

哺乳动物细胞基因电转移技术研究

杨建涛 王秀琴 吴 旻

(中国医学科学院肿瘤研究所,北京)

提 要

使用国产仪器对哺乳动物细胞基因电转移进行了研究,获得了 PxlTK 和 PSV 2Neo 等外源基因在哺乳动物细胞中的稳定表达;并研究了部份电学参数如电极电阻、电场强度等对基因转化频率的影响和基因电转移条件的优化。

基因转移在研究基因的结构、功能、调控、创造动植物新品种及基因治疗等领域中是一种不可缺少的手段。常用的几种基因转移技术各有其局限性:如磷酸钙沉淀法,主要限于几种鼠细胞系,对其它细胞尤其是人的细胞效果不佳;显微注射法,一次处理的细胞量太少;原生质体融合术,不易用于共转染。电脉冲介导的基因转移是近几年发展起来的一种很有前途的新技术。它的主要特点^[1-7]: 1. 可用于各种细胞,包括人、动植物和细菌细胞;2. 一次可处理大量细胞;3. 可用于共转染,转化频率较高;4. 操作简单,省力省时;5. 系物理性刺激,无残余物影响。因此,它综合了其它几种基因转移技术的优点,是目前体外基因转移最有希望的方法之一。

本实验使用国内自制仪器,以 PxlTK 基因和 PSV2Neo 基因为外源基因,以 MLTK⁻细胞、NIH/3T3 细胞为受体细胞,研究了在各种条件下基因的转入和表达及基因电转移的优化条件。

材 料 与 方 法

一、细胞及 DNA

细胞 MLTK⁻细胞,由中国预防医学科学院病毒所任贵方惠赠。培养方法见文献[8]。NIH/3T3 细胞,由 J. Cooper 惠赠,培养方法

见文献[9]。

DNA PxlTK 质粒,7.7kb, TK 基因 3.4 kb, BamHI 酶切,氨苄青霉素抗性 (Ap^r),由 T. F. Deuel 惠赠; PSV2Neo 质粒, 5.8 kb, Neo 基因 1.5kb, Ap^r, 由 H. Land 惠赠。质粒 DNA 的提取参照文献[10]。

二、电脉冲介导的基因转移

本实验使用的非电容放电的脉冲发生器,由实验者根据文献[1]提出物理参数,北京师范大学低能物理所制造。电极分两种: 1. 丝状电极,间距 0.15cm,长 1.5cm,电极丝直径约 0.02 cm; 2. 片状电极,间距 0.1cm,高 1cm,宽 2cm。

(一) 电学参数的测定

(1) 电极电阻的测定

$$R = \rho \frac{L}{A}$$

其中: R ——电阻,欧姆(Ω); A ——电极截面积, cm^2 ; L ——电极间距, cm ; ρ ——电阻率, $\Omega \cdot \text{cm}$ 。

a. 传导介质溶液电阻率的测定

$$\rho = \frac{1}{r}$$

r ——电导率,通过电导率仪测定。

b. 加入细胞后溶液电阻率的测定,根据

Maxwell 的修正方程^[11]

$$\rho = \rho_1 \frac{(1 - \phi)\rho_1 + (f + \phi)\left(\rho_2 + \frac{r_3}{a}\right)}{(1 + f\phi)\rho_1 + f(1 - \phi)\left(\rho_2 + \frac{r_3}{a}\right)}$$

其中： ρ ——细胞溶液电阻率； ρ_1 ——传导介质电阻率； ρ_2 ——细胞质电阻率； r_3 ——单位面积膜电阻， Ω/cm^2 ； a ——细胞半径； ϕ ——细胞体积占总体积之比值； f ——当细胞为圆形时，取 1.5。

