

小鼠胚胎干细胞转染条件的优化

陈天姬, 杜娟, 卢光琇

(中南大学 生殖与干细胞工程研究所, 湖南 长沙 410078)

[摘要] **【目的】**对小鼠胚胎干细胞(mESCs)转染条件进行优化。**【方法】**分别将 0.5×10^5 , 1×10^5 , 2×10^5 , 4×10^5 个细胞接种 24 孔板(各细胞量均接种 2 孔), 培养 48 h 在其细胞融合度分别为 30%, 50%, 70%, 90% 左右时, 分别设置相同的(0.8 μ g DNA/2 μ L 脂质体)和不同的 DNA/脂质体用量(DNA 量(μ g)/Lipo 量(μ L))分别为 0.4/1, 0.8/2, 1.6/4, 3.2/8, 采用脂质体(Lipofectamine™ 2000)转染法, 将 pEGFP-N1 报告基因载体转染到 mESCs 中, 48 h 后通过荧光观察和流式分析检测各组 EGFP 荧光强度, 比较转染效率。**【结果】**在质粒及脂质体用量相同(0.8 μ g DNA/2.0 μ L 脂质体)的条件下, 随着细胞融合度的增加, EGFP 荧光强度逐渐减弱, 在细胞融合度为 30%, 50%, 70%, 90% 左右时转染, 各组 EGFP 阳性细胞率分别为 56.4%, 51.8%, 40.8% 和 23.3%。提高转染质粒及脂质体量可在一定程度上提高转染效率, 但脂质体的细胞毒性也随之增加, 不利于细胞生长。**【结论】**低融合度(30%~50%)条件下, 使用 0.8 μ g DNA/2.0 μ L 脂质体对 mESCs 进行转染, 可获得较高的转染效率(>50%), 同时可维持良好的细胞状态。

[关键词] 小鼠胚胎干细胞; 细胞融合度; 脂质体法; pEGFP-N1; 转染效率

[中图分类号] R321.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2010)12-0020-05

Optimization of the transfection efficiency of mouse embryonic stem cells

CHEN Tian-ji, DU Juan, LU Guang-xiu

(Institute of Reproduction and Stem Cell Engineering, Central South University, Changsha, Hunan 410078, China)

Abstract: **【Objective】**The study was done to optimize the transfection efficiency of mouse embryonic stem cells (mESCs). **【Method】**mESCs were seeded into 24-well plates at a density of 0.5×10^5 , 1×10^5 , 2×10^5 , 4×10^5 per well (each for two wells). 48 h later, cells were transfected when cell confluence was 30%, 50%, 70%, 90% respectively. The reporter plasmid pEGFP-N1 was transfected into cells using Lipofectamine™ 2000 by using the same amount (0.8 μ g DNA/2 μ L liposome) or different amounts of DNA and liposome (DNA(μ g)/liposome (μ L)): 0.4/1, 0.8/2, 1.6/4, 3.2/8 respectively. 48 hr later, the fluorescence intensities in each group were observed and the transfection efficiencies were compared. **【Result】**The result of fluorescence microscopy and FACS analysis showed that the percentage of EGFP positive cells gradually decreased (56.4%, 51.8%, 40.8% and 23.3% respectively) as the cell confluence increased (30%, 50%, 70% and 90% respectively) when using the same amount of DNA and liposome (0.8 μ g DNA/2.0 μ L liposome/well of 24-well plate). When using more DNA and liposome, transfection efficiency further increased. However, obvious cytotoxicity could be observed. **【Conclusion】**High transfection efficiency (>50%) on mESCs could be achieved by using 0.8 μ g DNA/2.0 μ L liposome/well of 24-well plate

* [收稿日期] 2010-05-12

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30570937); 国家高技术研究发展计划项目(2006AA02A102); 中南大学研究生创新基金项目(2340-74334000003)

[作者简介] 陈天姬(1984—), 女, 湖南长沙人, 在读博士, 主要从事干细胞相关基因功能研究。

[通信作者] 卢光琇(1939—), 女, 湖北天门人, 教授, 博士生导师, 主要从事辅助生殖与干细胞研究。

E-mail: lugxdirector@yahoo.com.cn

under condition of low cell confluences (30%—50%).

