA时请佩戴手套
- 制备用于转染的RNA时应使用不含RNA酶的试剂、试管和移液器吸头
- 应使用70%乙醇或其他RNA酶去污剂溶液（例如Invitrogen™ RNaseZap™ RNase 去污溶液）擦拭工作区

转染效率 哺乳动物细胞中的siRNA转染效率因细胞类型和所用的转染试剂的不同而异。这意味着必须根据经验确定转染时的最佳浓度。影响siRNA转染效率的主要因素包括：

- 转染试剂类型和用量
- 孔中的细胞数
- RNA或siRNA的类型
- RNA或siRNA的浓度

阳性对照 每个实验必须包括阳性对照。阳性对照应能够在研究分析细胞时具有检测的可重复性。如果您观察到该对照在预定阈值水平之上/下具有最大效应，则表示同一天的其他实验的测量结果均可靠。请注意，必须根据经验确定每种分析方法和对照的阈值。

针对特定RNA或siRNA的响应度与其转染效率直接相关。为评估转染效率，我们推荐在每个实验中使用Invitrogen™ BLOCK-iT™ 荧光寡核苷酸。在转染实验中使用BLOCK-iT 荧光寡核苷酸，您可以利用荧光显微镜和标准FITC滤光片组轻松评估寡聚体的吸收和转染效率。 $\geq 80\%$ 的细胞吸收荧光寡聚体即代表高转染效率。

RNA转染指导原则 (续)

阴性对照 阴性对照与阳性对照同样重要, 有助于获得可信结果。转染时应包括至少一条等摩尔量的阴性对照, 用于比对靶RNA或siRNA处理和对照处理细胞的效果。上述重要的对照数据可用作靶点抑制评估实验的基线。

未转染或仅含细胞的阴性对照同样十分重要。通过比较未转染细胞和转染含非靶向RNA细胞中看家基因的表达, 可获得转染本身对细胞活性影响的有效信息。

对照类型	建议用途	推荐产品
转染对照	利用荧光计算并监测转染效率	• BLOCK-iT Alexa Fluor红色荧光对照 • BLOCK-iT荧光寡核苷酸
阴性对照	利用非特异性或错序对照检测抑制水平及背景	• Silencer Select阴性对照siRNA • Stealth RNAi siRNA阴性对照 • Silencer阴性对照siRNA
阳性对照	利用已知可以获得高抑制水平的RNAi试剂检测导入效果, 并优化实验条件	• Silencer Select GAPDH阳性对照siRNA • Stealth RNAi siRNA阳性对照 • Silencer阳性对照siRNA
未转染的对照	检测正常基因表达水平和基因型	
针对同一靶点的多条RNAi序列	用于验证表型变化, 控制脱靶效应, 生成可供发表的实验结果	
RNAi滴定	采用最低的效率水平, 避免改变细胞的正常过程	
回补实验	关闭可诱导的RNAi或导入表达靶mRNA但不影响RNAi序列的质粒	采用诱导型启动子的BLOCK-iT Pol II miR RNAi或BLOCK-iT shRNA载体 (分别为CMV/TO和H1/TO)

共转染 当用户想要同时导入siRNA和用于蛋白表达的质粒至细胞时, 可使用共转染。该蛋白可以是检测系统的一部分, 或者在更多情况下可用作报告基因 (荧光素酶、GFP、β-内酰胺酶)。某些情况下, 用户可能想要表达突变蛋白及siRNA, 利用siRNA阻断某个通路, 使突变蛋白过表达。

当使用脂质体转染试剂时, 质粒可能会降低共转染 (质粒和siRNA) 的转染效率, 因此转染优化十分重要。如果脂质体过多会引起非预期的非特异性细胞死亡; 或者如果转染条件不合适, 会导致较低的基因抑制或蛋白表达。

siRNA质量

siRNA的质量会对RNAi实验产生重要影响。siRNA须不含合成试剂残留，如乙醇、盐和蛋白质。此外，长度超过30 bp的dsRNA污染物可以通过激活非特异性的干扰素反应改变基因表达，引起细胞毒性（Stark等人，1998）。因此，我们推荐使用标准纯度超过80%全长siRNA。

siRNA的储存

将siRNA置于-20°C或-80°C保存，但切勿储存于无霜冰箱内。我们的数据显示，50次以下的反复冻融不会对100 μM的siRNA溶液产生不利影响（采用质谱和分析HPLC评估）。但是，我们建议将重悬于不含RNA酶的水或缓冲液中的siRNA进行分装保存，以避免出现污染。

siRNA的核酸酶抗性

尽管退火的双链siRNA对核酸酶的抗性远高于单链RNA，但在RNAi整个实验过程中都应采用严格的无RNA酶技术。

检查siRNA是否降解

如果您怀疑制备好的siRNA可能被降解，可以取约2.5 μg进行15-20%非变性丙烯酰胺凝胶电泳，检查siRNA的完整性。另外，可采用溴化乙锭染色法显示RNA，确认其是否为预期大小和强度。siRNA应呈现紧凑的条带；条带模糊表示有降解现象。

siRNA的用量

siRNA的最佳用量及其引起基因沉默的能力在某种程度上受靶基因产物性质的影响，包括：mRNA位置、稳定性、丰度以及靶蛋白的稳定性和丰度。

尽管许多siRNA实验的细胞转染量仍为100 nM siRNA，但公开发表的研究结果显示，转染较低浓度的siRNA可降低siRNA引起的脱靶效应（Jackson等人，2003；Semizarov等人，2003）。脂质体介导的反向转染一般只需10 nM siRNA即可（范围为1-30 nM）。采用电穿孔进行siRNA转染时，siRNA用量引起的效果差异不明显，但一般1 μg/50 μL的细胞（1.5 μM）与siRNA的使用比例在0.5-2.5 μg/50 μL细胞或0.75-3.75 μM即可。

值得注意的是，siRNA过多会引起脱靶或细胞毒性效应，siRNA过少则可能会降低靶基因表达水平。由于其中涉及的变量过多，因此需要针对每种细胞系优化siRNA用量。此外，非靶向的siRNA阴性对照的用量应与实验组siRNA相同。

RNA转染指导原则 (续)

转染试剂的体积

转染试剂的体积是一个重要的优化参数, 体积过少会限制转染, 过多则会引起毒性。最终转染效率受与siRNA结合的转染试剂量的影响。在优化时, 可以在较宽的浓度范围内对转染试剂进行滴定, 选择浓度最低但仍能提供良好的基因抑制效果的浓度。另外, 对每种细胞系都应该分别优化确定最优体积。

