

# FuGENE® HD转染试剂对原代骨骼肌成肌细胞进行的高效转染

Stefanie Grunwald\* and Astrid Speer

分子生物学 生命科学和技术系, Berlin 应用科学和技术大学, 德国

\* 联系作者: stgrunw@tfh-berlin.de

## 简介

细胞转染是用于调控基因表达最主要的技术。针对某些细胞系如 C2C12, 有多种适合的转染试剂和方法, 但大部分原代细胞或人骨骼肌成肌细胞 (SkMC) 特别难转染。只有少数文献报道对人原代的成肌细胞用非病毒系统成功进行转染 [1, 2, 3]。这些方法包括阳离子脂质体例如磷酸脂质体, 电转染以及结合了脂质体和腺病毒相关蛋白的方法。但转染效率都偏低, 是在毒性和转染效率之间达到折衷的结果。

尤其对于来自营养不良或者萎缩个体的原代 SkMCs, 其细胞生长受限, 更需要一种高转染效率和低毒性的转染技术。因此我们验证了 FuGENE® HD 转染试剂在原代 SkMCs 中的转染效率和毒性, 并与其它转染试剂进行了比较。

## 材料和方法

### 载体 DNA 的制备

质粒 pReceiver M03 (Genecopoeia) 根据生产方提供的指南进行无内毒素条件下纯化。该质粒载体包括一 7 kb 长的 cDNA 插入片段。

### 细胞培养和转染

原代 SkMCs (肌肉组织培养机构; Munich, 德国)

在含有 5% 胎牛血清 (Promocell, 德国) 及抗生素的骨骼肌细胞培养基培养。

转染步骤包括用胰酶消化细胞后,  $4 \times 10^5$  个细胞铺在六孔板中, 与 FuGENE® HD 转染试剂的步骤相反, 转染在接种后直接进行。用不同的转染试剂与 DNA 配比以及不同体积的转染试剂 - DNA 复合物进行实验, 按照建议的步骤操作 (Table 1), 例如, 2  $\mu$ g 的 DNA 用 100  $\mu$ l 的血清和不含抗生素的培养基稀释 (OptiMem, Invitrogen)。然后再加入 3  $\mu$ l FuGENE® HD 转染试剂 (3:2 比例) 并温育 15 分钟后, 立刻将这一混合物 (100%) 加入到细胞中。至于 200% 和 400%, 体积则分别增加到两倍和四倍。细胞在培养 24 小时后, 用新鲜培养基洗过并更换新培养基。

同时用转染试剂 E 和 F 作对比实验转染细胞, 系统 A 是按照供应商的步骤来操作。

### 转染效率分析

72 小时后, 细胞洗过后, 经胰酶处理, 再用  $1 \times$  PBS 洗过后加入 TRI PURE 试剂。DNA 提取按照生产商的说明书。提取 DNA 后加入 RNase H 和限制性内切酶 *Stu I* 来切割质粒。

用实时定量 PCR 来分析转染载体 DNA 的量。采用两对引物, 第一对引物用于检测质粒上插入的 cDNA 同

Table 1: Different transfection parameters as tested for primary human SdMCs transfection efficiency.

	Negative control				FuGENE® HD Transfection Reagent: DNA		
	DNA only	FuGENE® HD Transfection Reagent only			FuGENE® HD Transfection Reagent: DNA		
FuGENE HD Transfection Reagent: DNA (ul:ug)	0:2	3:0	6:0	12:0	3:2	6:2	12:4
Volume of complex (%)	100	100			100	100	100
	200	200	200	200	200	200	200
					400	400	400

时也检测两个在插入物上已知的内源性假基因（见 [www.pseudogene.org](http://www.pseudogene.org)）。由于实验中采用的细胞来源于同一提供者，整个基因组和假基因相同且可以忽略。第二对引物用来扩增内源性 DNA 的插入序列，其中正向引物和 cDNA 插入序列的正向引物对应，反向引物则根据下一个内含子 DNA 设计。

五份不同拷贝数的载体 DNA 分别取三分之一进行四倍梯度稀释，计算得到标准曲线效率为 1.99。对于 Table 1 中列出的所有样品，均进行了两个实时定量 PCR 反应：载体上 cDNA 插入片段的扩增和内源性 DNA 的检测，以确定每个反应中 DNA 量的差异。所有样品的结果调整后应用于标准曲线以重新获得每个实验的拷贝数。

