

## 原代大鼠海马神经元的高效转染

苗宏生<sup>1,2</sup>, 余路阳<sup>2</sup>, 林波<sup>2</sup>, 武家才<sup>2</sup>, 郭礼和<sup>2\*</sup>, 惠国桢<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>苏州大学附属第一医院神经外科, 苏州 215006;

<sup>2</sup>中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所, 上海 200031)

**摘要:** 用原代大鼠海马神经元为模型, 对新型电转染方法 Nucleofector™ 与脂质体 DOTAP 和 Lipofectamine™ 的转染效率和转染前后细胞存活率进行比较研究, 探讨 Nucleofector™ 的高效性与可靠性。从 E18 胎鼠海马中取出神经元进行体外培养, 并用神经微丝(NF)抗体进行免疫细胞化学染色鉴定细胞类型。分别用 DOTAP, Lipofectamine™ and Nucleofector™ 包裹 pCMV-eGFP 质粒转染原代大鼠海马神经元。神经元的存活率用流式细胞仪检测。实验结果表明: DOTAP 和 Lipofectamine™ 的基因转染效率仅为 1.55% 和 2.45%, 而 Nucleofector™ 的转染效率则超过 20%; 细胞转染前后的存活率在 DOTAP 组分别为 98.37% 和 88.35%, Lipofectamine™ 组分别为 98.37% 和 90.11%, 而在 Nucleofector™ 组中分别为 98.37% 和 51.82%。上述实验数据表明: Nucleofector™ 转染技术能高效并安全地转染原代大鼠海马神经元, 但死亡率较高。

**关键词:** 转染; 原代大鼠海马神经元; DOTAP; Lipofectamine™; Nucleofector™; 绿色荧光蛋白

中图分类号: Q291

文献标识码: A

文章编号: 0253-9977(2004)03-305-04

原代培养中枢神经系统的细胞由于直接来自体内, 在形态、生理功能上类似母体组织, 能够模拟体内环境, 较之细胞系而言, 在神经系统及相关疾病<sup>[1-3]</sup>的研究中, 发挥着更为重要的作用。

目前常用的基因转染的方法有 4 种: 磷酸钙沉淀转染, 脂质体转染, 电穿孔转染及病毒转染。这些方法对于细胞系而言, 均有较为理想的效果。但是由于神经细胞细胞核处于后有丝分裂阶段, 外源基因很难进入, 传统方法的转染效率很不理想<sup>[4]</sup>。举例来说, 对于原代神经元, 磷酸钙穿透法的转染效率不足 5%, 而且结果不稳定, 不同实验室报道的数据差别很大<sup>[5,6]</sup>; 病毒转染法能够得到较高的转染率, 但操作复杂, 毒性大, 不适合治疗性的实验研究<sup>[7,8]</sup>。近年来, 一些新技术, 特别是脂质体转染法得到了很快的发展。体内和体外实验表明, 脂质体介导的基因转染能够成功地将目的基因转入细胞, 并且无自身免疫反应, 毒性低, 无生殖系统转移<sup>[9]</sup>; 但其转染率仍比较低, 不能用于基因治疗和组织工程的研究<sup>[10]</sup>。

本研究介绍一种由 Amaxa Biosystems 公司最新发明的 Nucleofector™ 转染方法, 在转染原代胚胎大鼠海马神经元的实验中得到了较高的转染效率。

