

技术与方法

三种试剂转染293T细胞的效率及毒性比较

陈凤 靳兴汉 王菲*

(中山大学附属第七医院, 消化医学中心, 深圳 518107)

摘要 该文旨在比较不同的转染试剂介导两种荧光素酶报告基因转染人胚肾细胞293T的效果。采用脂质体转染试剂Lipofectamine® 2000、非脂质体成分X-tremeGENE HP DNA和FuGENE® HD转染试剂, 选取不同配比的质粒DNA和转染试剂分别将含有绿色荧光蛋白(GFP)和红色荧光蛋白(RFP)的质粒转入293T细胞中, 应用倒置荧光显微镜和流式细胞仪分析转染效率, 锥虫蓝染色法检测细胞存活率。X-tremeGENE HP DNA转染试剂转染293T细胞的效率最高, 不管目的基因、质粒DNA和转染试剂的配比如何, 其转染效率均显著高于脂质体转染试剂(P 均 <0.05); 在相同的质粒DNA和转染试剂比例下, FuGENE® HD试剂介导GFP转染的效率显著高于脂质体试剂Lipofectamine® 2000(P 均 <0.05), 但二者介导RFP转染的效率无显著性差异(P 均 >0.05); 在质粒DNA和转染试剂比为1:2时, X-tremeGENE HP DNA试剂转染GFP和RFP的效率均显著高于FuGENE® HD试剂(P 均 <0.05), 当比例递变为1:4时, 二者的转染效率无显著性差异(P 均 >0.05)。随着转染试剂使用量的增多, Lipofectamine® 2000和FuGENE® HD试剂的转染效率明显升高, 而X-tremeGENE HP DNA试剂的转染效率则下降。与转染GFP基因相比, 三种试剂的转染效率均随着目的基因RFP片段的增大而显著降低(P 均 <0.05)。在质粒DNA和转染试剂的比例相同的情况下, 三种试剂转染后的存活率无显著性差异(P 均 >0.05), 但随着转染试剂用量的增加, 三种试剂转染后的细胞存活率均显著降低(P 均 <0.05)。目的基因大小与转染效率成反比, 综合考虑转染试剂用量、转染效率和细胞活性, 该研究认为X-tremeGENE HP DNA转染试剂效果最好。

关键词 转染试剂; 293T; 转染效率; 细胞活性

Comparative Study of the Transfection Efficiency and Toxicity of 293T Cells Transfected by Three Reagents

CHEN Feng, JIN Xinghan, WANG Fei*

(Digestive Medicine Center, the Seventh Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Shenzhen 518107, China)

Abstract This paper aims to compare the transfection efficiencies of two luciferase reporter genes into human embryonic kidney cells 293T by different transfection reagents. By using Lipofectamine® 2000, X-tremeGENE HP DNA, FuGENE® HD transfection reagents that with different ratios of plasmids DNA and transfection reagents, the plasmids containing GFP (green fluorescent protein) and RFP (red fluorescent protein) were transfected into

收稿日期: 2021-04-25 接受日期: 2021-05-26

国家自然科学基金(批准号: 81800525、81873573)资助的课题

*通讯作者。Tel: 13816601005, E-mail: fay_wong1116@hotmail.com

Received: April 25, 2021 Accepted: May 26, 2021

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81800525, 81873573)

*Corresponding author. Tel: +86-13816601005, E-mail: fay_wong1116@hotmail.com

293T cells, respectively. The transfection efficiency was analyzed by inverted fluorescence microscope and flow cytometry, and the cell survival rate was detected by trypan blue stain. Regardless of the target gene and ratio of plasmid DNA to transfection reagents, the transfection efficiency of X-tremeGENE HP DNA was significantly higher than Lipofectamine[®] 2000 (all $P < 0.05$). Under the same ratio of plasmid DNA to transfection reagent, the efficiency of FuGENE[®] HD mediated GFP was significantly higher than Lipofectamine[®] 2000 (all $P < 0.05$), but there was no significant difference of RFP transfection between the two reagents (all $P > 0.05$). When the ratio of plasmid DNA to transfection reagent was 1:2, the efficiency of X-tremeGENE HP DNA mediated GFP and RFP transfection was significantly higher than FuGENE[®] HD reagent (all $P < 0.05$). When the ratio of plasmid DNA to transfection reagent was changed to 1:4, the transfection efficiency between the two reagents was not significantly different (all $P > 0.05$). With the increase of the amount of transfection reagents, the efficiencies of Lipofectamine[®] 2000 and FuGENE[®] HD transfection reagent were increased significantly, whereas the transfection efficiency of X-tremeGENE HP DNA transfection reagent was decreased significantly. Compared with GFP gene transfection, the transfection efficiency was significantly decreased with the increase of target gene RFP fragment (all $P < 0.05$). When the ratio of plasmid DNA to transfection reagent was the same, there was no significant difference in the survival rate after transfection among the three reagents (all $P > 0.05$), while when the amount of transfection reagent increased, the survival rate was significantly decreased (all $P < 0.05$). The target gene was inversely proportional to the transfection efficiency. Considering the amount of transfection reagent, transfection efficiency and cell activity, this study believed that the X-tremeGENE HP DNA transfection reagent had the best effect.

