

FuGENE[®]HD 转染试剂对人类胚胎干细胞的出色转染

Kouichi Hasegawa*, Shin-ya Yasuda, Hirofumi Suemori

日本京都大学再生医学研究所干细胞研究中心胚胎干细胞研究实验室

联系作者: khase@frontier.kyoto-u.ac.jp

简介

基因操作技术在人类胚胎干细胞研究的许多应用中是一个潜在的强大工具。对特异基因表达水平的控制可以提高分化诱导的效率。目的类型细胞可通过标记基因和抗生素抗性基因选择。可采用示踪基因对移植后胚胎干细胞起源的细胞进行追踪,也可以选择性地破坏移植细胞。然而,人类胚胎干细胞的基因转染效率普遍很低。而且,除了需要具有较高的基因转染效率,用于人类胚胎干细胞的转染试剂还必须不仅对于干细胞自身而且对于支持它们在组织中稳定维持的滋养层细胞具有较低的毒性。试剂必须不干扰胚胎干细胞的未分化状态,考虑到临床应用它们还必须不具有动物来源组分。

我们测试了30多种转染试剂,并且分析了它们对于人类胚胎干细胞的细胞毒性和转染效率。我们发现FuGENE[®]HD转染试剂具有最高的转染效率,并且对于干细胞没有毒性,对滋养层细胞也没有显著的毒性。

材料和方法:

人类胚胎干细胞

使用KhES-1人类胚胎干细胞系^[1]。由于完全分离后人类胚胎干细胞的生存能力大大降低,因此我们分离以含有大约100个细胞的细胞簇的形式重悬细胞。10⁵细胞种入包被有Matrigel (BD Biosciences, CA)的35 mm的培养皿。为了分析转染效率,采用滋养层细胞的培养基上清来维持胚胎干细胞的未分化状态。在这个实验中不采用滋养层细胞,以避免不期望的噪音,例如,滋养层细胞的转染。细胞种植24小时后进行转染实验。

由于人类胚胎干细胞必须培养于滋养层细胞以获得稳定维持,转染实验也在种植于滋养层细胞上的人类胚胎干细胞中进行,检测转染试剂对于滋养层细胞的毒性和对于干细胞未分化状态的作用。人类胚胎干细胞系的使用遵守了日本文部科学省颁布的《人类胚胎干细胞的获得和使用准则》(2001)。

转染

采用本研究组构建的pCAG-GFP-SV40-Neo^[2]质粒

进行转染实验。对FuGENE[®]HD转染试剂,2μg质粒DNA和6μl FuGENE[®]HD转染试剂与100μl OPTIMEN (Invitrogen,CA)共孵育15分钟以形成复合物并且直接使用到转染用培养基中。对于FuGENE[®]6转染试剂,1μg质粒DNA和3μl FuGENE[®]6转染试剂与97μl OPTIMEN共孵育15分钟以形成复合物。对于其它的转染试剂,转染遵照供应商提供的标准实验方法。对于FuGENE[®]HD和FuGENE[®]6转染试剂,转染需要24小时。对其他转染试剂,转染需要24小时或者标准试验方法建议的时间。转染结束后替换新鲜的培养基并且继续培养细胞。在最初转染的48小时后,消化分离收集细胞并且进行分析。

转染效率和细胞毒性分析

用trypsin/EDTA消化分离转染细胞,采用FACs Calibur (BD Biosciences,CA)仪器分析GFP阳性细胞的比例进而测定转染效率。为了检测细胞毒性,将细胞数与未使用转染试剂的培养皿中细胞数进行比较,计算存活率。对表现出高转染效率的转染试剂,进行3次以上的转染实验来确定试验结果的可重复性。

结果和讨论

我们分析了37种转染试剂以寻找对于人类胚胎干细胞具有高转染效率,同时具有较低细胞毒性的转染试剂。

为了精确测定对于人类胚胎干细胞的转染效率,试验在无滋养层细胞的培养体系中进行^[3]。我们观察到FuGENE[®]HD转染试剂对于人类胚胎干细胞具有最高的转染效率,紧接着的是FuGENE[®]6转染试剂(图1a),而对于人类胚胎干细胞的细胞毒性,FuGENE[®]HD转染试剂和FuGENE[®]6转染试剂都显示出约70%的细胞存活率,没有发现明显的细胞毒性(图1b)。这些结果显示FuGENE[®]HD转染试剂是对人类胚胎干细胞的高效而低毒性的转染试剂。

