

## FuGENE®HD 转染试剂：

### 微阵列表达谱分析证实具有最小脱靶效应的转染试剂

Susan Calvin<sup>1</sup>, Jay Wang<sup>1</sup>, Jay, Jeff, Simone, and Linda

美国印地安纳波利斯罗氏应用科学部；德国曼海姆，罗氏应用科学部

联系作者：linda.jacobsen@roche.com

#### 简介

转染是将核苷酸 (DNA 或者 RNA) 导入哺乳动物或昆虫细胞的一种方法<sup>[1,2]</sup>。它在许多应用中得以使用，例如基因表达分析，通过瞬时转染细胞生产蛋白，稳定细胞株的生成，逆转录病毒的产生，在药物研发项目中用于基因敲除研究的 siRNA 或 shRNA 的导入，以及基因治疗。脂质体和非脂质体试剂是最普遍且使用方便的转染试剂。但是，大多数转染试剂对细胞具有相当的细胞毒性和其他副作用。脱靶效应 (off-target effect) 包括所研究的转染细胞中非故意的基因的上调和下调。这样的效应如果不仔细评估，可能导致对转染结果的误解或者得到错误的结论。因此，在所有可选用的转染试剂中，评估和选择一个具有最小脱靶效应并同时具有高转染效率的转染试剂对转染实验中获得公正并且有意义的结果非常重要。

寡核苷酸微阵列使得全基因组范围的基因表达研究得以在一块芯片上进行。可以评估经过不同化合物例如药物、细胞因子或转染复合物处理过的细胞的转录水平的表达谱。得到的数据可用于判定哪个基因或者哪条通路受到了影响，以及这些改变是否相互关联。

在这项研究中，评估了采用 FuGENE®HD 和来自于其他供应商的转染试剂 (转染试剂 L2K) 对两种人类细胞系转染两种不同质粒后的表达谱。表达谱的比较显示，相对于转染试剂 L2K，FuGENE®HD 在两种细胞系中在转录水平上都影响相对较少的基因数量。

#### 材料和方法

##### 转染

Hela (ATCC®CCL-2) 和 MCF7 (ATCC®HTB-22) 细胞系在转染前一天种入 6 孔板中，每孔 2 ml，400000 个细胞。按照生产商提供的标准方法分别选用 FuGENE®HD 或者 L2K 进行转染。将 pM1-SEAP 一分泌型碱性磷酸酶 (SEAP) 的质粒，和 pM1-MT 不含插入片段的对照质粒稀释在 OPTIMEN I 低血清培养基中，然后

分别分装到每个管中用于不同的转染试剂。将 FuGENE®HD 转染试剂加入稀释的 DNA，稍加混匀，然后立即 (大约 3 分钟后) 加入合适的细胞孔中。在第一组实验中，每个细胞系采用了 10 μl FuGENE®HD 转染试剂：2 μg DNA 的转染比例。在第二组实验中，7 μl FuGENE®HD 转染试剂：2 μg DNA 的比例用于 MCF7 细胞，6 μl FuGENE®HD 转染试剂：2 μg DNA 的比例用于 Hela 细胞。L2K 稀释于 OPTIMEN I 低血清培养基中，孵育 5 分钟后加入稀释的 DNA 样本中，温和混匀，共孵育 20 分钟后加入细胞中：12 μl L2K 转染试剂：4 μg DNA 加入 MCF7 细胞中，10 μl L2K 转染试剂：4 μg DNA 加入 Hela 细胞中。之前的研究表明，这些量的转染试剂和 DNA 对两种细胞都产生较高的转染效率和对细胞形态上最低的可见效应。

##### 转染效率的定量

转染的 48 小时后，稀释细胞培养上清，用化学发光的 SEAP 报道基因试剂盒检测 SEAP 活性。

##### RNA 抽提和 cRNA 生物素化

一旦 SEAP 检测结束后，小心地移去细胞孔中培养基，将细胞冻于 -80°C 用于后期处理。采用标准步骤分离总 RNA，用分光光度计对每个总 RNA 样本定量，用 Agilent Bioanalyzer 分析其大小分布。依照标准的 Affymetrix GeneChip 方法 (Affymetrix) 准备生物素化的 cRNA。简而言之，采用 GeneChip OneCycle cDNA Synthesis Kit (Affymetrix) 将每个样本具有 poly A 尾 (标记对照) 的总 RNA 转化成双链 cDNA，其中 9 号样本 (L2K 试剂转染 pM1-MT 后的 Hela 细胞，见表 2 样本细节) 由于总 RNA 产量的降低而例外，这与实验中这个样本中观察到的细胞的死亡相一致。