细胞密度

在传统的预接种转染实验中, 细胞密度十分重要, 但采用反向转染导入siRNA时, 细胞密度的影响较低, 所以一般无需优化。但是, 如果使用的细胞过多, 而不相应增加siRNA用量, 则样本中的siRNA浓度可能会过低, 无法实现高效的基因沉默。相反当细胞密度过低时, 则培养物会变得不稳定, 且这种不稳定性会因孔而异, 因为多孔板中各孔间的培养条件 (如pH、温度) 会存在差异。

细胞在转染试剂/siRNA复合物中的暴露

尽管大多数转染试剂都尽可能地减少细胞毒性, 但细胞暴露在过多转染试剂中或暴露时间过长均会危害细胞培养物的整体健康。敏感细胞暴露在转染试剂中几个小时后即开始死亡。如果转染会引起过多细胞死亡, 则应在8-24小时后去除转染混合物, 补充新鲜培养基。

转染过程中血清的存在

转染试剂和siRNA复合物的形成应在减血清或无血清培养基中进行, 以避免血清组分对转染的影响。但一旦当复合物形成, 一些转染试剂则允许使用含有血清的正常培养基进行转染 (遵循生产商的说明)。转染后无需加入培养基或更换培养基, 但某些情况下, 更换培养基可以获得更好的结果 (甚至在使用血清相容性试剂时)。在使用特定的试剂之前, 应确定其血清相容性。一些转染试剂在转染过程中需要使用无血清培养基, 在与转染复合物完成初始孵育后再更换为完全培养基。

siRNA实验成功的技巧

1. 针对每个基因设计并检测二至四条siRNA序列。切勿自行设计siRNA, 可登录 thermofisher.com/sirna, 采用最佳设计算法设计您的siRNA。
2. 避免RNA酶。极微量的核糖核酸酶也会影响siRNA实验。整个实验室环境中都会存在RNA酶, 包括您的皮肤上、空气中以及未戴手套的手触及的任何地方或者与空气接触的所有物品, 因此需要采取适当的操作防止并去除RNA酶污染。我们可提供用于检测并去除RNA酶的全套产品。
3. 保持细胞培养物的健康, 遵循严格的实验方案, 获得良好的转染重复性。一般而言, 健康细胞的转染效率会高于状态不佳的细胞。使用传代次数较少的细胞, 可以确保不同实验之间连续细胞系的不稳定性最低化。进行优化实验时, 我们建议使用转染50代以内的细胞, 因为细胞的转染效率会随传代数增加而下降。
4. 避免使用抗生素。在平板接种过程中以及转染后72小时内, 避免使用抗生素, 因为抗生素会在透化处理的细胞中积聚产生毒性。此外, 一些细胞和转染试剂需要在无血清的条件下才能达到最佳的siRNA输送效果。我们建议您采用标准培养基和无血清培养基进行转染预实验, 确定最佳转染条件。
5. 使用优化的试剂转染siRNA。根据您的细胞类型, 使用优化的siRNA转染试剂和实验方案, 因为选择合适的转染试剂是siRNA实验成功的关键。必须使用专用的转染试剂来导入小RNA (大多数商品化的转染试剂是针对较大的质粒DNA而非小RNA分子设计的)。此外, 我们还开发了一些专用于特定细胞系转染的试剂, 而其他试剂的特异性范围更广。如需了解更多转染试剂选择指南, 请参见第100页的siRNA转染。
6. 使用适当的阳性对照进行转染和实验条件的优化。看家基因是适合大多数细胞类型的阳性对照。可以用不同浓度的siRNA转染你的阳性对照和siRNA靶向细胞来优化转染条件。待转染48小时后, 检测和未转染的细胞相比, 对照蛋白或mRNA的降低水平。过多的siRNA会导致细胞毒性和细胞死亡。为了使用方便, 我们提供了针对各种基因靶点的阳性对照siRNA (参见第103页)。

RNA转染指导原则(续)

7. 使用阴性对照siRNA鉴别非特异性的影响(参见第104页)。可以通过打乱大多数活性siRNA的核苷酸序列设计阴性对照。但应进行同源性比对,确保阴性对照序列与待研究的生物体基因组无同源性。
8. 使用带标记的siRNA优化实验方案。荧光标记的siRNA可用于siRNA稳定性和转染效率分析。标记siRNA还可用于研究siRNA亚细胞定位,以及在双标记实验中(利用标记抗体)观察成功转染siRNA的细胞并将转染与靶蛋白下调相关联。

siRNA转染优化

siRNA转染效率的影响因素

使转染效率最大化和细胞毒性最小化是实现最佳基因沉默的关键。与siRNA诱导的基因抑制和细胞活性之间的平衡类似, siRNA转染与下游表型分析条件之间也存在平衡关系。需要根据不同的下游分析应用重新优化siRNA转染条件。通过鉴别下列因素,可在各种细胞类型中获得最佳转染效率(按重要性排序):

1. 转染试剂的选择
2. 转染试剂的体积
3. siRNA用量
4. 转染时的细胞密度
5. 细胞暴露在转染试剂/siRNA复合物中的时长
6. 转染方法: 传统转染(预接种细胞)或反向转染(在细胞贴壁时转染)
7. 是否存在血清

确定好某种细胞类型的最佳基因沉默条件后,应在实验中保持该条件不变。

附录

故障排除

下表列出了在细胞培养实验中可能遇到的一些疑难问题以及解决方案。需要注意的是, 这个表格只包含细胞培养中最常遇到的问题, 而且仅提供指导原则作为解答。为了提高评估结果的体验, 我们建议您阅读产品随附的手册和信息表, 以及有关实验工作的文献和书籍。

问题	原因	解决方案
细胞储存液解冻后没有活细胞	细胞储存不正确	获取新的细胞储存液并储存在液氮中。将细胞保存在液氮中, 然后等待解冻。
	自制冷冻细胞储存液中没有活细胞	按照供应商推荐的密度对细胞进行冷冻。
		使用低传代细胞制作冷冻细胞储存液。
		严格按照供应商推荐的程序冷冻细胞。请注意, 本手册中推荐的冷冻程序为一般程序, 仅供参考。
	细胞解冻不正确	获取新的细胞储存液。
		严格按照供应商推荐的程序解冻细胞。请注意, 手册中推荐的解冻程序为一般程序, 仅供参考。
	培养基解冻不正确	确保快速解冻冷冻细胞, 但接种前需要使用预热的生长培养基缓慢稀释。
	细胞稀释过度	使用供应商推荐的培养基。确保培养基已预热。
	细胞处理过程不够轻柔	按照供应商推荐的密度接种解冻后的细胞, 优化回收率。
细胞生长缓慢	冷冻培养基中使用的甘油在光照条件下储存 (如适用)	大多数细胞在冷冻和解冻时均受到外力作用。移出细胞时, 请勿涡旋、敲打培养瓶, 或高速离心细胞 (昆虫细胞培养除外)。
	生长培养基不正确	如果储存在光照条件下, 甘油会转化为丙烯醛, 对细胞有毒。获取新的细胞储备液。
	生长培养基中的血清质量不良	使用供应商推荐的培养基, 使用前预热。
	细胞传代次数过多	使用不同批次的血清。
	细胞生长超出所需汇合度	使用健康、传代次数少的细胞。
	培养物被支原体污染	处于对数期的哺乳动物细胞, 在达到融合度前便进行传代。
		丢弃细胞、培养基和试剂。获取新的细胞储备液, 并与新制备的培养基和试剂一起使用。

