

先进的转染技术：

使用 FuGENE® HD 转染试剂转染 PCR 构建产物

Jay Wang¹, Susan Calvin¹, Simone Pitz^{2*}, and Linda Jacobsen¹

¹ 罗氏诊断应用科学部，印第安纳波利斯，美国；² 罗氏诊断应用科学部，曼海姆，德国

* 联系作者：simone.pitz@roche.com

简介

随着当前分子生物学技术的发展，构建基因序列并且评估由这些基因序列翻译成的蛋白质成为可能。基因组中越来越多部分的功能以及因为基因序列的变化引起的突变正在被破解。这些研究包括检测基因组中未知区段的功能，或是在一段特定的区域中突变一段序列来检测蛋白功能产生何种变化或是和其它分子的结合产生何种影响。在这些研究中，转染质粒耗时费力，在质粒的构建过程中克隆、扩增和纯化会花费很多时间。如果有多个突变子需要检测，采用以下方法将更为简便：直接检测PCR产物，待目标序列验证正确以后将其构建入质粒中。我们做了一系列实验来验证 FuGENE® HD 转染试剂能否将 PCR 片段转入细胞并且在细胞内达到转染基因序列的高表达。转染线状和环状的质粒作为本底对照。PCR 产物的构建采用商业试剂盒。为了达到我们的实验目的，我们进行了如下调查：

- 有多少百分比的细胞表达了目标蛋白质？
- 是否足够多的单个细胞表达的蛋白水平能被观察到？
- 转染的程度是否可以和标准质粒载体的转染程度相当？

材料和方法

细胞

转染前一天，在 96 孔细胞培养板中每孔植入 5,000 个 HeLa 细胞 (ATCC® CCL-2™)，此密度低于该细胞系的推荐密度，此处使用这个密度是为了观察单个细胞的蛋白表达量。

质粒

在此实验中使用了 gWIZ-GFP (GeneTherapy Systems P 040400) 和 pGL3 荧光素酶报告载体 (Promega E1741)。用 Xho I 单酶切 gWIZ-GFP 使其线性化，并纯化。

转染试剂

采用 FuGENE® HD 转染试剂和 GenePORTER® 转染试剂 (epiTAP Express® 试剂盒，Gene Therapy Systems TAP 010220)，转染试剂的操作参照操作手册。

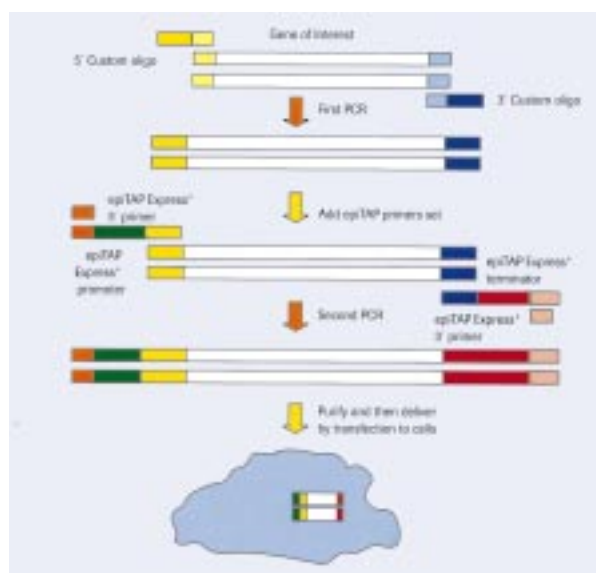


图 1 按照 epiTAP Express® 试剂盒的操作程序构建 PCR 产物，用于转染进 HeLa 细胞。

PCR 产物

PCR 产物的制备采用质粒中的基因为模板，参照 epiTAP Express® 试剂盒的操作说明构建（图 1）。

复合体的形成

转染试剂 - DNA 复合体的构建参照 FuGENE® HD 转染试剂盒内的包装说明书进行。

根据注解 3 作为设计细胞种板的指南[1]。因为 PCR 产物的直接转染以前从来没有人做过，因此这里我们采用了扩大转染试剂与 DNA 比例的检测方法。不同量的复合体按照推荐的比例被加入到细胞中。所有的核苷酸（环状质粒、线状质粒和 PCR 产物）按照相同的操作步

骤加入至圆底96孔板中，转染试剂和DNA的比例不同。

当采用 PCR 产物构建复合体时，我们只准备 25 μl 的复合体（常规的需要 100 μl ），以便限制 PCR 产物的用量。epiTAP Express[®] 试剂盒所含名叫 GenePORTER[®] 转染试剂，按照其说明书进行操作。

转染操作步骤

- 1. 准备稀释后终浓度分别为20 $\mu\text{g/ml}$ 和40 $\mu\text{g/ml}$ 的质粒或 PCR 产物，轻微漩涡震荡以确保混匀。需要计算体积；
- 2. 将 DNA 加入到一个 96 孔组织培养板的两列；
- 3. 加入2-10 μl FuGENE[®] HD转染试剂至两列DNA 孔中，开始准备不同比例的转染试剂 – DNA 复合体(表 1 列出了转染试剂和 DNA 的比率)。