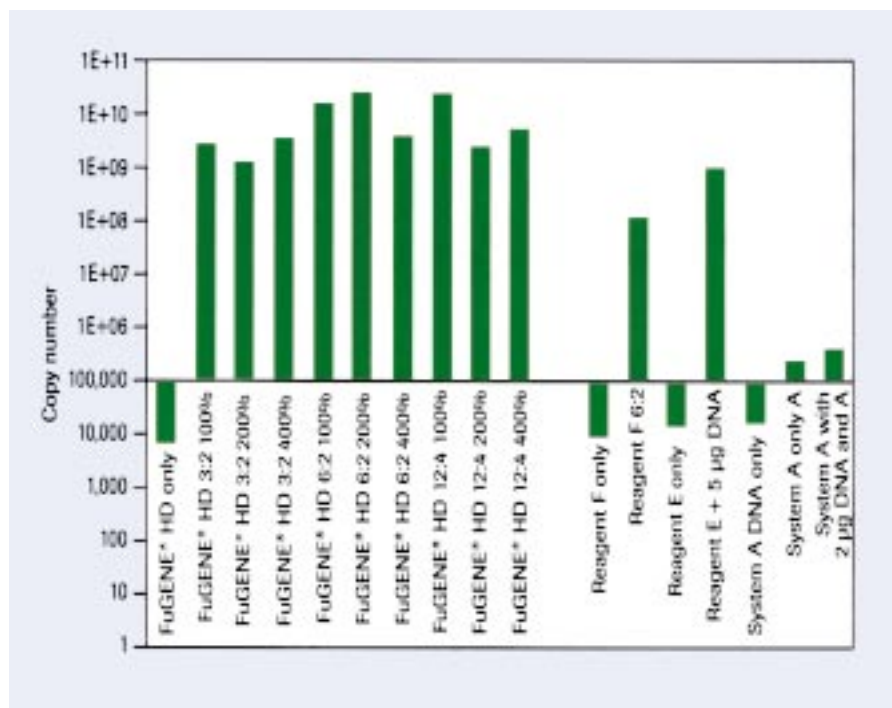


Figure 1: Copy numbers of transfected plasmid vector DNA. Plasmid DNA copy numbers isolated from  $4 \times 10^5$  Primary SkMCs derived with FuGENE® HD Transfection Reagent as transfection reagents E, F, and the system A.

## 结果和讨论

Figure 1 代表 FuGENE® HD 转染试剂和试剂 E、F、系统 A 的结果。转化效率最高的是通过 FuGENE® HD 获得的(从  $4 \times 10^5$  原代 SkMCs 细胞中获得  $2.4 \times 10^{10}$  拷贝)，转染试剂和 DNA 的比例是 6:2，转染复合物的体积为 200%。该值初始看起来特别高，但有文献报道这一拷贝数用几种原代细胞都能获得【4】。作者提到每个细胞注射  $10^3$  个质

粒拷贝导致只有 30-50% 的细胞获得微弱的 eGFP 荧光信号。要想获得强的信号，每个细胞需要  $10^5$  个拷贝的质粒。阴性对照只用 FuGENE® HD 处理，仍然在实时定量检测中显示微弱的信号，这也许是由于插入序列中两个已知的假基因导致的，而不是载体 DNA 的污染所致。

和 FuGENE® HD 试剂相比，试剂 E、F 和系统 A 只得到一个很低的载体拷贝数。转染试剂 E 在这三者中相对效率最高，但也只有 FuGENE® HD 最高值的 1/25。另外它的毒性相对于 FuGENE® HD 也是非常突出的。在细胞和 FuGENE® HD 转染试剂 - DNA 复合物混合后培养 24 小时之后通过显微镜监测毒性的影响，其它转染试剂和方法也同样进行实验。体积为

100% 和 200% 的时候没有监测到有毒性，但是在 400% 的条件下有中等毒性，而用试剂 E、F、系统 A（未列出数据）导致 30-40% 的细胞死亡。

## 结论

用 FuGENE® HD 转染试剂能够成功进行原代人 SkMCs 的转染，并同时保证毒性最小化。这些细胞用标准转染试剂转染有困难而且对毒性敏感。

由此可以得出结论，FuGENE® HD 转染试剂新创了一种简单实用、低毒的转染方法，成功地将 7 kb 的质粒载体转入原代人 SkMCs 中。

转染质粒载体 DNA 的拷贝数。质粒 DNA 拷贝数

是经过 FuGENE® HD 和其它转染试剂 E、F、系统 A 转染后从  $4 \times 10^5$  原代 SkMCs 获得。

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	04 709 713 001
	10 ml	05 061 369 001