Key words: mouse embryonic stem cells (mESCs); cell confluence; Liposome-mediated; pEGFP-N1; transfection efficiency

胚胎干细胞(Embryonic stem cells, ESCs)来源于囊胚时期的内细胞团(Inner cell mass, ICM)^[1],其最显著的特征是具有多向分化和自我更新潜能,因此 ESCs 为研究早期胚胎发育提供了良好的体外模型,此外其在再生医学领域也具有广泛的应用前景^[2]。运用 ESCs 进行的相关基础和应用研究已成为 21 世纪生命科学研究的热点之一,而获得较高的 ESCs 转基因效率是 ESCs 相关研究的基础。

目前,常见的用于 ESCs 的转基因技术有脂质体转染法^[3]、慢病毒感染法^[4]和电穿孔法^[5]等。慢病毒感染法对于 ESCs 而言能获得较理想的转基因效率^[6-7],但目前仍无法完全排除该法转染体系中的不安全因素,其潜在的安全隐患对实验操作环境提出了较高要求,增加了推广的难度。电穿孔法最大的问题是对细胞,尤其是对 ESCs 等较敏感细胞的损伤较大,容易导致细胞死亡^[8]。近年来还有研究者提出了磁转染(Magnetofection)方法,并报道在 ESCs 上获得了较理想的转染效率^[9],但该方法由于操作较复杂,成本较高,目前并未得到推广。脂质体转染法是一种相对安全、成本较低、操作简单的转基因方法,目前虽然已有研究人员采用该法转染小鼠胚胎干细胞(Mouse embryonic stem cells, mESCs)来进行相关研究^[10-15],但关于其转染条件的优化尚未见报道。为此,本研究以 mESCs 为材料,较详尽地比较了不同细胞密度、DNA 和脂质体用量对 mESCs 转染效率的影响,摸索出了较理想的脂质体法转染 mESCs 的条件,以期为进一步的 ESCs 相关研究提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 所用 R1/E 细胞为 mESCs 系,来源于美国模式菌种收集中心(ATCC, SCRC-1036)。

1.1.2 试剂及仪器 高糖 DMEM 培养基、胎牛血清(FBS)、L-谷氨酰胺、非必需氨基酸、1×DPBS 和 2.5 g/L 胰蛋白酶均为 Invitrogen-Gibco 公司产品,β-巯基乙醇和 Lipofectamine™ 2000 为 Invitrogen 公司产品,白血病抑制因子(Leukemia inhibitory factor, LIF)为 Millipore-Chemicon 公司产品,明胶为 Sigma-alldwich 公司产品, pEGFP-N1 报告基因

载体为 Clontech 公司产品,质粒大量制备试剂盒为 QIAGEN 公司产品。24 孔细胞培养皿为 Corning 公司产品。荧光显微镜为 Nikon 公司产品,流式细胞仪为 BD 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 质粒的制备 将 pEGFP-N1 报告基因载体的冻存菌种接种于 100 mL LB 培养基中,37 °C 恒温水平摇床(250 r/min)扩增过夜后,采用 Maxi prep Kit 大量制备质粒。对所制备质粒进行琼脂糖凝胶电泳鉴定,并用紫外分光光度计测定其浓度。

1.2.2 细胞培养及传代 R1/E mESCs 采用无饲养层细胞培养体系培养,培养基为含体积分数 15% FBS、2 mmol/L L-谷氨酰胺、0.1 mmol/L 非必需氨基酸、0.1 mmol/L β-巯基乙醇,1 000 U/mL LIF 的高糖 DMEM 培养基。细胞每天换液 1 次,每 3~4 d 用胰蛋白酶消化后进行传代。细胞用 1×DPBS 洗 1 次后加入适量的 2.5 g/L 胰蛋白酶进行消化(37 °C 消化 1 min 左右),用培养基中和胰蛋白酶,1 000 r/min 离心 5 min 收获细胞,进行计数。将 0.5×10^5 , 1×10^5 , 2×10^5 , 4×10^5 个细胞分别传代至已用 0.1% 明胶包被过的 24 孔板中(依次记为 1, 2, 3, 4 组,各组分别传 2 孔),待转染。所有细胞均置 37 °C、体积分数 5% CO₂ 恒温培养箱中培养。