细胞培养和转染产物

我们为您的细胞培养实验提供各种原代培养物和现成的细胞系，以及试剂、培养基、血清和生长因子。下表列出一部分Thermo Fisher Scientific可为您提供的常见细胞系和其他细胞培养产品。有关我们产品的更多信息，请访问 thermofisher.com/cellculture。

细胞系

除以下列出的哺乳动物和昆虫细胞系外，我们还提供原代哺乳动物细胞和完整的细胞培养系统，包括角质形成细胞、成纤维细胞、黑色素细胞、肝细胞、角膜和乳腺上皮、大血管和微血管内皮、平滑肌和神经元细胞培养系统。有关细胞、技术资源和相关技术的完整列表，请访问 thermofisher.com/primarycells。

产品	规格	货号
哺乳动物细胞系		
Expi293F细胞	1小瓶	A14527
Expi293F细胞 (cGMP保存)	1小瓶	100044202
ExpiCHO-S细胞	1小瓶	A29127
ExpiCHO-S细胞 (cGMP保存)	1小瓶	A37785
Expi293F GnTI细胞	1小瓶	A39240
Expi293F诱导细胞	1小瓶	A39241
Expi293F诱导GnTI细胞	1小瓶	A39242
FreeStyle 293-F细胞	1 mL	R79007
293-F细胞, SFM适应 (7.5×10^6 个细胞)	1.5 mL	11625-019
293-H细胞, SFM适应 (7.5×10^6 个细胞)	1.5 mL	11631-017
293FT细胞系	3×10^6 个细胞	R700-07
293A细胞系	3×10^6 个细胞	R705-07
GripTite 293 MSR细胞系	1套	R795-07
CHO DG44细胞 (cGMP保存) 和培养基试剂盒	1套	A11000-01
昆虫细胞系		
ExpiSf9细胞	1小瓶	A35243
Sf9细胞 (SFM适应) (1.5×10^7 个细胞)	1.5 mL	11496-015
Sf21细胞 (SFM适应) (1.5×10^7 个细胞)	1.5 mL	11497-013
Mimic Sf9昆虫细胞 (1×10^7 个细胞)	1 mL	12552-014
在Sf-900 III SFM中适应的Sf9细胞 (1.5×10^7 个细胞)	1小瓶	12659-017
在Sf-900 III SFM中适应的Sf21细胞 (1.5×10^7 个细胞)	1小瓶	12682-019
Sf9冷冻细胞 (Grace's培养基) (1×10^7 个细胞)	1 mL	B825-01
Sf21冷冻细胞 (Grace's培养基) (1×10^7 个细胞)	1 mL	B821-01
High Five细胞, 在Express Five SFM中驯化 (3×10^6 个细胞)	1 mL	B855-02

用于哺乳动物细胞培养的培养基

Gibco™细胞培养基可支持多种哺乳动物细胞系的生长。Thermo Fisher Scientific 提供的所有细胞培养基产品均经过污染检测，并保证满足质量、安全性、一致性和监管合规性要求。除了下文列出的培养基外，我们还提供多种无血清和专用培养基，用于原代细胞、已建立的细胞系和干细胞，以及用于病毒生产、蛋白质表达、干细胞分化和细胞遗传学研究。有关细胞培养基的更多信息和完整列表，请访问 thermofisher.com/media。

产品*	规格**	货号
BenchStable DMEM	500 mL	A4192101
BenchStable DMEM/F-12	500 mL	A4192001
BenchStable MEM	500 mL	A4192201
BenchStable RPMI 1640	500 mL	A4192301
DMEM (1X), 液体 (高葡萄糖, 不含谷氨酰胺)	10 × 500 mL	35053-036
DMEM (1X), 液体 (低葡萄糖, 不含谷氨酰胺)	500 mL	11054-020
DMEM (1X), 液体 (高葡萄糖, 含GlutaMAX-I)	10 × 500 mL	10564-029
DMEM (1X), 液体 (低葡萄糖, 含GlutaMAX-I)	10 × 500 mL	10567-022
Advanced DMEM (1X), 液体 (高葡萄糖, 不含谷氨酰胺)	10 × 500 mL	12491-023
DMEM/F-12, 液体, 1:1 (含GlutaMAX-I)	10 × 500 mL	10565-042
DMEM/F-12, 液体, 1:1 (含L-谷氨酰胺)	10 × 500 mL	11320-082
Advanced DMEM/F-12, 液体, 1:1 (不含谷氨酰胺)	10 × 500 mL	12634-028
最低必需培养基 (MEM) (1X), 液体 (不含谷氨酰胺)	10 × 500 mL	11090-099
最低必需培养基 (MEM) (1X), 液体 (含GlutaMAX-I)	10 × 500 mL	41090-101
Advanced MEM (最低必需培养基) (1X), 液体 (不含谷氨酰胺)	10 × 500 mL	12492-021
RPMI培养基1640 (1X), 液体 (不含谷氨酰胺)	1,000 mL	21870-084
RPMI培养基1640 (1X), 液体 (含GlutaMAX-I)	10 × 500 mL	61870-127
Advanced RPMI培养基1640 (1X), 液体 (不含谷氨酰胺)	10 × 500 mL	12633-020
杂交瘤-SFM	1 L	12045076
Expi293表达培养基	1 L	A1435101
293 SFM II, 液体	1,000 mL	11686-029
CD 293培养基, 液体	1,000 mL	11913-019
FreeStyle 293表达培养基	1,000 mL	12338-018
ExpiCHO表达培养基	1 L	A2910001
CD CHO培养基 (1X), 液体	1,000 mL	10743-029
CHO-S-SFM II	1,000 mL	12052-098
Freestyle CHO表达培养基	1,000 mL	12651-014
CD OptiCHO培养基 (1X), 液体	1,000 mL	12681-011
Recovery细胞培养冻存培养基, 液体	50 mL	12648-010
Synth-a-Freeze冻存培养基	50 mL	R-005-50

