

· 论 著 ·

人急性淋巴细胞白血病细胞株 T 细胞电转染条件的优化*

江 雪¹, 杨 平^{1,2}, 李 玥¹, 赵少志¹, 马用信^{1△}

(1. 四川大学华西医院医学遗传室/生物治疗国家重点实验室, 成都 610041; 2. 成都医学院 610041)

摘要:目的 优化人急性淋巴细胞白血病细胞株细胞(Jurkat T 细胞)的电转染条件。方法 采用电穿孔的方法,将 pEGFP-C1 导入 Jurkat T 细胞中,通过改变电转时的电压来检测细胞存活率,调节电压、细胞密度、电转质粒数、电转缓冲液,通过流式细胞仪检测质粒转染效率。结果 电转条件在电压 140 V、细胞密度 10^7 个/毫升、质粒数 30 μ g、电转缓冲液为优化培养基时,电转染效率可达 $(79.2 \pm 3.21)\%$ 。本研究为外源基因电转染 Jurkat T 细胞提供了可靠的试验参数依据。结论 本实验通过优化 Jurkat T 细胞电转染条件能够有效地提高 Jurkat T 细胞的电转染效率。

关键词:电转染;急性淋巴细胞白血病细胞株 T 细胞;转染效率;pEGFP-C1

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.15.003

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)15-1463-03

Optimization of electransfection for Jurkat T cell*

Jiang Xue¹, Yang Ping^{1,2}, Li Yue¹, Zhao Shaozhi¹, Ma Yongxin^{1△}

(1. Department of Medical Genetics and Division of Morbid Genomics, State Key Laboratory of Biotherapy, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041, China;

2. Chengdu Medical College, Chengdu, Sichuan 610041, China)

Abstract: Objective To optimize the electransfection parameters of Jurkat T cell and develop an electransfection system for Jurkat T cell. **Methods** To electransfect the green fluorescent protein(GFP) into Jurkat T cell by electroporation apparatus, with different electric voltages, cell concentrations, plasmid concentration and electroporation buffers. **Results** The electransfection rate was optimized under the conditions: the electric voltage was 140V, the cell concentration was 10^7 /mL, the plasmid concentration was 30 μ g, choosing electroporation buffers as the optimum culture medium. This study provides reliable test parameters for electransfection of Jurkat T cell. **Conclusion** By optimizing the electransfection conditions, the electransfection rate of Jurkat T cell is efficiently improved.

Key words: electransfection; Jurkat T cell; electransfection rate; pEGFP-C1 vector

随着社会的不断变化、环境污染的加剧,人们生活压力的增加等一些外界因素影响,白血病发病率不断提升,其中急性淋巴细胞白血病在儿童恶性肿瘤发病率中居首位。近年来对急性淋巴细胞白血病的研究成为对白血病研究的热点之一^[1]。以人急性淋巴细胞白血病细胞株细胞(Jurkat T 细胞)为模型,成为研究急性淋巴细胞白血病的重要手段^[2]。电转染方法与脂质体转染比较,有转染效率高、可重复性强、无试剂费用等优点^[3]。但电转染需高电压脉冲刺激,会降低细胞的存活率。本实验通过改变电转过程中的电压、细胞密度、质粒数以及电转缓冲液,确立 Jurkat T 细胞的电转染条件,为该菌株相关研究提供试验参考依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 细胞株和质粒 Jurkat T 细胞, pEGFP-C1 载体均由本实验室保存。

1.1.2 试剂和仪器 Bio-rad 0.2 cm 电转杯;电穿孔仪(Bio-rad Gene Pulser Xcell 真核系统);Olympus 倒置荧光显微镜;Nanodrop ND-1000 微量测定仪;Beckmen 培养箱;质粒提取试剂盒(OMEGA);RPMI-1640、胎牛血清(FBS)及 β -巯基乙醇等细胞培养试剂购自 GibcoBRL 公司;优化培养基(Gibco)。

