

图2: FACS 分析。转染两天后 293T 细胞被收集。(a)转染效率用 GFP 表达来评价, 非转染的 K562 细胞作为阴性对照。(b)利用碘化丙啶进行毒性分析。

到了显著的提高。总之, 利用FuGENE® HD 转染试剂转染 293T 细胞, 86.46% 转染细胞显示 eGFP 表达阳性。荧光激活细胞分选仪分析碘化丙啶染色的结果显示利用慢病毒载体质粒, FuGENE® HD 转染试剂对 293T 细胞的细胞毒性极小。

### 参考文献

1. Felgner P L, Ringold GM(1989) Nature 337:387-388
2. Djull T et al.(1998) J Viol 72:8463-8467
3. Wiznerowicz Met al. (2006) Nat Methods 3:682-688

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

## FuGENE® HD 转染试剂对鼠 NB2a 细胞系提供高效转染

Chen Chen\* and Mahendra Deonarain

Division of Cell and Molecular Biology, Faculty of Natural Science, Imperial College London, UK

\* 联系作者: c.chen07@imperial.ac.uk

### 简介

细胞转染是一种将外源 DNA 转入细胞的基因传递方法, 并成为现代遗传学和蛋白质组学研究中最重要工具之一。因其自身特点转染原代细胞可被应用于组织工程和基因治疗中。然而, 一个最主要的问题是很多转染方法对神经细胞系并不十分有效。在这里, 我们发现 FuGENE® HD 转染试剂对鼠的成神经细胞瘤细胞—NB2a 细胞系能实现高效率转染和提供细胞内蛋白表达的高水平。在一个优化实验中分别使用了三种转染试剂, 包括 FuGENE® HD, FuGENE® 6 以及另一个脂质体转染试剂, 检测通过瞬时转染在到 NB2a 细胞中绿色荧光蛋白的表达水平。FuGENE® HD 的操作规程使用简单, 在神经细胞中显示出转染迅速, 结果突出 (效率约为其它转染试剂的两倍) 的优点。

### 材料与方法

#### 转染条件优化实验

在转染前一天, 将  $2 \times 10^5$  NB2a 细胞 (伦敦大学帝国理工学院 J. Silva 博士馈赠) 接种到灭菌 6 孔板上, 添加 2 ml DMEM (补充了 10% FCS, 1% L-谷氨酰胺, 1% 青霉素和链霉素) 进行培养。过夜培养条件为 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 湿度 60%。然后用三种不同的转染试剂: FuGENE® HD, FuGENE® 6 和脂质体转染试剂分别转染质粒 pEGFP-C1 进细胞。

按照 FuGENE® HD 和 FuGENE® 6 的操作规程, 含 2 μg 质粒的 DNA 溶液用 100 μl 无血清 DMEM 稀释, 然后为转染制备不同的转染试剂和 DNA 比例的转染复合物。对于 FuGENE® HD, 比例分别为 3:2、4:2、5:2、6:2、7:2 和 8:2 (根据操作规程中推荐的比例)。对于 FuGENE®

6, 比分别为 3:1、3:2、6:1、1:1 和 1:2 及未转染的阴性对照。对 FuGENE® HD, 旋涡混匀在室温下培养 15 分钟; 对 FuGENE® 6 则培养 5 分钟。期间, 6 孔板上的培养基将被转移, 细胞用 1 × PBS 清洗。900 μl 新鲜无血清 DMEM 和 100 μl 转染复合物混匀后加入各板孔中。对 FuGENE® HD, 新鲜培养基加入, 过夜培养。对 FuGENE® 6, 在通常细胞培养条件下培养 3 小时、8 小时和过夜后, 将培养基改换成新鲜含血清的 DMEM。所有细胞都再继续培养 2 天后检测。