同时我们采用了两种目前最为常用的脂质体 DOTAP Liposome 和 Lipofectamine™ 与之进行比较。

### 1 材料与方法

#### 1.1 细胞培养

将怀孕 18 天的大鼠用 10% 水合氯醛麻醉后打开腹腔取出胎鼠, 置于 60mm 培养皿中, 加入 HBS (HEPES-buffered saline without Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup>), 手术显微镜下, 剖开皮层取出 C 型的海马组织。加入 0.03% 胰蛋白酶置于 37℃, 5%CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中温育 20min 完成消化, 加入胰蛋白酶抑制剂(购于 GIBCO 公司)终止消化。离心去上清液, 用 DMEM+10%FBS 培养基将细胞清洗 3 遍, 每次 5min 去除细胞碎片。离心后加入 Neurobasal+5%B<sub>27</sub> 培养基(均购于 GIBCO 公司)将细胞吹打成单细胞悬液, 以 2×10<sup>5</sup> 的密度铺置于 35mm 培养皿中, 37℃, 5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养<sup>[11]</sup>。

#### 1.2 免疫组织荧光染色

采用神经元特异性表面标志神经微丝(neuron-

收稿日期: 2003-10-28; 修回日期: 2004-02-09

\* 通讯作者, <sup>1</sup>惠国桢; <sup>2</sup>郭礼和, E-mail: lhguo@sibs.ac.cn

filament, NF) 抗体对所培养的细胞进行鉴定。细胞由 PBS 洗 2 次, 4% 多聚甲醛室温固定 15min, PBS 冲洗 2 次, 加入封闭缓冲液(D-PBS, 10% FBS, 0.2% Triton X-100), 37℃ 温育 20min。加入一抗(1:100 小鼠抗大鼠 NF IgG)(DAKO), 4℃ 过夜。PBS 洗 2 次, 然后加入罗丹明标记二抗(1:500 山羊抗小鼠 IgG) (Kirkegaard Perry Laboratories, ML, USA) 37℃ 温育 90min。PBS 洗 3 次后在荧光显微镜下观察。

### 1.3 转染

**1.3.1 DOTAP 转染** 转染于神经元培养 24h 后进行。5μg DNA-pCMV-eGFP 用 HBSS 稀释至 50μl; 30μl DOTAP 用 HBSS 稀释至 100μl; 将二者混合室温放置 15min, 将  $2 \times 10^5$  神经元培养液换成 DOTAP/DNA 混合液, 37℃/5%CO<sub>2</sub> 中温育 6h, 然后换成新鲜 Neurobasal+5%B<sub>27</sub> 培养基。

**1.3.2 Lipofectamine™ 转染** 转染于神经元培养 24h 后进行。100μl OptiMEM I 与 15μl Lipofectamine™ (2mg/ml) 混合, 室温放置 5min; 100 μl OptiMEM I 与 2.5μg DNA (pCMV-eGFP) (1 mg/ml) 混合, 室温放置 5min。二者混合后室温放置 20min(所有转染试剂来自 Invitrogen, Rockville, MD)。将 OptiMEM I®/DNA/Lipofectamine™ 混合液加入  $2 \times 10^5$  细胞中, 37℃/5%CO<sub>2</sub> 中温育 6h, 然后换成新鲜 Neurobasal+5%B<sub>27</sub> 培养基<sup>[12]</sup>。

**1.3.3 Nucleofector™ 转染** 胰蛋白酶消化后, 用 DMEM+10%FBS 培养基清洗 3 次的大鼠海马神经元混悬液离心后, 重悬于 Nucleofector™ 溶液中, 使其终浓度为  $1 \times 10^6 \sim 6 \times 10^6$  个细胞/100 μl。将混合液与 1~3μg DNA 混合均匀, 装入转染盒后放入电转仪中, G-13 程序转染。转染结束后, 加入 500μl 事先预热的 DMEM + 10%FBS 培养基, 温育 2~4h 后, 将培养液更换成 750 μl 新鲜 Neurobasal™+ B<sub>27</sub>, 置入 37℃/5%CO<sub>2</sub> 培养箱中。

### 1.4 生存率的测定

生存率在未转染神经元培养 24h 后和转染神经元培养 24h 后测定。细胞收集后, 进行 PI 染色, 然后由流式细胞仪 FACStar(Becton Dickinson)在 585nm 波长下激发测定。