1.2 方 法

1.2.1 质粒的制备 将 pEGFP-C1 转入 DH5 α 感受态细胞,

37 $^{\circ}$ C 培养箱培养过夜,质粒提取试剂盒提取质粒,去内毒素。Nanodrop ND-1000 微量测定仪测定质粒浓度, $OD_{260}/OD_{280} = 2.0$ 。

1.2.2 电转染及转染效率的测定 复苏 Jurkat T 细胞于 RPMI-1640 培养基(RPMI-1640+10%FBS+50 μ mol/L β -巯基乙醇)中培养。复苏培养 2~3 d,电转前用 RPMI-1640 培养基处理细胞。使用计数板调整细胞密度,台盼蓝染色法在显微镜下观测细胞活力,记录活细胞数。用 Eppendorf 微量移液枪取 250 μ L 于 Bio-rad 0.2 cm 电转杯中。再将 pEGFP-C1 质粒按一定微量数加入电转杯中,小心混匀,准备电转。设置各电转条件,将电转杯放入电转槽中电转^[4]。电转完成后,立即取出电转杯,将转染的细胞及电转缓冲液小心移入 12 孔培养板中培养。培养板中已预先加入 1 mL RPMI-1640 培养基,在 37 $^{\circ}$ C 培养箱预热 30 min。放入 37 $^{\circ}$ C,饱和湿度 5% 培养箱中静置培养。电转后 8 h,小心取出 12 孔培养板。收集每孔电转后细胞,0 $^{\circ}$ C PBS 500 μ L 重悬 Jurkat T 细胞。取 20 μ L 细胞培养液稀释至 200 μ L。用正常 Jurkat T 细胞作为对照,检测绿色荧光信号。获取带有绿色荧光表达的 Jurkat T 细胞个数。

电转染效率 = [(绿色荧光细胞个数 \times 稀释倍数) / (A \times 电转时总细胞数)] $\times 100\%$ A 为电转细胞存活系数^[5]。

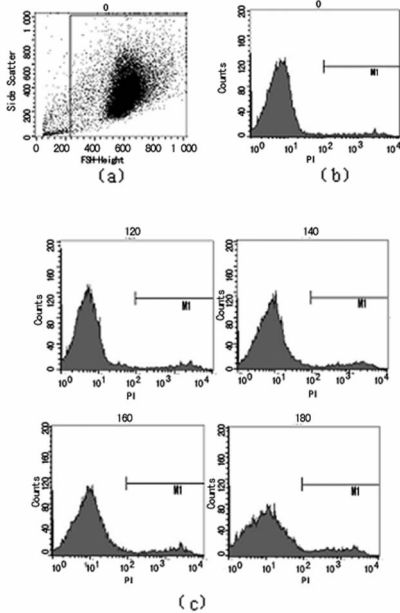
1.2.3 电转结果的鉴定 pEGFP-C1 载体带有编码绿色荧光蛋白的基因片段,转入细胞体内后,编码绿色荧光蛋白(green

fluorescent protein,GFP),在 490 nm 蓝色波长下观测,可见稳定绿色荧光。

1.3 统计学处理 每组实验在相同条件下重复 3 次。数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,所得组间数据结果用 SPSS17.0 统计软件进行数据分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 电压对细胞存活率的影响 在细胞电转实验中,首先对不同电压强度下的细胞存活率做了比较。取 6 个 0.2 cm 的电转杯,在每个电转杯中移入 250 μ L 细胞浓度为 10^7 个/毫升的培养基。分别用 0、120、140、160、180 V 的电压刺激细胞后,立即小心移入 6 孔板中培养。在 37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养 8 h 后,分别收集细胞,用碘化丙啶(PI)避光染色 10 min 后,流式细胞仪检测细胞存活率。由实验数据可得细胞存活率,即电转细胞存活系数(A)为 $A_{120} = (94.94 \pm 2.97)\%$, $A_{140} = (92.97 \pm 3.02)\%$, $A_{160} = (88.39 \pm 3.11)\%$, $A_{180} = (76.67 \pm 3.78)\%$ 。



