

免疫细胞转染方案

利用Invitrogen Neon转染系统实现免疫细胞研究

简介

血细胞的基因操纵是了解并开发各种疾病治疗方法的关键，如白血病、实体瘤和HIV感染。癌症和传染病的免疫治疗方面的最新进展以及诸如基因组编辑等技术的进步使血细胞实验受到了越来越多的关注。但是，探索的道路并非是一帆风顺的。尽管越来越多的研究人员寻求突破，但将分子导入这些细胞的难度仍然是该领域快速发展的障碍[1]。

造血细胞和循环血液细胞的转染一般较为困难、耗时且昂贵[1,2]。T淋巴细胞因为存在治疗前景尤其受到关注，但利用标准试剂方法很难导入DNA和RNA；慢病毒转染是目前最常用的将核酸导入T细胞的方法[3-7]。尽管现在已经开发

出了更高效的慢病毒技术，但关于人类治疗使用的安全性问题尚未完全解决。研究人员正在探索其他物理导入方法，如电穿孔[8-11]。

Invitrogen™ Neon™转染系统可将DNA、RNA和蛋白质导入细胞内，同时避免了试剂和病毒方法存在的问题。通过使用Neon系统优化电穿孔条件和细胞密度，我们可以在各种血液细胞系及原代T细胞中获得超过80%的转染效率(图1)。我们还能使用Neon系统在多种血液细胞系中进行CRISPR-Cas9系统进行基因组改造，在原代人T细胞中获得超过90%的基因组剪切效率。

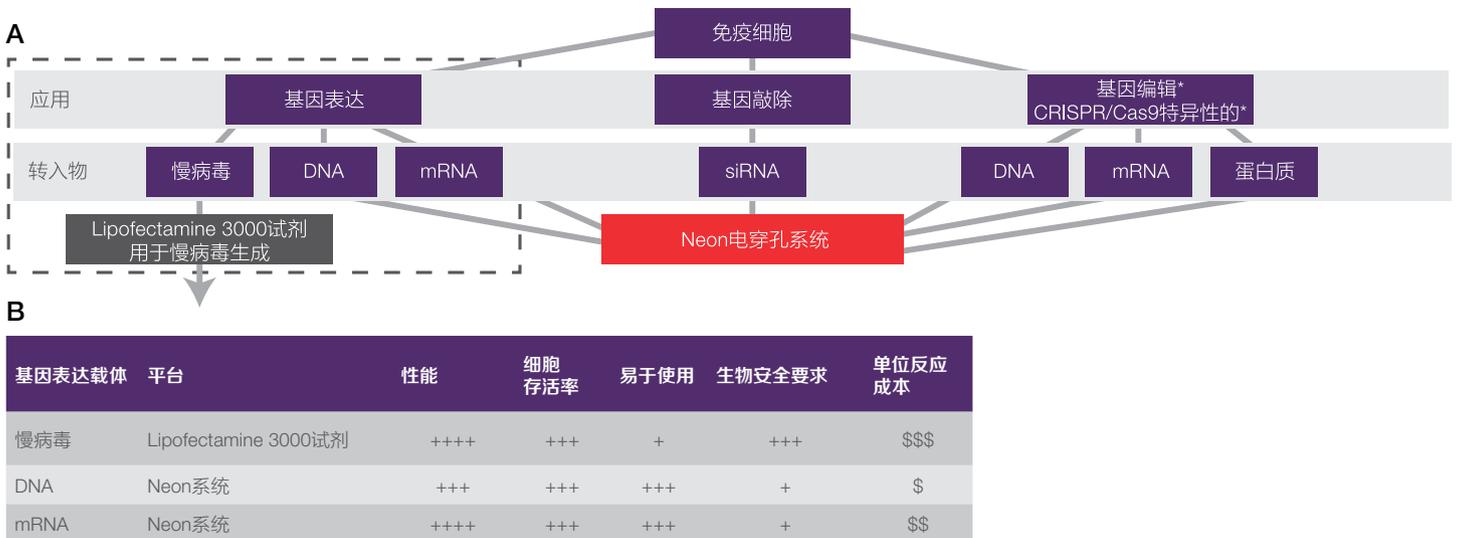


图1. Neon转染系统的应用。(A)免疫细胞基因操纵实验的决策图。*使用的细胞模型：原代T细胞、CD34+、Jurkat、K562、NK-92、Raji、SC-1和THP-1。(B)可选的基因表达载体导入方法以及影响实验的不同因素。