### 1.5 统计方法

数据以平均数±标准差形式呈现。三种转染方法转染效率的比较分析和存活率的比较分析采用 Student' *t*-test 检验。

## 2 结果

### 2.1 神经元的鉴定

免疫组织荧光染色的结果表明: 我们所培养的细胞大部分能够被以 NF 抗体为一抗, 罗丹明为二抗的化学试剂所染色, 发出特异性的红荧光。说明所培养的细胞主要为神经元, 只有少部分胶质细胞未被染色(图 1)。

### 2.2 转染效率的评价

转染后 48h, 用 pCMV-eGFP 转染的细胞放在倒置荧光显微镜下观察转染效率。转染成功的细胞发出绿色荧光。为定量观察统计, 取 3 个视野记数后取平均数。然后采用流式细胞仪进行细胞记数并用 CellQuest 软件进行计算。结果如下: DOTAP 转染的神经元约 1.55% eGFP-阳性(图 2A); Lipofectamine™ 转染的神经元 2.45% eGFP-阳性(图 2B); Nucleofector™

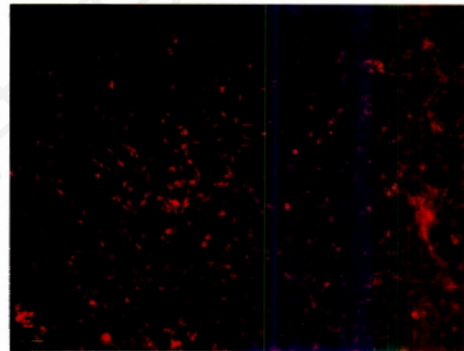


图 1 原代培养大鼠海马神经元特异性表面标志神经微丝(NF)免疫荧光染色

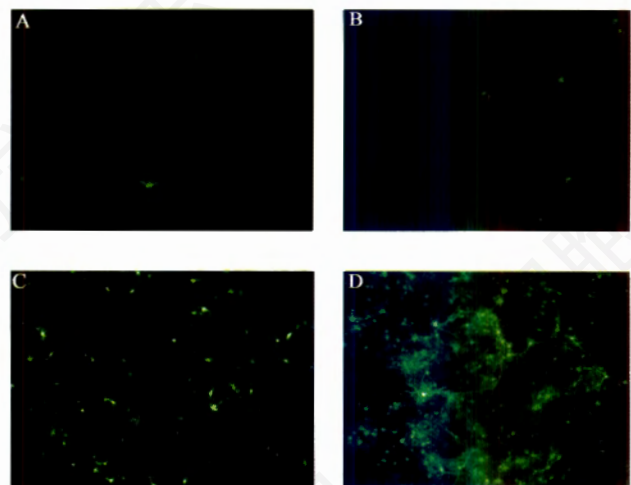


图 2 三种方法转染 pCMV-eGFP 质粒的细胞在倒置荧光显微镜下观察

(A)采用 DOTAP 转染海马神经元, 摄于转染 24h 后(100×); (B)采用 Lipofectamine™ 转染海马神经元, 摄于转染后 24h(100×); (C)采用 Nucleofector™ 转染海马神经元, 摄于转染后 24h(100×); (D)采用 Nucleofector™ 转染海马神经元, 摄于转染后 7 天(100×)。