1.2.3 细胞转染 将上述 1, 2, 3, 4 组细胞培养 48 h,在其融合度分别为 30%, 50%, 70%, 90% 左右时,按表 1 中的条件进行转染,组成 A1~A4、B1~B4 组。试验所用转染试剂为 Lipofectamine™ 2000,转染过程基本按照说明书进行操作,仅进行一处改进,即吸去皿中旧培养基后,先小心加入孵育好的 DNA-转染试剂混合物,使之在皿中铺开后将细胞放到 37 °C 培养箱孵育 5 min,之后取出细胞及时加入新鲜培养基。

1.2.4 EGFP 阳性细胞的荧光观察及流式检测 转染 48 h 后,于荧光显微镜下观察比较各组细胞的 EGFP 荧光信号强度。采用胰蛋白酶消化的方法收集各组细胞,进行流式分析,对各组 EGFP 阳性细胞率进行定量。

1.2.5 统计学分析 以上转染及检测试验均重复 3 次,采用 SPSS 10.0 软件对流式检测结果进行分析, $P < 0.05$ 表明统计学差异显著。

表 1 各组 R1/E 细胞的转染条件
Table 1 The transfection condition of each group

处理 Treatment	1 组 Group 1	2 组 Group 2	3 组 Group 3	4 组 Group 4
A (DNA 量(μg)/Lipo 量(μL))	0.8/2	0.8/2	0.8/2	0.8/2
B (DNA 量(μg)/Lipo 量(μL))	0.4/1	0.8/2	1.6/4	3.2/8

2 结果与分析

2.1 转染细胞的荧光显微镜观察

显微镜下观察结果见图 1。光镜观察发现，A1/B1 和 A2/B2 组细胞克隆形态典型，状态良好。A3/B3 组由于细胞融合度较大，生长空间有限，克隆之间发生一定融合，细胞不再呈典型的克隆形态。而细胞融合度进一步增加时(A4/B4 组)，细胞连成一片，已基本看不出克隆形态。

从 EGFP 荧光观察结果可看出，A1、A2 和 A3 组 EGFP 阳性细胞率没有明显差别，但荧光强度有逐渐减弱的趋势，其中 A1 组 EGFP 信号最强，且这种较强的荧光信号几乎分布于整个克隆；A4 组中 EGFP 荧光信号明显减弱。

为了检测是否细胞融合度较高时所用质粒呈

“不饱和”状态而影响了其转染效率，本试验保持细胞融合度为 50%左右时的转染条件不变(即 B2 = A2)，将其他各组分别以该组为标准成倍递减或递增所用质粒及脂质体量(表 1)进行转染试验。结果表明，B1 组 EGFP 荧光信号弱于 A1 组，而 B3 组荧光信号强于 A3 组，表明转染质粒量的减少或增加能在一定程度上降低或增加 EGFP 荧光强度。但 B4 组和 A4 组之间 EGFP 荧光信号强度无明显差别，提示在细胞融合度较高的条件下，即使增加转染质粒量也无法明显提高转染效率。此外，B3 与 A3、B4 与 A4 组相比，增加转染质粒及脂质体量后，光镜下可见死亡细胞明显增多，细胞生长速度减慢，状态受到影响(尤其对于 B4 组)。这提示虽然增加转染质粒及脂质体量能在一定程度上提高转染效率，但这是以增加细胞毒性和损伤细胞状态为代价的。