第二条链合成后，采用 GeneChip Sample Cleanup Module (Affymetrix) 纯化 cDNA。得到的双链 DNA 采用 GeneChip 3' -Amplification Reagent Kit for IVT Labeling (Affymetrix) 通过体外转录产生生物素化 cRNA 的多拷贝。生物素化的 cRNA 的定性和定量通过测量 260

nm 和 280 nm 的吸收值检测。RNA 抽提, cRNA 生物素化, 微阵列杂交和表达谱分析在 Cogenics 完成( Cogenics 隶属于 Clinical Data, Inc )。

### 微阵列杂交和基因表达谱数据分析

对每一个样本, 15μg 标记有 bioB、bioC、bioD 和 cre (杂交对照) 的生物素化的 cRNA 与 Human HG-U133 Plus 2.0 microarray (Affymetrix) 在 45°C 杂交 16 小时。杂交后, 洗涤芯片并在 Affymetrix GeneChip Fluidics Station 中染色。染色的阵列采用 Affymetrix GeneChip® Scanner 3000 扫描。品质检测 and 数据分析采用 Affymetrix GeneChip Operating Software (GCOS) 和 Quality Reporter 进行。

使用 Rosetta Biosoftware's Resolver 计算比率, 每一种转染的细胞系是分子, 细胞系相对应的对照样本是分母(表 1)。以下对差异表达的标准筛选条件被应用于 8 组比较: a) 比率 p 值 < 0.001; b) 绝对倍数变化 > 1.3 倍; c) 对数强度 > -0.5。表 1 和图 1 给出了转染复合物引起的上下调表达的基因数量。

细胞系	分子	分母	差异表达转录子数量 实验 1(实验 2)
MCF7	FuGENE®HD 转染试剂 +pM1-MT	未转染细胞	197 (263)
MCF7	FuGENE®HD 转染试剂 +pM1-SEAP	未转染细胞	282 (174)
MCF7	L2K+pM1-MT	未转染细胞	1,405 (802)
MCF7	L2K+pM1-SEAP	未转染细胞	1,741 (964)
Hela	FuGENE®HD 转染试剂 +pM1-MT	未转染细胞	934 (746)
Hela	FuGENE®HD 转染试剂 +pM1-SEAP	未转染细胞	820 (653)
Hela	L2K+pM1-MT	未转染细胞	3,190 (3,884*)
Hela	L2K+pM1-SEAP	未转染细胞	1,868 (535)

\* 这个实验 2 的样本未通过杂交质量控制

### 结果与讨论

之前的基因表达谱和细胞毒性实验显示 FuGENE®6 转染试剂在人类 HEK293 细胞中产生最小的基因表达的改变, 而转染试剂 L 产生很大的表达谱的改变<sup>[3]</sup>。为了评估以及将新的 FuGENE®HD 转染试剂和 L2K 作比较, 在使用这两种转染试剂转染了不含插入的质粒 (pM1-MT) 和含有编码分泌型碱性磷酸酶的质粒 (pM1-SEAP) 的 HeLa 细胞和 MCF-7 细胞上进行了相似的转录谱研究。最初的表达谱实验 (实验 1) 之后又独立地重复了一次 (实验 2) 以证实结果并且测试这项研究对于生物复制的可重复性。

### 表达模式

使用 p 值 < 0.001, 绝对倍数改变 > 1.3 倍和对数强度 > -0.5 作为筛选准则, 在两组实验中, 转染和未转染细胞中差异表达的转录子数目列于表 1 中, 圆括号中是第二组生物复制品的实验结果。图 1a 和 1b 中给出了文

氏图说明了 FuGENE®HD 转染试剂和 L2K 对基因表达模式改变的不同影响。重叠区域显示了同时被两种转染试剂改变的转录子的数目。

为了直接比较 FuGENE®HD 转染试剂和 L2K 在 MCF7 (黑色字体) 和 HeLa (蓝色字体) 细胞系中的作用。图 1 列出了各自转染了对照质粒 pM1-MT (不含插入)(图 1a) 和含有编码 SEAP 插入的质粒 pM1-SEAP 后差异表达基因的数目。图表清楚地显示, 无论采用何种细胞系和质粒, FuGENE®HD 转染试剂比 L2K 产生少得多的脱靶效应。例如, 在实验 1 中, 当 MCF7 细胞转染对照质粒, FuGENE®HD 试剂导致总共 197 个基因的上调或下调, 而 L2K 影响了 1405 个基因。197 个中的 140 个基因是采用两种试剂进行转染后均发生差异表达的基因, 只有 57 个基因是 MCF7 使用 FuGENE®HD 转染 pM1-MT 后差异表达的基因。在第二组生物复制品结果中(实验 2) 当采用 FuGENE®HD 转染后 263 个基因被改变了, 而采用 L2K 转染是 802 个基因受到影响。