Keywords transfection reagent; 293T; transfection efficiency; cell activity

随着细胞和分子生物学研究的不断发展, 转染已经成为研究真核细胞基因功能的常规工具, 选择合适的细胞转染方法并进行优化, 可以获得较高的转染效率。目前常用的转染方法有电穿孔法、病毒载体法、脂质体法、磷酸钙沉淀法等^[1-2], 其中脂质体转染由于操作简单、转染效率较高、试剂商品化等优点, 被众多实验室使用^[3]。虽然众所周知脂质体转染对细胞具有毒性作用, 可能会对相关研究结果产生干扰, 但由于没有找到更高效的转染方法代替脂质体, 所以脂质体转染试剂在目前仍应用非常广泛。同时, 也有许多研究者聚焦于开发非脂质体聚合物成分的转染试剂, 目前已有多种此类试剂产品出现在市面上, 但与其他方法相比, 效果如何罕有报道。细胞转染受多种因素的影响, 如细胞类型、细胞密度、细胞生长状态、目的基因大小、质粒DNA与转染试剂的配比等都是影响转染效率的重要因素^[4-5], 通过实验摸索合适的转染条件对提高细胞转染效率具有重要作用。因此, 本研究采用带有荧光蛋白基因的质粒, 通过不同的转染试剂在质粒DNA与转染试剂不同配比情况下转染293T细胞, 比较它们的转染效率和细胞存活率, 以期筛选更优的转染方法和条件。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞与主要试剂 293T细胞为作者实验室保存; 表达GFP(pcDNA3.1-GFP)和RFP(pcDNA3.1-RFP-EGFP)的载体由作者实验室构建; 去内毒素质粒大提试剂盒购自Qiagen公司; DMEM培养基、Opti-MEM培养基、胎牛血清、0.25%胰蛋白酶-EDTA购自Gibco公司; Lipofectamine[®] 2000购自Invitrogen公司; X-tremeGENE HP DNA转染试剂购自Roche公司; FuGENE[®] HD转染试剂购自Promega公司。

1.1.2 主要仪器 生物安全柜、CO₂培养箱、离心机、自动细胞计数仪、核酸定量检测仪、倒置荧光显微镜、流式细胞仪。

1.2 方法

1.2.1 质粒提取 取出保存于-80 °C冰箱的载体菌种, 吸取10 μL, 接种至10 mL含有氨苄抗性的液体LB培养基中, 37 °C、200 r/min振荡过夜培养。随后, 取200 μL活化好的载体菌液转接至200 mL液体LB培养基中, 37 °C、200 r/min振荡培养12 h。质粒提取按照Qiagen去内毒素质粒大提试剂盒的说明书进行, 使用核酸定量检测仪测定质粒浓度, -20 °C冰箱保存备用。

1.2.2 细胞培养 按照常规方法复苏冻存于液氮中的293T细胞,用含有10% FBS和1%双抗的DMEM培养基进行培养,待细胞密度生长至80%~90%时传代至6孔板中继续培养,当孔内的细胞密度达到70%~80%时,准备进行转染。

1.2.3 脂质体转染 将细胞培养液换成Opti-MEM培养基,按照Lipofectamine® 2000转染试剂盒说明书进行转染,取2.5 µg质粒DNA加入至50 µL Opti-MEM中混匀,室温静置5 min,按照质粒DNA与转染试剂配比分别为1:2、1:3、1:4,将其分别与含有5 µL、7.5 µL、10 µL脂质体转染试剂的50 µL Opti-MEM混合,室温孵育20 min,将混合液逐滴加入细胞培养液中,轻轻摇匀后放入培养箱内,6 h后更换成含10% FBS的DMEM培养基继续培养42 h。

1.2.4 罗氏转染 将细胞培养液换成含10% FBS无双抗的DMEM培养液,按照X-tremeGENE HP DNA试剂盒说明书进行转染,取2.5 µg质粒DNA加入至250 µL Opti-MEM培养基中,按照质粒DNA与转染试剂分别为1:2、1:3、1:4的比例分别加入5 µL、7.5 µL、10 µL转染试剂,轻轻混匀,室温静置30 min,将转染复合物逐滴加入细胞培养液中,轻轻摇匀后放入培养箱内继续培养48 h。