- a. 将移液枪头直接插入稀释的质粒中，轻轻的上下吸吹 15 次；
- b. 当所有的复合体都形成以后，将培养板放入摇床中震荡 15-30秒以保证充分混合，室温放置培养板 10-15 分钟；
- 4. 从培养箱中拿出细胞培养板，加入不同比例的复合体（第3步中制备）至细胞培养板中（7 μl ，5 μl ，3 μl 和 1 μl ，如表 1 所示）；
- a. 将复合体直接加入到培养基中并轻柔混合，以保证充分混匀但不搅乱细胞；
- b. 将细胞培养板(含加入的复合体)振荡 15-30秒，已保证充分混匀；
- 5. 将培养板放入孵箱中，24 或 48 小时后观察和检测。

***	1	2	3	4	5	***	6	7	8	9	10	11	12
Reagent control		7 μl	5 μl	3 μl	1 μl								
8:2		7 μl	5 μl	3 μl	1 μl	10:2	7 μl	5 μl	3 μl	1 μl			
7:2		7 μl	5 μl	3 μl	1 μl	6:4	7 μl	5 μl	3 μl	1 μl			
6:2		7 μl	5 μl	3 μl	1 μl	5:4	7 μl	5 μl	3 μl	1 μl			
5:2		7 μl	5 μl	3 μl	1 μl	4:4	7 μl	5 μl	3 μl	1 μl			
4:2		7 μl	5 μl	3 μl	1 μl	3:4	7 μl	5 μl	3 μl	1 μl			
3:2		7 μl	5 μl	3 μl	1 μl	2:4	7 μl	5 μl	3 μl	1 μl			
DNA control		7 μl	5 μl	3 μl	1 μl								

表 1 加入细胞中的转染试剂 -DNA 复合体的比例和数量
*** 列代表加入细胞培养板中的复合体比例。此表中，1-12 列代表加入进细胞培养板中的复合体体积。第 1 列作为细胞对照，第 2-5 列（黄色）为加入标准的转染试剂 -DNA 比例和标准的对照。第 6-9 列为加入待测试的额外比例（绿色）。第 10 列代表用 GenePORTER[®] 转染试剂盒转染 PCR 产物。第 11 和 12 列代表用 FuGENE[®] HD 转染质粒。

结果

转染环状和线状 gWIZ-GFP 质粒

标准的环状质粒比线状质粒的转染效率要高得多（图 2）。细胞表达的蛋白质产量不同：当用 FuGENE[®] HD 转染环状质粒时，绝大多数Hela细胞都有不同程度的蛋白表达；线状质粒复合体的蛋白表达效率低；经线状质粒转染的细胞中，少于 1/3 的细胞被观察到有 GFP 的表达。

转染 gWIZ-GFP PCR 产物

如图 3 所示，PCR 产物直接进行转染，有足够多的 GFP 表达，我们可以在荧光显微镜下看到细胞内 GFP 的表达。即使在这个简单的优化实验中，在某些条件下，PCR 产物经 FuGENE[®] HD 转染的细胞中约有 1/3 表达出

了足量的可观察到的蛋白。经 FuGENE[®] HD 转染 PCR 产物后能够观察到的转染细胞数和表达量都比 epiTAP Express[®] 试剂盒中所包含的 GenePORTER[®] 转染的多许多（结果未展示）。经 FuGENE[®] HD 转染的 Hela 细胞在形态学上与对照细胞一致。

转染荧光素酶质粒和 PCR 产物

在观察了 PCR 产物编码的 GFP 表达效率以后，我们采用荧光素酶来鉴定不同的表达量（图 4）。pGL3 对照质粒用来作为模板以扩增荧光素酶基因，PCR 产物的构建采用 epiTAP Express[®] 系统。在转染 24 小时以后，对荧光素酶的表达量做对比，结果显示当用 FuGENE[®] HD 转染 PCR 产物时，表达量比 pGL3 质粒的要高。每孔有 10,000 个细胞被观察到的蛋白表达量比每孔 5,000

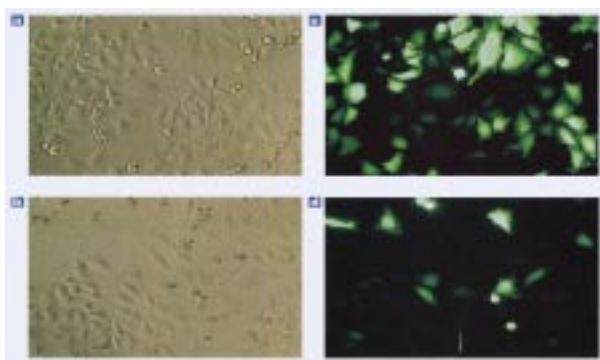


图 2：标准质粒转染 2 天后的 HeLa 细胞显微照片。上图为(a)对照阶段,(c)HeLa 细胞的荧光显微照片，每孔 5,000 个细胞，8:2 的复合体比例，5 μ l 转染。该孔的最终量为 0.4 μ l 转染试剂和 0.1 μ g 环状质粒 DNA。