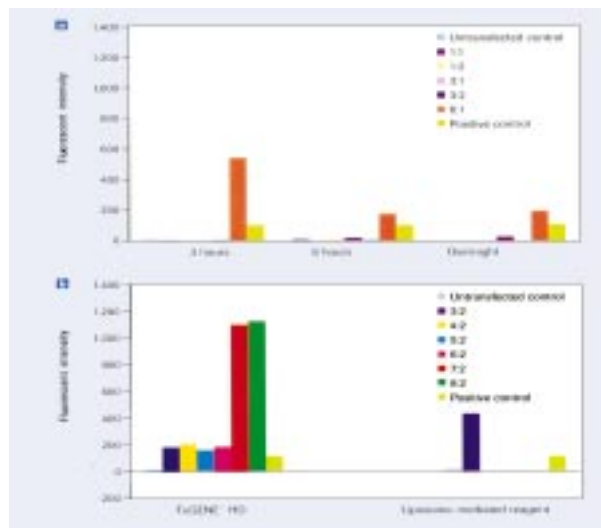
### 细胞裂解和转入细胞表达分析

在转染两天后, 细胞用 1 × PBS 清洗两次, 用胰岛素处理后收集和离心。接着用 10 ml 1 × PBS 清洗细胞小球, 再悬浮于 400 μl 的冰浴细胞裂解液(10 mM Tris-HCl, 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 130 mM NaCl 和 1% Triton X-100, pH7.5)中放置 30 分钟。在 4°C, 14000 rpm 下离心提取胞内蛋白。收集上清液, 用 96 孔荧光读板机 (Fluoroskan Ascent II, USA) 分析 GFP 表达量。

相同的 NB2a 细胞量 (2 × 10<sup>5</sup>) (之前已用相同的 DNA 质粒转染) 也被接种到 6 孔板上并用同样的方法处理来读取荧光值。

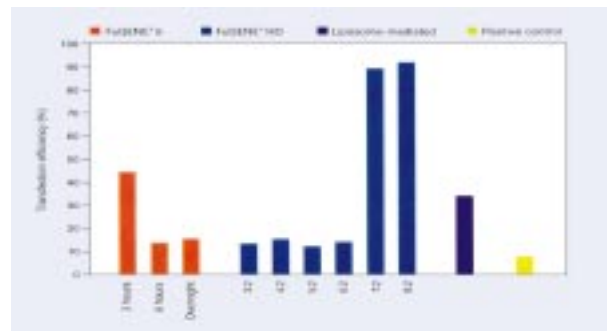
### 结果和讨论

使用不同转染试剂与质粒 DNA 比例的复合物下的 FuGENE® HD 转染效果, 可从 NB2a 细胞中提取到的 GFP



**Figure 1: GFP expression in NB2a cells two days after transfection.**  
 (a) FuGENE® 6 Transfection Reagent with three different incubation times.  
 (b) FuGENE® HD Transfection Reagent and liposome-mediated transfection system.  
 Different transfection reagent: DNA ratios are indicated.

量上区别 (Figure 1b)。与 FuGENE® 6 和另一被广泛应用的脂质体转染试剂相比, FuGENE® HD 提供了超过两倍的转染效率 (Figure 2) 和转入基因的蛋白表达量 (Figure 1)。特别是对于 FuGENE® HD 和 FuGENE® 6, 当转染试剂和 DNA 比例达到某一临界水平时会明显提高转染效率和蛋白表达水平。此外, FuGENE® HD 用量较少 (约 50%), 却仍可获得超过 90% 的转染效率 (推荐比例为 7:2 和 8:2)。很高的转入基因蛋白表达量也表明, 即使在长时间处理情况下, FuGENE® HD 的细胞毒性非常小。基于对 FuGENE® 6 的时间控制, 3 小时转染混合液培养时间比更长时间培养能得到更佳的转染效果 (Figure 1a)。这也说明, FuGENE® 6 在较短转染时间内更有效率。



**Figure 2: Transfection efficiency in NB2a cells.** FuGENE® 6 Transfection Reagent (reagent to DNA ratio, 6:1) with three different transfection intervals, FuGENE HD Transfection Reagent with six recommended reagent: DNA ratios, and liposome-mediated transfection system, together with positive control with known transfection efficiency (8.5%).

### 结论

使用 FuGENE® HD 对鼠成神经细胞瘤细胞的 NB2a 细胞系转染时能得到很高的转染效率和蛋白表达水平。简单的操作规程, 更低的细胞毒性, 将更易于质粒 DNA 的导入和优化蛋白的表达水平。用 FuGENE® HD 对 NB2a 细胞的稳定转染实验成为了在 DNA 转染后对分泌蛋白更好的表达和导入基因的神经细胞系的克隆选择的有力保证。

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
FuGENE® 6	0.4 ml	11 815 091 001
	1.0 ml	11 814 443 001
	5*1.0 ml	11 988 387 001
	10 ml	05 061 377 001