

研究生实验教学中细胞转染技术结合斑点免疫印迹技术的实验探索

黄凌云, 张健翔, 刘进, 窦非, 张晓嫣*

北京师范大学生命科学学院, 细胞增殖及调控生物学教育部重点实验室, 北京

收稿日期: 2023年12月21日; 录用日期: 2024年1月18日; 发布日期: 2024年1月26日

摘要

在研究生组织及细胞培养实验教学中, 细胞转染技术是一个重要的组成部分, 以往实验方案使用携带荧光蛋白GFP基因的质粒转染细胞后, 可使用荧光显微镜进行观察定性分析转染是否成功并粗略计算转染效率, 但对于没有荧光标记的细胞转染结果分析检测方法在教学上尚有欠缺。本实验针对这个问题, 在检测方法中加入斑点免疫印迹技术, 并对实验方案及分析方法进行了探索, 以便于学生掌握更全面的细胞生物学分析技术。

关键词

转染, 荧光显微成像, 斑点免疫印迹

The Experimental Design of Cell Transfection Combined with Dot Immunoblotting for Experiment Teaching of Graduate Students

Lingyun Huang, Jianxiang Zhang, Jin Liu, Fei Dou, Xiaoyan Zhang*

Key Laboratory for Cell Proliferation and Regulation Biology of Ministry of Education, College of Life Sciences, Beijing Normal University, Beijing

Received: Dec. 21st, 2023; accepted: Jan. 18th, 2024; published: Jan. 26th, 2024

*通讯作者。

文章引用: 黄凌云, 张健翔, 刘进, 窦非, 张晓嫣. 研究生实验教学中细胞转染技术结合斑点免疫印迹技术的实验探索[J]. 教育进展, 2024, 14(1): 800-805. DOI: 10.12677/ae.2024.141125

Abstract

In the experimental teaching of tissue and cell culture for graduate students, cell transfection technology is an important component. In previous experimental schemes, plasmids carrying fluorescent protein GFP genes were used to transfect cells. Fluorescence microscopy can be used to observe the results of transfection and roughly calculate transfection efficiency. However, there is still a lack of methods for analyzing and detecting transfection results of cells without fluorescent markers. This experiment aims to address this issue by incorporating dot immunoblotting technology into the detection method, and exploring the experimental protocol and analysis methods to help students to handle more comprehensive cell biology techniques.

Keywords

Transfection, Fluorescence Microscopy, Dot Immunoblotting

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

细胞转染技术是采用除病毒感染外的方法,例如化学、生物学或物理方法将核酸(DNA 或 RNA)人工导入细胞的过程。导入的外源性核酸在细胞内或生成重组蛋白,或特异性地提升或抑制某个基因表达,从而用于细胞中基因或蛋白功能的研究。转染技术是一种功能强大的细胞生物学分析技术,可用于基因或基因产物的功能和调控研究,用于生成转基因生物,并用作基因治疗方法。在研究生组织及细胞培养实验教学中,细胞转染技术是一个重要的组成部分,以往实验方案使用携带荧光蛋白 GFP 基因的质粒转染细胞后,使用荧光显微镜进行观察,通过对细胞中绿色荧光蛋白表达情况,可以定性分析转染是否成功。对表达绿色荧光蛋白的细胞及细胞总数计数,可以粗略计算转染效率,但对于质粒所表达的蛋白携带其他标签而没有融合荧光蛋白时,质粒转染细胞后的分析检测方法在教学上尚有欠缺。

本实验针对这个问题,在检测方法中加入了斑点免疫印迹技术。斑点免疫印迹杂交(Dot blot, DB)是指将被检标本点到膜上干燥固定后直接进行抗原抗体杂交的蛋白质印迹检测方法,是经常会被人们忽略掉的一种优良实验技术。与聚丙烯酰胺凝胶电泳后进行酶联免疫印迹检测的传统方法相比,这种方法操作简单,耗时很短,而且一张膜上可同时检测多个样品,非常适应于高通量样本中某特定蛋白半定量检测和教学实验。本文对实验方案及分析方法进行了探索,以帮助学生掌握更全面的细胞生物学分析技术。

2. 材料、仪器与试剂

2.1. 材料

HEK-293T 细胞和 EGFP-C3 质粒均由北京师范大学窦非教授实验室惠赠。

2.2. 仪器

CO₂ 培养箱(SANYO, MCO-15AC); 生物安全柜(Thermo, 1300-A2); 水浴锅(华利达, HS-2); 冰箱(上菱, BCD-183D); 倒置荧光显微镜(Zeiss, Observer-Z1); 低温离心机(Eppendorf, 5424-R); 细胞计数仪