1.2.5 FuGENE® HD转染 将细胞培养液换成含10% FBS无双抗的DMEM培养液,按照FuGENE® HD试剂盒说明书进行转染,取2.5 µg质粒DNA加入至100 µL Opti-MEM培养基中,按照质粒DNA与转染试剂分别为1:2、1:3、1:4的比例分别加入5 µL、7.5 µL、10 µL转染试剂,轻轻混匀,室温静置15 min,将转染复合物逐滴加入细胞培养液中,轻轻摇匀后放入培养箱内继续培养48 h。

1.2.6 转染效率的检测 采用倒置荧光显微镜观察各组细胞在转染24 h时荧光蛋白的表达情况;转染48 h后胰酶消化细胞,1 000 r/min离心3 min收集细胞用PBS重悬,调整细胞浓度为 1×10^6 个/mL,通过流式细胞仪检测各组细胞的转染效率,实验重复3次,取平均值。

1.2.7 细胞存活率分析 转染实验过程设置未转染的阴性细胞为对照,各孔细胞接种时数量相同。转染后48 h,胰酶消化各组细胞进行流式分析时,取少量细胞用锥虫蓝染色后于自动细胞计数仪上计数,然后将各转染组的活细胞数量与阴性对照组的活细胞数量相除即得出细胞转染后48 h的细胞存活率。

1.2.8 统计学分析 以SPSS 26.0软件,采用t检验方法对数据进行统计学分析, $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果

2.1 荧光显微镜下观察细胞转染效果

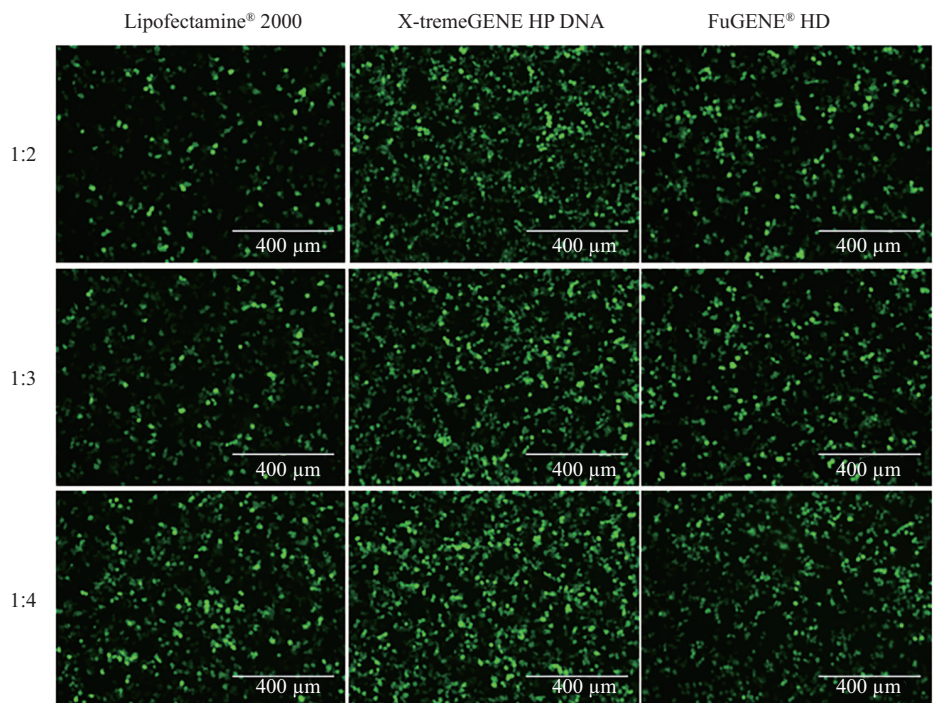
荧光显微镜下观察,发现三种试剂转染分别表达GFP和RFP基因的载体后,均有相应的绿色荧光和红色荧光出现,显示转染成功,但不同的转染方法以及不同的质粒DNA和转染试剂配比荧光蛋白表达的效果不同(图1和图2)。

