

Ad-A-Gene EGFP-GCCR 腺病毒载体和传统质粒方法的转染效率和对于地塞米松应答程度的比较

P.J. Tatnell and A.F. Santos

GE Healthcare. The Maynard Centre, Cardiff, UK

为比较不同载体的转染效率，分别用腺病毒和质粒构建了带 EGFP 标签的肾上腺皮质激素受体(EGFP-tagged glucocorticoid receptor; EGFP-GCCR)的两种表达载体；通过对 EGFP 荧光信号强度和 EGFP-GCCR 对于地塞米松(dexamethasone)应答程度的监测定量了两种方法对于目的基因的转染效率和对生物功能的研究。对比结果表明：使用腺病毒载体基因传递系统不仅能大大简化操作，其有效性和重复性也高于传统的质粒转染途径，用该方法能够更好地对 GCCR 进行细胞功能学水平的研究。

介绍

Ad-A-Gene腺病毒基因传递系统能将和信号通路相关的传感因子方便地转入哺乳动物细胞。它们包含了编码主要细胞蛋白的基因和报告基因（荧光蛋白基因或硝基还原酶基因）的序列。这些基因在细胞内瞬时表达，其表达量可以通过对上述报告基因的检测来测定。本研究用腺病毒载体和传统质粒方法分别将传感因子转染至细胞内，并对两者的基因传递效率和 EGFP-GCCR 对地塞米松发生的生物学应答进行了比较。

方法

病毒转导和质粒转染

转导通过在合适的 MOI(感染复数)对细胞直接加入 EGFP-GCCR 腺病毒完成，pDC515 质粒中的人类 CMV 启动子被 ubiquitin C 启动子所代替⁽¹⁾，并在开放性阅读框中插入了 EGFP-GCCR 序列。根据质粒提供商的建议，在过程中还使用了 Lipofectamine™-2000 和 FuGENE 6™

使用 IN Cell Analyzer 1000 确定转导 / 转染效率

图像摄取方式：360/40-nm 激发滤光片(Hoechst)，475/20-nm 激发、535/20-nm 发射滤光片(EGFP)，使用“目标强度分析”模块测量 EGFP 在细胞核和细胞质内的比值(nuclear:cytoplasmic ratio)。对于细胞质区域的定义，使用了算法“collar”，该算法通过确定的细胞核形状在周围定义同样圆周的细胞质区域。先定义出未转导 / 未转染的细胞在该区域内的 EGFP 强度，并把该强度加上其标准偏差定义为一个域值。细胞质内的

荧光强度高于该域值的即被认为发生了转导、转染。

通过 FACS 确认转导 / 转染效率

使用 FACSCalibur™ 的流式细胞仪评测转导/转染效率。被转导 / 转染后的细胞根据不同强度的 EGFP 信号被分为两类。其中低信号代表未转导 / 转染的细胞。

GCCR 功能测试

在使用 100-nM 的地塞米松刺激 30min 前，对细胞进行血清饥饿(serum starved)处理 1 小时。地塞米松将促使 GCCR 从细胞质向细胞核转移⁽²⁾。最终用 Hoechst 对细胞核染色、用福尔马林固定细胞后进行细胞计数。

结果

腺病毒转导

分别使用 IN Cell Analyzer 1000 和流式细胞仪对各种不同细胞系的转导效率进行比较(表 1)。HepG2, HeLa 和 U2OS 细胞的转染效率均高于 99%，SW1353 细胞略低一些。之前的研究表明，在表 1 的数据中，U2OS 和 SW1353 细胞转导效率的确存在类似的差异⁽³⁾。

FuGENE 6-mediated 转染

分别使用 IN Cell Analyzer 1000 和 FACS 比较各细胞系的转染效率(表 2)。结果表明使用融合了 EGFP-GCCR 的 FuGENE 6 重组质粒的转染效率不如等量的腺病毒转导效率(表 1)。

表 1 Ad-A-Gene EGFP-GCCR 转导效率

Cell line	IN Cell Analyzer 1000, 96-well plate*			Flow cytometry, 12-well plate†
	10 MOI	50 MOI	100 MOI	12 MOI
U2OS	99% (± 1%)	99% (± 1%)	99% (± 1%)	96%
HepG2	97% (± 1%)	99% (± 1%)	99% (± 1%)	73%
HeLa	73% (± 23%)	98% (± 5%)	99% (± 3%)	80%
SW1353	26% (± 10%)	37% (± 8%)	46% (± 10%)	14%

IN Cell Analyzer 1000 数据为 3 次实验平均结果。流式细胞仪数据为单一实验结果

* 96 孔板植入 1×10^4 cells/well.

† 12 孔板植入 1×10^5 cells/well.