注:(a)、(b)是用 0 V 电压刺激下的细胞作为参照组。(c)中各组数据显示细胞在不同电压情况下(120、140、160、180 V)细胞情况。M1 表示各组中细胞死亡数量。细胞存活率=(截取细胞总数-M1)/截取细胞总数。

图 1 电压对细胞存活率的影响

2.2 电压对转染效率的影响 当电转时电容为 25 μ F、电阻为 200 Ω 的固定条件下,分别用 120、140、160、180 V 电压对细胞进行电穿孔试验,电转后于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中静置培养 8 h 后取出培养板测定绿色荧光表达情况。转染效率与电压关系如图 1。当电压在 140 V 时,电转染效率达到最大值。

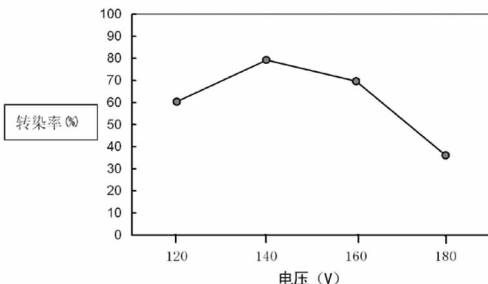


图 2 电压对电转化效率的影响

2.3 细胞密度对转染效率的影响 当固定电转电容的条件

下,选择不同细胞密度对细胞电穿孔试验进行参数优化。如图 2 所示,在流式细胞仪检测中, 1.5×10^7 个/毫升和 2×10^7 个/毫升虽然能捕获相对多的绿色荧光表达个体,但是因为总电转细胞数量的增加,使得效率降低。本实验中,在细胞密度为 10^7 个/毫升时,细胞电转染效率最高。

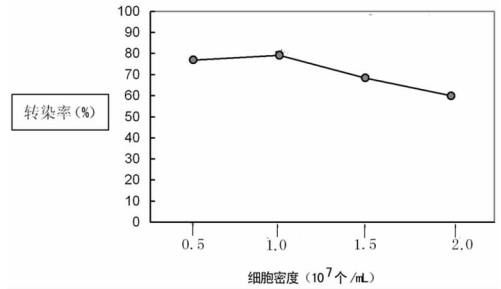


图 3 细胞密度对电转化效率的影响

2.4 质粒浓度对转染效率的影响 转染质粒浓度在电转电容 25 μ F、电阻 200 Ω 、电压 140 V 以及细胞密度电转染参数恒定的情况下,随着质粒浓度的增加,电转染效率先增加明显,后相对恒定在一定数值。本实验结果如表 1 所示,质粒浓度在 30 μ g 时有最大转染效率(79.6 \pm 4.02)%。

表 1 质粒数量对点转染效率的影响($\bar{x} \pm s$)

Table with 2 columns: 质粒数(μg) and 转染效率(%)

2.5 电转缓冲液对转染效率的影响 电转染前分别用普通 RPMI-1640 培养基和优化培养基(Gibco)处理重悬 Jurkat T 细胞。在电容、电阻、电压一定条件下,对电转后 Jurkat T 细胞进行培养,检测绿色荧光表达个体。实验结果如图 3 所示,优化培养基处理后的 Jurkat T 细胞有较高的电转染效率,电转染效率为(73 \pm 3.45)%。