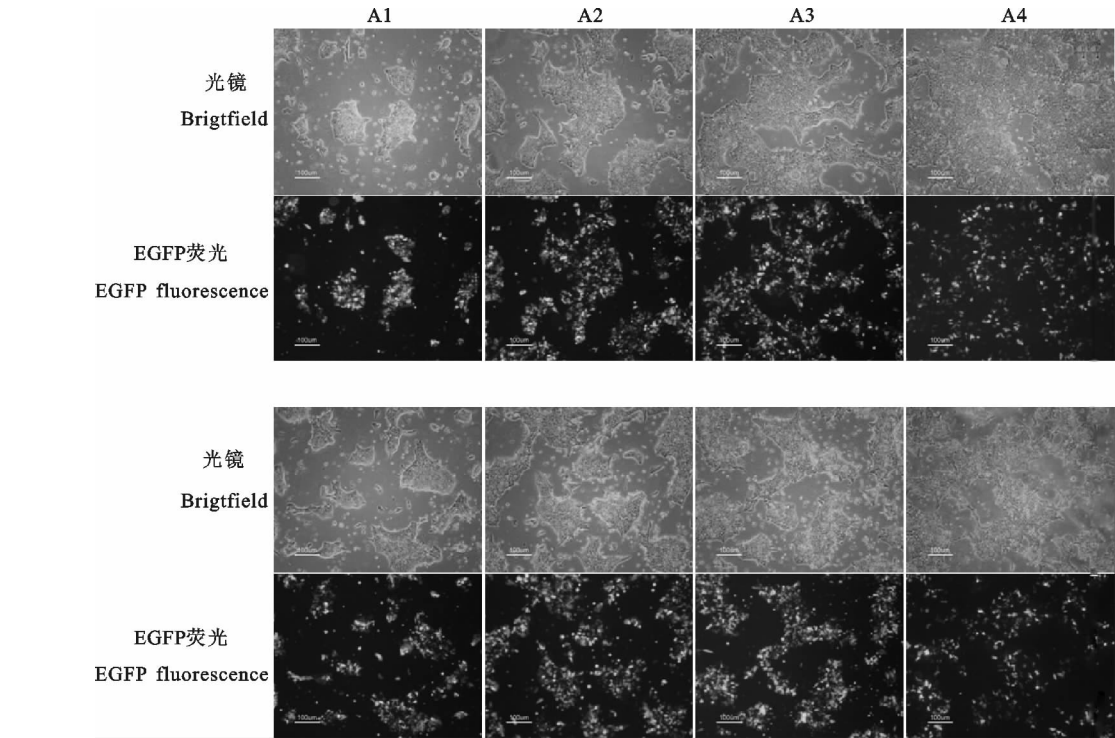


图 1 不同条件下脂质体法对 R1/E 细胞转染效率的显微镜观察(100×)

A1~A4. 各组 pEGFP-N1 质粒(μg)/脂质体(μL)均为 0.8/2; B1~B4. 各组所用 pEGFP-N1 质粒(μg)/脂质体(μL)分别为 0.4/1, 0.8/2, 1.6/4, 3.2/8

Fig. 1 Fluorescence observation of the liposome-mediated transfection efficiency of R1/E cells under different conditions (100×)

A1—A4. All transfected with 0.8 μg pEGFP-N1 reporter plasmid/2 μL Liposome; B1—B4. DNA and liposome used in each group were 0.4/1, 0.8/2, 1.6/4, 3.2/8 respectively

2.2 各组转染效率的流式分析

通过流式细胞计数对各组转染效率进行定量分析,结果如图 2 所示。

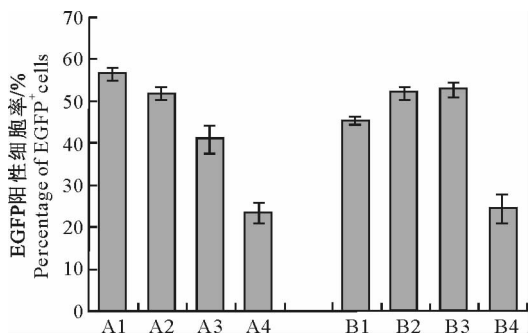


图 2 不同条件下脂质体法对 R1/E 细胞转染效率的比较

Fig. 2 Comparison of the transfection efficiency of the liposome-mediated transfection efficiency of R1/E cells under different conditions

