

利用 FuGENE® HD 转染试剂和慢病毒载体有效转染 293T 细胞株

Duran Ustek*, Deniz Durali, and Esin Aktas

实验医学研究所, 伊斯坦布尔大学, 伊斯坦布尔, 土耳其

*联系作者: dustek@istanbul.edu.tr

慢病毒载体已经成为基因转移和遗传操作研究中强有力的工具。转染试剂的效率对于得到高滴度的重组慢病毒最为关键。这里我们展示了如何利用 FuGENE® HD 转染试剂和慢病毒载体高效转染 293T 细胞株。

简介

慢病毒已经成为基因转移和表达方面具有吸引力的运输工具。慢病毒载体能够在体内整合到非分化细胞中并得以长期稳定地基因表达, 这一能力正是许多科学方法需要运用的特性。新一代的慢病毒载体系统减少了与载体基因组发生重组的风险。慢病毒构造能利用异质的包膜糖蛋白组成假型病毒, 如水泡性口炎病毒(VSV-G)或罗斯河病毒(RRV)的糖蛋白。VSV-G包膜有广泛的宿主范围, 但是 VSV-G 的毒性在转染后会杀死 293T 细胞。转染试剂的效率对于在 293T 细胞为基础的系统得到高滴度的重组载体最为关键。在我们的工作中, 利用来源于 HIV-1 并带有 VSV-G 包膜的慢病毒载体, 转染 293T 细胞, 病毒包装系统包括第二代包装质粒 pPAX2(缺少 vif, vpr, vpu 和 nef 基因), 编码 VSV 包膜蛋白的质粒 pMDG, 和一个编码报告基因 eGFP 和表达 p210 bcr/abl 特异性 shRNA 的转移质粒 pLVTHM。最后我们评估了 FuGENE® HD 转染试剂借助慢病毒载体转染 293T 细胞株的效率。

材料和方法

293T 细胞培养

293T 人的肾上皮细胞株是重组病毒方便的来源。293T 细胞被培养在 Dulbecco 经改良的 Eagle 培养基中, 补充了 10% 胎牛血清, 200 mM L- 谷氨酰胺, 10 mM MEM 非必需氨基酸, 100 mM 丙酮酸钠, 100 U/ml 青霉素, 100 µg/ml 链霉素, 500 µg/ml 遗传霉素和 5% CO₂。转染前 24 小时, 2.5 × 10⁶ 的细胞被接种在含有 4 ml 生长培养基的 60 mm 组织培养皿中。

转染

表达 p210 bcr/abl shRNA 的质粒 pLVTHM,

pPAX2 和 pMDG 用于转染实验。转染步骤如下所示: pLVTHM, pPAX2 和 pMDG 稀释在 150 µl 的培养基中。不含任何添加剂的 MEM 培养基和 6 µl FuGENE® HD 转染试剂逐滴地加到 DNA 混合液中用于形成 DNA-转染试剂复合物。混合物在室温下孵育 15 分钟。在复合物形成期间, 293T 细胞用预热的新鲜培养基培养。DNA-FuGENE® HD 转染试剂复合物用 700 µl 预热的培养基稀释, 逐滴地加到细胞培养物中。在显微镜和荧光激活细胞分选仪分析之前 293T 细胞需要孵育 24 小时。

结果和讨论

利用第二代含 GFP HIV-1 来源的慢病毒构造(带有表达 p210 bcr/abl 的 shRNA 和包装质粒), 并用 FuGENE® HD 转染试剂瞬间转染 293T 细胞。令人惊讶的是, 倒置荧光相差显微镜评估结果显示了超过 90% 的转染细胞(图 1)。转染后 48 小时, 荧光激活细胞分选仪分析结果显示了 86.46% eGFP 显色阳性的细胞(图 2a)。我们同

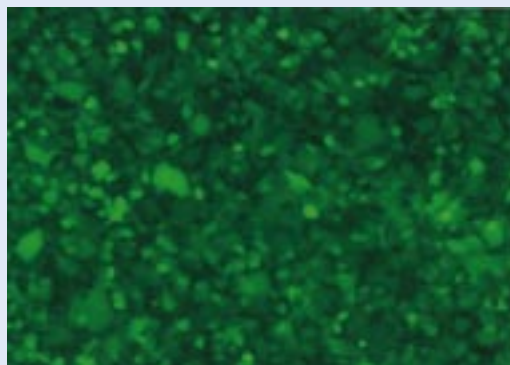


图 1: 转染的 293T 细胞

时用碘化丙啶染色分析了细胞活性(图 2b)。

结论

利用表达 p210 bcr/abl shRNA 的 pLVTHM 和包装质粒, FuGENE® HD 转染试剂转染 293T 细胞转染效率得