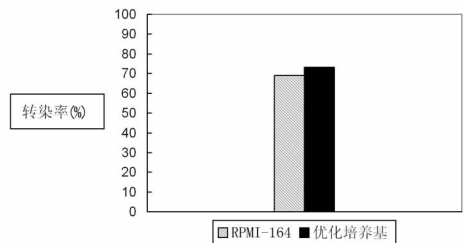


图 4 电转缓冲液对转染效率的影响

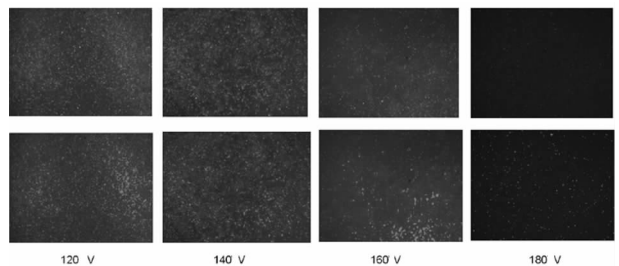


图 5 不同电压条件下电转后 Jurkat T 细胞绿色荧光蛋白表达情况

2.6 电转结果的鉴定 用 pEGFP-C1 电转染 Jurkat T 细胞, pEGFP-C1 转入细胞内后,参与细胞内的蛋白翻译,表达 GFP。在汞灯激发 490 nm 蓝色波长下,暗室中能观察到绿色荧光信号。下图用软件做了荧光强度分析。

3 讨论

电转技术是通过外加电场产生一定的电脉冲,诱导活细胞产生跨膜点位。当外加电场强度大于细胞膜穿孔的临界值,导致细胞膜产生小孔,使外源基因进入细胞内^[6]。电转技术相较于脂质体转染技术有更高的转染率,但因为较大的电压刺激,使得电转后细胞的死亡率也较高。而在高转染率和低死亡率间达到一个相对的平衡,就成为了本实验的目的^[7-8]。电转染效率受很多方面的影响,包括电压、电阻、电容、电转前后温度的控制、反应物的性质和状态(DNA 和细胞)、电转缓冲液、培养基成分等多种因素控制^[9]。本实验选取了其中几个相对重要的影响因素进行研究,为 Jurkat T 细胞电转染外源基因的电转条件提供可靠的实验参数依据。

电压对电转染效率的影响是重要因素之一。电压从两个方面直接影响电转染的成功。一是电压刺激后细胞的死亡率,一是电压刺激过程中质粒成功导入细胞内的效率。当电压越低时,细胞数的死亡率越低,呈线性关系^[10]。但是当电压过低时,又因为达到阈刺激的细胞数量相对较少,而导致进入细胞内的质粒数量少。本研究对不同电压情况下的 Jurkat T 细胞电转染效率的一个检测。在 Jurkat T 细胞内成功导入外源 pEGFP-C1 质粒时,质粒在 Jurkat T 细胞内部转录翻译,在蓝色荧光激发下可表达绿色荧光。而没有成功导入质粒的 Jurkat T 细胞则不会表达绿色荧光。由实验可知,当电压小于 140 V 时,电压值越大,产生的疏水小孔越多,细胞膜通透性越好,外源质粒更容易进入细胞内。随着电压的不断增强,相对更多细胞数能产生跨膜点位,细胞获取外源质粒更容易,但高电压对细胞的损伤也越大^[11]。电压越强,引起细胞死亡率也随之增高。本实验结果显示,当电压为 140 V 时,电转染有最高效率(79.2±3.21)%。

