

罗维,艾磊,周越. 小鼠巨噬细胞 RAW264. 7 细胞电穿孔转染条件的建立和验证[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(2): 193-200.

Luo W, Ai L, Zhou Y. Establishment and verification of transformation conditions for mouse RAW264. 7 macrophages by electroporation [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(2): 193-200.

Doi:10. 3969/j. issn. 1005-4847. 2020. 02. 007

小鼠巨噬细胞 RAW264. 7 细胞电穿孔转染条件的建立和验证

罗维^{1,2}, 艾磊³, 周越^{2*}

(1. 南京体育学院运动健康学院, 南京 210014; 2. 北京体育大学运动生理学教研室, 北京 100084;
3. 江苏省体育科学研究所, 南京 210033)

【摘要】 目的 筛选并验证 RAW264. 7 细胞中电穿孔转染 TRIB3 过表达质粒和 TRIB3 siRNA 的条件, 建立适用于 RAW264. 7 细胞的最佳电穿孔转染方案。**方法** 通过改变脉冲电压、脉冲时长和质粒浓度等条件, 将载体为 pCMV6-Entry 的 TRIB3 过表达质粒和 TRIB3 siRNA 转入 RAW264. 7 细胞, 24 h 后相差显微镜观察细胞形态, CCK-8 法检测细胞存活率, 72 h 后 Western Blot 法检测 TRIB3 蛋白表达以验证目的基因表达改变情况。**结果** (1) 以不同脉冲电压转染时, 110 和 120 mV 组细胞形态和存活率与对照组无差异, 130 和 140 mV 组悬浮细胞较多、细胞存活率显著低于对照组 ($P < 0. 01$), 120、130 和 140 mV 组 TRIB3 蛋白表达显著增加 ($P < 0. 05$); (2) 以不同脉冲时长进行转染时, 10 和 20 ms 组细胞形态和存活率与对照组无差异, 30 ms 组细胞存活率显著低于对照组 ($P < 0. 01$), 20 和 30 ms 组 TRIB3 蛋白表达显著增加 ($P < 0. 01$); (3) 以不同质粒浓度进行转染时, 2 和 4 μg 组细胞形态和存活率与对照组无差异, 6 μg 组细胞存活率低于对照组 ($P < 0. 05$), 4 μg 组 TRIB3 表达显著增加 ($P < 0. 01$); (4) 以 120 mV、20 ms 条件转染不同浓度 TRIB3 siRNA 时, 各组细胞形态和存活率均与对照组无差异, 10 nmol/L 组 TRIB3 表达仅为对照组的 0. 19 倍 ($P < 0. 01$)。**结论** 以 120 mV、20 ms 条件在 RAW264. 7 细胞中电穿孔转染 TRIB3 过表达质粒 (每样本 4 μg) 和 TRIB3 siRNA (10 nmol/L), 在保证较高的细胞存活率的同时能显著改变目的基因的蛋白表达水平, 为后续 RAW264. 7 细胞中质粒转染相关的基础研究提供实验依据和借鉴。

【关键词】 RAW264. 7 细胞; 电穿孔; TRIB3 过表达质粒; TRIB3 siRNA

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020) 02-0193-08

Establishment and verification of transformation conditions for mouse RAW264. 7 macrophages by electroporation

LUO Wei^{1,2}, AI Lei³, ZHOU Yue^{2*}

(1. Department of Sports and Health Sciences, Nanjing Sport Institute, Nanjing 210014, China. 2. Department of Exercise Physiology, Beijing Sport University, Beijing 100084. 3. Jiangsu Research Institute of Sports Science, Nanjing 210033)
Corresponding author: ZHOU Yue. E-mail: zhouy@bsu.edu.cn

【Abstract】 Objective To screen and validate the conditions for transforming Tribbles Pseudokinase 3 (TRIB3) overexpression plasmids and siRNA into RAW264. 7 cells by electroporation, to establish the best electroporation scheme for RAW264. 7 cells. **Methods** By changing the conditions of pulse voltage, pulse duration and plasmid concentration,

[基金项目] 南京体育学院校级培育项目 (PY201924); 江苏省高校自然科学研究面上项目 (18KJB180013)。
Funded by the Nanjing Sport Institute Fund (PY201924), and Natural Science Fund for Colleges and Universities in Jiangsu Province (18KJB180013).

[作者简介] 罗维 (1989—), 女, 讲师, 在读博士研究生, 研究方向: 代谢性疾病的运动膳食干预效果及机制。Email: luoweihyd@163.com