*表中列出的大多数培养基含有Gibco™ L-谷氨酰胺、GlutaMAX™-I添加剂。但也有一部分培养基不含谷氨酰胺。有的培养基含有酚红，有的则不含。这些培养基也可以粉末和液体的形式提供。

**还可提供其他规格和包装尺寸产品。

细胞培养和转染产物 (续)

用于昆虫细胞培养的培养基 异源蛋白质的表达通常选用昆虫细胞培养。对于大规模生产或基础研究而言，昆虫细胞能够表达大量具有复杂翻译后修饰的蛋白质。Thermo Fisher Scientific提供的Gibco™昆虫培养基可促进蛋白质最大程度生长和最高产量。获取更多信息，请访问 thermofisher.com/insectcellculture。

产品*	规格**	货号
ExpiSf CD培养基	1 L	A3767802
Grace's昆虫细胞培养基, 无添加剂 (1X), 液体	500 mL	11595-030
Grace's昆虫细胞培养基, 含添加剂 (1X), 液体	500 mL	11605-094
SF-900 II SFM (1X), 液体	500 mL	10902-096
SF-900 III SFM (1X), 液体	500 mL	12658-019
Schneider果蝇培养基 (1X), 液体	10 × 500 mL	11720-067
IPL-41昆虫培养基 (1X), 液体	1,000 mL	11405-081
Express Five SFM (1X), 液体	1,000 mL	10486-025

*本表中列出的大多数培养基均以粉末和液体的形式提供。

**还可提供其他规格和包装尺寸产品。

细胞培养血清产品 我们提供多种用于细胞培养的Gibco™动物血清，包括牛血清和非牛血清，其中胎牛血清 (FBS) 用途最广。下表列出了Thermo Fisher Scientific提供的部分血清产品。请访问thermofisher.com/fbs了解有关血清使用、来源、可追溯性、收集和灌装 的详细列表和信息。

产品*		规格**	货号
特级胎牛血清	胎牛血清, 特级	500 mL	A4766801
特级胎牛血清	胎牛血清, 经过认证, One Shot形式, 美国	10 × 50 mL	A3160402
	胎牛血清, 经过认证, 美国	500 mL	16000044
特殊用途胎牛血清	活性炭处理的胎牛血清(Charcoal Stripped FBS)	500 mL	12676029
	超低胎牛血清(Ultra-Low FBS)	500 mL	16250078
	透析胎牛血清(Dialyzed FBS)	500 mL	26400044
	胚胎干细胞专用的胎牛血清	500 mL	16141079
	MSC专用的胎牛血清	500 mL	12662029
	已去除分泌体的胎牛血清(Exosome-Depleted FBS)	500 mL	A2720801
	四环素调控系统专用胎牛血清(Tet-System Approved FBS)	500 mL	A4736401
Value Plus FBS	胎牛血清, 经验证, One Shot形式, 美国	10 × 50 mL	A3160502
	胎牛血清, 经验证, 美国	500 mL	26140079
Value FBS	胎牛血清, 经验证, One Shot形式, USDA认可的地区	10 × 50 mL	A3160602
	胎牛血清, 经验证c, USDA认可的地区	500 mL	10437028
	胎牛血清, 经验证, One Shot形式, 加拿大	10 × 50 mL	A3160702
	胎牛血清, 经验证, 加拿大	500 mL	12483020

*为了确保供应，我们从美国、新西兰、澳大利亚和其他符合USDA进口要求的国家/地区采购FBS。所有其他血清产品的来源均采购自新西兰，但免血清除外，因为采购自美国。

**除不同规格和包装尺寸外，还提供热灭活和特殊用途胎牛血清。

细胞培养塑料耗材

Thermo Scientific™ Nunc™细胞培养产品已被世界各地的实验室研究人员使用了超过60年。我们非常自豪能够提供始终如一的高质量产品，来帮助您得到最具可重现性和最可靠的研究结果。我们的产品仅使用符合《美国药典》VI级测试的高质量原材料制造而成。我们的大多数细胞培养产品都用来源可靠的Gibco™培养基做过测试，以确保多种细胞系都能良好生长。敬请访问thermofisher.com/cellcultureplastics，您可根据表面处理工艺选择产品，并查看完整的产品组合。

产品*	规格	货号
Nunc EasYDish培养皿 (直径35 mm×高13 mm)，表面经过Nuncclon Delta细胞培养物处理	500	150460
Nunc EasYDish培养皿 (直径60 mm×高16 mm)，表面经过Nuncclon Delta细胞培养物处理	280	150462
Nunc EasYDish培养皿 (直径100 mm×高17 mm)，表面经过Nuncclon Delta细胞培养物处理	150	150464
Nunc EasYDish培养皿 (直径100 mm×高21 mm)，表面经过Nuncclon Delta细胞培养物处理	240	150466
Nunc EasYDish培养皿 (直径150 mm×高21 mm)，表面经过Nuncclon Delta细胞培养物处理	80	150468
Nunc EasYFlask (培养面积25 cm ²)，经Nuncclon Delta认证	200	156367
Nunc EasYFlask (培养面积75 cm ²)，经Nuncclon Delta认证	100	156499
Nunc EasYFlask (培养面积175 cm ²)，经Nuncclon Delta认证	30	159910
Nunc EasYFlask (培养面积225 cm ²)，经Nuncclon Delta认证	30	159934
Nunc6孔细胞培养多孔皿，经Nuncclon Delta认证	75	140675
Nunc24孔细胞培养多孔皿，经Nuncclon Delta认证	75	142475
Nunc96孔细胞培养多孔皿，经Nuncclon Delta认证	50	167008
Nunc Edge 96孔细胞培养微孔板，经Nuncclon Delta认证	50	167425
Nunc Nuncclon Sphera 96孔U型底3D细胞培养微孔板	8	174925
Nunc96孔微孔板，经Nuncclon Delta认证，黑色	50	137101
Nunc96孔微孔板，经Nuncclon Delta认证，白色	50	136101
1 mL，单独包装，去除纸/塑料包装，已堵住孔	1,000	170353N
2 mL，单独包装，去除纸/塑料包装，已堵住孔	500	170354N
5 mL，单独包装，去除纸/塑料包装，已堵住孔	200	170355N
10 mL，单独包装，去除纸/塑料包装，已堵住孔	200	170356N
25 mL，单独包装，去除纸/塑料包装，已堵住孔	200	170357N
50 mL，单独包装，去除纸/塑料包装，已堵住孔	100	170358N
Nunc 15 mL锥形离心管，散装	500	339650
Nunc 15 mL锥形离心管，架	500	339651
Nunc 50 mL锥形离心管，散装	500	339652
Nunc 50 mL锥形离心管，架	300	339653
Nunc Lab-Tek培养腔室玻片，4孔	96	177399
Nunc Lab-Tek培养腔室玻片，8孔	96	177402
Nunc Lab-Tek腔室盖玻片，4孔	96	155383
Nunc Lab-Tek腔室盖玻片，8孔	96	155411
Nunc Lab-Tek II培养腔室玻片，4孔	96	154526
Nunc Lab-Tek II培养腔室玻片，8孔	96	154534
Nunc Lab-Tek II腔室盖玻片，4孔	96	155382
Nunc Lab-Tek II腔室盖玻片，8孔	96	155409

细胞培养和转染产物 (续)

用于细胞培养的实验室试剂

下表列出了部分Thermo Fisher Scientific为实验室提供的细胞培养试剂。更多信息和完整列表, 请访问 thermofisher.com/culturereagents.