在电压一定的条件下,细胞存活系数一定的情况下,电转染中其他条件的改变,也对电转染效率有着重要的影响。电转染效率在细胞密度在(0.5~1)×10⁷/mL 之间时,随着细胞密度的增加而有增加。这个数值间,因为细胞数量越大,而相对的能够获得电转子的细胞个数越多。而在细胞密度大于 1.5×10⁷/mL 后,细胞电转染效率反而降低。因为本实验中选用的电转杯是 0.2 cm 规格的,细胞密度过大会使得细胞在电转时电刺激过程受到影响,可能导致部分细胞没有达到阈值,而使得成功获得的电转子数反而减小,最终导致电转染效率的降低^[12]。质粒浓度对电转染效率也起着一定的影响作用。从实验结果可以看出,质粒浓度对电转染效率的影响并不是一个简单的线性关系。当质粒浓度低于 20 μg 时,电转染效率随着质粒数的增加有明显的升高,当质粒浓度为 20~30 μg 之间时,质粒浓度的增加并没有太大影响电转染效率,10 μg 数值上的变化仅提高了 0.4% 的转染效率。当质粒浓度高于 30 μg 时,电转染效率反而随着质粒数的增加而降低。在细胞密度一定时,质粒浓度在未达到饱和状态时电转染效率会随着质粒浓度的增大而提高,但当质粒浓度达到饱和状态后,电转染率就没有太大的变化^[13]。在质粒浓度过大的情况下,电转染率反而有下降的趋势,考虑可能是质粒浓度过大,内毒素对细胞毒性

也相应增大,从而导致电转染率的下降。

综上所述,本实验表明在电压 140 V、细胞密度 10⁷ 个/毫升、质粒数 30 μg、电转缓冲液为优化培养基时,电转染效率可以达到最高,为(79.2±3.21)%。通过优化 Jurkat T 细胞的电转染条件,对 Jurkat T 细胞的电转染效率有明显提高。在将来的白血病等以 Jurkat T 细胞作为研究模型的基础和临床研究中提供了有效的实验研究方法。

参考文献:

- [1] List AF, Kopecky KJ, Willman CL, et al. Benefit of cyclosporine modulation of drug resistance in atipients with poor-risk acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group Study[J]. *Blood*, 2001, 98: 3212-3220.
- [2] Dahl GV, Lacayo NJ, Brophy N, et al. Mitoxantrone, etoposide, and cyclosporine therapy in Pediatric patients with recurrent or refractory acute myeloid leukemia[J]. *J Clin Oncol*, 2008, 18: 1867-1875.
- [3] Groll A, Levin Y, Barbosa MC, et al. Linear DNA low efficiency transfection by liposome can be improved by the use of cationic lipid as charge neutralizer[J]. *Biotechnol Prog*, 2006, 22(4): 1220-1224.
- [4] Turgeon N, Laflamme C, Ho J, et al. Elaboration of an electroporation protocol for *Bacillus cereus* ATTC 14579 [J]. *J Microbil Methods*, 2006, 67: 543-548.
- [5] 张旭, 崔艳华, 张兰威, 等. 乳酸菌电转化条件研究[J]. *兰州大学学报: 自然科学版*, 2009, 45(6): 26-33.
- [6] Neumann E, Sowers AE, Jordan CA. *Electroporation and eletrofusion in cell biology*[M]. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 1989.
- [7] Zimmermann U. Electric field mediated fusion and related electrical phenomena [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1982, 694: 227-277.
- [8] Neumann E, Rosenbeck K. Permeability changes induced by electric impulses in vesicular membranes[J]. *J Membr Biol*, 1972, 10: 279-290.
- [9] Weaver JC, Chizmadzhev YA. Theory of electroporation a review[J]. *Bioelec-trochem Bioenerg*, 1996, 41: 135-160.
- [10] 格日勒图, 王艳霞, 包秋华, 等. 电转化方法将外源性质粒导入干酪杆菌的研究[J]. *中国乳品工业*, 2009, 37(2): 9-13.
- [11] Teissie J, Golzio M, Rols MP. Mechanisms of cell membrane electroporation: a minireview of our present knowledge[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1(724): 270-280.
- [12] Tyurin MV, Desai SG, Lynd LR. Electrotransformation of *clostridium thermocellum* [J]. *Appl Environ Mierobil*, 2004, 70(2): 883-890.
- [13] Change DE, Lee HI, So JS. Optimization of electrotransformation conditions for *propionibacterium acnes* [J]. *J Microbil Methods*, 2008, 72(1): 38-41.