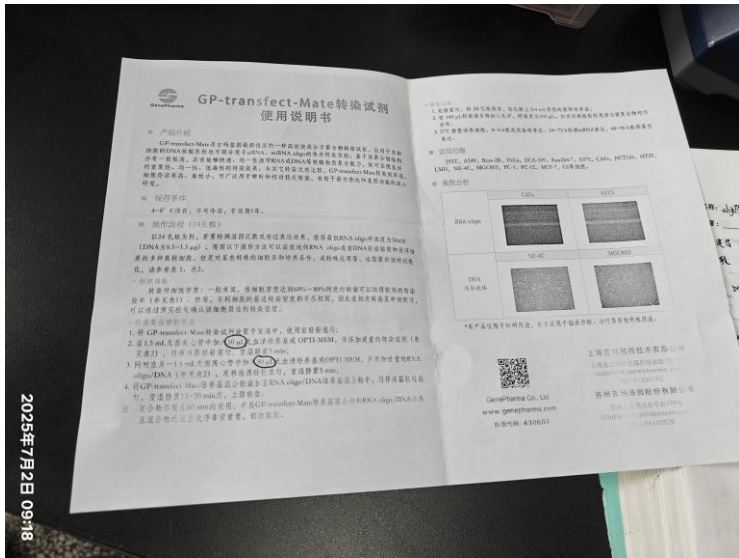


转染及琼脂糖凝胶电泳

1 转染

1.1 操作

筛选 DNA 和转染试剂的比例（根据转染试剂的说明书操作），由于转染试剂易被微生物及酶降解。所以转染操作需在 cell 房内进行。转染产物进行琼脂糖凝胶电泳，成功转染的产物为带正电，无琼脂糖凝胶电泳移动行为。根据结果，确认 DNA 和转染试剂的最佳比例。



1.2 备注

试剂加至底部，避免附壁。

无特殊情况，不额外考察耗材对 DNA 的吸附。

培养基中的酚红用于判断培养基有无过期；该转染试剂使用酚红作为稀释剂，目的是便于后续直接转染 cell。

细胞房：关外间的紫外开关；开闸(黑色)；开空调通风 10min 后再进入

1.3 原理

阳离子聚合物转染试剂：带负电的核酸与带正电的阳离子聚合物转染试剂(上面的 Mate 试剂)形成带正电的复合物，与细胞表面带负电的蛋白多糖相互作用，并通过内吞作用进入

细胞。特点：水溶性好；细胞毒性很低，很稳定；对血清的耐受性较强。如聚乙烯亚胺（PEI）。

阳离子脂质体转染试剂：阳离子脂质体的基本结构由**带正电荷的头基**和一个或两个烃链组成，带正电荷的头基与带负电荷的核酸通过静电作用形成复合物 lipoplex，经细胞的内吞作用进入细胞。特点：没有免疫原性；脂质体本身会参与细胞生理活动，引起基因表达的上调或下调，脂质体这些作用是造成细胞毒性的根本原因；**在血清存在的情况下会迅速失活**（当血清浓度过高时，可能会与转染试剂发生相互作用，形成复合物，从而降低转染试剂与细胞的结合能力，导致转染效率下）；在肺组织内累积，诱发强烈的抗炎反应，导致高水平的毒性。

2 琼脂糖凝胶电泳（FOR DNA）

2.1 原理：

电泳（分子量，构象）+类似分子筛(小分子更快)

2.2 操作：

实验视频：<https://www.bilibili.com/video/BV1UR4y1x7ng/>

制胶：向锥形瓶中加入琼脂糖干粉和 TAE 电泳缓冲液 50mL（Tris，乙酸，EDTA），加热溶解（可超声可加磁力搅拌子直至煮沸），冷却至 60℃，冷却过程中摇晃 or 搅拌，避免底部先凝固，并及时挑出液面的凝胶膜和气泡，冷却至不烫手后加入核酸染料（DNA goldview，注意避光），混匀，倒入凝胶模具（约厚 3~5mm），挑去气泡或将气泡引至上样孔对侧。室温冷却凝固（约 30min），拔出梳子，将凝胶及托盘转移至电泳槽中。向电泳槽中加入电泳缓冲液（约没过凝胶 2-3mm）。

分离线性 DNA 分子的有效范围 (bp)	琼脂糖的含量 (%)
50 ~ 2000	2.0
200 ~ 3000	1.5
400 ~ 7000	1.2
500 ~ 10000	1.0
800 ~ 12000	0.7
1000 ~ 30000	0.5

加样：PBS or 超纯水稀释 DNA 样品至约 50 ug/mL，上样 DNA Marker（含有不同分子量的标准品，可省略添加 Loading Buffer 步骤）至 gel 加样孔 1（可置于开头、末尾、中间），吸取载样缓冲液（loading Buffer，含有溴酚蓝）和样品混匀并上样至加样孔 2，3....

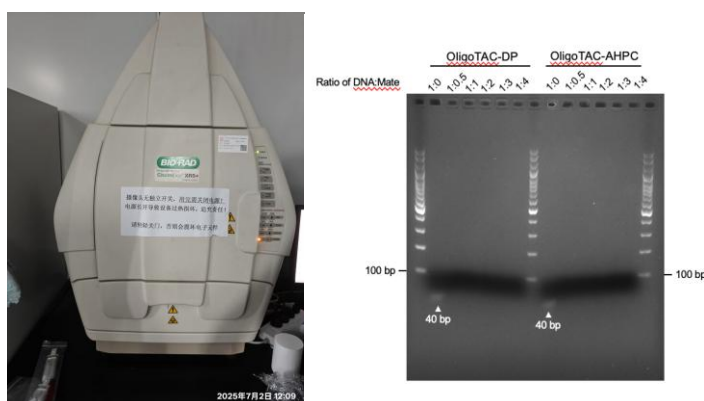
电泳：DNA（含磷酸基团带负电荷，由负极向正极泳动），150V，12-15min，一般溴酚蓝迁移至 gel 约 2/3 处停止电泳，取出电泳槽中的凝胶及托盘。

成像：314 的 BioRad 凝胶成像系统，image lab 软件，从托盘中取出 gel 放置于样品盘中，选择通道<gold>，调整滤光片，观察显色。

制胶及电泳设备图：



BioRad 凝胶成像系及结果图



2.3 备注

上样量：88 孔梳载样 20 ul，16 孔梳载样 10ul。

50×TAE Buffer 配制方法：称量 Tris 242 g 和 Na₂EDTA • 2H₂O 37.2 g 于 1 L 烧杯中；向烧杯中加入约 600 ml 去离子水，充分搅拌溶解；加入 57.1 ml 的冰乙酸，充分搅拌；加去离子

水定容至 1 L 后，室温保存。(Na⁺离子 0.01-0.04 M，浓度太低时电泳速度变慢；太高时会造成过大的电流使胶发热甚至熔化；EDT 1-2 M，目的是螯合 Mg²⁺，防止电泳时激活 DNA 酶，以及防止 Mg²⁺离子与核酸生成沉淀。)

长链 DNA：电泳缓冲液还需要加 Mg²⁺，稳定 DNA

loading buffer：避免 DNA 上浮；与样品的比例按照 buffer 的说明书；含有溴酚蓝，电泳时在最前沿，电泳时直观可见

核酸染料 gold view：需要避光，所以在加入后的制胶和电泳过程中，都关灯或黑色塑料袋遮光进行：

电泳过程中：正常接入电极后，负极出现气泡；电压可中途调整；电泳槽置于冰水浴中，利于 DNA 样品稳定。