产品	规格*	货号
平衡盐溶液: D-PBS**、EBSS、HBSS†、PBS		
Dulbecco's磷酸盐缓冲液 (D-PBS) (1X), 液体	1,000 mL	14040-117
Earle's 平衡盐溶液 (EBSS) (1X), 液体	500 mL	14155-063
Hank's 平衡盐溶液 (HBSS) (1X), 液体	1,000 mL	14025-076
磷酸盐缓冲液 (PBS) pH值7.4 (1X), 液体	500 mL	10010-023
磷酸盐缓冲液 (PBS) pH值7.2 (1X), 液体	500 mL	70013-032
缓冲液和化学品		
HEPES缓冲液 (1M)	20 × 100 mL	15630-130
碳酸氢钠溶液, 7.5% (w/v)	100 mL	25080-094
细胞解离试剂		
含酚红的TrypLE Express细胞解离试剂	500 mL	12605-028
不含酚红的TrypLE Express细胞解离试剂	100 mL	12604-013
TrypLE Select细胞解离试剂	500 mL	12563-029
胰蛋白酶, 0.5% (10X), 液体, 含EDTA, 不含酚红	100 mL	15400-054
胰蛋白酶, 0.25% (10X), 液体, 不含EDTA, 含酚红	500 mL	15050-057
胶原酶I型	1 g	17100-017
胶原酶II型	1 g	17101-015
分散酶	5 g	17105-041
胰蛋白酶抑制剂, 大豆	1 g	17075-029
添加剂		
L-谷氨酰胺**, 200 mM (100X), 液体	100 mL	25030-081
GlutaMAX-I添加剂	100 mL	35050-061
D-葡萄糖 (右旋糖)	1 kg	15023-021
Pluronic F-68, 10% (100X)	100 mL	24040-032
MEM氨基酸溶液 (50X), 液体	100 mL	11130-051
MEM非必需氨基酸溶液10 mM (100X), 液体	100 mL	11140-050
MEM丙酮酸钠溶液10 mM (100X), 液体	100 mL	11360-070
MEM维生素溶液 (100X), 液体	100 mL	11120-052
2-巯基乙醇 (1,000X), 液体	50 mL	21985-023
CHO CD EfficientFree试剂盒	1套	A10241-01
FoamAway 经辐照的AOF (非动物源性) 消泡剂	500 mL	A1036902

*还可提供其他规格和包装尺寸产品。

**也可以液体和粉末形式提供。

†HBSS可以含或不含镁和钙以及酚红。

抗生素和抗真菌剂

抗生素用于保护细胞培养物的完整性、细胞系的选择和细胞系构建。我们提供多种抗生素、抗真菌剂和检测试剂盒。更多信息请访问thermofisher.com/antibiotics。

产品	规格*	货号
抗生素和抗真菌剂		
抗生素-抗真菌剂 (100X), 液体	100 mL	15240-062
两性霉素B抗真菌剂, 液体	20 mL	15290-018
庆大霉素试剂溶液 (10 mg/mL), 液体	10 mL	15710-064
庆大霉素试剂溶液 (50 mg/mL), 液体	10 mL	15750-060
庆大霉素/两性霉素溶液	10 × 1 mL	R-015-10
硫酸新霉素, 粉末	100 g	21810-031
青霉素-链霉素, 液体	100 mL	15140-122
青霉素-链霉素-新霉素 (PSN) 抗生素混合物	100 mL	15640-055
选择抗生素		
Geneticin选择抗生素, 液体	20 mL	10131-027
Geneticin选择抗生素, 粉末	1 g	11811-023
潮霉素B	20 mL	10687-010
嘌呤霉素二盐酸盐, 筛选抗生素, 液体	10 × 1 mL	A11138-03
杀稻瘟菌素S HCl, 筛选抗生素, 液体	20 mL	A11139-02
杀稻瘟菌素S HCl, 粉末	50 mg	R210-01
Zeocin选择试剂, 粉末	1 g	R250-01
污染检测试剂盒		
细胞培养物污染检测试剂盒- 200次检测	1套	C7028
MycoFluor支原体检测试剂盒	1套	M7006

*还可提供其他规格和包装尺寸产品。

生长因子和纯化蛋白质

我们提供了一系列经过细胞培养验证的强效、纯化的生长因子、趋化因子、细胞因子以及其他蛋白质和蛋白质抑制剂。这些产品已通过Gibco™培养基在活细胞生物测定中验证。更多信息和完整列表，请访问thermofisher.com/recombinantproteins。

产品	表达系统	规格*	货号
Heat StablebFGF人重组蛋白	大肠杆菌	100 µg	PHG0369
TPO (血小板生成素) 人重组蛋白	哺乳动物	100 µg	PHC9511
BMP4人重组蛋白	哺乳动物	100 µg	PHC9531
BMP7人重组蛋白	哺乳动物	1 mg	PHC9543
Activin A人重组蛋白	哺乳动物	100 µg	PHC9561
VEGF人重组蛋白	哺乳动物	100 µg	PHC9391
EPO人重组蛋白	哺乳动物	500 IU	PHC2054
RSPO1人重组蛋白	稳定CHO细胞	50 µg	A42586
FGF-10人重组蛋白	大肠杆菌	50 µg	A42547
IL-7人重组蛋白	大肠杆菌	100 µg	PHC0071
IL-23人重组蛋白	哺乳动物	100 µg	PHC9321
IL-2人重组蛋白	大肠杆菌	100 µg	PHC0021
TGFB1人重组蛋白	哺乳动物	10 µg	PHG9214
M-CSF人重组蛋白	哺乳动物	100 µg	PHC9501
HGF人重组蛋白	杆状病毒	100 µg	PHG0321
EGF人重组蛋白	大肠杆菌	100 µg	PHG0311
SARS-CoV-2刺突蛋白 (S-RBD) (aa 319-541), His Tag重组蛋白	HEK293	100 µg	RP-87678
SARS-CoV-2核衣壳蛋白 (aa 1-419), His Tag重组蛋白	HEK293	200 µg	RP-87689
人ACE2 (aa 1-615), hFC Tag重组蛋白	HEK293	200 µg	RP-87692