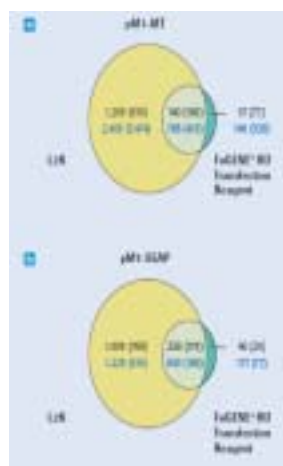


图1: 文氏图显示了 FuGENE®HD 和 L2K 两种不同的转染试剂对基因表达影响差异。通过对(a) 不含插入片段的 pM1-MT 及(b) 在两组独立实验中编码分泌型碱性磷酸酶 pM1-SEAP 的质粒表达(括号内的数字为同样条件下第 2 组实验结果)的比较差异表达基因变化。重叠区域代表两种转染试剂都会影响的基因数量。黑色字体代表 MCF7 细胞中变化的基因数量, 蓝色字体代表 HeLa 细胞中受变化的基因数量。

为了证实第一组样本中发现的表达谱趋势(实验 1), 一个半月后准备了第二组 10 个样本并且进行了同样的分析(实验 2)。第二组样本差异表达转录子的绝对数目(表 1 和图 1 的圆括号中)初看与第一组样本的结果不相同。但是, 考虑到在一个 HG-U133 Plus 2.0 microarray 上有超过 40,000 个基因, 这些差异对这些复制样本就并没有统计学上的意义。如同表 2 中所见, Pearson 相关系数(是对于两组数据相关性的一种统计方法, 当值为 1 表明 100% 相关, 当值为 -1 表明 100% 不相关), 对除 9 号样本外的每一对样本具有大于 0.988 的值。很明显, Pearson 相关系数表明了两组数据强烈的相关性, 并且证实了两组样本中相似的基因表达谱趋势。9 号样本 0.716 的相对较低的相关系数是由于在使用 L2K 转染对照质粒 pM1-MT 进入 HeLa 细胞时, 在两组实验中观察到的大量的细胞死亡导致的。

表2. 生物重复样本强度测量的 Pearson 相关系数

样本 #	细胞系	分子	Pearson 相关系数
1	MCF7	未转染	0.992
2	MCF7	FuGENE <sup>®</sup> HD 转染试剂 + pM1-MT	0.988
3	MCF7	FuGENE <sup>®</sup> HD 转染试剂 + pM1-SEAP	0.985
4	MCF7	L2K + pM1-MT	0.989
5	MCF7	L2K + pM1-SEAP	0.990
6	Hela	未转染	0.995
7	Hela	FuGENE <sup>®</sup> HD 转染试剂 + pM1-MT	0.990
8	Hela	FuGENE <sup>®</sup> HD 转染试剂 + pM1-SEAP	0.991
9	Hela	L2K + pM1-MT	0.716*
10	Hela	L2K + pM1-SEAP	0.993

\*实验 2 中的样本 9 未通过质量控制标准。这个样本缺乏足够的 RNA 来产生基因表达谱数据。来自失败杂交的数据用于此相关性，因此这个值较低。

表3. 与未转染对照相比较的部分重要细胞生物学过程/途径中差异表达基因的数目。FuGENE<sup>®</sup>D 和 L2K 转染试剂用于对 MCF7 和 Hela 细胞转染质粒 pM1-SEAP。第一列给出了在 Gene Ontology (GO) Consortium 数据库中注释过的生物学过程。对于两种细胞转染 pM1-MT 后，也观察到了相似的趋势，例如 L2K 在给出的生物学过程/途径中比 FuGENE<sup>®</sup>HD 转染试剂影响更多的基因（数据未给出）。想要获得更多关于 Gene Ontology 和生物学过程的定义，请参考 <http://www.geneontology.org>。