[通信作者] 周越 (1966—), 男, 教授, 博士, 研究方向: 运动对骨骼肌形态机能影响机理研究。Email: zhouy@bsu.edu.cn

TRIB3 overexpression plasmid and TRIB3 siRNA were transformed into RAW264.7 cells. Cell morphology was observed by phase contrast microscopy. Cell viability was detected by CCK-8, and TRIB3 protein expression was detected by Western blot. **Results** (1) When transformed with different pulse voltages, there was no difference in cell morphology and survival rate between 110 and 120 mV groups and the control group. The cell survival rate in the 130 and 140 mV groups were significantly lower than in the control group ($P < 0.01$). TRIB3 protein expressions in the 120, 130 and 140 mV groups were significantly increased than that in the control group ($P < 0.05$). (2) When transformed with different pulse durations, there was no difference in cell morphology and survival rate between the 10 and 20 ms groups and the control group. The cell survival rate in the 30 ms group was significantly lower than that in the control group ($P < 0.01$). The expressions of TRIB3 in the 20 and 30 ms groups were significantly increased than that in the control group ($P < 0.01$). (3) When transformed with different plasmid concentrations, the cell morphology and survival rate of the 2 and 4 μg groups were not different from the control group. The cell survival rate of the 6 μg group was lower than that in the control group ($P < 0.05$), and the expression of TRIB3 in the 4 μg group was significantly increased than that in the control group ($P < 0.01$). (4) When transformed with TRIB3 siRNA at different concentrations, the expression of TRIB3 in the 10 nmol/L group was only 0.19 times that in the control group ($P < 0.01$). **Conclusions** In RAW264.7 cells, the TRIB3 overexpression plasmid (4 $\mu\text{g}/\text{sample}$) and TRIB3 siRNA (10 nmol/L) were transfected by electroporation under the conditions of 120 mV and 20 ms, which ensured a high cell survival rate and significantly changed the protein expression level of the target gene.

【Keywords】 RAW264.7 cells; electroporation; TRIB3 overexpression plasmid; TRIB3 siRNA

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

质粒转染对于分子生物学研究具有重要意义,目前最为常用的质粒转染方法主要包括电穿孔法、阳离子脂质体法和反转录病毒法^[1-2]。阳离子脂质体法对细胞毒性较大,反转录病毒法又需要考虑多种安全因素^[3],而电穿孔法作为物理转染方法,具有操作简单、可重复性好、转染效率高、适用谱广、作用机制清晰等优点,尤其是对于原代细胞等难以转染的细胞系具有较大的优势^[4-5]。

RAW264.7 细胞是小鼠来源的单核巨噬细胞株^[6-8],近几年因在代谢性疾病相关研究中受到广泛关注而成为质粒转染的目标细胞^[9]。RAW264.7 细胞体积较小,且易极化而难以扩增和传代,增加了该细胞质粒转染的难度^[10-11],目前未见稳定高效的 RAW264.7 细胞质粒转染方法。

Tribbles 同源蛋白 3 (Tribbles Pseudokinase 3, TRIB3) 是 21 世纪新发现的假激酶^[12-13],是目前寻找癌症、心血管疾病、糖尿病等慢性代谢性疾病药物靶点的研究热点^[14-15],因此,本研究以电穿孔法在 RAW264.7 细胞中转染 TRIB3 过表达质粒和 TRIB3 siRNA 并检测目的基因表达改变情况,以期望一方面建立稳定的 RAW264.7 细胞电穿孔转染条件,另一方面研究 TRIB3 过表达质粒和 siRNA 的转染条件,为后续进一步研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料

TRIB3 基因过表达质粒 (Myc-DDK-Tagged, MR204806)、TRIB3 siRNA (SR410947) 以及相应的对照质粒 (PS100001) 和对照 siRNA 均购于美国 OriGene 公司。小鼠巨噬细胞 RAW264.7 购于中国科学院细胞库。

1.1.2 主要仪器

电穿孔仪器为日本 BEX 公司的 CUY21EDITII 型电转染仪。电极杯购于日本 BEX 公司,型号为 SE-202,电极间隙尺寸为 2 mm。电穿孔缓冲液为不含血清的培养基 OPTI-MEM,购于德国 Gibco 公司,货号为 31985-062。

1.2 方法

1.2.1 质粒构建与纯化

本研究采用 TRIB3 基因过表达质粒 (Myc-DDK-Tagged, MR204806)、TRIB3 siRNA (SR410947) 以及相应的对照质粒 (PS100001) 和对照 siRNA 进行转染。TRIB3 过表达质粒载体为 pCMV6-Entry Vector,全长 4929 bp,限制性内切酶 Sgf I (GCGAT[▼]CGC) 和 Mlu I (A[▼]CGCGT) 双酶切目的基因与 pCMV6-Entry Vector 质粒载体后,使用 T4 DNA 连接酶将酶切产物连接在一起,使得插入片段与载体定向匹配连接。质粒纯化采用阴离子交换树脂柱纯化方法,经 PowerPrep[®] HP Midiprep 质粒纯化试剂盒进行纯化 (NP100024),试剂盒购于美国 OriGene 公司,

严格按照试剂盒说明书进行规范操作。TRIB3 siRNA 为 27-mer siRNA, 其中 TRIB siRNA (a) 序列为 rGrCrArUrCrUrGrArCrUrCrArArGrGrArArUrArGrUrCrUGG; TRIB siRNA (b) 序列为 rGrGrArArGrArArArCrCrGrUrUrGrGrArGrUrUrUrGrArUGA。

1.2.2 RAW264.7 细胞培养

小鼠巨噬细胞 RAW264.7 常规培养于含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素以及 100 μ g/mL 链霉素的 DMEM 培养基 (Gibco, 德国) 中, 于 5% CO₂、37℃ 细胞孵育箱中孵育, 依细胞生长状态 1 ~ 2 d 传代一次。待细胞增殖传代到足够细胞量后统一冻存, 选取同一代细胞作为实验对象。