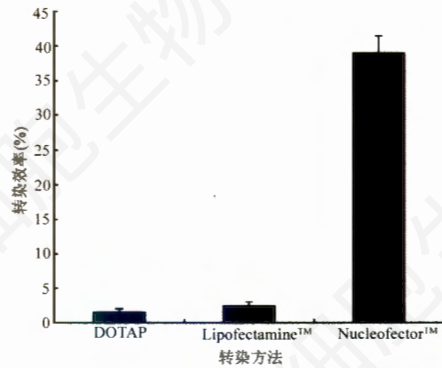


图3 三种不同方法转染 pCMV-eGFP 质粒转染效率比较

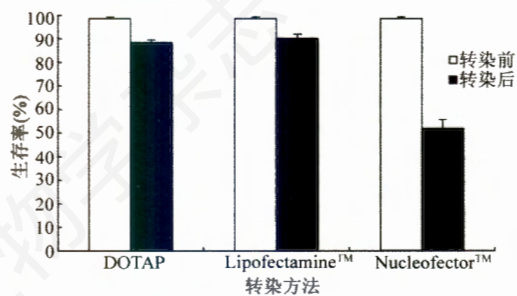


图4 不同转染方法在转染前后细胞生存率的比较

转染的神经元 39.8% eGFP- 阳性(图 2C, 2D)。三者转染效率的比较见图 3,  $P < 0.05$ 。

### 2.3 存活率

存活率于转染前和转染后 24h 测定。转染前神经元的存活率为 98.37% (平均值 98.37%, S.E.M.  $\pm 0.68$ )。DOTAP 转染后神经元存活率为 88.35% (平均值 88.35%, S.E.M.  $\pm 1.18$ ); Lipofectamine™ 转染后存活率为 90.11% (平均值 90.11%, S.E.M.  $\pm 1.80$ ); 而 Nucleofector™ 转染后的存活率为 51.82% (平均值 51.82%, S.E.M.  $\pm 3.91$ ) (图 4)。

## 3 讨论

原代细胞来自于母体, 在外型和生理功能上都具有很强的相似性。因此, 原代细胞基因转染是模拟体内情况研究基因功能的很好方法。相比于细胞系, 它们能提供更准确的医学和生物学信息。本研究中所利用的原代大鼠海马神经元是研究很多中枢神经系统疾病(比如脑缺血和帕金森症)和脑中许多常规事件的重要体外模型<sup>[1-3]</sup>。利用神经元特异性标记 NF 抗体进行的免疫细胞化学结果证实我们分离培养的主要是神经元。

目前在基因转染原代培养细胞方面已经有了不小进展, 但是大都不尽如人意。根据绿荧光蛋白的

表达水平, 磷酸钙质粒沉淀在神经细胞转染效率只有 1% 至 5%<sup>[5,6]</sup>。而且钙沉淀转染对 pH 值, 离子浓度, 温度和缓冲液的微小变化很敏感, 导致了不同实验室所报告的结果重复性较差。研究显示, 微管电穿孔转染法能在体内有效转染单细胞, 但不适合大量细胞实验<sup>[13]</sup>。病毒载体, 如腺病毒或杆状病毒, 在神经细胞上有较高的转染效率, 但需要复杂的载体制备过程和防备局部免疫反应的威胁<sup>[7,8]</sup>。

脂质体基因转染是目前在遗传学和细胞生物学中应用最广泛的转染方法。在 NIH3T3, COS-7 和 HeLa 等细胞中, 阳性脂质体有较高的转染效率<sup>[14]</sup>。本研究中, 两种脂质体(DOTAP and Lipofectamine™)作为载体将报告基因 eGFP 转染到神经元中。但是极低的转染效率表明, 脂质体不适于转染原代培养神经元。这与 Wang 等人用 DOTAP 转染大鼠原代海马神经元取得的结果相似<sup>[15]</sup>。

在研究中, 利用了一种由 Amaxa 公司最新发明的电穿孔转染方法。此方法的独特之处在于作用机制为一种物理过程, 适合一些化学转染方法效果很不理想的非吞噬细胞和非增殖细胞的基因转染<sup>[16,17]</sup>; 如外周血细胞、神经细胞和干细胞。同时, 这种新方法也不存在生物污染和免疫反应的危险。实验结果表明: 与脂质体转染相比, Nucleofector™ 技术能够得到存活细胞中大于 38.9% 的转染效率(全部细胞大于 20%), 高于前者 20 倍以上。与常用的病毒转染相比, 有高速度、低风险的优点。这对于进一步开展基因治疗和组织工程的工作是非常重要的。

