

FuGENE[®]HD 转染试剂：基因表达研究的优秀帮手

Maria Manifava*

Babrahem 研究所剑桥, 英国

*联系作者: maria.manifava@bbsrc.ac.uk

简介

将外源分子导入细胞的技术,对于任何实验室都是非常重要的,该类技术能帮助研究基因表达调节和蛋白质功能。

目前已经有很多转染方法可以帮助人们将DNA转入哺乳类或其他动物细胞。这些方法要么利用DNA载体的各种理化性质,要么运用感染哺乳动物的病毒作为载体。在第一类方法中,有几种经典的技术较为知名,如:磷酸钙法^[1]、DEAE葡聚糖^[2]、电穿孔^[3、4]、脂质体介导转移^[5]、直接微注射/基因枪^[6、7],以及非脂质体多组分试剂。第二类方法中,DNA病毒(如腺病毒)和RNA病毒(如逆转录病毒或慢病毒)均可用作载体系统。

这些转染方法没有一种是完美无缺的,他们都有各自的优缺点。一种真正“完美”的方法应该可以满足以下要求:转染效率高、细胞毒性低/死亡率低、重现性高、既可做瞬时转染也可做稳定转染、适用细胞类型广泛、易用,并且应用成本低廉。

在我们实验室中,多年来我们用过上述的大多数转染方法。我们测试过多种脂类试剂,发现FuGENE[®]6转染试剂在本实验室表现比其他方案更为可靠。最近我们又测试了FuGENE[®]6的升级版FuGENE[®]HD转染试剂。我们在哺乳动物和昆虫细胞系中进行了测试,使用了两种DNA报告基因,一种表达相对简单,另一种则较困难。实验证实FuGENE[®]HD转染试剂非常有效,转染效率更高,这一点对难以表达的DNA报告基因尤为明显。

材料与amp;方法

细胞培养

HEK-293细胞:人胚胎肾细胞,DMEM培养基加10%胎牛血清,37℃潮湿培养,95% O₂, 5% CO₂。

PAE细胞:猪大动脉内壁细胞,F12-HAM培养基加10%高温灭活血清,培养条件同HEK-293。

果蝇S2 Schneider细胞:Shields and Sang M3昆虫培养基加10%高温灭活血清及1%混合双抗(抗生素及抗真菌素),25℃保温。

转染

哺乳动物细胞转染前一天传代至玻璃盖玻片上。转

染时细胞融汇度高于50%。S2细胞在转染当天传代至6孔板上,直至融汇度达到90%。

无论使用FuGENE[®]6还是FuGENE[®]HD,转染时都会与多种不同的转染构建物形成复合物,如pCMV3 GFP PLD1^[8]、pEGFPC2 GFPSK1^[9]、pRMHA3 myctagged Drosophila、PLD (DPLD,未发表)等。转染试剂与DNA比例从3:1 (GFPSK1)到3:2 (GFPLD),最高到6:3 (DPLD)。复合物的形成需要18分钟 (FuGENE[®]HD)或40分钟 (FuGENE[®]6),在无血清培养基中进行 (FuGENE[®]HD用OPTIMEM, FuGENE[®]6用DMEM加10 mM HEPES-NaOH (pH 7.2))。复合物形成后,涂布到细胞表面。表达时间从22小时 (GFPSK1)至30小时 (GFPLD)不等,而DPLD则需42小时,包括用650μM CuSO₄对金属硫蛋白启动子进行诱导所需的24小时。在固定及染色前,S2细胞须在刀豆素A (Concavalin A)覆盖的盖玻片上摊1小时,以使其充分展开。

免疫荧光显微镜

细胞用PBS冲洗后以3.7%的甲醛(200 mM HEPES, pH 7.2)固定。用DMEM冲洗细胞以防甲醛残留干扰荧光背景。需染色的样本用另含0.25% NP-40的NET GEL (150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM Tris-Cl pH 7.4、0.05% NP-40、0.25% 明胶 (Gelatin)、0.02% 叠氮化钠)处理以增加通透性。我们用小鼠杂交瘤蛋白myc抗体检测myc附着的DPLD。最后,盖玻片用去离子水冲洗,并用Aqua Polymount为封固剂封固到载玻片上。样本用荧光显微镜 (Zeiss Axiophot) 观察并用SPOT数码相机拍照记录。

结果与amp;讨论

哺乳动物细胞的转染

为直接检测FuGENE[®]HD的转染效率,我们转染了几种不同的哺乳动物细胞系。由于我们经常使用HEK-293细胞,而且其生化体系可靠,可支持多种哺乳动物或非哺乳动物来源蛋白质的表达^[10],我们首先对其进行了测试。GFPLD1蛋白质粒转染条件如前述。同