2.2 流式分析细胞转染效率

2.2.1 不同试剂对细胞转染的影响 293T细胞转染48 h后进行流式分析,结果(图3)显示X-tremeGENE HP DNA试剂介导GFP和RFP转染293T细胞的效率最高,不管质粒DNA与转染试剂的用量比是1:2、1:3还是1:4,其转染效率均显著高于Lipofectamine® 2000转染试剂(P 均 < 0.05);在相同的质粒DNA和转染试剂比例下,FuGENE® HD试剂介导GFP转染的效率也显著高于Lipofectamine® 2000试剂(P 均 < 0.01),但二者介导RFP转染的效率无显著性差异(P 均 > 0.05);在质粒DNA和转染试剂比为1:2时,X-tremeGENE HP DNA试剂转染GFP和RFP的效率均显著高于FuGENE® HD试剂(P 均 < 0.01),当比例递变为1:3时,二者转染GFP的效率无显著性差异,但X-tremeGENE HP DNA试剂转染RFP的效率仍明显高于FuGENE® HD试剂($P < 0.001$),当比例进一步递变为1:4时,两种试剂的转染效率无显著性差异(P 均 > 0.05)。

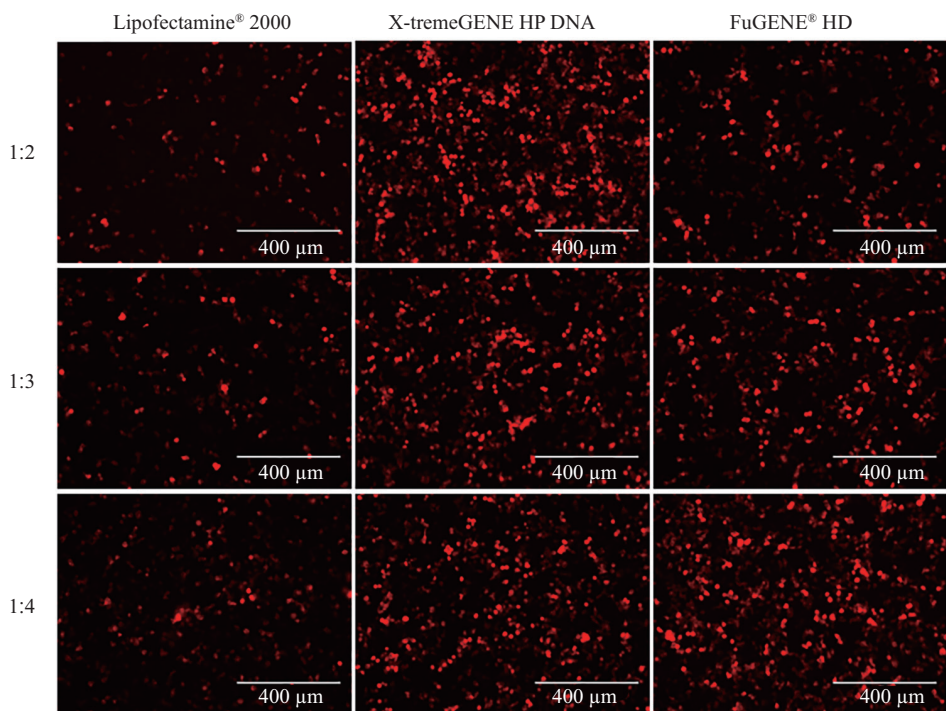
2.2.2 质粒DNA和转染试剂比对细胞转染的影响 三种试剂介导GFP和RFP转染至293T细胞中,Lipofectamine® 2000和FuGENE® HD随着转染试剂使用量的增多,转染效率显著性升高,而X-tremeGENE HP DNA试剂相反,其转染效率随着转染试剂使用量的升高明显下降(图4)。仅从转染效率看,Lipofectamine® 2000转染GFP和RFP最佳的质粒DNA和转染试剂配比是1:4,X-tremeGENE HP DNA试剂为1:2,FuGENE® HD试剂转染GFP和RFP的最佳比例分别为1:3和1:4。

2.2.3 目的基因大小对细胞转染的影响 如图5所示,与转染GFP基因相比,不管三种试剂中质粒DNA和转染试剂的配比如何,转染效率均随着目的基因RFP片段的增大而显著降低(P 均 < 0.001)。