另一方面, 通过对转染细胞存活率的比较, 我们注意到, Nucleofector™ 技术引起的细胞死亡率亦远远大于脂质体转染的死亡率。原因可能有以下 3 方面: (1) 外源 DNA 摄取引起细胞的凋亡; (2) 电子脉冲后胶体渗透压的改变引起细胞的肿胀<sup>[18-20]</sup>。通过使用 caspase 抑制剂阻断细胞凋亡途径, 和脉冲后细胞粒化以减轻细胞肿胀后细胞死亡率会有所降低<sup>[21]</sup>。(3) 胰蛋白酶消化后引起细胞表面损伤降低了对电脉冲的耐受。本实验采用专用的胰蛋白酶抑制剂来中止消化而不是常规使用的血清, 力图将这方面的损伤减到最低。因此, 此项转染技术能够满足大多数分子生物学实验要求。

## 参 考 文 献

- [1] NADAREISHVILI Z, HALLENBECK J. Neuronal regeneration after stroke [J]. *N Engl J Med*, 2003, **348**: 2355 - 2356.
- [2] SANES J N, TRUCCOLO W. Motor "binding:" do functional assemblies in primary motor cortex have a role? [J] *Neuron*, 2003, **38**: 3 - 5.

- [3] NUSSBAUM R L, ELLIS C E. Alzheimer's disease and Parkinson's disease [J]. *N Engl J Med*, 2003, **348**: 1356 — 1364.
- [4] COSTANTINI L C, BAKOWSKA J C, BREAKFIELD X O, *et al.* Gene therapy in the CNS [J]. *Gene Therapy*, 2000, **7**: 93 — 109.
- [5] XIA Z, DUDEK H, MIRANTI CK, *et al.* Calcium influx via the NMDA receptor induces immediate early gene transcription by a MAP kinase/ERK-dependent mechanism [J]. *J Neurosci*, 1996, **16**: 5425 — 5436.
- [6] JAWORSKI J, FIGIEL I, PROSZYNSKI T, *et al.* Efficient expression of tetracycline-responsive gene after transfection of dentate gyrus neurons *in vitro* [J]. *J Neurosci Res*, 2000, **60**: 754 — 760.
- [7] BARKATS M, BILANG-BLEUEL A, BUC-CRON M H, *et al.* Adenovirus in the brain: recent advances of gene therapy for neurodegenerative diseases [J]. *J Prog Neurobiol*, 1998, **55**: 333 — 341.
- [8] SARKIS C, SERGUERA C, PETRES S, *et al.* Efficient transduction of neural cells *in vitro* and *in vivo* by a baculovirus-derived vector [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**: 14638 — 14643.
- [9] NABEL E G, GORDON D, YANG Z Y, *et al.* Gene transfer *in vivo* with DNA liposome complexes: lack of autoimmunity and gonadal localization [J]. *Human Gene Therapy*, 1992, **3**: 649 — 656.
- [10] TSUCHIYA R, YOSHIKI F, KUDO Y, *et al.* Cell type-selective expression of green fluorescent protein and the calcium indicating protein, yellow cameleon, in rat cortical primary cultures [J]. *Brain Res*, 2002, **956**: 221 — 229.
- [11] BREWER G J. Isolation and culture of adult rat hippocampal neurons [J]. *J Neurosci Methods*, 1997, **71**: 143 — 155.
- [12] OHKI E C, TILKINS M L, CICCARONE V C, *et al.* Improving the transfection efficiency of post-mitotic neurons [J]. *J Neurosci Methods*, 2001, **112**: 95 — 99.
- [13] HAAS K, SIN W C, JAVAHERIAN A, *et al.* Single-cell electroporation for gene transfer *in vivo* [J]. *Neuron*, 2001, **29**: 583 — 591.
- [14] NOGUCHI A, FURUNO T, KAWAURA C, NAKANISHI M. Membrane fusion plays an important role in gene transfection mediated by cationic liposomes [J]. *FEBS Lett*, 1998, **433**: 169 — 173.
- [15] WANG S, BUI V, HUGHES J A, *et al.* Adeno-associated virus mediated gene transfer into primary rat brain neuronal and glial cultures: enhancement with the pH-sensitive surfactant dodecyl 2-(1P-imidazolyl) propionate [J]. *Neurochem Int*, 2000, **37**: 1 — 6.
- [16] NEUMANN E, SCHAEFER-RIDDER M, WANG Y, *et al.* Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields [J]. *EMBO J*, 1982, **1**: 841 — 845.
- [17] WATANABE M, SHIRAYOSHI Y, KOSHIMIZU U, *et al.* Gene transfection of mouse primordial germ cells *in vitro* and analysis of their survival and growth control [J]. *Experimental Cell Research*, 1997, **230**: 76 — 83.
- [18] LI L H, SEN A, MURPHY S P, *et al.* Apoptosis induced by DNA-uptake limits transfection efficiency [J]. *Experimental Cell Research*, 1999, **253**: 541 — 550.
- [19] SHIMOKAWA T, OKUMURA K, RA C. DNA induced apoptosis in electroporated human promonocytic cell line U937 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, **270**: 94 — 99.
- [20] HOFMANN F, OHNIMUS H, SCHELLER C, *et al.* Electric field pulses can induce apoptosis [J]. *J Membrane Biology*, 1999, **169**: 103 — 109.
- [21] LI L H, MCCARTHY P, HUI S W. High-efficiency electrotransfection of human primary hematopoietic stem cells [J]. *FASEB J*, 2001, **15**: 586 — 588.