细胞培养和转染产物 (续)

细胞计数仪 我们提供2款满足各种实验室需求的高性能自动细胞计数仪。Invitrogen™ Countess™ 3 FL和Countess 3自动细胞计数仪具有先进的自动对焦和机器学习图形分析算法,可避免计数时可能出现的用户差异,同时为您提供快速且精确的细胞计数服务。获取更多信息,请访问thermofisher.com/countess。

产品	规格*	货号
Countess 3 FL自动细胞计数仪	1台	A49893
Countess II自动细胞计数仪	1台	A49891
Countess细胞计数室载玻片	50片	C10228
Countess 可重复使用玻片	1台	A25750
Countess 可重复使用玻片支架	1台	AMEP4746

*表中所列的产品也可能具有不同的用量和包装尺寸。

转染试剂 我们可提供种类最齐全的阳离子脂质体转染试剂,产品性能出众,可用于DNA、siRNA、寡核苷酸和RNA导入。下表列出了Thermo Fisher Scientific提供的部分阳离子脂质体转染试剂更多信息和完整列表,请访问thermofisher.com/transfection。

产品	规格*	货号
Lipofectamine 3000转染试剂	1.5 mL	L3000015
Lipofectamine 2000转染试剂	1.5 mL	11668019
Lipofectamine 2000 CD (化学成分确定) 转染试剂	1mL	12566014
Lipofectamine RNAiMAX转染试剂	1.5 mL	13778150
Lipofectamine CRISPRMAX试剂	1.5 mL	CMAX00001
Lipofectamine MessengerMAX转染试剂	1.5 mL	LMRNA015
InvivoFectamine 3.0试剂	1mL	IVF3001
ExpiFectamine 293转染试剂盒	1x1 L	A14524
ExpiFectamine CHO转染试剂盒	1x1 L	A29129
ExpiFectamine Sf转染试剂	1 mL	A38915
FreeStyle MAX试剂	1 mL	16447100
Cellfectin II试剂	1 mL	10362100

*还可提供其他规格和包装尺寸产品。

Neon转染系统 Neon转染系统可将核酸、蛋白质和siRNA高效输送到包括原代和永生化造血细胞、干细胞和原代细胞在内的各种哺乳动物细胞中，具有很高的细胞存活率。如需了解有关Neon转染系统和各种常用细胞类型的优化Neon转染实验方案，请登录 thermofisher.com/neon。

产品	规格	货号
Neon转染系统入门级套装	1套	MPK5000S
Neon转染系统	各1台	MPK5000
Neon转染系统 (100 µL 套装)	192次反应	MPK10096
Neon转染系统 (10 µL 套装)	192次反应	MPK1096
Neon转染系统移液器	各1台	MPP100
Neon转染系统移液器架	各1台	MPS100
Neon转染试管	1套	MPT100

RNA干扰 RNAi是一种特异、高效且极为成功的方法，可以在几乎所有真核生物体中进行功能缺失研究。我们开发出了两种类型的小RNA分子用于RNAi研究：短干扰RNA (siRNA) 分子和microRNA (miRNA)，并可提供各种产品用于体外和体内RNAi分析，包括高通量文库。选择哪种RNAi工具取决于您的实验模型、抑制所需时长和其他实验参数。

此外，我们可提供种类最齐全的阳离子脂质体转染试剂，产品性能出众，可用于各种RNAi试剂的导入，包括shRNA和miR RNAi载体以及各种合成分子，如siRNA、Stealth RNAi siRNA和Dicer酶切siRNAi库。我们还利用上述转染试剂针对多种常用细胞系开发了细胞特异性RNAi转染实验方案。

如需了解更多信息及完整的Thermo Fisher Scientific RNAi产品列表，请登录 thermofisher.com/rnai。

3D细胞培养

类器官、球状体和3D细胞培养

类器官、球状体和3D细胞模型研究在包括疾病建模和再生医学在内的许多应用中表现出了巨大的潜力。相对于2D模型, 类器官和球状体等3D细胞模型使研究人员有机会在生理学相关背景下更好地理解生物学的复杂性。经过验证的实验方案和工作流程产品解决方案增强了对于培养和分析类器官和球状体的信心。

3D服务

当今研究人员面临各种研究困境, 他们不断被要求将研究过渡至更具生理相关性的模型, 但通往3D模型的道路并不容易的。无论您的团队是需要帮助开发合适的3D细胞模型, 还是有兴趣将研究项目的步骤外包, 我们的CellModel™服务团队都可以针对您的研究需求提供量身定制的解决方案。

详情请访问 thermofisher.com/3Dmodels

产品	规格*	货号
Advanced DMEM/F-12	500 mL	12634010
Geltrex不含LDEV低生长因子基底膜基质	1 mL	A1413201
AlgiMatrix 3D培养系统, 96孔板	5×96孔板	12684031
经人类球状体验证合格的肝细胞 (Human Spheroid-Qualified Hepatocytes)	1瓶	HMCP SQ
定制iPSC细胞系	定制	thermofisher.com/cellbioservices
Nunclon Sphera 96孔板, U形底	一盒8个	174925
多孔板中的Nunc聚碳酸酯细胞培养小室	一盒48个	140620
CytoVista 3D细胞培养清除/染色试剂盒	1套	V11325
PrestoBlue HS细胞	25 mL	P50200
CyQUANT Direct细胞增殖分析试剂盒	10个微孔板	C35011
Countess 3 FL自动细胞计数仪	1	A49893
EVOS M5000细胞成像系统	1	AMF5000
Varioskan LUX多功能酶标仪	1	VLBLATD0

*表中所列的产品也可能具有不同的规格和包装尺寸。

用于细胞培养的实验室设备

CO₂培养箱

自上个世纪以来, CO₂培养箱已取得很大的进展。现代尖端的细胞培养箱具有主动空气循环和污染控制功能, 包括24/7 HEPA过滤, 可在开门30秒后的5分钟内提供ISO 5级洁净室条件。您需要选择合适的型号, 确保可以将所有传感器和温度计放置到培养箱中, 以便及时监测培养细胞所处环境的参数。