(Thermo, CountessII-FL); 迷你离心机(Baygene, QSpin); 漩涡振荡器(SCI-Logiex, MX-S); 水平摇床(其林贝尔, TS-2000A); 超声细胞破碎仪(上海沪析, JY96-II/N); 恒温箱(上海精宏, DNP-9082); 酶标仪(BMG, POLARstar-Omega); 化学发光成像仪(Tanon, 5200); 微量移液器(Gilson, 2 μ L; 10 μ L; 100 μ L; 1000 μ L); 电动助吸器(Eppendorf, Easypet-3)等。

2.3. 耗材

枪头(Axygen, T-1000-B/200-Y/10-W-R-S); 1.5 mL 离心管(Axygen, MCT-150-C); 50 mL 离心管(Crystalgen, 23-2262); 移液管(Costar, 4487; 4489); 10 cm 培养皿(Corning, 430166); 6 孔板(Corning, 3516); 96 孔板(Corning, 3599); 硝酸纤维素膜(BBI, 0.22 μ m, F619511)等。

2.4. 试剂

DMEM (Gibco, 10566016); 胎牛血清(FBS, AusSeneX, FBSSA500-S); TrypLE (Gibco, 12604021); TurboFect 转染试剂(Thermo, R0531); PBS (Gibco, 10010031); RIPA (Pplygen, C1053); BCA 蛋白定量试剂盒(Thermo, 23227); 脱脂奶粉(BD, 232100); TBST 洗液(Sangon, C520009), 小鼠抗 TUBB1 单克隆抗体(BBI, D198906-0100), 小鼠抗 GFP 单克隆抗体(BBI, D190750), HRP 标记兔抗小鼠 IgG (BBI, D110098), HRP 化学发光底物(Millipore, WBKLS0500), 蛋白酶抑制剂(Roche, 04693132001)等。

3. 方法

3.1. HEK-293T 细胞的培养与传代

在 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 的条件下, 用 10~12 mL 含 10% FBS 的 DMEM 培养基培养 HEK-293T 细胞于 10 cm 培养皿中, 每 3 天传代 1 次。传代需先 37 $^{\circ}$ C 预热全部试剂, 弃去全部培养基, 加入 2 mL TrypLE 消化细胞 30~60 s, 弃去 TrypLE 并用 2 mL DMEM 重悬细胞, 弃去 1.7 mL 细胞悬液后补加 10~12 mL 含 10% FBS 的 DMEM 培养基, 十字铺匀后继续培养。

3.2. EGFP-C3 质粒转染与荧光显微观察

如 3.1 中方法制备细胞悬液并计数, 之后稀释至 10 万/mL, 每孔 2 mL 接种至 6 孔板, 十字铺匀后静置 15~20 min 使细胞沉降, 后平稳转移至 CO₂ 培养箱中培养至汇合度 40%~50%。6 孔板中第一排为对照组, 第二排为实验组。在 1.5 mL 离心管中加入 1.2 mL 无血清的 DMEM 和 4 μ g EGFP-C3 质粒, 颠倒混匀。加入 6 μ L TurboFect, 即刻颠倒混匀, 室温静置孵育 15 min。对照组在等量 DMEM 中加等量无质粒溶剂, 其余操作完全相同。向每个孔中加入孵育后的混合物 400 μ L, 十字铺匀后平稳转移至 CO₂ 培养箱中, 培养 4 h 后换液。继续培养 32 h 后于倒置荧光显微镜 AF-488 荧光通道下观察并拍照。

3.3. 细胞裂解液的制备与蛋白浓度定量分析

弃去全部培养基, 每孔用 2 mL PBS 轻柔洗涤 2 次。吸干洗涤液, 加 0.5 mL PBS, 稍用力吹打悬浮贴壁细胞, 并将全部细胞悬液转移至 1.5 mL 离心管中, 冰上静置 15~20 min 使细胞沉降。取 1 片蛋白酶抑制剂(PI), 加 1 mL ddH₂O 漩涡震荡至充分溶解, 制备 50*PI 储液并按照比例添加到 RIPA 裂解液中。在 4 $^{\circ}$ C 下 500 g 离心 8~10 min 收集细胞, 吸净全部上清。向细胞中快速打入 250 μ L 含 1*PI 的 RIPA, 立刻吹打 15~20 次使细胞完全分散, 冰上裂解 30 min。13,000 g 离心 15 min, 取 200 μ L 上清并转移至一个新的 1.5 mL 离心管。取 5 μ L 裂解液, 用含 1*PI 的 RIPA 稀释 10 倍后, 依照 BCA 试剂盒说明书方法进行蛋白定量。