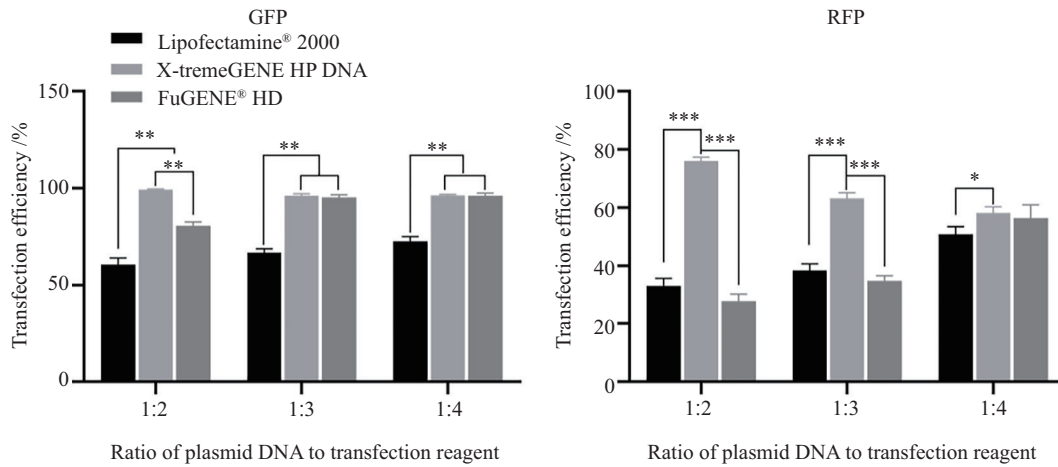
荧光显微镜观察三种转染试剂在不同的质粒DNA和转染试剂配比下的绿色荧光蛋白表达。
GFP expression in three transfection reagents that with different ratios of plasmid DNA to transfection reagents were observed by inverted fluorescence microscope.

图1 绿色荧光蛋白在转染24 h后的表达情况
Fig.1 The expression of GFP at 24 h after transfection



荧光显微镜观察三种转染试剂在不同的质粒DNA和转染试剂配比下的红色荧光蛋白表达。
RFP expression in three transfection reagents that with different ratios of plasmid DNA to transfection reagents were observed by inverted fluorescence microscope.

图2 红色荧光蛋白在转染24 h后的表达情况
Fig.2 The expression of RFP at 24 h after transfection

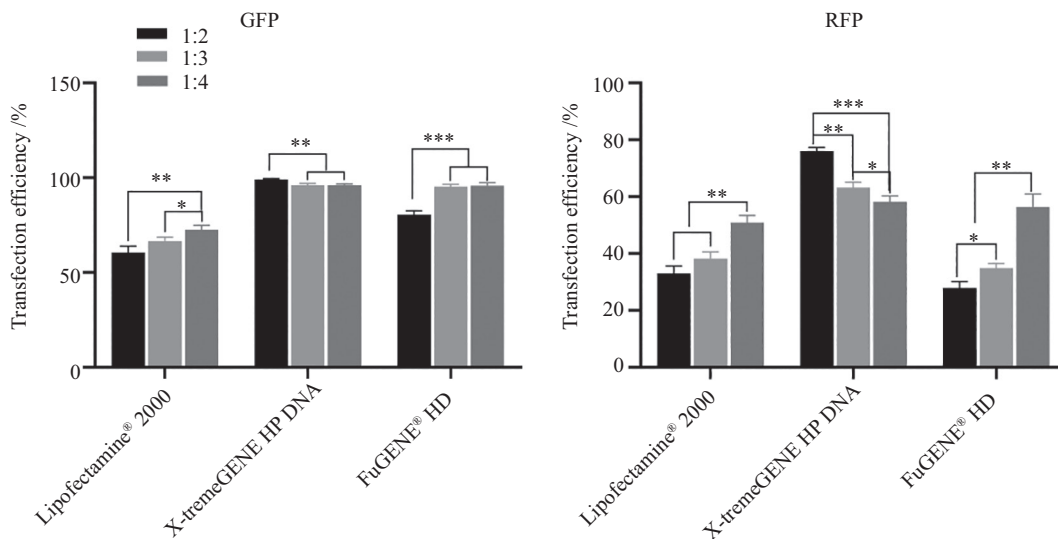


在相同的质粒DNA与转染试剂比例下, 比较分析三种试剂转染GFP和RFP的转染效率。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

The transfection efficiencies of the three reagents mediated GFP and RFP were compared and analyzed under the same ratio of plasmid DNA to transfection reagent. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

图3 相同配比下不同试剂的细胞转染效率比较

Fig.3 Comparison of cell transfection efficiencies of different reagents at the same ratio



在相同试剂中, 比较分析不同的质粒DNA与转染试剂比例介导GFP和RFP的转染效率。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

The transfection efficiencies of the same reagent mediated GFP and RFP were compared and analyzed under the different ratio of plasmid DNA to transfection reagent. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