1.2.3 电穿孔转染

RAW264.7 细胞在电穿孔转染前 24 h 换不含青霉素和链霉素的培养基。转染前吸出培养皿中的含血清培养基, 加入 2 mL 无血清培养基洗细胞 2 次, 将细胞刮下, 离心后用 OPTI-MEM 重悬细胞, 调节细胞密度为 $1 \times 10^6/24 \mu\text{L}$ OPTI-MEM, 每次转染时吸出 24 μL 细胞悬液, 与一定量 TRIB3 过表达质粒 (2、4、6 μg) 混合均匀, 选择 110、120、130 和 140 mV 电压分别进行转染, 单次脉冲时间分别为 10、20 和 30 ms, 重复次数为 10 次。

电穿孔转染后将细胞用不含青霉素和链霉素的培养基吹打混匀, 接种于 6 孔板, 倒置显微镜下观察后置于 5% CO₂、37℃ 细胞孵育箱中孵育, 24 h 后更换含青霉素和链霉素的培养基。每天在显微镜下观察细胞形态。

确定 TRIB3 过表达质粒最佳电转条件后, 再以这一电转条件转染 10、20、50、100 nmol/L TRIB3 siRNA, 进行验证的同时筛选 TRIB3 siRNA 的最佳转染浓度。

1.2.4 CCK8 法检测细胞存活率

电穿孔转染 24 h 后收集细胞进行检测, 收细胞时每孔加入 10 μL CCK-8 (美国 APEX BIO 公司), 混匀, 于孵育箱中继续培养 2 h 后在酶标仪中检测各孔 450 nm 处的吸光度值 ($A_{450 \text{ nm}}$)。根据下列公式计算细胞平均存活率: 细胞存活率% = $(A_{\text{实验处理孔}} - A_{\text{空白孔}}) / (A_{\text{对照孔}} - A_{\text{空白孔}}) \times 100$, 每个样本重复三次, 检测不同转染条件对细胞存活率的影响。

1.2.5 TRIB3 蛋白表达检测

蛋白提取: 电穿孔转染后 72 h 收集细胞, 将细胞刮下吸入 2 mL EP 管, 4℃ 离心留沉淀, 每管加入 150 μL 裂解液, 混匀, 置冰上裂解 25 min; 10 μL 裂

解的蛋白液加入蛋白定性液, 分光光度计检测蛋白浓度; 剩余蛋白液加入等体积 $2 \times \text{loading bufer}$, 100℃ 加热 10 min, 4℃ 离心取上清。

Western Blot 蛋白上样量为 30 μg , 经 100 V 电压电泳和 60 V 电压电转后取出 NC 膜, 立春红预染剪下对应条带, TRIB3 (美国 abcam 公司) 以 5% 牛血清白蛋白封闭 2 h, β -actin (北京中山金桥公司) 以 5% 牛血清白蛋白封闭过夜。5% 牛血清白蛋白配制一抗, TRIB3 一抗浓度为 1/2000、孵育过夜, β -actin 一抗浓度为 1/5000、孵育 2 h。5% 牛血清白蛋白配制二抗, TRIB3 为兔源一抗, 采用山羊抗兔二抗, 浓度为 1/500, β -actin 为鼠源一抗, 采用山羊抗鼠二抗, 浓度为 1/3000, 均孵育 2 h。X 射线曝光胶片显影。

显影后的胶片扫描导入 Image-Pro Plus 6.0 进行灰度分析。

1.3 统计学分析

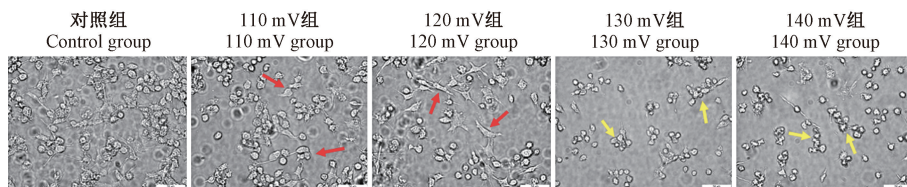
实验结果均以平均数 $\pm$ 标准误 ($\bar{x} \pm s\bar{x}$) 表示, 运用 SPSS16.0 进行数据统计分析, 采用 Levene 检验进行方差齐性检验, 单因素方差分析 (One-way ANOVA) 方法处理数据。 $P < 0.05$ 为差异具有显著性, $P < 0.01$ 为差异极具有显著性。Origin7.5 绘制图表。

2 结果

2.1 不同脉冲电压对细胞形态、存活率和目的基因表达的影响

BEX 电穿孔转染仪推荐的脉冲时长为 10 ~ 30 ms, 脉冲电压为 100 ~ 150 mV, 因此检测不同脉冲电压对 RAW264.7 细胞的转染效果时, 质粒浓度设为每样本 4 μg , 脉冲时长设为 20 ms, 脉冲电压设为 110、120、130 和 140 mV。转染后 24 h 更换培养基并观察细胞形态、检测细胞存活率, 发现 110、120 mV 组细胞形态与对照组无差异, 细胞呈圆形或梭形贴壁生长 (图 1 红色箭头标示处)^[16], 而 130、140 mV 组细胞换液前悬浮细胞较多, 换液后细胞密度明显减少且出现收缩变圆呈悬浮状 (图 1 黄色箭头标示处)^[17], 48 h 后基本无贴壁细胞。110、120 mV 组细胞存活率与未进行转染的对照组无差异 ($P < 0.05$), 而 130、140 mV 组细胞存活率显著低于对照组 ($P < 0.01$) (图 2)。