60多年来, 美国和德国的工程师不断设计、改造并生产Thermo Scientific™ CO₂培养箱。Thermo Scientific™ Cell Locker™系统可为当今比较敏感的细胞类型(包括干细胞、原代细胞、神经元、病毒克隆等)提供最佳的稳定性、保护性和灵活性。有关Thermo Fisher Scientific细胞培养箱的更多信息和完整介绍, 请访问 thermofisher.com/co2。

生物安全柜

保护从不间断。Thermo Scientific™生物安全柜(BSC)每一天都为您提供经认证的性能和保护性。这是普通安全柜无法做到的, 主要依赖于我们的设计:

- Thermo Scientific™ SmartFlow™技术采用双直流电机, 可实时地自动平衡安全柜的空气流入和下行气流速度
- 数字化气流验证(DAVe)可为超出规格的任何情况发出报警信号以提升保障

我们的先进技术旨在保护您和细胞的安全。如您想了解更多信息, 敬请访问 thermofisher.com/bsc。

离心机

分离在您的工作流程中是一个很关键的步骤; 因此, 考虑您应用的离心机要求和技术规范是非常重要的, 包括选择合适的速度和离心力、了解最新的离心技术发展趋势。一系列Thermo Scientific™离心机及其创新转头适用于您所有的处理需求, 支持从微孔板和微管到大容量实验瓶等配套实验器具, 在多次离心后仍可提供出色的性能。

如您想了解我们为各种用途设计的离心机产品以及确保您安全分离的技术, 请访问 thermofisher.com/centrifuge。

其他资源

- Gibco虚拟培训实验室** 这是一座免费的交互式实验室，您可在此接受完整的Gibco™细胞培养培训，学习优化体外研究的技巧，了解使用细胞的最佳实践步骤，接受学业测试，获得证明您知识掌握程度的徽章。更多信息请访问thermofisher.com/gibcoeducation。
- Gibco癌症基础知识** 癌细胞培养介绍课程包括癌症生物学、细胞系培养、癌症球状体和癌症类器官培养等主题。更多信息请访问thermofisher.com/cancercellculturebasics。
- Gibco细胞培养大咖** 遇见可能在未来获得突破的研究人员。大咖们从不追求认可，他们实至名归。大咖们意志坚定，夙兴夜寐地工作，只希望为治愈性疗法的早日发现尽一份绵薄之力。我们想把他们的努力公诸于世。如想了解大咖们的工作，可访问thermofisher.com/cellcultureheroes。
- 哺乳动物和昆虫细胞培养物** 有关哺乳动物和昆虫细胞培养、特定细胞类型的培养方案以及其他细胞培养产品的更多信息，请访问我司网站的哺乳动物细胞培养和昆虫细胞培养门户：thermofisher.com/insectcellculture或thermofisher.com/mammaliancellculture。
- 细胞和组织分析** 理解细胞和组织间的结构和功能关系对主要研究学科的进展具有极其重要的意义，包括分子生物学、遗传学、生殖功能学、免疫学、癌症和神经生物学。细胞和组织分析的关键领域包括细胞活性和增殖、细胞信号通路、细胞周期分析和细胞结构。我们有一系列用于细胞和组织分析的试剂和试剂盒，包括Invitrogen™荧光产品和技术，以及用于细胞分离和扩增的Dyna™基于微珠的解决方案。从抗体到台式仪器（如Countess 3自动细胞计数仪和Invitrogen™ Qubit™ 4.0荧光计），我们拥有细胞分析研究所必需的工具。更多信息请访问thermofisher.com/cellanalysis。

细胞生物学服务	从基因组编辑、定制培养基和细胞系工程到定制抗体生产和病毒载体服务, 我们拥有专业的技术, 可帮助推进您的项目进程。现在就联系我们的项目管理团队吧, 了解更多信息! 选择与我们合作, 您在医学研究领域能获得更丰硕的研究成果! 更多信息请访问 thermofisher.com/cellbioservices 。
安全技术说明书	如需下载安全技术说明书 (SDS), 您可登陆 thermofisher.com/sds 。
分析证书	分析证书 (CoA) 提供每个产品的详细质量控制和产品鉴定信息。CoA可登陆我们的网站 thermofisher.com/cofa 按产品批号 (印在包装盒上) 来搜索CoA。
技术支持	如需更多信息或技术援助, 请访问 thermofisher.com/support 联系我们。
有限产品质量保证	Thermo Fisher Scientific Corporation和/或其关联公司按照Thermo Fisher Scientific销售条款和条件 (可在 thermofisher.com/termsandconditions 中查看) 中的规定对其产品提供保证。

参考文献

- Ambros V (2004) The functions of animal microRNAs. *Nature* 431:350–355.
- Anson DS (2004) The use of retroviral vectors for gene therapy-what are the risks? A review of retroviral pathogenesis and its relevance to retroviral vector-mediated gene delivery. *Genet Vaccines Ther.* 2:9.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, and Struhl K (1995) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York.
- Bergelson JM, Cunningham JA, Droguett G, Kurt-Jones EA, Krithivas A, Hong JS, Horwitz MS, Crowell RL, and Finberg RW (1997) Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* 275:1320–1323.
- Burkholder JK, Decker J, and Yang NS (1993) Rapid transgene expression in lymphocyte and macrophage primary cultures after particle bombardment-mediated gene transfer. *J Immunol Methods* 165:149–156.
- Capecchi MR (1980) High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells. *Cell* 22: 479–488.
- Capecchi MR (1989) Altering the genome by homologous recombination. *Science* 244:1288–1292.
- Chen X (2005) MicroRNA biogenesis and function in plants. *FEBS Letters* 579:5923–5931.
- Chesnoy S and Huang L (2000) Structure and function of lipid-DNA complexes for gene delivery. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 29:27–47.
- Chu G and Gunderson K (1991) Separation of large DNA by a variable-angle contour-clamped homogeneous electric field apparatus. *Anal Biochem* 194:439–446.
- Condreay JP, Witherspoon SM, Clay WC, and Kost TA (1999) Transient and stable gene expression in mammalian cells transduced with a recombinant baculovirus vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:127–132.
- Elbashir S, Lendeckel W, and Tuschl T (2001) RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* 15:188–200.
- Fraley R, Subramani S, Berg P, and Papahadjopoulos D (1980) 简介 of liposome-encapsulated SV40 DNA into cells. *J Biol Chem.* 255:10431–10435.
- Freshney RI (2016) *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*, Wiley-Blackwell, New York.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, and Mello CC (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391:806–811.
- Glover DJ, Lipps HJ., and Jans DA (2005) Towards safe, non-viral therapeutic gene expression in humans. *Nat Rev Genet.* 6:299–310.
- Graham FL and van der Eb AJ (1973) Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5. *Virology* 54:536–539.
- Hirata RK and Russell DW (2000) Design and packaging of adeno-associated virus gene targeting vectors. *J Virol* 74: 4612–4620.
- Hirko A, Tang F, and Hughes JA (2003) Cationic lipid vectors for plasmid DNA delivery. *Curr Med Chem* 10:1185–1193.
- Hutvagner G and Zamore PD (2002) A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* 297:2056–2060.
- Jackson AL, Bartz SR, Schelter J, Kobayashi SV, Burchard J, Mao M, Li B, Cavet G, Linsley PS. (2003) Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotechnol* 21:635–637.
- Kim TK and Eberwine JH (2010) Mammalian cell transfection: the present and the future. *Anal Bioanal Chem* 397: 3173–3178.