图4 相同试剂下不同配比的细胞转染效率比较

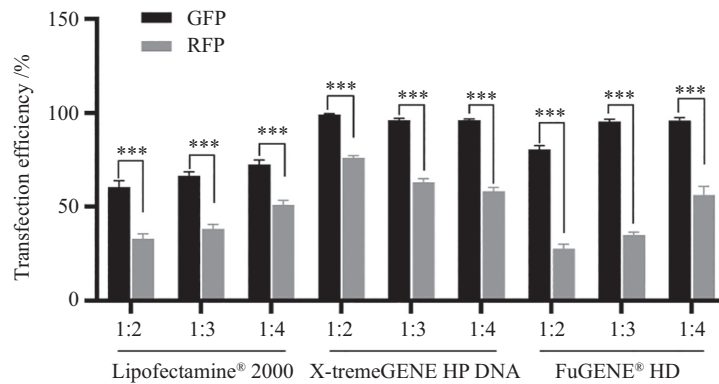
Fig.4 Comparison of cell transfection efficiencies of the same reagent at different ratio

2.3 细胞存活率分析

在质粒DNA和转染试剂的配比同样的情况下, 三种试剂介导GFP和RFP转染后的存活率无显著性差异(P 均 > 0.05 , 图6); 随着转染试剂使用量的增加, 三种试剂转染后的细胞存活率均明显降低, 除了Lipofectamine[®] 2000转染GFP组外, 其余转染组在质粒DNA与转染试剂比例为1:4时的细胞存活率显著低于1:2时的细胞存活率(P 均 < 0.05 , 图7)。

3 讨论

商品化的转染试剂是实验室研究目的基因生物学活性最常用的方法, 而获得高效的转染效率是目的基因转染成功表达的关键^[6-7]。Lipofectamine[®] 2000是公认的转染效果较佳的阳离子脂质体, 但由于自身毒性、部分细胞难以转染等不足使其应用受到限制, 随着市面上多种非脂质体转染试剂的出现, 它们的转染效果如何, 目前尚未有研究进行比

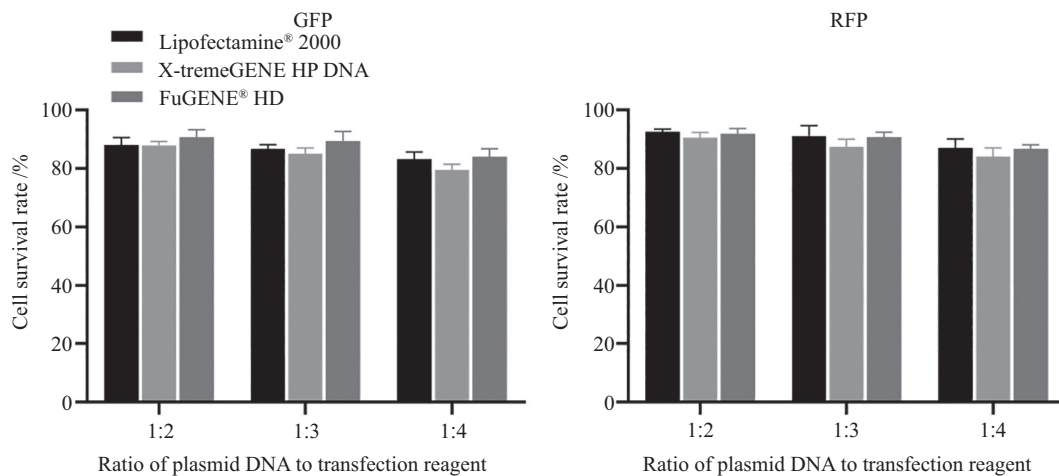


在相同的试剂和配比下, 比较分析不同载体的转染效率。*** $P < 0.001$ 。

The transfection efficiencies of the same reagent and ratio of plasmid DNA to transfection reagent were compared and analyzed between the two vectors. *** $P < 0.001$.

图5 相同配比下不同试剂的细胞转染效率比较

Fig.5 Comparison of cell transfection efficiencies of different reagents at the same ratio



在相同的质粒DNA与转染试剂比例下, 比较分析三种试剂转染GFP和RFP的细胞存活率。

The cell survival rates of the three reagents mediated GFP and RFP were compared and analyzed under the same ratio of plasmid DNA to transfection reagent.