为了检测目的基因表达变化情况, 转染 TRIB3 过表达质粒 72 h 后进一步检测细胞中 TRIB3 蛋白

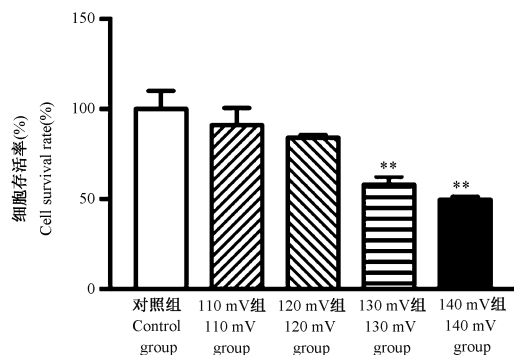


注:红色箭头标注为贴壁生长的 RAW264.7 细胞,黄色箭头标注为收缩变圆呈悬浮状的 RAW264.7 细胞。

图 1 不同脉冲电压电穿孔转染 TRIB3 过表达质粒对 RAW264.7 细胞形态的影响 (Bar = 50 μm , $\times 400$)

Note. The red arrows points RAW264.7 cells growing close to the wall, and the yellow arrows marks RAW264.7 cells which shrink and become round and suspend.

Figure 1 Changes of morphology in RAW264.7 treated with gradient pulsed voltages (Bar = 50 μm , $\times 400$)



注:与对照组相比, ** $P < 0.01$ 。

图 2 不同脉冲电压电穿孔转染 TRIB3 过表达质粒对 RAW264.7 细胞存活率的影响

Note. ** $P < 0.01$ vs Control group.

Figure 2 Effect of pulse voltages on RAW264.7 cell survival rate

的表达,发现与未进行质粒转染的对照组相比,110 mV 组 TRIB3 表达无显著差异 ($P > 0.05$),130、140 mV 组 TRIB3 表达显著增加 ($P < 0.05$),120 mV 组 TRIB3 表达增加更为显著 ($P < 0.01$) (图 3)。

以上实验结果说明,110 mV 脉冲电压虽能保证较高的细胞存活率,但目的基因表达变化并不显著;130、140 mV 脉冲电压虽能显著改变目的基因表达水平,但细胞存活率较低;而 120 mV 脉冲电压既能保证较高的细胞存活率,又能显著促进目的基因表达,是较为理想的 RAW264.7 细胞电穿孔转染的电压条件。

2.2 脉冲电压恒定时不同脉冲时长对细胞形态、存活率和目的基因表达的影响

为了进一步探索不同脉冲时长对细胞形态、存活率和目的基因表达的影响,结合 2.1 中结果,将脉冲电压设为 120 mV,质粒浓度仍为每样本 4 μg ,脉冲时长设为 10、20 和 30 ms。转染后 24 h 更换培养基并观察细胞形态、检测细胞存活率,发现 10、20

ms 组细胞形态与对照组无差异,细胞呈圆形或梭形贴壁生长(图 4 红色箭头标示处),而 30 ms 组细胞换液前悬浮细胞较多,换液后细胞密度明显减少且出现收缩变圆(图 4 黄色箭头标示处)。10、20 ms 组细胞存活率与未进行转染的对照组无差异 ($P > 0.05$),而 30 ms 组细胞存活率显著低于对照组 ($P < 0.01$) (图 5)。

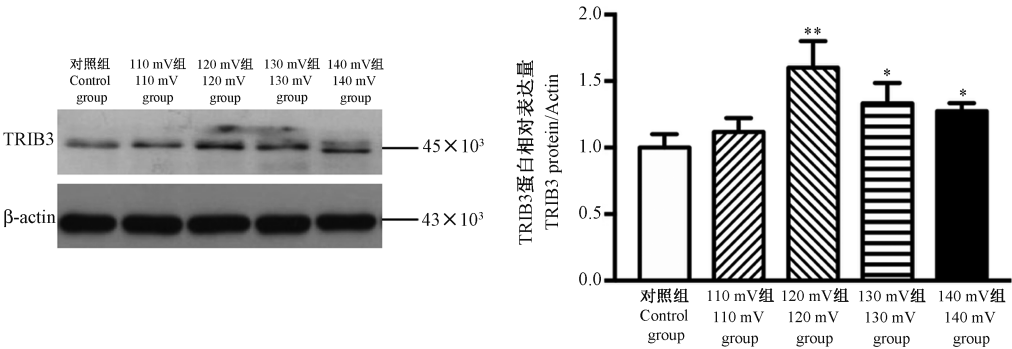
为了检测目的基因表达变化情况,转染 TRIB3 过表达质粒 72 h 后进一步检测细胞中 TRIB3 蛋白的表达,发现与未进行质粒转染的对照组相比,10 ms 组 TRIB3 表达无显著差异 ($P > 0.05$),20、30 ms 组 TRIB3 表达显著增加 ($P < 0.01$) (图 6)。

以上实验结果说明,10 ms 脉冲时长虽能保证较高的细胞存活率,但目的基因表达变化并不显著;30 ms 脉冲时长虽能显著改变目的基因表达水平,但细胞存活率较低;而 20 ms 脉冲时长既能保证较高的细胞存活率,又能显著促进目的基因表达,是较为理想的 RAW264.7 细胞电穿孔转染的脉冲时长条件。