3.4. 斑点印记免疫杂交检测

将细胞裂解液点在硝酸纤维素膜上, 每次点 10 μg 总蛋白, 每个点复点 2 次, 室温下充分风干 1 h 后用含有 10% 脱脂奶粉的 TBST 室温慢摇封闭 1 h。弃去封闭液, 加 5 mL 用含有 5% 脱脂奶粉的 TBST 稀释 1000 倍的一抗(Anti-EGFP/TUBB1), 4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜。弃去一抗, 用 10 mL TBST 洗涤 4 次, 每次 10 min。加入 5 mL 用含有 1% 脱脂奶粉的 TBST 稀释 5000 倍的二抗(HRP 标记兔抗小鼠 IgG), 室温孵育 1 h。弃去二抗, 用 10 mL TBST 洗涤 4 次, 每次 10 min。将 HRP 化学发光底物的 A、B 液 1:1 混合, 均匀淋在膜上, 室温孵育 2~3 min 后置于化学发光成像仪下曝光并观察。EGFP 印迹曝光时间 10 min, TUBB1 印迹曝光时间 30 s。

3.5. 图像处理与数据统计

图片的灰度和荧光强度通过 Image-J 程序(NIH)计算获得。条形图和曲线图使用 GraphPad Prism 6 或微软 Excel 获得。组间差异分析方法为单因素方差分析, 图示中的“*”表示 $P < 0.05$, “**”表示 $P < 0.01$, “***”表示 $P < 0.001$, “n/s”表示 $P > 0.05$ 。误差线代表样本 S.D.用于支持本文结果的数据可在读者的合理要求下获得。

4. 结果

4.1. EGFP-C3 转染 HEK-293T 细胞的荧光显微成像分析

如图 1(a)所示, 转染 36 h 后可以观察到细胞发出明显的绿色荧光。相同条件下, 对照组细胞观察不到显著的荧光信号, 表明细胞株本身几乎不合成绿色荧光物质, 实验观察到的荧光信号是外源基因表达的结果。进一步使用 Image-J 程序分析各组细胞图像荧光信号强度, 并进行统计学检验后发现: 实验组细胞荧光信号显著高于对照组, $P < 0.001$, 如图 1(b)所示。该结果从定性和定量两个角度说明 TurboFect 转染试剂转染 EGFP-C3 质粒后, HEK-293T 细胞有良好的转染效果。

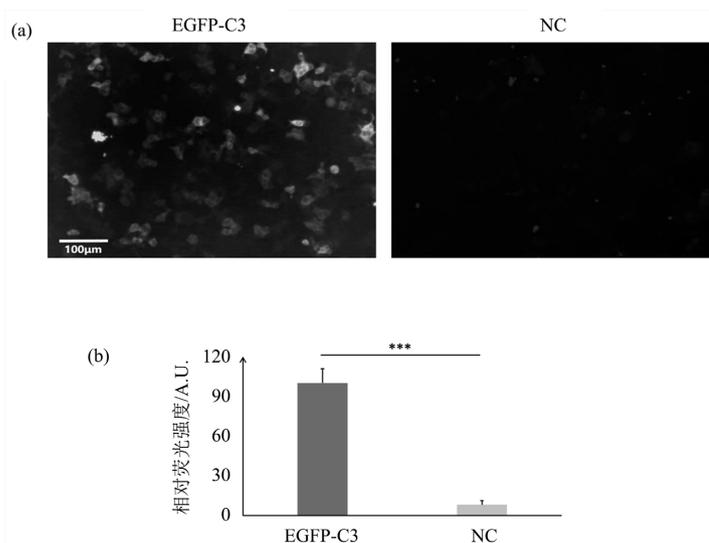


Figure 1. HEK-293T cells emitted green fluorescence after transfection with EGFP-C3 plasmid. (a) Compared with negative control, HEK-293T cells after transfection with EGFP-C3 plasmid emitted green fluorescence, and the fluorescence was mainly localized in the cytoplasm; (b) Compared with negative control, the relative fluorescence intensity observed after transfection of EGFP-C3 plasmid was significantly increased ($P = 0.0003$)