- Klein RM, Wolf ED, Wu R, and Sanford JC. (1992) High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Biotechnology* 24:384–386.
- Lim LP, Glasner ME, Yekta S, Burge CB, and Bartel DP (2003) Vertebrate microRNA genes. *Science* 299:1540.
- Liu D, Ren T, and Gao X (2003) Cationic transfection lipids. *Curr Med Chem* 10:1307–1315.
- Lukacs GL, Haggie P, Seksek O, Lechardeur D, Freedman N, and Verkman AS (2000) Size-dependent DNA mobility in cytoplasm and nucleus. *J Biol Chem* 275:1625–1629.
- Mack GS (2007) MicroRNA gets down to business. *Nature Biotech* 25:631–638.
- McLenachan S, Sarsero JP, and Ioannou PA (2007) Flow-cytometric analysis of mouse embryonic stem cell lipofection using small and large DNA constructs. *Genomics* 89:708–720.
- Nayak S and Herzog RW (2009) Progress and prospects: immune responses to viral vectors. *Gene Ther* 17:295–304.
- Pfeifer A and Verma IM (2001) Gene therapy: promises and problems. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2:177–211.
- Potter H, Weir L, and Leder P (1984) Enhancer-dependent expression of human kappa immunoglobulin genes introduced into mouse pre-B lymphocytes by electroporation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:7161–7165.
- Rhoades MW, Reinhart BJ, Lim LP, Burge CB, Bartel B, and Bartel DP (2002) Prediction of plant microRNA targets. *Cell* 110:513–520.
- Sarver N, Gruss P, Law MF, Khoury G, and Howley PM (1981) Bovine papilloma virus deoxyribonucleic acid: a novel eucaryotic cloning vector. *Mol Cell Biol* 1:486–496.
- Schneckenburger H, Hendinger A, Sailer R, Strauss WS, and Schmitt M (2002) Laser-assisted optoporation of single cells. *J Biomed Opt* 7:410–416.
- Semizarov D, Frost L, Sarthy A, Kroeger P, Halbert DN, and Fesik SW (2003) Specificity of short interfering RNA determined through gene expression signatures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:6347–6352.
- Shigekawa K and Dower WJ (1988) Electroporation of eukaryotes and prokaryotes: a general approach to the 简介 of macromolecules into cells. *Biotechniques* 6:742–751.
- Shirahata Y, Ohkohchi N, Itagak H, and Satomi S (2001) *J Invest Med* 49:184–190.
- Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, and Schreiber RD (1998) How cells respond to interferons. *Ann Rev Biochem* 67:227–264.
- Telenius H, Szeles A, Keresö J, Csonka E, Praznovszky T, Imreh S, Maxwell A, Perez CF, Drayer JL, and Hadlaczk G. (1999) Stability of a functional murine satellite DNA-based artificial chromosome across mammalian species. *Chromosome Res* 7:3–7.
- von Groll A, Levin Y, Barbosa MC, and Ravazzolo AP (2006) Linear DNA low efficiency transfection by liposome can be improved by the use of cationic lipid as charge neutralizer. *Biotechnol Prog* 22:1220–1224.
- Vaheri A and Pagano JS (1965) Infectious poliovirus RNA: a sensitive method of assay. *Virology* 27:434–436.
- Vorburger SA and Hunt KK (2002) Adenoviral gene therapy. *Oncologist* 7:46–59.
- Ye GN, Daniell H, and Sanford JC (1990) Optimization of delivery of foreign DNA into higher-plant chloroplasts. *Plant Mol Biol* 15:809–819.

赛默飞世尔科技

上 海

上海市浦东新区新金桥路27号3,6,7号楼
邮编 201206
电话 021-68654588*2570

生命科学产品和服务业务

上海市长宁区仙霞路99号21-22楼
邮编 200051
电话 021- 61453628 / 021-61453637

北 京

北京市东城区北三环东路36号环球贸易中心C座7层/8层
邮编 100000
电话 010-87946888

广 州

广州国际生物岛寰宇三路36、38号合景星辉广场北塔204-206 单元
邮编 510000
电话 020-82401600

成 都

成都市临江西路1号锦江国际大厦1406 室
邮编 610041
电话 028-65545388*5300

沈 阳

沈阳市沈河区惠工街10号卓越大厦3109 室
邮编 110013
电话 024-31096388*3901

西 安

西安市高新区科技路38号林凯国际大厦
1006-08单元
邮编 710075
电话 029-84500588*3801

南 京

南京市中央路201号南京国际广场南楼1103室
邮编 210000
电话 021-68654588*2901

武 汉

武汉市东湖高新技术开发区高新大道生物园路
生物医药园C8栋5楼
邮编 430075
电话 027-59744988*5401

昆 明

云南省昆明市五华区三市街6号柏联广场写字
楼908单元
邮编 650021
电话 0871-63118338*7001

欲了解更多信息，请扫描二维码关注我们的微信公众账号

赛默飞世尔科技在全国有共21个办事处。本资料中的信息，说明和技术指标如有变更，恕不另行通知。

如需支持，请访问thermofisher.com/support或发送电子邮件至cellculturesupport@thermofisher.com

如需更多的教育资源，请访问 thermofisher.com/cellculturebasics



赛默飞
官方微信



赛默飞
生命科学小助手

热线 800 810 5118
电话 400 650 5118
www.thermofisher.com

ThermoFisher
S C I E N T I F I C

仅供研究使用。不用于临床诊断。© 2020 Thermo Fisher Scientific Inc.保留所有权利。除非另有说明，所有商标均为Thermo Fisher Scientific及其子公司所有。Cy是GE Healthcare UK Limited的注册商标。Hoechst是Hoechst GmbH的商标。Pluronic是BASF Corporation的商标。Zeocin是InvivoGen的商标。Plan Neofluar是Carl Zeiss AG的商标。COL011985 0820