

## 质粒转染（Lipofectamine系列）实验

### 1. 转染前准备

- 1.1 消化并接种处于对数期的细胞，调整细胞密度，使转染时细胞汇合度达到70%-90%；
- 1.2 室温下解冻质粒DNA，轻轻混匀后瞬离，转染试剂在室温下平衡5-10 min；

### 2. 转染复合物制备

- 2.1 根据转染试剂说明书，在无菌离心管中分别稀释质粒DNA和转染试剂；
- 2.2 将稀释好的质粒DNA和转染试剂溶液分别轻轻混匀，室温静置5 min；
- 2.3 将稀释后的质粒DNA溶液缓慢加入到转染试剂溶液中，轻轻混匀，室温静置20 min，形成DNA-转染试剂复合物；

### 3. 细胞转染

- 3.1 用无血清培养基轻轻洗涤细胞两次；
- 3.2 向每个培养孔中加入适量无血清培养基，缓慢滴加制备好的DNA-转染试剂复合物，轻轻晃动培养板；
- 3.3 37°C、5% CO<sub>2</sub>培养箱中孵育4-6 h；

### 4. 转染后处理

- 4.1 小心弃除含有转染复合物的培养基，加入适量完全培养基，继续培养；
- 4.2 基因表达分析：瞬时转染（转染后24-48 h通过荧光显微镜观察报告基因的表达情况，或通过Western blot、qPCR等方法检测目的基因的表达），稳定转染（根据筛选需求延长培养时间）。

# 常见问题

## 1. 转染效率低怎么办？

可能原因：细胞状态不佳、质粒质量差、试剂与DNA比例不当、孵育时间不合适或细胞汇合度不佳等。

解决方案：优化细胞培养条件以提高活力；重新提取质粒DNA以提高纯度和浓度；调整转染试剂与质粒的比例；优化转染时间和细胞汇合度。

## 2. 细胞毒性高怎么办？

可能原因：转染试剂浓度过高、与转染复合物孵育时间过长或细胞对试剂敏感。

解决方案：降低转染试剂的浓度，缩短孵育时间；或考虑使用毒性较低的转染试剂，或选择适合该细胞类型的替代转染方法。

## 3. 目的基因表达量低怎么办？

可能原因：质粒启动子与细胞类型不匹配、稳定转染的整合效率低或目的基因序列本身存在问题。

解决方案：选择适合特定细胞类型的启动子；优化稳定转染的筛选条件；并验证目的基因序列的正确性和完整性。

## 4. 背景信号高怎么办？

可能原因：转染试剂固有的荧光干扰或非特异性结合。

解决方案：选择无或低荧光的转染试剂；设置适当的阴性对照以排除非特异性信号。

## 参考文献

- [1] Faurie C, Rebersek M, Golzio M, et al. Electro-mediated gene transfer and expression are controlled by the life-time of DNA/membrane complex formation [J]. *J Gene Med*, 2010, 12(1): 117-125.
- [2] Kavanagh EW, Tzeng SY, Sharma N, et al. Ligand-free biodegradable poly(beta-amino ester) nanoparticles for targeted systemic delivery of mRNA to the lungs [J]. *Biomaterials*, 2025, 313: 122753.