2.3 电压和电击时长恒定时不同质粒浓度对细胞形态、存活率和目的基因表达的影响

为进一步探索不同质粒浓度对细胞形态、存活率和目的基因表达的影响,结合 2.1 和 2.2 中结果,将脉冲电压设为 120 mV,脉冲时长设为 20 ms,质粒浓度设为每样本 2、4 和 6 μg 。转染后 24 h 更换培养基并观察细胞形态、检测细胞存活率,发现各组细胞形态均与对照组无差异,呈圆形或梭形贴壁生长(图 7)。2、4 μg 组细胞存活率与未进行转染的对照组无差异 ($P > 0.05$),而 6 μg 组细胞存活率低于对照组 ($P < 0.05$) (图 8)。

为了检测目的基因表达变化情况,转染 TRIB3 过表达质粒 72 h 后进一步检测细胞中 TRIB3 蛋白的表达,发现与未进行质粒转染的对照组相比,2、6 μg 组 TRIB3 表达无显著差异 ($P > 0.05$),4 μg 组

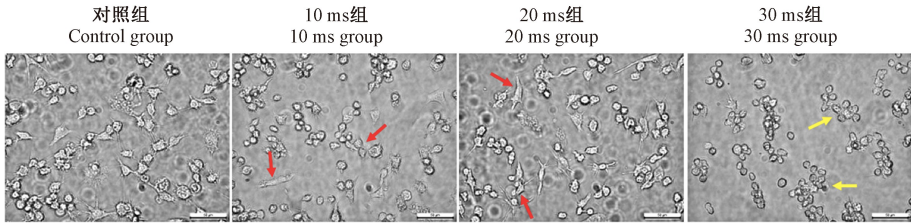


注:与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 3 不同脉冲电压电穿孔转染 TRIB3 过表达质粒对目的基因 TRIB3 蛋白表达的影响

Note. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Control group.

Figure 3 Changes of TRIB3 protein expression in RAW264.7 treated with gradient pulsed voltages

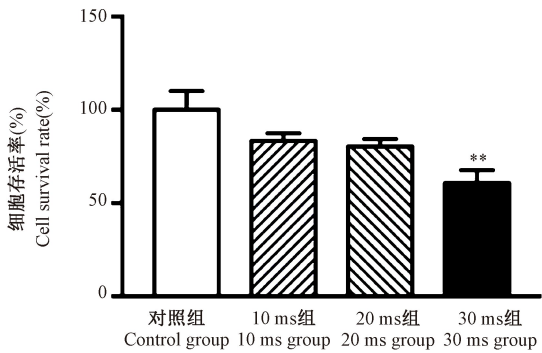


注:红色箭头标注为贴壁生长的 RAW264.7 细胞,黄色箭头标注为收缩变圆呈悬浮状的 RAW264.7 细胞。

图 4 不同脉冲时长电穿孔转染 TRIB3 过表达质粒对 RAW264.7 细胞形态的影响 (Bar = 50 μm , $\times 400$)

Note. The red arrows points RAW264.7 cells growing close to the wall, and the yellow arrows marks RAW264.7 cells which shrink and become round and suspend.

Figure 4 Changes of morphology in RAW264.7 treated with gradient pulsed time (Bar = 50 μm , $\times 400$)



注:与对照组相比, ** $P < 0.01$ 。

图 5 不同脉冲时长电穿孔转染 TRIB3 过表达质粒对 RAW264.7 细胞存活率的影响

Note. ** $P < 0.01$ vs Control group.

Figure 5 Effect of pulse time on RAW264.7 cell survival rate

TRIB3 表达显著增加 ($P < 0.01$) (图 9)。

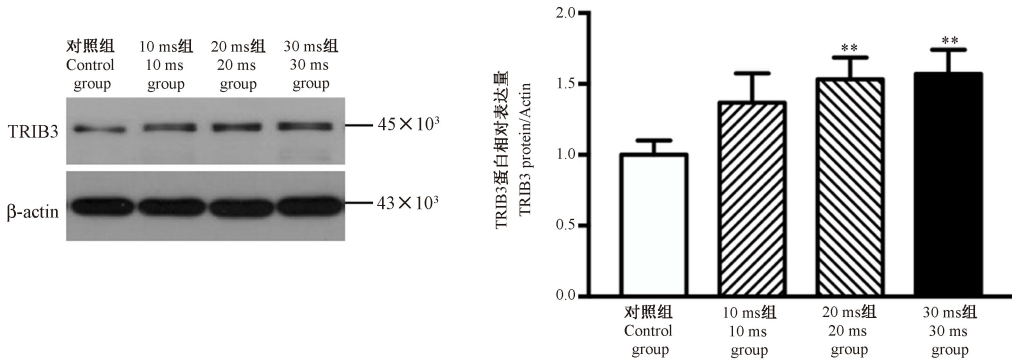
以上实验结果说明,120 mV 脉冲电压、20 ms 脉冲时长是理想的巨噬细胞 RAW264.7 电穿孔转染条件,但该条件下质粒浓度也是影响转染效果的重要因素,本研究中的 TRIB3 过表达质粒在 4 μg 样本浓度时能显著增加目的基因表达水平。

2.4 电压和电击时长恒定时不同 TRIB3 siRNA 浓度对细胞形态、存活率和目的基因表达的影响

为进一步验证以上研究中的电穿孔转染条件,本研究进一步以该条件转染不同浓度 TRIB3 siRNA (TRIB3 siRNA (a) 和 TRIB3 siRNA (b)),根据质粒说明书,设置浓度为 10、20、50 和 100 nmol/L。转染后 24 h 更换培养基并观察细胞形态、检测细胞存活率,与 2.3 中结果一致,各组细胞形态均与对照组无差异,呈圆形或梭形贴壁生长,且各组细胞存活率也与对照组无差异 ($P > 0.05$)。