Neon转染系统

Neon转染系统简化了电穿孔过程，可提高转染效率，缩短操作时间。Neon系统的吸头采用了创新设计，将样本置于更均匀的电场中，pH值变化很小，减少了离子形成和热量产生，相比标准的比色皿型电穿孔系统具有更高的转染效率和细胞存活率。



Neon转染系统具有以下特点：

- **体积小** — 台式设计，可放入组织培养通风橱内
- **灵活** — 可容纳 1×10^4 至 5×10^6 个细胞/反应，样本体积为 10 μ L 或 100 μ L
- **使用简便** — 触摸屏用户界面，便于设定各项电穿孔参数
- **可定制** — 预设的 24 孔优化实验方案，可采用其他实验方案的开放式平台
- **可成熟应用于免疫细胞** — 可在原代 T 细胞和免疫细胞系中获得较高的 DNA 和 RNA 导入效率

表1. 采用Neon转染系统的DNA导入结果。

电穿孔参数(10 μ L 吸头)			
细胞系	细胞数量	转染效率	24孔优化实验方案(程序#)
原代T细胞	2×10^5	84%	1,600 V/10 ms/3个脉冲(#24)
Jurkat	2×10^5	86%	1,700 V/20 ms/1个脉冲(#5)
NK-92	2×10^5	52%	1,300 V/10 ms/3个脉冲(#21)
KG-1	2×10^5	82%	1,700 V/20 ms/1个脉冲(#5)
THP-1	2×10^5	42%	1,600 V/10 ms/3个脉冲(#24)
SC-1	2×10^5	54%	1,700 V/20 ms/1个脉冲(#5)
SC	2×10^5	70%	1,700 V/20 ms/1个脉冲(#5)

采用Ficoll-Paque™ PLUS培养基和Invitrogen™ Dynabeads™ Untouched™ 人T细胞试剂盒来自健康供体的LeukoPak™ 血液制品中分离人原代T细胞。然后使用含有2%人血清的Gibco™ OpTmizer™ CTS™ T细胞扩增培养基培养细胞，并利用Gibco™ Dynabeads™ 人源T细胞扩增产品CD3/CD28活化。活化后3天在Neon系统上进行转染实验。各细胞系均遵照ATCC指南，采用Gibco™ 培养基、血清和生长因子维持。每10 μ L吸头制备 2×10^5 个细胞，使用缓冲液R (Neon转染系统试剂盒中的组分) 和1–1.5 μ g 编码GFP的DNA进行电穿孔。使用10 μ L Neon吸头进行24孔优化实验方案，将细胞分配至24孔板，每孔包含0.5 mL 预热的培养基。转染后24小时，使用Invitrogen™ Attune™ NxT 声波聚焦流式细胞仪分析细胞。

mRNA转染

在操作难以处理的细胞模型时，mRNA的独特特性使之比DNA更适用于转染(表1)。由于mRNA导入后无需入核，因此转染效率一般更高。其他优点包括mRNA转染是瞬时转染，蛋白表达的时间快于DNA。下列结果显示了将mRNA用于难以转染的免疫细胞模型的基因表达实验的优点(表2)。

表2. 采用Neon转染系统进行mRNA和DNA导入的比较。

电穿孔参数(10 μ L吸头)				
细胞系	细胞数量	mRNA转染效率	DNA转染效率	mRNA 24孔优化实验方案(程序#)
原代T细胞	2×10^5	96%	84%	1,600 V/10 ms/3个脉冲(#24)
Jurkat	2×10^5	95%	86%	1,400 V/20 ms/2个脉冲(#16)
NK-92	2×10^5	98%	52%	1,300 V/10 ms/3个脉冲(#21)
KG-1	2×10^5	95%	82%	1,600 V/20 ms/1个脉冲(#4)
THP-1	1.5×10^5	88%	42%	1,400 V/20 ms/2个脉冲(#16)
SC-1	2×10^5	78%	54%	1,700 V/20 ms/1个脉冲(#5)
SC	2×10^5	89%	70%	1,600 V/20 ms/1个脉冲(#4)
J774A.1	2×10^5	85%	ND	1,700 V/20 ms/1个脉冲(#5)