## Efficient Transfection Method for Rat Primary Hippocampal Neurons

MIAO Hong Sheng<sup>1,2</sup>, YU Lu Yang<sup>2</sup>, LIN Bo<sup>2</sup>, WU Jia Cai<sup>2</sup>, GUO Li He<sup>2\*</sup>, HUI Guo Zhen<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Department of Neurosurgery, The First Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, China; <sup>2</sup>Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

**Abstract:** To compare Nucleofector™, a new electroporation transfection method developed by Amaxa Biosystems, with two lipofection methods: DOTAP and Lipofectamine™ in E18 rat primary hippocampal neurons. The neurons freshly prepared by hippocampal dissection were identified with neuron-filament (NF) antibody by immunocytochemical staining. DOTAP, Lipofectamine™ and rat neuron Nucleofector™ were employed to transfer pCMV-eGFP plasmid into the rat hippocampal primary neurons respectively. The viability of the cells was assessed by fluorescence-activated cell sorting (FACS). The immunocytochemical staining for the neuronal marker NF showed that cells grown in Neurobasal™ supplemented with B<sub>27</sub>, and then transfected, were mostly neurons. The transfection efficiency of DOTAP and Lipofectamine™ reaches only 1.55% and 2.45% whereas Nucleofector™ can achieve over 20% transfection efficiency. The viability of pre- and post-transfected cells with DOTAP is 98.37% / 88.35% and 98.37%/90.11% with Lipofectamine™ whereas 98.37%/51.82% with Nucleofector™. The results of the experiment showed that the newly developed Nucleofector™ technology can lead a much higher transfection efficiency than other transfection methods in rat primary hippocampal neurons although the viability of transfected cells was somewhat reduced. Furthermore, this new technology is a suitable transfection method for most molecular biological applications.

**Key words:** transfection; rat primary hippocampal neuron; DOTAP; lipofectamine™; nucleofector™; eGFP

\*Corresponding author, <sup>1</sup>HUI Guo Zhen; <sup>2</sup>GUO Li He, E-mail: lhguo@sibs.ac.cn