为了检测目的基因表达变化情况,转染 TRIB3 siRNA 72 h 后,进一步检测细胞中 TRIB3 蛋白的表达,发现 TRIB3 siRNA 组 TRIB3 表达均显著低于对照 siRNA 组 ($P < 0.05$),但 10、20 nmol/L TRIB3 siRNA (a) 组和 10 nmol/L TRIB3 siRNA (b) 组的 TRIB3 表达显著低于其他浓度组 ($P < 0.01$) (图 10)。

以上实验结果再次证明 120 mV 脉冲电压、20 ms 脉冲时长是巨噬细胞 RAW264.7 理想的电穿孔转染条件,同时需要根据不同质粒探索最佳质粒转



注:与对照组相比, ** $P < 0.01$ 。

图 6 不同脉冲时长电穿孔转染 TRIB3 过表达质粒对目的基因 TRIB3 蛋白表达的影响

Note. ** $P < 0.01$ vs Control group.

Figure 6 Changes of TRIB3 protein expression in RAW264.7 treated with gradient pulsed time

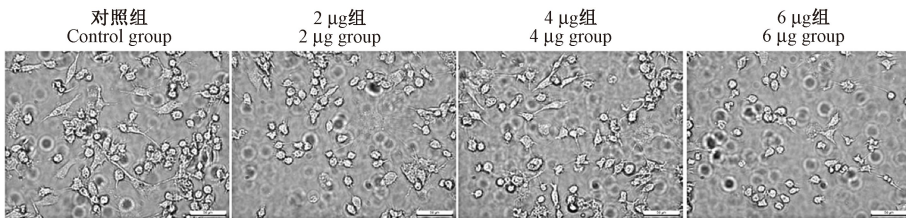
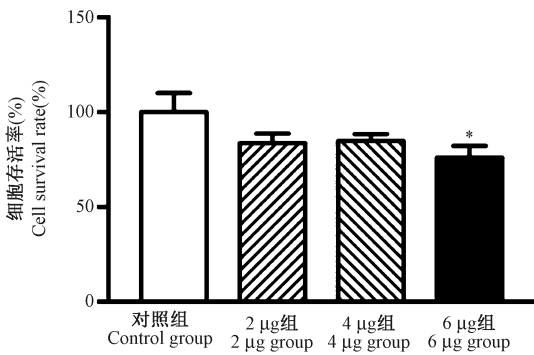


图 7 不同质粒浓度电穿孔转染 TRIB3 过表达质粒对 RAW264.7 细胞形态的影响 (Bar = 50 μm, ×400)

Figure 7 Changes of morphology in RAW264.7 treated with gradient plasmid concentration (Bar = 50 μm, ×400)



注:与对照组相比, * $P < 0.05$ 。

图 8 不同质粒浓度电穿孔转染 TRIB3 过表达质粒对 RAW264.7 细胞存活率的影响

Note. * $P < 0.05$ vs Control group.

Figure 8 Effect of plasmid concentration on RAW264.7 cell survival rate

染浓度以实现最好的转染效果,本研究中的 TRIB3 siRNA 在 10 nmol/L 转染浓度时能显著抑制 TRIB3 蛋白表达。

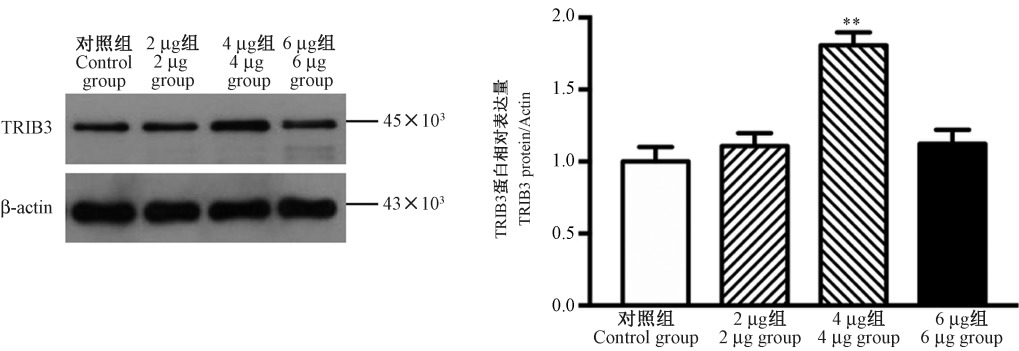
3 讨论

本研究以电穿孔法在 RAW264.7 细胞中转染 TRIB3 过表达质粒,通过设置不同的脉冲电压、脉冲时长和质粒浓度探讨电穿孔转染对 RAW264.7 细

胞形态、细胞存活率和目的基因表达水平的影响,筛选最优电穿孔转染条件后再次以 TRIB3 siRNA 进行转染以进一步对该转染条件进行验证^[18],期望一方面建立稳定的 RAW264.7 细胞电穿孔法转染条件,另一方面研究 TRIB3 过表达质粒和 siRNA 的细胞转染条件,为后续进一步研究奠定基础。