根据 Cole 和 Curtis^[12] 的推算， ρ_2 取 100 Ω/cm ， r_3 取 1000 Ω/cm^2 ， a 取 0.001 cm，代入不同传导介质电阻率 ρ_1 ，则可计算出细胞溶液的电阻率 ρ_0 。

c. 电极电阻的测定

$R = \rho \frac{L}{A}$ 这里 ρ 已由 (b) 算出，不同电极的 $\frac{L}{A}$ 为一已知常数，因此 R 可求得。

(2) 电极两端输出电压的测定

将电极两端并联一示波器，测出两种电极在不同传导介质下的实际输出电压。

(二) 基因转移

取对数生长期细胞，胰酶消化后，制成 1000 万个/ml 的细胞悬液，以 9.5% 蔗糖 (SUC) 或磷酸缓冲液 PBS 为悬浮液，加入所需浓度的 DNA，冰中放置 10 分钟，将细胞-DNA 溶液置电极中，进行电击。电击后的细胞培养 1—2 天后换选择性培养液筛选。HAT 筛选用于 P_{x1}TK 转染的 MLTK⁻ 细胞，方法见文献[8]；G₄₁₈ 筛选用于 PSV2Neo 转染的 NIH/3T3 细胞，方法见文献[10]。

结果与讨论

一、有关电学参数的研究及转化条件的优化

基因电转移的物理参数包括电场强度，脉冲时间和脉冲个数等。其中电场强度是个很重要的参数。但文献上报道的这些参数均为实验

表 1 不同条件下的电极电阻

电极类型	传导介质	f	ρ_1	ρ_2	r_3	a	$\frac{L}{A}$	不加细胞		1000 万细胞/ml			5000 万细胞/ml		
								ρ	R	ϕ_1	ρ	R	ϕ_1	ρ	R
丝	蔗糖	1.5	4.3×10^8	10^2	10^3	10^{-3}	5	4.3×10^8	2.15×10^6	0.02	4.4×10^8	2.18×10^6	0.1	4.6×10^8	2.3×10^6
丝	PBS	1.5	1×10^2	10^2	10^3	10^{-3}	5	1×10^2	5×10^2	0.02	101	5.01×10^2	0.1	108	5.4×10^2
片	蔗糖	1.5	4.3×10^8	10^2	10^3	10^{-3}	0.05	4.3×10^8	2.15×10^4	0.02	4.4×10^8	2.18×10^4	0.1	4.6×10^8	2.3×10^4
片	PBS	1.5	1×10^2	10^2	10^3	10^{-3}	0.05	1×10^2	5	0.02	101	5.01	0.1	108	5.4

注：测定方法及各数字单位见“材料与方法”。

者在仪器上调定的电学指令，并非细胞电极两端的实际输出电压和细胞在该电压下所承受的脉冲时间，而且不同的仪器具有不同的物理性能，使得这些参数的不确定性大大增加，参考价值减小。因此了解仪器显示的电学参数和电极两端实际输出电压和细胞所承受的脉冲时间之间的关系，对于使基因电转移技术理论化程序化有很大意义。为此我们首先测定并计算了三种因素即电极类型、传导介质及细胞数目对电极电阻的影响，如表 1 所示。从表 1 看出不同性

质的传导介质对电极电阻的影响最大，PBS 的电阻率与 9.5% SUC 的电阻率之比约为 $1:4 \times 10^3$ ，其次为电极类型对电极电阻的影响， $\frac{L}{A_{丝}}$ 与 $\frac{L}{A_{片}}$ 相比为 1:100，而细胞数目对细胞溶液电阻率 ρ 及电阻 R 的影响甚小。因此使用丝状电极蔗糖介质 (丝_{SUC}) 可获最大电极电阻，约 $2.15 \times 10^6 \Omega/\text{cm}$ ，而使用片状电极 PBS 介质 (片_{PBS}) 仅获最小的电极电阻，约 $5 \Omega/\text{cm}$ 。

表 2 则显示了不同的电极电阻条件下，电

表 2 电极两端输出电压及输出波形与指示电压之关系

指示电压 (V)	输出电压 (V)				输出波形		
	片 _{PBS}	片 _{SUC}	丝 _{PBS}	丝 _{SUC}	片 _{SUC}	丝 _{PBS}	丝 _{SUC}
200	6	196	195	200	尖	方	方
400	6	370	370	395	尖	方	方
600	—	520	520	585	尖	方	方
800	—	640	660	780	尖	方	方
1000	—	680	700	960	尖	方	方