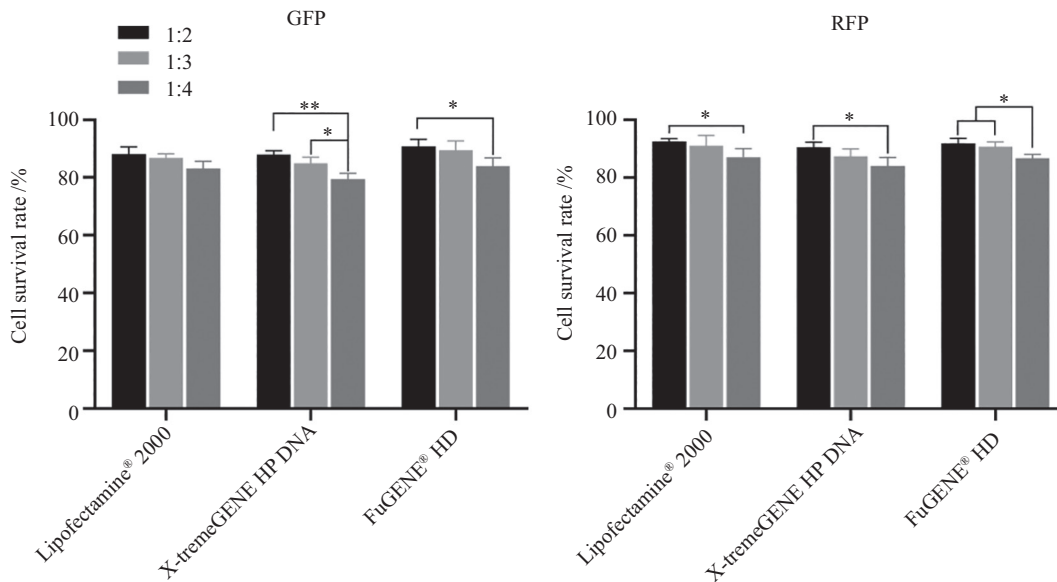
图6 相同配比下不同试剂的细胞存活率比较

Fig.6 Comparison of cell survival rates of different reagents at the same ratio

较报道。

本研究选取Lipofectamine® 2000、X-tremeGENE HP DNA和FuGENE® HD试剂在不同的质粒DNA和转染试剂配比下转染293T的效果进行比较分析, 使用GFP和RFP报告基因, 通过荧光显微镜和流式分析能简便、高效、可靠地观察细胞转染效果^[8]。本研究通过荧光显微镜观察, 可以看到所有转染组细胞均表达荧光蛋白; 进一步进行流式分析, 我们发现不管质粒DNA与转染试剂的配比如何, X-tremeGENE HP DNA的转染效率均最高, 与近期报道的文献结果相似^[9], 其次为FuGENE® HD转染试剂, 其转染效率也优于脂质体转染试剂, 但它受目的

基因的影响较大, 当目的基因片段较大时, 它的转染效率与脂质体转染试剂无明显差异。本研究中脂质体试剂的转染效率较低, 可能与采取的转染方案并非其最优的转染条件有关, 也可能受转染后换液影响, 导致丢失一部分表达荧光的死亡细胞, 造成转染效率较低。以上表明在转染不同的目的基因时, 选取合适的转染方法, 有助于获得更高的表达效率。质粒DNA/转染试剂比例是影响转染效率的关键因素, 决定了转染复合物的颗粒大小和表面电荷^[10-11], 在转染过程中, 加大转染试剂浓度, 可以提高转染效率, 但浓度太高, 毒性增大容易导致细胞死亡^[11]。本研究发现, Lipofectamine® 2000和FuGENE® HD的转染效率都



在相同试剂中,比较分析不同的质粒DNA与转染试剂比例介导GFP和RFP的细胞存活率。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

The cell survival rates of the same reagent mediated GFP and RFP were compared and analyzed under the different ratio of plasmid DNA to transfection reagent. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

图7 相同试剂不同配比下的细胞存活率比较

Fig.7 Comparison of cell survival rate of the same reagent at different ratio

随着转染试剂用量的增多而升高, X-tremeGENE HP DNA反而随着用量的增多而下降,当转染试剂用量为质粒DNA的4倍时,两种非脂质体试剂的转染效率没有明显差异,但仍高于脂质体转染试剂。这可能是由于不同的转染试剂含有不等量的阳离子脂质体或阳离子聚合物,而它们又有其最佳的DNA结合摩尔比,导致与DNA结合形成的转染复合物转运核酸的效果不同,从而影响其转染效率^[12]。这表明,不同的转染试剂,获得最佳转染效率需要的质粒DNA与转染试剂的配比不尽相同,我们在采用不同的试剂进行转染时应尽可能的进行条件的摸索和优化。转染GFP和RFP的比较分析结果表明,无论转染试剂用量如何,三种试剂的转染效率都受到目的基因大小的影响,目的基因越大,转染效率越低,与之前的研究报道一致^[13]。在细胞毒性方面,三种试剂的存活率之间没有明显差异性,但都随着转染试剂使用量的增加导致细胞存活率降低,可能是由于阳离子脂质体或聚合物带有很强的正电荷,导致细胞膜损伤,当脂质体或聚合物浓度过高时,造成细胞形态的变化,甚至细胞漂浮死亡等^[14],这也是导致细胞存活率降低或使某些贴壁细胞转染效率降低的原因。在本研究中,当Lipofectamine® 2000和FuGENE® HD转染效率最高时,其细胞存活率也是最低的,提示我们