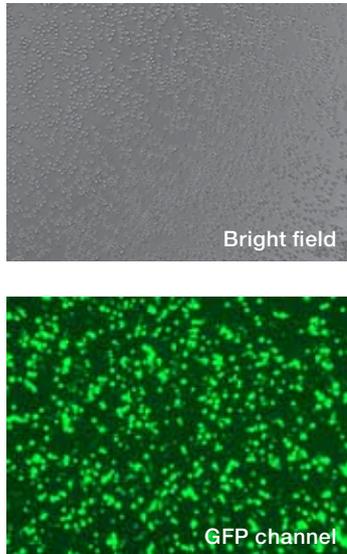
采用Ficoll-Paque PLUS培养基和Invitrogen Dynabeads Untouched人T细胞试剂盒来自健康供体的LeukoPak血液制品中分离人原代T细胞。然后使用含有2%人血清的OpTmizer CTS T细胞扩增培养基培养细胞，并利用Dynabeads人源T细胞扩增产品CD3/CD28活化。活化后3天在Neon系统上进行转染实验。各细胞系均遵照ATCC指南，采用Gibco培养基、血清和生长因子维持。每10 μ L吸头制备 $1.5-2.0 \times 10^5$ 个细胞，使用缓冲液R (Neon转染系统试剂盒中的组分)和1-1.5 μ g编码GFP的mRNA进行电穿孔。使用10 μ L Neon吸头进行24孔优化实验方案，将细胞分配至24孔板，每孔包含0.5 mL预热的培养基。转染后24小时，使用Attune NxT声波聚焦流式细胞仪分析细胞。ND =无法确定。

原代T细胞中的mRNA和DNA导入

转染原代T细胞的能力是进一步了解这些细胞及其功能的关键。优化的T细胞导入在临床研究的新领域中亦发挥了重要作用，如嵌合抗原受体T细胞(CAR-T)癌症治疗。采用Neon系统，输送mRNA和DNA至原代T细胞，转染效率分别超过90%和80% (图2)。

A

GFP DNA导入



B

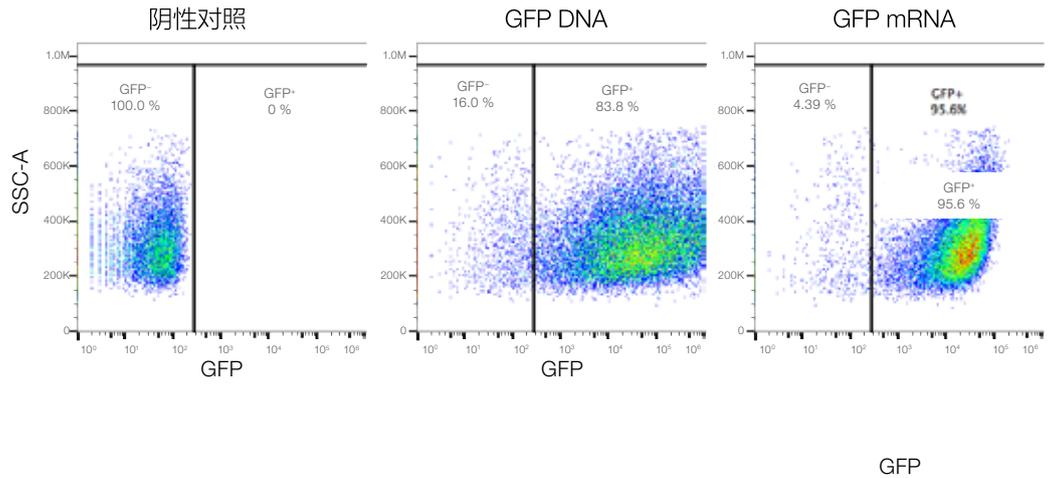


图2. 采用Neon转染系统进行电穿孔，转染人原代T细胞。使用Neon程序#24 (1,600 V/10 ms/3个脉冲)和使用缓冲液R，将GFP DNA或mRNA (1 μ g)导入至 2×10^6 个细胞/10 μ L吸头中。电穿孔后24小时，采用**(A)** Invitrogen™ EVOS™ 细胞成像系统和**(B)** Invitrogen™ Attune™ NxT 声波聚焦流式细胞仪分析细胞。

嵌合抗原受体T细胞(CAR-T)治疗主要是将癌症患者体内的T细胞转变为个性化的抗癌药物。CAR-T治疗包括分离和活化患者的T细胞，导入编码目的CAR的病毒、DNA或mRNA，并在体外进行细胞扩增。然后将表达CAR的细胞回输至患者体内进行治疗。CAR-T临床试验的阳性结果推动了更多新合作以及数十亿美元的投资，其相关研究正在以前所未有的速度发展。