极两端的实际输出电压和输出波形与指示电压的关系。当使用丝_{SUC}时,输出电压值相等或稍低于指示电压;当换用丝_{PBS}或片_{SUC}时,随着指示电压的升高,输出电压值与指示电压值之差变大;而用片_{PBS}时,指示电压在 200V 左右,输出电压只有几伏。由此可见电极电阻可极大影响输出电压的值。输出波形的测定依据在指示电压下,输出电压升至最高所需的时间。使用丝_{SUC}时,需 3—5 μ s;使用丝_{PBS}需 15—20 μ s;使用片_{SUC}时,需较长时间,在指示电压为 1000V 时,输出电压上升至 700V 约需 80 μ s。(数据未显示。)因此,丝状电极输出电压波形为方波,片状电极输出电压波形为尖波。

基因电转移时,一方面细胞在高压脉冲的作用下,产生可逆性膜孔,从而使外源基因导入;另一方面必然有部份细胞损伤过重而死亡。图 1 是台盼蓝活染法计数测定的 MLTK⁻细胞

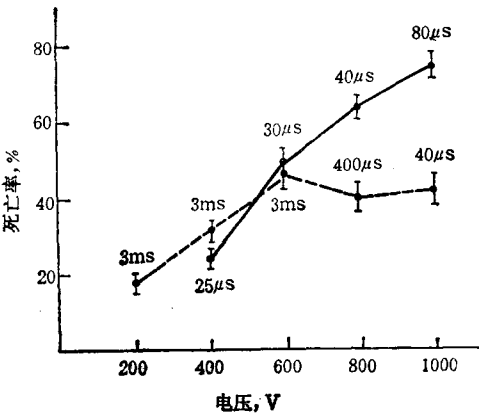


图 1 MLTK⁻ 细胞死亡率

所取电压基本上不发生细胞解体现象,故不影响计数 $n=3$

●--- 丝状电极蔗糖介质 ●——片状电极蔗糖介质

的死亡率。由图 1 可见,细胞死亡率在相同的时间不同的电压下(丝_{SUC} 从 200V—600V, 3ms),随电压的增高而增高,似呈线性关系;用片_{SUC}时细胞的死亡率明显高于用丝_{SUC}的,虽然用丝_{SUC}时脉冲时间长于用片_{SUC}时,且输出电压值(丝_{SUC} 800V—1000V)也高于片_{SUC}时(片_{SUC} 800V—1000V)。这种现象出现的原因可能是: 1. 片状电极是匀强电场,而丝状电极是非匀强电场,是否匀强电场对细胞损伤更大; 2. 片状电极产生尖波,丝状电极产生方波,是否因尖波更易损伤细胞。另外由图 1 可见,在丝_{SUC} 600V—1000V 的范围,低电压长时间和高电压短时间引起的细胞死亡率基本相同。

二、不同条件下的细胞转化频率

用丝_{SUC}时,可获得最大的电极电阻,最高的输出电压,方波以及较低的细胞死亡率,因此设想是较理想的实验条件。表 3 比较了各种

表 3 不同转化条件下的克隆形成率
(克隆数/ 2×10^5 细胞/ 0.8μ g DNA)

细胞类型	传导介质	片状 电极		丝状电极	
		400V 80 μ s	800V 80 μ s	400V10ms	800V1ms
MLTK ⁻	PBS	0	0	2 ± 1	4.3 ± 1.5
NIH/3T3	PBS	—	—	5.7 ± 1.2	12 ± 3.6
NIH/3T3	蔗糖	—	—	10 ± 2	20.3 ± 2.5

注: $n=3$ 。

条件下基因转移的克隆形成率。使用同一介质不同电极,MLTK⁻细胞经 PxlTK 转染的抗性克隆数在片_{PBS}时为 0,丝_{PBS} 400V 为 2, 800