图 1. 转染 EGFP-C3 质粒后 HEK-293T 细胞发出绿色荧光。(a) 与对照相比, 转染 EGFP-C3 质粒后 HEK-293T 细胞放出绿色荧光, 且荧光主要定位于细胞质; (b) 与对照相比, 转染 EGFP-C3 质粒后视野中的相对荧光强度显著增大 ($P = 0.0003$)

4.2. EGFP-C3 转染不影响 HEK-293T 细胞裂解液蛋白浓度

为定量比较各组细胞裂解液样本中转染蛋白表达量, 需要总蛋白加样量一致, 因此使用 BCA 蛋白定量试剂盒对样品蛋白浓度进行了测定。测试过程中, 需要绘制标准曲线, 结果显示, 本次实验样本蛋白浓度(Y, $\mu\text{g/mL}$)与样本吸光度(X, OD)线性回归拟合后的关系式为 $Y = 892.22X$, 线性回归系数 $R^2 > 0.999$, 如图 2(a)所示, 可以判定本次总蛋白定量的结果准确可信。与对照组相比, 实验组细胞裂解液总蛋白水平无显著性差异, $P > 0.05$, 如图 2(b)所示。该定量结果说明, 在实验条件下, EGFP-C3 质粒转染对 HEK-293T 细胞的蛋白合成能力无明显影响, 该实验方法不影响对后续酶联斑点免疫印迹实验结果的判读。

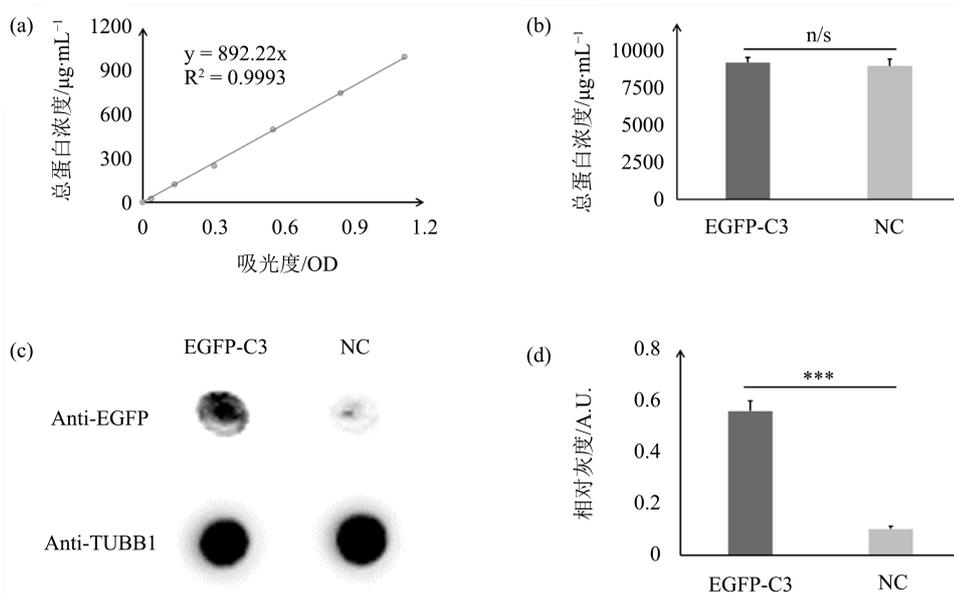


Figure 2. HEK-293T cells expressed EGFP protein after transfection with EGFP-C3 plasmid. (a) Standard curve for protein quantification by BCA method. (b) There was no significant difference in protein concentration between the experimental and the control samples ($P = 0.6219$). (c) Cell lysates DB analysis of the experimental and control samples. (d) Compared with the control samples, the chemiluminescence signal of EGFP was significantly enhanced after transfection of EGFP-C3 plasmid ($P = 0.0001$)

图 2. 转染 EGFP-C3 质粒后 HEK-293T 细胞表达 EGFP 蛋白。(a) BCA 法蛋白定量标准曲线。(b) 实验组与对照组细胞裂解液蛋白浓度无显著差异($P = 0.6219$)。(c) 实验组和对照组细胞裂解液的 DB 分析。(d) 与对照相比, 转染 EGFP-C3 质粒后 EGFP 相对 TUBB1 的化学发光信号显著增强($P = 0.0001$)