我们同时研究了转染细胞目的基因的表达模式和形态。在大约所有的使用其他转染试剂的情况下,强烈表达转染基因的细胞仅在干细胞克隆周边区域观察到。但

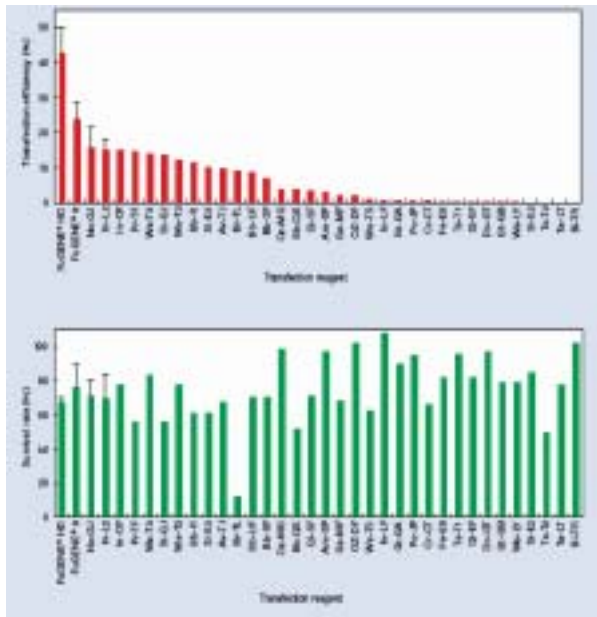


图1: 细胞转染效率和存活率。

(a)基因转染效率及(b)胚胎干细胞转染48小时后的存活度

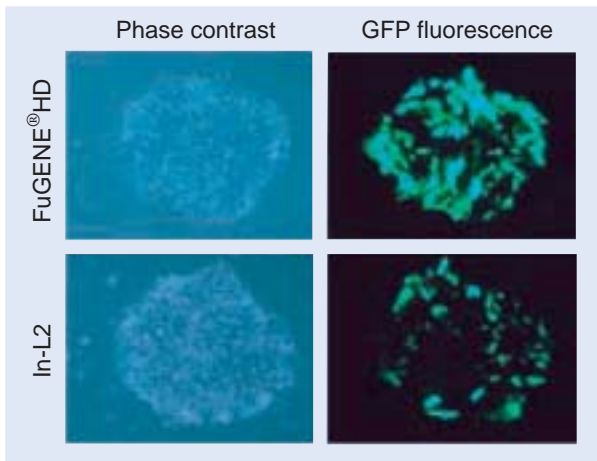


图2: 转染后的人类胚胎干细胞的细胞形态和GFP蛋白表达荧光。使用FuGENE HD转染试剂转染24小时后, 没有发现细胞形态方面的改变。而且, GFP阳性细胞的比例很高, 同时高荧光信号的细胞也存在于克隆的中央区域。

是, 使用FuGENE HD转染试剂, 这样的细胞在克隆的中心得以观察到, 这表明FuGENE HD转染试剂的转染不仅是高效的, 而且是相对均一的转染(图2)。人类胚胎干细胞对于诸如分离产生的物理性损伤很敏感, 因此必须以细胞簇形式操作。因此, 无论干细胞位于细胞簇中的什么位置, FuGENE HD转染试剂的转染能力都能对它们进行有效的转染。除此之外, 也没有发现转染细胞显著的形态改变, 意味着FuGENE HD转染试剂并不改变人类干细胞的未分化状态。

然后, 我们分析了转染试剂对于滋养层细胞的细胞毒性。滋养层细胞对于人类干细胞的稳定维持是必须的。与其他的转染试剂相比较, 没有观察到FuGENE HD转染试剂对于滋养层细胞的显著毒性作用(图3), 意味着FuGENE HD转染试剂对于人类干细胞培养体系几乎没有负效应。

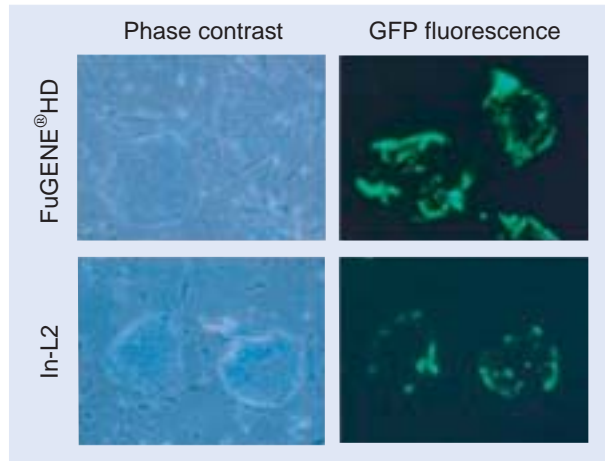


图3: 对滋养层上的人类胚胎干细胞的转染。在对照试剂中, 最初转染后的24小时, 出现了对滋养层细胞的损伤。滋养层细胞数量减少, 同时起皱形态增加。另外, 干细胞的生长收到抑制, 可能是缘于滋养层细胞的损伤。相应使用FuGENE HD转染的细胞, 无论是滋养层细胞还是胚胎干细胞都没有出现以上的效应现象。

结论

在这项研究中测试的许多基因转染试剂中, FuGENE HD转染试剂表现出最高的转染效率并且达到了均一的转染。FuGENE HD转染试剂并不显现出对人类胚胎干细胞或者支持滋养层细胞显著的细胞毒性。而且没有发现对于人类干细胞的未分化状态的负效应。这些结果表明, FuGENE HD转染试剂是一个对人类干细胞进行转染的非常有效的试剂。

参考文献:

1. Suemori H et al.(2006) Biochem Biophys Res Commun 345:926-932
2. Niwa H et al.(1991) Gene 108:193-199
3. Xu C et al.(2001) Nat Biotechnol 19:971-974

产品名称	包装规格	序列号
FuGENE HD	0.4ml	04 709 691 001
Transfection Reagent	1.0ml	04 709 705 001
	5 × 1.0ml	04 709 713 001