利用Neon转染系统和Cas9/gRNA复合体在免疫细胞中进行基因组改造

近年来，利用电穿孔将Cas9蛋白和gRNA形成的核糖核蛋白(RNP)复合体导入CD4+ T细胞中，简化了原代人T淋巴细胞的基因组编辑，从而实现了HIV相关的CXCR4和PD-1基因的敲除和嵌入修饰[12]。CRISPR蛋白无需细胞转录和翻译，简化了细胞工程(图3)。利用电穿孔方法将Invitrogen™ GeneArt™ Platinum™ Cas9核酸酶和体外转录的gRNA转染至细胞内，可以获得较高的基因组剪切效率，如表3所示。

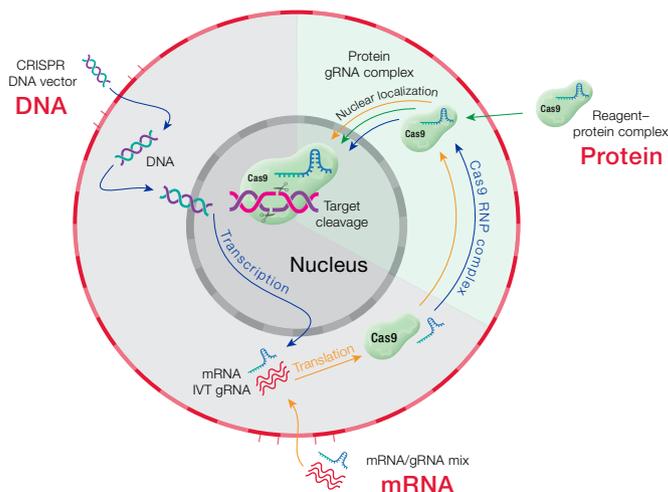


图3. CRISPR-Cas9系统的优点。

表3. 利用Neon转染系统可以获得更佳的Cas9/gRNA复合体导入结果。

电穿孔参数(10 μL吸头)				
细胞系	细胞数量	24孔优化实验方案 (程序#)	Cas9/gRNA	基因组 剪切效率**
原代T细胞	200 × 10 ³	1,600 V/10ms/3个脉冲(#24)	1,000 ng/240 ng	93% ± 1%
Jurkat	200 × 10 ³	1,700 V/20 ms/1个脉冲(#5)	1,500 ng/350 ng	94% ± 2%
K562	200 × 10 ³	1,400 V/10 ms/3个脉冲(#22)	1,000 ng/250 ng	91% ± 1%
THP-1	200 × 10 ³	1,600 V/10 ms/3个脉冲(#24)	1,000 ng/250 ng	31% ± 3%
SC-1	200 × 10 ³	950 V/30 ms/2个脉冲(#18)	1,000 ng/250 ng	44% ± 2%
Raji	200 × 10 ³	1,600 V/10 ms/3个脉冲(#24)	1,000 ng/250 ng	50% ± 5%
NK-92	200 × 10 ³	1,400 V/10 ms/3个脉冲(#22)	2,000 ng/500 ng	31% ± 5%
CD34**	200 × 10 ³	1,100 V/20 ms/2个脉冲(#13)	1,000 ng/250 ng	24% ± 6%

* CD34+人脐带血细胞[13]。

** 平均值和标准差是基于最佳的三种24孔优化实验方案计算出来的。

采用Ficoll-Paque PLUS培养基和Invitrogen Dynabeads Untouched人T细胞试剂盒来自健康供体的LeukoPak血液制品中分离人原代T细胞。然后使用含有2%人血清的OpTmizer CTS T细胞扩增培养基培养细胞，并利用Dynabeads人源T细胞扩增产品CD3/CD28活化。活化后3天在Neon系统上进行转染实验。各细胞系均遵照ATCC指南，采用培养基、血清和生长因子维持。在缓冲液R中制备密度为2.0 × 10⁶的细胞样品，使用标示量的靶向HPRT-1位点的Cas9/gRNA复合体进行电穿孔。使用10 μL Neon吸头和24孔优化实验方案，将细胞分配至24孔板，每孔包含0.5 mL预热的培养基。48小时后收集细胞，按照Invitrogen™ GeneArt™基因组剪切检测试剂盒说明制备细胞。然后按照试剂盒实验方案分析基因组剪切效率。

表4. 已发表文献中的剪切效率。

细胞系	靶位点	Neon实验方案	基因组剪切效率	参考文献
原代T细胞	CD45	1600 V/10 ms/3个脉冲(#24)	86% ± 2%	14
CD34 ⁺	CD45	1600 V/10 ms/3个脉冲(#24)	73% ± 16%	14
CD4 ⁺ T细胞	CXCR4	1600 V/10 ms/3个脉冲(#24)	55%	12