4.3. 斑点免疫印迹实验结果

图 2(c)结果表明, 转染 EGFP-C3 质粒后, HEK-293T 细胞裂解液中出现了较强的 EGFP 抗原抗体杂交信号。对照组中虽然也检测到了微弱的杂交信号, 但其强度显著低于实验组, 且在先前的实验中, 未观察到对照组细胞发出明显的绿色荧光, 推测该杂交信号的出现可能与实验中所用的 EGFP 抗体与细胞裂解液中某些蛋白发生非特异性结合有关。以 TUBb1 斑点的灰度作为内参对所有样本 EGFP 信号强度进行均一化后, 统计组间差异显著性, 结果如图 2(d)所示。实验中, 实验组 EGFP 信号灰度显著高于对照组, $P < 0.001$, 说明 GFP-C3 转染后的 HEK-293T 细胞成功表达 EGFP 蛋白。

5. 讨论

实验细胞选用 HEK-293T 细胞, 此细胞株细胞持续表达 SV40 抗原, 具有较好的外源质粒摄取能力

和外源基因的表达能力, 常用于转染实验, 转染效率较高[1]。Thermo Scientific TurboFect 转染试剂是一种高效、易于使用的非免疫原性转染试剂, 用于将 DNA 质粒和表达载体送入真核细胞中。特点是针对多种细胞类型有高转染效率, 大多数细胞系不需要优化, 较低的细胞毒性, 即用型——无需复溶、稀释或处理, 因此比较适合在实验教学中使用并得到较好的结果[2]。在本实验中, 借助 TurboFect 转染试剂用 EGFP-C3 质粒转染 HEK-293T 细胞得到了很好的转染效率。

总蛋白的加样量是蛋白免疫印迹实验中需要被控制的重要变量, 对后续定量分析影响很大, 因此实验中我们使用 BCA 蛋白定量试剂盒对样品进行检测, 确认该方法在实验中测得数据可信, 保证后续的定量分析可行。BCA 蛋白定量是通过比色检测进行总蛋白质定量的常用方法。相比基于考马斯染料的定量方法(Bradford 法定量), Pierce BCA 蛋白定量试剂具有独特的优势, 因为它们可以兼容含有多达 5% 表面活性剂(去垢剂)的蛋白样品, 并且受蛋白组成差异的影响小得多, 从而具有更高的蛋白间均一性[3]。BCA 蛋白定量实验也验证了 EGFP-C3 质粒转染对 HEK-293T 细胞的蛋白合成能力无明显影响, 该实验方法不影响对后续酶联斑点免疫印迹实验结果的判读。

由于实验条件的影响, 样品中蛋白质总量可能会存在差异, 因此需要使用内参蛋白消除实验条件等因素的影响, 准确地比较不同样品中待检测蛋白的含量变化。微管蛋白 TUB [4]是细胞重要的内参蛋白, 主要参与细胞骨架的构建, 常被用作细胞总蛋白或胞质蛋白相对定量过程中的内参。我们的实验证明, 选用 TUBb1 作内参, 可以在分子水平上半定量地说明转染 EGFP-C3 质粒后, HEK-293T 细胞中蛋白表达情况变化。

综上, 经过实验摸索, 我们设计了可以用于研究生实验课教学的, 细胞转染及后续蛋白表达检测实验, 通过实验学生可以得到稳定可靠的实验结果, 从而掌握相关实验技术以及分析方法。

参考文献

- [1] Lin, Y.C., Boone, M., Meuris, L., *et al.* (2014) Genome Dynamics of the Human Embryonic Kidney 293 Lineage in Response to Cell Biology Manipulations. *Nature Communications*, **5**, Article Number 4767. <https://doi.org/10.1038/ncomms5767>
- [2] Thermo Scientific TurboFect 转染试剂使用说明[EB/OL]. https://www.thermofisher.cn/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.cn/TFS-Assets%2FMSG%2Fmanuals%2FMAN0013147_TurboFect_Transfection_Reagent_UG.pdf, 2020-03-10.
- [3] Pierce BCA 蛋白定量试剂使用说明书[EB/OL]. https://www.thermofisher.cn/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.cn/TFS-Assets%2FMSG%2Fmanuals%2FMAN0011430_Pierce_BCA_Protein_Asy_UG.pdf, 2020-03-10.
- [4] Leandro-García, L.J., *et al.* (2010) Tumoral and Tissue-Specific Expression of the Major Human Beta-Tubulin Iso-types. *Cytoskeleton*, **67**, 214-223. <https://doi.org/10.1002/cm.20436>