下图为(b)对照阶段,(d) HeLa 细胞的荧光显微照片，每孔 5,000 个细胞，8:2 的复合体比例，7 μ l 转染。该孔的最终量为 0.56 μ l 转染试剂和 0.14 μ g 线状质粒 DNA。

个细胞被观察到的表达量高。我们同时也发现，当用 FuGENE[®] HD 转染 PCR 产物时，荧光素酶的表达量也要高于 epiTAP Express[®] 系统试剂盒中提供的转染试剂转染 PCR 产物的表达量。

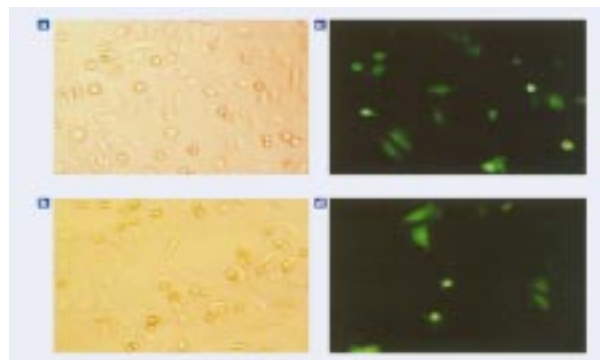


图 3：用 PCR 产物转染 1 天后的 HeLa 细胞显微照片。上图为(a)对照阶段,(c)HeLa 细胞的荧光显微照片，3:4 的复合体比例，7 μ l 体积，使用 FuGENE[®] HD 转染。下图为(b)对照阶段,(d) HeLa 细胞的荧光显微照片，4:2 的复合体比例，5 μ l 体积，使用 FuGENE[®] HD 转染。

在所做的荧光素酶的实验中，FuGENE[®] HD 可以转染足量 pGL3 来源的 PCR 产物，比如，转染进 HeLa 细胞中 PCR 编码产物的荧光素酶的表达量比环状质粒要高。这个原因可能是 pGL3 本身结构的缘故。我们以前曾经发现 pGL3 的表达量大约是另外一种载体 pM1-荧光素酶

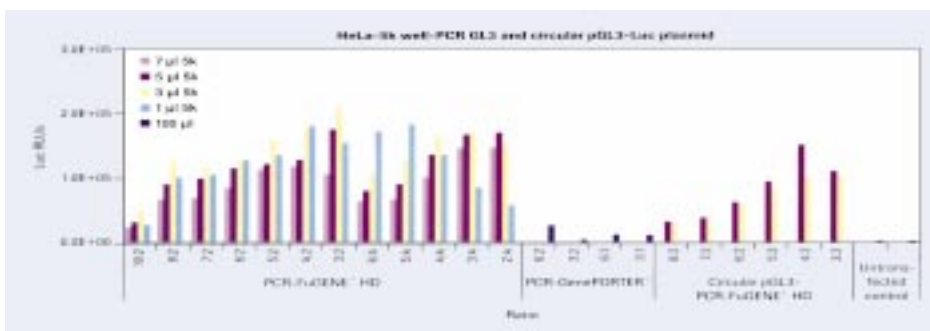


图 4 荧光素酶的表达
每孔 5,000 个 HeLa 细胞，经不同的复合体量转染，测试的材料为：
——左：用 FuGENE[®] HD 转染 PCR 产物
——中：用 GenePORTER[®] 转染 PCR 产物
——右：用 FuGENE[®] HD 转染 pGL3 载体

讨论和结论

我们这里展示了 FuGENE[®] HD 转染试剂盒可以转染环状质粒、线状质粒和 PCR 产物，这些质粒和 PCR 产物中含有我们感兴趣的基因片断和调节序列。在这三种 DNA 序列的转染中，细胞的 GFP 表达量都是足够的，都能够被荧光显微镜观察到。尽管现在已经公认线状质粒转染后的蛋白表达量比其相应的环状质粒要小得多，但线状质粒有时还是被用来做稳定的转染载体。如我们预期的一样，我们发现环状质粒的 GFP 表达量最高，线状质粒和 PCR 产物的 GFP 表达量相同。

在此次实验中使用的 GFP 质粒载体含有强 CMV 启动子，PCR 产物的低表达有可能是缺乏这个启动子的缘故。这个预期是基于荧光素酶质粒的表达结果，即荧光素酶 PCR 产物与其质粒都是弱启动子。

表达量的 10% 左右（结果未出示）。改进更多的调节因素应该可以增加 PCR 产物的蛋白表达量。

直接转染 PCR 产物至细胞内开创了一个蛋白表达的新途径。DNA 序列中的单点或多点突变可以更快的在蛋白质水平上被检测到。FuGENE[®] HD 转染试剂是此类应用中最先进的转染试剂：PCR 产物转染的蛋白表达量和传统的载体相当，相对于 GenePORTER[®] 转染试剂而言，FuGENE[®] HD 转染试剂转染 PCR 产物的效率要高得多。

产品名称	包装规格	序列号
FuGENE [®] HD	0.4 ml	04 709 691 001
Transfection Reagent	1.0 ml	04 709 705 001
	5*1.0 ml	04 109 713 001
	10 ml	05 061 369 001