Ad-A-Gene腺病毒转导和质粒转染: 基于同一种测试系统得比较

通过测试, 所有 EGFP-GCCR 腺病毒载体转导的细胞都表现出了稳定了转导效率。与之相对应, 质粒转染方法会由于所使用的细胞系种类的不同, 其转染效率的稳定性会表现出很大的差异。例如, 使用质粒转染的话, HeLa 和 U2OS 就比 HepG2 或 SW1353 细胞更能获得可靠的重复性(图 1)(表 3)。

对于 EGFP-GCCR 腺病毒载体转导的细胞, 地塞米松的响应值同样展现了更好的信噪比和 p 值。SW1353 和 HepG2 细胞虽然在低水平 MOI 下的转导效率也较低, 但使用核转运分析模块(Nuclear Trafficking Analysis Module)同样能够得到可被接受的地塞米松响应值; 而使用质粒转染方法, 所有细胞系的转染效率都相对较低, 仅仅在 HeLa 和 U2OS 细胞上得到了可接受的信噪比和 p 值, 即使如此, 其信噪比的稳定性还是不理想。而对于 HepG2 和 SW1353 细胞来说, 无论是信噪比和 p 值均无法让人满意。

结论

腺病毒载体相对于传统的质粒载体而言有着多种明显的优势。我们提供的 Ad-A-Gene 腺病毒基因传递系统操作非常简单, 只需直接将病毒和细胞混合。在合适的 MOI 下, 使用腺病毒载体方法能够使转染效率明显提升, 其实验重复性也更为可靠。研究结果同样表明了, 使用了 EGFP-GCCR 腺病毒载体方法的细胞系更够使用地塞米松直接转导进行检测, 通过荧光信号的差异区别不同的转导效率。

表 2 使用 FuGENE 6 和 pDC515 UbCEGFP-GCCR 载体的转染效率

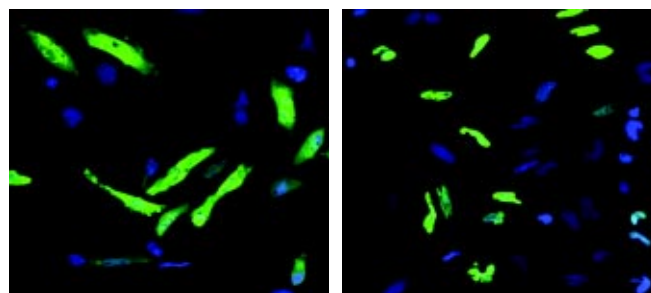
Cell line	IN Cell Analyzer 1000, 96-well plate*	Flow cytometry, 12-well plate†	Flow cytometry, 6-well plate‡
U2OS	4-24%	8-15%	13-17%
HepG2	4-18%	4-8%	2-8%
HeLa	6-54%	11-24%	15-26%
SW1353	3-8%	0-1%	1-2%

数据为 3 次实验平均结果

* DNA 含量范围: 25-100 ng, FuGENE 6: 2-6%; 通过不同体积使之达到 1×10^4 cells/well.

† DNA 含量范围: 250 ng - 1 μ g, FuGENE 6: 3%; 通过不同体积使之达到 1×10^5 cells/well.

‡ DNA: 1 μ g, FuGENE 6: 3-9%; 通过不同体积使之达到 3×10^5 cells/well.



A 对照

B 加入地塞米松

图 1 典型的 HeLa 细胞转染 EGFP-GCCR 后的实验前后变化

表 3 四种细胞系的转导/转染效率, 以及加入地塞米松后的相应变化

Adenoviral transduction				
Cell line	MOI	Transduction (%)	S:N*	Significance
U2OS	5	74 (\pm 6.4)	4.5 (\pm 0.4)	P < 0.01
HepG2	5	39 (\pm 2.8)	2.1 (\pm 0.4)	P < 0.01
HeLa	20	84 (\pm 1.4)	5.0 (\pm 2.2)	P < 0.01
SW1353	42	27 (\pm 7.8)	3.4 (\pm 0.5)	P < 0.01
Plasmid transfection				
Cell line	DNA (ng)	Transfection (%)	S:N*	Significance
U2OS	50-150	4-24	0.8-3.4	P < 0.01
HepG2	50-150	3-10	0.1-0.8	P < 0.35
HeLa	50-150	7-55	0.5-2.9	P < 0.02
SW1353	50-150	4-9	0.4-1.9	P < 0.11

数据为 3 次实验平均结果。对于质粒转染方法, 使用了两种设计 (FuGENE 6 和 Lipofectamine), 表中显示的为两者共 6 次实验中最高信噪比和 p 值。

$$* \text{信噪比计算方法, 依据公式: } \frac{\mu_p - \mu_x}{\sqrt{\alpha_x^2 + \alpha_n^2}}$$

μ = 平均信号强度, α = 标准偏差,

p = 加入地塞米松后, n = 对照。

参考文献

1. Ng, P. et al., Hum. Gene Ther. 11, 693-699 (2000).
2. Kumar, R. and Thompson, E.B., J. Steroid Biochem. and Mol. Biol. 94,383-394 (2005).
3. Ketola, A. et al., Int. J. Molec. Med. 13, 705-710 (2004).

订购资料

产品	货号
Ad-A-Gene EGFP-Glucocorticoid Receptor	GDS20008
IN Cell Analyzer 1000	25-8010-26
IN Cell Analyzer 1000 Seat License	25-8098-22
Object Intensity Analysis Module (for IN Cell Analyzer 1000)	25-8010-56
Nuclear Trafficking Analysis Module (for IN Cell Analyzer 1000)	25-8010-31