GO 目录	MCF7 细胞		Hela 细胞	
	L2K	FuGENE <sup>®</sup> HD 转染试剂	L2K	FuGENE <sup>®</sup> HD 转染试剂
GO: 0000087 有丝分裂细胞周期 M 期	26	1	23	9
GO: 0006351 DNA 依赖的转录过程	113	9	133	59
GO: 0006397 mRNA 加工	24	1	16	8
GO: 0006886 胞外蛋白运输	37	3	36	18
GO: 0006915 凋亡	44	8	47	27
GO: 0006917 凋亡诱导	12	2	11	5
GO: 0006950 压力应答	75	20	72	41
GO: 0006955 免疫应答	57	29	37	15
GO: 0007049 细胞周期	78	5	71	38
GO: 0006412 蛋白质生物合成	64	8	44	21
GO: 0007155 细胞黏着	30	7	36	26
GO: 0030154 细胞分化	19	2	32	21
GO: 0009605 外部刺激应答	21	5	28	16
GO: 0006974 DNA 损伤刺激应答	25	3	22	9
GO: 0042221 化学物质刺激应答	17	1	24	23

### 对重要生物学过程的干扰

为了检测实验 1 中差异表达转录子的相关性，我们分析了当使用 FuGENE<sup>®</sup>HD 转染试剂和 L2K 对 MCF7 和 Hela 细胞系转染质粒 pM1-SEAP 时改变的一些重要生物学过程 / 途径的基因的数目（表 3）。这些结果表明 FuGENE<sup>®</sup>HD 转染试剂在 MCF7 和 Hela 细胞系中仅仅改变很小一部分涉及重要生物学过程的基因的表达。相对

的，L2K 影响较多的此类基因。例如，L2K 表现出对于 DNA 依赖的转录具有较大的影响作用。对所有分析的样本，L2K 至少改变了 2 倍于 FuGENE<sup>®</sup>HD 转染试剂改变的这类基因。相似的趋势也在两种细胞中转染 pM1-MT 后观察到。这种趋势在实验 2 中也存在并且在几乎所有其它生物学过程中都显现出来了（数据未显示）。

### 转染效率

将培养基上清中分泌型碱性磷酸酶（SEAP）的活性作为转染效率的测量方法。在 MCF7 和 Hela 细胞的最优化条件下，当细胞使用 FuGENE<sup>®</sup>HD 转染试剂进行转染时，相对高的 SEAP 活性意味着高的 SEAP 的表达。相对转染效率在表 2 中得以描述。很有趣的是，在两种细胞系中 FuGENE<sup>®</sup>HD 相对高的转染效率并不导致相对多的差异表达转录子的数目。在使用 FuGENE<sup>®</sup>6 和 FuGENE<sup>®</sup>HD 的这些实验之前，我们一直认为差异表达转录子与表达水平相关。高转染效率和对转录水平较低的干扰证实了 FuGENE<sup>®</sup>HD 转染试剂出众的转染表现。

### 结论

在这项研究中，FuGENE<sup>®</sup>HD 转染试剂和 L2K 表现出对转染后的人 MCF7 和 Hela 细胞表达谱和重要生物学过程干扰的极大不同的影响。当 FuGENE<sup>®</sup>HD 在两种细胞中都具有较高的转染效率的同时，相对于转染试剂 L2K 影响少得多的基因。FuGENE<sup>®</sup>HD 转染试剂这两种优秀的表现特性使得其成为了功能研究中要求高转染效率和低脱靶效应时对转染试剂的选择。

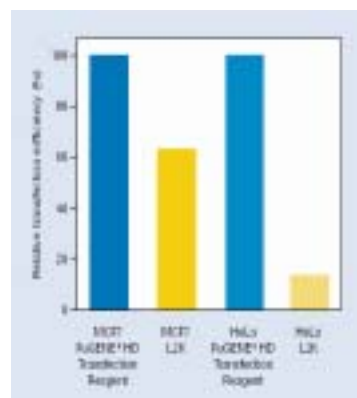


图2: 转染效率。FuGENE<sup>®</sup>HD 较之 L2K 在 MCF7 和 Hela 细胞中转染编码分泌型碱性磷酸酶载体（pM1-SEAP）相对转染效率，对每个细胞系都将 FuGENE<sup>®</sup>HD 相对发光单位值设为 100%。

### 参考文献

1. Azzam T, Domb AJ (2004) *Curr Drug Deliv* 1:165-193
2. Farrell P, Iatrou K (2004) *Protein Expr Purif* 36:177-185
3. Nagy N, Watzel M (2004) *Biochemica* 4:9-11