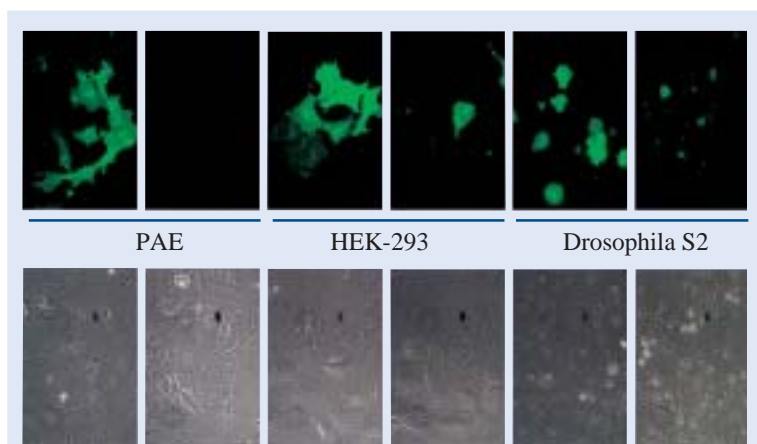


图 1: 三种细胞系使用 FuGENE[®]HD 或 FuGENE[®]6 转染试剂的免疫荧光照片。所有组均附相应的相差显微镜照片，以示细胞密度具有可比性。

种细胞用 FuGENE[®]6 转染作为对照，转染条件使用本实验室多年来成功在多种细胞 (COS7、CHO、HEK、RBL、RAW264.7、PAE 等) 中表达各种质粒的成熟条件。我们用免疫荧光方法来评估表达水平。如图 1 所示，与 FuGENE[®]6 相比，更多的细胞表达了用 FuGENE[®]HD 转染的构建物。样本组及对照组的相差显微镜照片 (图 1 下半部) 显示在视野中的细胞数量相似。另一种细胞系 PAE 用相同条件转染。如图 1 所示，用 FuGENE[®]HD 得到的表达量远高于 FuGENE[®]6。前者的转染效率比后者高出 50%，而后的表达几乎检测不到。两种细胞也用 FuGENE[®]HD 和 FuGENE[®]6 分别转入 GFP-SK1 构建物，二者的转染效率都很高 (数据未显示)。我们从过去的经验知道 PLD 相关的构建物总是被认为难以表达，而 SK1 构建物表达情况则更好。

我们由此定论，FuGENE[®]6 和 FuGENE[®]HD 都很有用，但更新的 FuGENE[®]HD 试剂对相对较为困难的表达课题更为有效。将 FuGENE[®]HD 与市场其它高效转染试剂 (如试剂 L) 相比同样如此。二者对难以表达的构建物的转染效率相似，但我们认为 FuGENE[®]HD 的优势在于其造成的细胞死亡很少，且对初始细胞密度这一条件不像试剂 L 那样敏感。

转染 S2 细胞

S2 Schneider 细胞用 6 孔板培养。用两种转染试剂分别制备了 3 种复合物，FuGENE[®] 转染试剂与 DNA 比例相同，所用无血清培养基不同。最终有效的 FuGENE[®] 试剂与 DNA 之比是 6:2。所用的无血清培养基有 Sang M3、Drosophila SFM 和 OPTIMEM。形成的复合物在摊开细胞的 1 小时内 (见材料与方法 - 转染) 涂布到细胞上。我们观察到，当时使用 OPTIMEM 培养基时，两种转染试剂的转染效率均达到最高。如图 1 所示，使用

FuGENE[®]HD 所得的转染效率至少是 FuGENE[®]6 的 2 倍。我们还用难以表达的构建物 DPLD 对转染效率进行了评估。哺乳动物细胞系中 FuGENE[®]HD 优于 FuGENE[®]6 的事实在果蝇细胞中也得到确认。

值得一提的是以上所有实验均未观察到细胞毒性的迹象。哺乳动物细胞系的接种融合度为 30% 到 60%，果蝇细胞系的融合度为 60% 到 90% (数据未显示)。

结论

FuGENE[®]HD 转染试剂是一种非常温和而有效的转染试剂。它结合了两种极度

有利的特性：在多种细胞类型中的高转染效率，同时不会造成细胞死亡，即使接种融合度低于 50%。这对于难以表达的载体特别有用，我们最近已经开始用它有效地进行基于质粒的 RNAi 研究。

FuGENE[®]HD 转染试剂在以上描述的实验中均优于 FuGENE[®]6。但 FuGENE[®]6 仍非常适合用于转染目前尚未用 FuGENE[®]HD 检验过的多种细胞系。

参考文献

- Graham FL, van der Eb AJ (1973) Virology 52: 456-467
- Vaheri A, Pagano JS (1965) Virology 27: 434-436
- Wong TK, Neumann E (1982) Biochem Biophys Res 107: 584-587
- Shikegawa K, Dower WJ (1988) Biotechniques 6: 742-751
- Felgner PL et al. (1987) Proc Natl Acad Sci USA 84: 7413-7417
- Capecchi MR (1980) Cell 22: 479-488
- Klein TM et al. (1987) Nature 327: 70-73
- Corrotte M et al. (2006) Traffic 7: 365-377
- Delon C et al. (2004) J Biol Chem 279: 44763-44774
- Thomas P, Smart TG (2005) J Pharmacol Toxicol Methods 51: 187-200

产品名称	包装规格	序列号
FuGENE [®] HD Transfection Reagent	0.4 ml	04 709 691 001
	1.0 ml	04 709 705 001
	5 × 1.0 ml	04 709 713 001
	10 ml	05 061 369 001
FuGENE [®] 6 Transfection Reagent	0.4 ml	11 815 091 001
	1.0 ml	11 814 443 001
	5 × 1.0 ml	11 988 387 001
	10 ml	05 061 377 001