详细信息请参阅参考文献，包括有关细胞制备、培养条件、细胞数量的详情，以及各电穿孔实验所用的RNP量。

总结

找到将核酸和蛋白质导入血细胞的方法，拓展了科学家们对前沿科学领域的研究能力。本文中的数据证明，Neon系统可以高效转染各种血液细胞系和原代血细胞，同时提供了简单优化的电穿孔条件。采用Neon转染系统导入mRNA时，可以转染75–98%的细胞。此外，已发表文献中的数据显示，利用电穿孔方法导入DNA、RNA和蛋白质进行基因组编辑，可以在许多细胞系及原代T淋巴细胞中获得较高的基因组剪切效率。与慢病毒转染相比，Neon系统更简单、更快速且成本更低。对于原代T细胞，Neon系统与现有的导入方法相比，具有更高的有效性。对于所有类型的血细胞，强烈推荐使用Neon电转染系统替代常规的转染方法。

其他资源

请登录Neon网站了解实验方案、用户推荐及更多信息：

thermofisher.com/neon

请登录GeneArt Platinum Cas9核酸酶和Lipofectamine CRISPRMAX网站thermofisher.com/crisprprotein，了解有关Cas9基因组编辑的更多信息和结果

参考文献

References

1. Ebert O, Finke S, Salahi A et al. (1997) Lymphocyte apoptosis: induction by gene transfer techniques. *Gene Ther.* 4:296–302. doi:10.1038/sj.gt.3300394.
2. Brenner MK (2012) Will T-cell therapy for cancer ever be a standard of care? *Cancer Gene Ther.* 19:818–821. doi:10.1038/cgt.2012.74.
3. Bonini C, Ferrari G, Verzeletti S et al. (1997) HSV-TK gene transfer into donor lymphocytes for control of allogeneic graft-versus-leukemia. *Science* 276:1719–1724.
4. Di Stasi A, Tey SK, Dotti G et al. (2011) Inducible apoptosis as a safety switch for adoptive cell therapy. *N Engl J Med.* 365:1673–1683.
5. Pule MA, Savoldo B, Myers GD et al. (2008) Virus-specific T cells engineered to coexpress tumor-specific receptors: persistence and antitumor activity in individuals with neuroblastoma. *Nat Med.* 14:1264–1270. doi:10.1038/nm.1882.
6. Kalos M, Levine BL, Porter DL et al. (2011) T Cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia. *Science Translational Medicine* 3:95ra73. doi:10.1126/scitranslmed.3002842.
7. Porter DL, Levine BL, Kalos M et al. (2011) Chimeric antigen receptor–modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med.* 365: 725–733.
8. Apollonio F, Liberti M, Marracino P, Mir L (2012) Electroporation mechanism: review of molecular models based on computer simulation. 2012 6th European Conference on Antennas and Propagation (EUCAP), pp. 356–358. doi:10.1109/EuCAP.2012.6206719.
9. Kotnik T, Kramar P, Pucihar G et al. (2012) Cell membrane electroporation-Part 1: the phenomenon. *Electrical Insulation Magazine*, IEEE 28:14–23.
10. Murakami T, Sunada Y (2011) Plasmid DNA gene therapy by electroporation: principles and recent advances. *Curr Gene Ther.* 11:447–456.
11. Chicaybam L, Sodre AL, Curzio BA, Bonamino MH (2013) An efficient low cost method for gene transfer to T lymphocytes. *PLoS One* 8: e60298. doi:10.1371/journal.pone.006029.
12. Shumman K, Lin S, Boyer E et al. (2015) Generation of knock-in primary human T cells using Cas9 ribonucleoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA.* 112:10437–10442. doi: 10.1073/pnas.1512503112.
13. Liang X, Potter J, Kumar S et al. (2015) Rapid and highly efficient mammalian cell engineering via Cas9 protein transfection. *J Biotechnol.* 208:44–53. doi:10.1016/j.jbiotec.2015.04.024.
14. Gundry MC, Brunetti L et al. (2016) Highly Efficient Genome Editing of Murine and Human Hematopoietic Progenitor Cells by CRISPR/Cas9. *Cell Rep.* 17(5):1453–1461. doi:10.1016/j.celrep.2016.09.092.

如需了解更多信息，请登录 thermofisher.com/neon



赛默飞
官方微信



赛默飞
生命科学官方微信

免费服务电话：800 820 8982/400 820 8982
销售服务信箱：sales.china@thermofisher.com
技术咨询信箱：LifeScience-CNTS@thermofisher.com

ThermoFisher
SCIENTIFIC