由图 2 可看出,流式分析结果与荧光观察结果基本一致,各组都转染 $0.8 \mu\text{g}$ 质粒/ $2 \mu\text{L}$ 脂质体时,A1~A4 组 EGFP 阳性细胞率分别为 $(56.4 \pm 1.5)\%$ 、 $(51.8 \pm 1.2)\%$ 、 $(40.8 \pm 3.2)\%$ 和 $(23.3 \pm 2.4)\%$,提示转染效率随着细胞融合度的增加而呈逐渐递减趋势。减少或增加转染质粒和脂质体量后,B1~B4 组 EGFP 阳性细胞率分别为 $(45.3 \pm 0.6)\%$ 、 $(51.8 \pm 1.2)\%$ 、 $(52.6 \pm 1.7)\%$ 和 $(24.3 \pm 3.3)\%$,提示减少或增加转染质粒和脂质体量,能在一定程度降低或提高转染效率,但当转染细胞融合度为 90%左右时,即使提高转染质粒及脂质体量也无法明显改善转染效率(A4 为 $(23.3 \pm 2.4)\%$,B4 为 $(24.3 \pm 3.3)\%$)。从以上结果可看出,本试验中转染效率最高的为 A1 组 $(56.4 \pm 1.5)\%$;A2 $(51.8 \pm 1.2)\%$ 和 B3 $(52.6 \pm 1.7)\%$ 组转染效率差别不大,也较为理想较。A3 组而言,转染质粒和脂质体量增加后,B3 组中死亡细胞明显增多,细胞状态受到影响,不利于细胞生长。综上可知,在细胞融合度为 30%~50%时, $0.8 \mu\text{g}$ 质粒/ $2 \mu\text{L}$ 脂质体是较理想的 mESCs 转染条件。

3 讨论

考虑到实验室安全性以及操作简便等因素,本试验采用脂质体法对 mESCs 进行转染,并对其转染条件进行了优化,通过分析和比较不同细胞密度下脂质体法转染 mESCs 所获得的 EGFP 阳性细胞率,发现在转染细胞融合度为 30%左右时,转染效率(即 EGFP 阳性细胞率)可达 56.4%,随着细胞融合度的增加荧光信号逐渐减弱,当转染细胞融合度

为 90%左右时,转染效率明显下降至 23.3%。虽然细胞融合度为 70%左右时,增加转染质粒及脂质体量能将转染效率从 40.8%提高到 52.6%,但这是以增加细胞毒性和损伤细胞状态为代价的。而细胞融合度为 90%左右时,即使按比例提高转染试剂及质粒量也无法明显改善转染效率。

值得一提的是,Lipofectamine™ 2000 说明书建议在细胞传代 24 h 后细胞融合度为 90%左右时进行转染,但从本试验结果来看,这个条件并不适合所有的细胞,应结合不同细胞的特性对转染条件进行优化。mESCs 是一种较特殊的细胞,其呈克隆状生长,如果克隆过大,密度过高,都将导致质粒不容易被转入。此外,如果 mESCs 传代密度过高,将导致细胞生长空间太小,不利于克隆的形成。因此,本试验降低了细胞密度,对转染条件重新进行摸索。采用低细胞密度转染时,细胞克隆形态典型,状态良好,但需要注意的是,降低细胞密度后,传代时将会导致细胞生长周期延长,细胞进入对数生长期的时间也将延后。笔者认为,mESCs 低密度传代 24 h 后,细胞更倾向于处于恢复过程中,此时未必是合适的转染时机。而传代后 24~48 h,细胞生长和增殖逐渐增强,状态良好,进入对数生长期,此时应为恰当的转染时机。

本研究还发现,若按照 Lipofectamine™ 2000 说明书提供的使用量($0.8 \mu\text{g}$ DNA/ $2 \mu\text{L}$ 脂质体)进行操作,脂质体对于 mESCs 毒性并不大。此外,作者对转染过程进行了调整,在加入新鲜培养基之前,先让 DNA-转染试剂复合物直接与细胞孵育 3~5 min,这有助于提高细胞转染效率,其原因可能是这样的操作可增加 DNA-转染试剂和细胞接触进而进入细胞的机率。但由于 DNA-转染试剂复合物量少,且仅含基础培养基,这样的孵育可能会导致细胞皱缩现象,不利于维持良好的细胞状态。