电穿孔转染中脉冲电压、脉冲时长和质粒浓度是影响细胞存活率和转染效果的主要因素^[19-20]。电阻一定的前提下,脉冲电压大小决定了通过细胞及电转液的电流大小,对于转染效果和细胞存活率具有重要影响^[21],因此本研究首先检测不同脉冲电压对 RAW264.7 细胞形态、细胞存活率和目的基因表达水平的影响,结果表明 120 mV 脉冲电压既能保证较高的细胞存活率,又能显著增加目的基因蛋白表达水平,是较为理想的 RAW264.7 细胞电穿孔转染的电压条件。

确定脉冲电压条件后,本研究又进一步检测了电穿孔转染中脉冲时长和质粒浓度对 RAW264.7 细胞形态、细胞存活率和目的基因表达水平的影响^[22],发现脉冲时长为 20 ms,质粒浓度为每样本 4 μg 时,在保证较高的细胞存活率的同时,TRIB3 蛋白表达水平约为对照组的 1.8 倍,显著促进目的基因蛋白表达。因此本研究认为脉冲电压 120 mV、脉

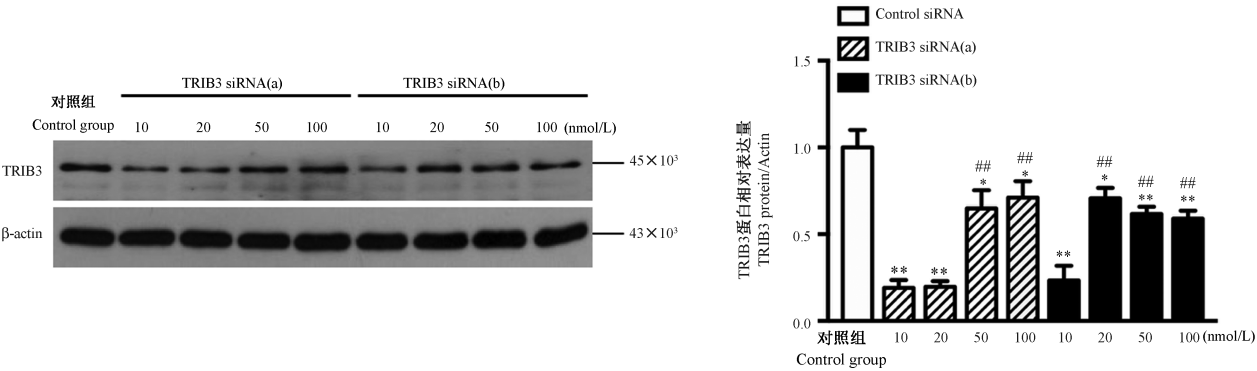


注:与对照组相比, ** $P < 0.01$ 。

图 9 不同质粒浓度电穿孔转染 TRIB3 过表达质粒对目的基因 TRIB3 蛋白表达的影响

Note. ** $P < 0.01$ vs Control group.

Figure 9 Changes of TRIB3 protein expression in RAW264. 7 treated with gradient plasmid concentration



注:与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与对应的 10 nmol/L 组相比, ## $P < 0.01$ 。

图 10 以最佳电转条件转染不同浓度 TRIB3 siRNA 对 TRIB3 蛋白表达的影响

Note. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Control group; ## $P < 0.01$ vs 10 nmol/L group.

Figure 10 Changes of TRIB3 protein expression in RAW264. 7 treated with TRIB3 siRNA

冲时长 20 ms、质粒浓度每样本 4 μg 是比较理想的 RAW264. 7 细胞中电穿孔转染 TRIB3 过表达质粒的转染条件。

为进一步验证这一脉冲电压和脉冲时长条件是否适用于在 RAW264. 7 细胞中转染 siRNA,本研究又以这一条件转染 TRIB3 siRNA,浓度为 10 nmol/L 时,细胞获得较高存活率的情况下,TRIB3 蛋白表达水平仅为对照组的 0.19 倍,显著下调目的基因蛋白表达,说明 120 mV、20 ms 的电穿孔条件同样适用于在 RAW264. 7 细胞中转染 TRIB3 siRNA。另外,实验中发现质粒或 siRNA 的转染浓度与目的蛋白表达间均未成线性关系,我们分析可能是由于质粒和 siRNA 浓度对转染效率的影响存在一定的阈值,过高或过低均有可能影响转染效果。本研究实验过程中还发现电穿孔转染操作中应密切关注电阻情况,一般在 150 ~ 250 Ω 之间较为合适,若电阻持续过低则应减少细胞悬液体积或更换电极杯,

若电阻过大则应适当增加细胞悬液体积。

综上所述,本研究通过优化脉冲电压、脉冲时长和质粒浓度,以 120 mV、20 ms 条件在 RAW264. 7 细胞中电穿孔转染 TRIB3 过表达质粒(每样本 4 μg)和 TRIB3 siRNA(10 nmol/L),在保证较高的细胞存活率的同时能显著改变目的基因的蛋白表达水平,为后续 RAW264. 7 细胞中质粒转染相关的基础研究提供实验依据和借鉴。

参 考 文 献 (References)

[1] Chan WT, Verma CS, Lane DP, et al. A comparison and optimization of methods and factors affecting the transformation of Escherichia coli [J]. Biosci Rep, 2013, 33(6):32-39.

[2] 卢莎, 谭文杰, 张玲, 等. 脂质体转染法与电转染法在丙型肝炎病毒 RNA 转染人肝癌细胞中的应用效果比较 [J]. 山东医药, 2016, 56(19): 15-18.

Lu S, Tan WJ, Zhang L, et al. Application effects of electroporation and lipofection in HCV RNA transfecting human hepatoma cells [J]. Shandong Med J, 2016, 56(19): 15-18.