选择合适的转染条件时需要综合考虑细胞活力和转染效率。

综上所述,本研究选取的三种试剂均可以用于介导GFP和RFP转染293T细胞,转染效率与目的基因大小成反比,在同等的转染条件下,综合考虑转染试剂用量、转染效率和细胞活性,我们认为X-tremeGENE HP DNA转染试剂效果最好,但三种试剂用于转染其他细胞或者其他基因的比较分析结果是否与此相同有待分析。

参考文献 (References)

- [1] PYLAEV T, VANZHA E, AVDEEVA E, et al. A novel cell transfection platform based on laser optoporation mediated by Au nanostar layers [J]. J Biophotonics, 2019, 12(1): e201800166.
- [2] GUO L, WANG L, YANG R, et al. Optimizing conditions for calcium phosphate mediated transient transfection [J]. Saudi J Biol Sci, 2017, 24(3): 622-9.
- [3] ZHOU Z, LIU X, ZHU D, et al. Nonviral cancer gene therapy: delivery cascade and vector nanoproperty integration [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2017, 115: 115-54.
- [4] 赵铁男, 张树彪, 崔韶晖, 等. 阳离子脂质体介导基因转染肿瘤细胞[J]. 中国细胞生物学学报(ZHAO Y N, ZHANG S B, CUI S H, et al. Transfection of genes into cancer cells mediated by cationic liposomes [J]. Chinese Journal of Cell Biology), 2013, 35(10): 1459-64.
- [5] LIU H, YANG Z, XUN Z, et al. Nuclear delivery of plasmid DNA determines the efficiency of gene expression [J]. Cell Biol

- Int, 2019, 43(7): 789-98.
- [6] RAMAMOORTH M, NARVEKAR A. Non viral vectors in gene therapy: an overview [J]. J Clin Diagn Res, 2015, 9(1): GE01-6.
- [7] 李凤娥, 向国艳, 孔繁利, 等. pEGFP-N1脂质体转染方法的优化及其应用[J]. 吉林大学学报(医学版)(LI F E, XIANG G Y, KONG F L, et al. Optimization of liposome-mediated transfection of pEGFP-N1 and its application [J]. Journal of Jilin University, Medicine Edition), 2016, 42(3): 612-16.
- [8] LAURENTI E, BARDE I, VERP S, et al. Inducible gene and shRNA expression in resident hematopoietic stem cells *in vivo* [J]. Stem Cells, 2010, 28(8): 1390-8.
- [9] LEE J H, LEE S T, NAM Y K, et al. Gene delivery into Siberian sturgeon cell lines by commercial transfection reagents [J]. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2019, 55(2): 76-81.
- [10] GASPAR R, COELHO F, SILVA B F B. Lipid-nucleic acid complexes: physicochemical aspects and prospects for cancer treatment [J]. Molecules, 2020, 25(21): 5006-44.
- [11] 张万锋, 黑伟, 何志强, 等. 3种介导猪NR2F2基因转染PK15细胞方法的比较研究[J]. 中国畜牧兽医(ZHANG W F, HEI W, HE Z Q, et al. Comparative study on three methods of mediated porcine NR2F2 gene transfection into PK15 cells [J]. Chinese Animal Husbandry and Veterinary Medicine), 2020, 47(5): 1360-7.
- [12] MASOTTI A, MOSSA G, CAMETTI C, et al. Comparison of different commercially available cationic liposome-DNA lipoplexes: parameters influencing toxicity and transfection efficiency [J]. Colloid Surf B, 2009, 68(2): 136-44.
- [13] 丁旭, 郭佳琦, 张嘉琪, 等. 目的基因大小对脂质体转染效率影响的研究[J]. 吉林医药学院学报(DING X, GUO J Q, ZHANG J Q, et al. Study on the effect of gene size on the efficiency of liposome transfection [J]. Journal of Jilin Medical College), 2020, 41(4): 265-7.
- [14] MALECKI M, SWOBADA P, PACHECKA J. Recombinant adeno-associated virus derived vectors (rAAV2) efficiently transduce ovarian and hepatocellular carcinoma cells: implications for cancer gene therapy [J]. Acta Pol Pharm, 2009, 66(1): 93-9.