综上可以得出,在细胞融合度为 30%~50%的条件下,用脂质体转染 mESCs 可获得较为理想的转染效率($>50\%$),并维持良好的细胞状态。本研究结果为进一步的 mESCs 相关研究提供了良好的工作基础,同时也为提高一些较难转染细胞系的转染效率提供了思路。

[参考文献]

- [1] Smith A G. Embryo-derived stem cells; of mice and men [J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2001, 17: 435-62.
- [2] Keller G. Embryonic stem cell differentiation; Emergence of a

- new era in biology and medicine [J]. *Genes Dev*, 2005, 19(10): 1129-1155.
- [3] Chew J L, Loh Y H, Zhang W S, et al. Reciprocal transcriptional regulation of Pou5f1 and Sox2 via the Oct4/Sox2 complex in embryonic stem cells [J]. *Mol Cell Biol*, 2005, 25(14): 6031-6046.
- [4] Pfeifer A, Ikawa M, Dayn Y, et al. Transgenesis by lentiviral vectors; lack of gene silencing in mammalian embryonic stem cells and preimplantation embryos [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(4): 2140-2145.
- [5] 张梅英, 李 华, 董婉维, 等. 稳定整合 pTet-on 载体小鼠胚胎干细胞株的建立 [J]. *中国实验动物学报*, 2006, 14(3): 161-166.
- Zhang M Y, Li H, Dong W W, et al. Establishment of a mouse embryonic stem cell line integrated with pTet-on gene [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2006, 14(3): 161-166. (in Chinese)
- [6] Ma Y, Ramezani A, Lewis R, et al. High-level sustained transgene expression in human embryonic stem cells using lentiviral vectors [J]. *Stem Cells*, 2003, 21(1): 111-117.
- [7] Zaehres H, Lensch M W, Daheron L, et al. High-efficiency RNA interference in human embryonic stem cells [J]. *Stem Cells*, 2005, 23(3): 299-305.
- [8] Li G B, Lu G X. Gene delivery efficiency in bone marrow-derived dendritic cells; comparison of four methods and optimization for lentivirus transduction [J]. *Mol Biotechnol*, 2009, 43(3): 250-256.
- [9] Lee C H, Kim E Y, Jeon K, et al. Simple, efficient, and reproducible gene transfection of mouse embryonic stem cells by magnetofection [J]. *Stem Cells Dev*, 2008, 17(1): 133-141.
- [10] Tang F C, Meng G L, Yang H B, et al. Stable suppression of gene expression in murine embryonic stem cells by RNAi directed from DNA vector-based short hairpin RNA [J]. *Stem Cells*, 2004, 22(1): 93-99.
- [11] Zhang J, Tam W L, Tong G Q, et al. Sall4 modulates embryonic stem cells pluripotency and early embryonic development by the transcriptional regulation of Pou5f1 [J]. *Nat Cell Biol*, 2006, 8(10): 1114-1123.
- [12] Hough S R, Clements I, Welch P J, et al. Differentiation of mouse embryonic stem cells after RNA interference-mediated silencing of OCT4 and NANOG [J]. *Stem Cells*, 2006, 24(6): 1467-1475.
- [13] Madan B, Madan V, Weber O, et al. The pluripotency-associated gene Dppa4 is dispensable for embryonic stem cell identity and germ cell development but essential for embryogenesis [J]. *Mol Cell Biol*, 2009, 29(11): 3186-3203.
- [14] Ko B S, Chang T C, Shyue S K, et al. An efficient transfection method for mouse embryonic stem cells [J]. *Gene Ther*, 2009, 16(1): 154-158.
- [15] Okita K, Hong H, Takahashi K, et al. Generation of mouse-induced pluripotent stem cells with plasmid vectors [J]. *Nat Protoc*, 2010, 5(3): 418-428.