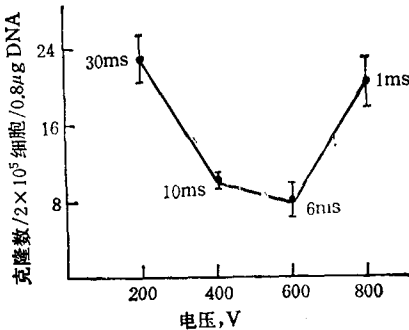


图 2 使用丝_{SUC}, NIH/3T3 细胞在不同电压及脉冲时间下的克隆形成率 ($n=3$)

V 为 4,提示由于片 PBS 电阻太小,甚至远远低于仪器内阻,致使输出电压太小,而转化结果为阴性。使用同一电极不同介质,NIH/3T3 细胞经 PSV2Neo 转染出现的抗性克隆数在丝 PBS 时低于在丝 SUC 时的克隆数。

根据国外的经验,哺乳动物细胞基因电转移需在较高的电场强度下(3800 V—8000 V/cm)进行。但通过前述细胞死亡率的测定,发现低电压长时间和高电压短时间可引起相同的细胞死亡率,因此设想低场强长时间或高场强短时间均能使转化成功。图 2 的实验证实了这种设想。NIH/3T3 细胞在 200V,30 ms 时经 PSV2Neo 转染出现的抗 G_{418} 克隆数是 23 个,在 800V,1ms 下出现的克隆数是 20 个左右,二者结果相近。提示哺乳动物细胞基因转移可在较低电场强度下(约 1300V/cm)进行。

以不同浓度的 DNA 转化细胞,发现基因电转移不同于磷酸钙沉淀法,转化频率随着

DNA 浓度的增高而增高。图 3 所示是 NIH/3T3 细胞用丝 SUC 时在不同浓度 DNA 下所获得的转化克隆数。当 DNA 浓度为 $80\mu\text{g/mL}$ 时,可获得 57 个克隆。

综上所述,不同细胞介质和不同电极对细胞电极电阻有很大影响,从而在很大程度上影响到电极两端输出电压值和输出波形,并由此影响到转化频率和转化成功率。结果表明,丝 SUC 为较理想的转化条件,而片 PBS 则给出阴性转化结果;高电场强度短时间和低电场强度长时间均可使转化成功,哺乳动物细胞的稳定转化可在较低电场强度(约 1300V/cm)下获得。

参 考 文 献

- [1] Wong, T. K. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1982, **107**, 584.
- [2] Chu, G. et al.: *Nucleic Acids Res.*, 1987, **15**, 1311.
- [3] 杨建涛等:《国外医学分子生物学分册》,1987, **9**,106.
- [4] Riggs, C. D. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, **83**, 5602.
- [5] Toneguzzo, F. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, **83**, 3496.
- [6] Reiss, M. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1986, **137**, 244.
- [7] Ou-Lee, T. M. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, **83**, 6815.
- [8] Yamaizumi, M.: *Mol. Cell. Biol.*, 1983, **3**, 511.
- [9] 卢欣等:《遗传》,1986,(8),26.
- [10] Maniatis, T. et al.: *Molecular Cloning*, Sixth Printing, Cold Spring Harbor Lab., USA., 1983, 86—96.
- [11] 斯达西, R. W. 等著:《生物物理和医学物理学原理》,科学出版社,北京,1967,357.
- [12] Cole, K. D. et al.: *Medical Physics*, Year Book Publishers Inc., Chicago, 1950, 2, 82.

[本文于 1987 年 9 月 12 日收到]

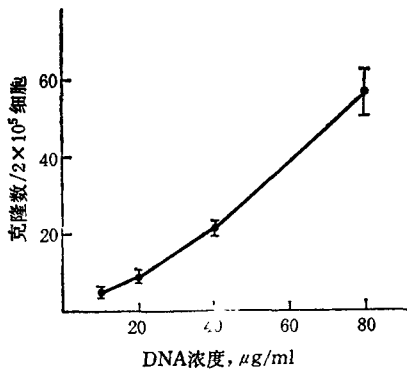


图 3 不同浓度 DNA 的克隆形成率 ($n = 3$)