- [3] 张放,周载鑫,张丹丹,等. 电穿孔法转染人原代成纤维细胞条件的优化 [J]. 第二军医大学学报, 2017, 38(10): 1311-1314.
- Zhang F, Zhou ZX, Zhang DD, et al. Optimization of transfection conditions of human primary fibroblasts by electroporation [J]. Acad J Sec MilMed Univ, 2017, 38(10): 1311-1314.
- [4] Xu Y, Lu Y, Xing W. An individually addressable suspended-drop electroporation system for high-throughput cell transfection [J]. Lab Chip, 2014, 14(4): 686-690.
- [5] Faurie C, Rebersek M, Golzio M, et al. Electro-mediated gene transfer and expression are controlled by the life-time of DNA/membrane complex formation [J]. J Gene Med, 2010, 12(1): 117-125.
- [6] Xiao L, Wu Z, Zhang J, et al. Synthesis, photothermal effect and cytotoxicity of Fe₃O₄@ Au nanocomposites [J]. J Nanosci Nanotechnol, 2019, 19(5): 2467-2473.
- [7] Liu Y, Xia X, Xu L, et al. Design of hybrid β -hairpin peptides with enhanced cell specificity and potent anti-inflammatory activity [J]. Biomaterials, 2013, 34(1): 237-250.
- [8] 姜文清,戚艳,沙若荷,等. PTEN 在多烯磷脂酰胆碱下调 LPS 诱导巨噬细胞炎症反应中的抑制作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(8): 44-49.
- Jiang WQ, Qi Y, Sha RH, et al. Inhibitory effect of PTEN on polyene phosphatidylcholine in downregulating LPS-induced macrophage inflammatory response [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(8): 44-49.
- [9] 仰明明,牛婷,刘擎,等. MMP12 缺失引起小鼠血液和白色脂肪中巨噬细胞的变化 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(3): 14-20.
- Yang MM, Niu T, Liu Q, et al. Matrix metalloproteinase-12 knockout regulates macrophages in the blood and white fat in mice [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(3): 14-20.
- [10] Cheng YW, Cheah KP, Lin CW, et al. Myrrh mediates haem oxygenase-1 expression to suppress the lipopolysaccharide-induced inflammatory response in RAW264.7 macrophages [J]. J Pharm Pharmacol, 2011, 63(9): 1211-1218.
- [11] 方瑶,毛旭虎. 小鼠巨噬细胞 RAW264.7 的培养技巧及经验总结 [J]. 现代生物医学进展, 2012, 12(22): 4358-4359.
- Fang Y, Mao XH. Culture skill and experience of RAW264.7 [J]. Prog Mod Biomed, 2012, 12(22): 4358-4359.
- [12] Ghatak S, Morgner J, Wickström SA. ILK: a pseudokinase with a unique function in the integrin-actin linkage [J]. Biochem Soc Trans, 2013, 41(4): 995-1001.
- [13] Silvennoinen O, Ungureanu D, Niranjani Y, et al. New insights into the structure and function of the pseudokinase domain in JAK2 [J]. Biochem Soc Trans, 2013, 41(4): 1002-1007.
- [14] Guo L, Guo ZX, Gong HP, et al. Tribbles homolog 3 is induced by high glucose and associated with apoptosis in human endothelial cells [J]. Mol Med Rep, 2015, 12(2): 1963-1970.
- [15] Liu J, Zhang W, Chuang GC, et al. Role of TRIB3 in regulation of insulin sensitivity and nutrient metabolism during short-term fasting and nutrient excess [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2012, 303(7): E908-E916.
- [16] 周冰冰,李玉洁,李琦,等. 参莲提取物对 M1 巨噬细胞的影响 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(11): 2086-2090.
- Zhou BB, Li YJ, Li Q, et al. Effect on M1 macrophage of Shenlian extracts [J]. Chin J Chin Mat Med, 2014, 39(11): 2086-2090.
- [17] 李红蓉,常丽萍,秘红英,等. 巨噬细胞对上皮细胞凋亡的影响及通心络的干预作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(13): 121-127.
- Li HR, Chang LP, Mi HY, et al. Effect of macrophages on apoptosis of endothelial cells and intervening effect of tongxinluo [J]. Chin J Exp Trad Med Form, 2017, 23(13): 121-127.
- [18] Wei Z, Zhao D, Li X, et al. A laminar flow electroporation system for efficient DNA and siRNA delivery [J]. Anal Chem, 2011, 83(15): 5881-5887.
- [19] Chang CC, Wu M, Yuan F. Role of specific endocytic pathways in electrotransfection of cells [J]. Mol Ther Methods Clin Dev, 2014, 17(1): 140-158.
- [20] Canatella PJ, Karr JF, Petros JA, et al. Quantitative study of electroporation-mediated molecular uptake and cell viability [J]. Biophys J, 2001, 80(2): 755-764.
- [21] Ekici Y, Tezcaner T, Aydın HO, et al. Arterial complication of irreversible electroporation procedure for locally advanced pancreatic cancer [J]. World J Gastrointest Oncol, 2016, 8(10): 751-756.
- [22] Bobick BE, Alexander PG, Tuan RS. High efficiency transfection of embryonic limb mesenchyme with plasmid DNA using square wave pulse electroporation and sucrose buffer [J]. Biotechniques, 2014, 56(2): 85-89.

[收稿日期] 2019-09-09