

研究简报

脂质体法和电穿孔法转染哺乳动物细胞研究

钱 锋 肖成祖

(军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100071)

摘要 用脂质体法和电穿孔法分别转染 Cos-7, Vero 和 Namalwa 细胞, 发现脂质体法在转染效率和操作方便方面比电穿孔法优越, 而电穿孔法对细胞种类的适用性方面似乎比脂质体法广. 结果表明, 电穿孔法能转染 Cos-7, Namalwa 和 Vero 细胞, 而用脂质体法只能转染 Cos-7 和 Vero 细胞.

关键词 转染, 脂质体转染, 电穿孔, 比较研究

学科分类号 Q812

真核细胞转染在过去 20 年中涌现了许多不同的方法, 如磷酸钙沉淀法^[1], 脂质体法^[2], 电穿孔法^[3], DEAE-葡聚糖法^[4]等, 但无一种方法适用于所有细胞系. 在真核细胞转染中, 必须明确两个问题: a. 用什么方法能使细胞转染; b. 在此基础上如何提高细胞的转染效率. 本文用脂质体法和电穿孔法对 Cos-7, Vero 和 Namalwa 细胞进行了转染, 通过 β -半乳糖苷酶组织化学染色确定转移基因的表达. 研究发现脂质体法在转染效率和操作方便方面比电穿孔法优越, 而电穿孔法对细胞种类的适用性方面似乎比脂质体法广. 实验中发现, Namalwa 细胞只能被电穿孔法转染, 而 Cos-7 和 Vero 细胞用两种方法都能转染.

1 材料和方法

1.1 菌株, 质粒和细胞株

大肠杆菌 DH₅ α , 非洲绿猴肾细胞 Vero 为本室保存. 真核表达载体 pcDNA₃LacZ 由北京医科大学汤健教授惠赠. 来源于非洲绿猴肾的 Cos-7 细胞由本院王海涛教授惠赠. Namalwa 由上海细胞生物研究所惠赠.

1.2 细胞培养

1.3 DNA 制备

真核表达质粒 pcDNA₃LacZ 带有受巨细胞病毒早早期启动子和增强子调控的大肠杆菌 β -半乳糖苷酶基因, 用碱变性法^[5]抽提 DNA, 参照生产商所述方法用阴离子交换层析柱 (QIAGEN -Tip20, QIAGEN, GmbH, Hilden, Germany) 纯化 DNA. 或者用聚乙二醇法^[5]纯化 DNA.

1.4 细胞转染

参照文献 [3] 对细胞进行电转染. 用生产商所述方法优化脂质体 (lipofectamine, Life Technologies) 介导的细胞转染.

1.5 X-gal (5-溴-4-氯-3-吲哚- β -D-半乳糖苷) 染色

参照文献 [1].

2 结 果

2.1 Cos-7 细胞转染情况

对 Cos-7 细胞用脂质体法和电穿孔法进行了转染实验, 结果都得到了转染. 当用 0.5 μ l 脂质体时, 细胞转染率达到了 2.4%, 以后脂质体从 1 μ l 增加到 6 μ l 时, 转染的细胞越来越多, 呈蓝色的细胞太多以至不容易计数. 在同样转染条件下, Cos-7 细胞转染率是 Vero 细胞的 40 倍, 而 Namalwa 细胞根本不被脂质体转染 (图 1).

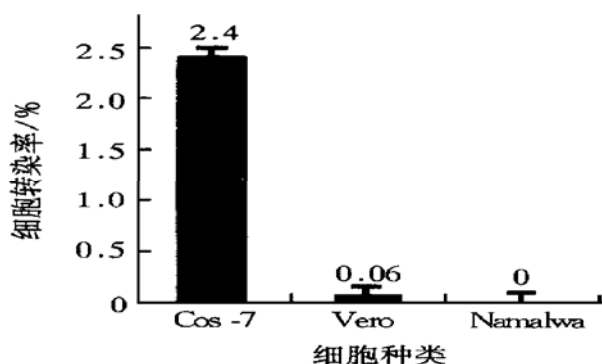


图 1 脂质体法中 Cos-7, Vero 和 Namalwa 细胞转染效率比较

在不同电压条件下, Cos-7 细胞获得的最大转染效率只有 0.43% (图 2). 比脂质体法在即使只有较少脂质体时的转染率还低, 这说明对 Cos-7 细胞, 用脂质体法比用电穿孔法好.

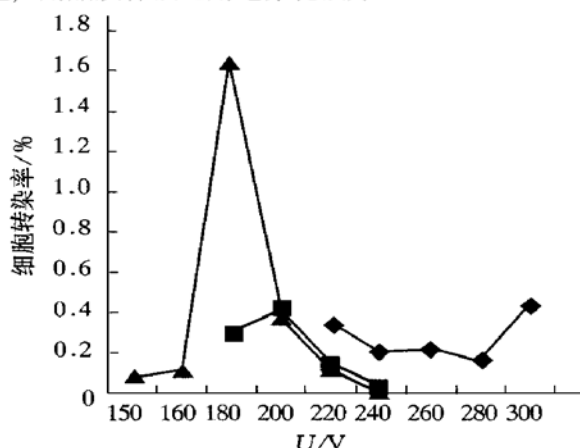


图 2 电压对 Cos 7, Vero 和 Namalwa 电穿孔转染效率的影响

◆—◆: Cos-7; ■—■: Vero; ▲—▲: Namalwa.

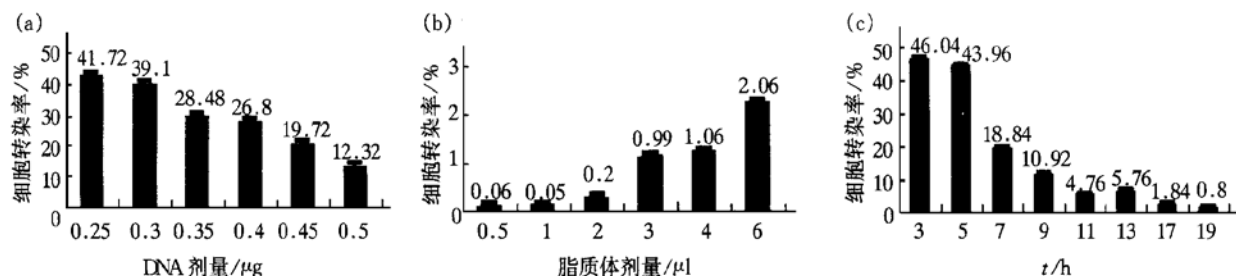


图 3 DNA 剂量 (a), 脂质体量 (b) 和细胞暴露于 DNA-脂质体复合物时间 (c) 对 Vero 细胞转染效率的影响

3 讨 论

脂质体介导的细胞转染可能是通过脂质体 DNA 复合物与细胞融合而将 DNA 导入细胞的^[6]. 使用该方法达到的转染率一般均较高, 但该方法的适用性不是太广. 本文实验结果与此一致: 脂质体法只能转染 Cos-7 和 Vero 细胞, 而用电穿孔法能转染 Cos-7, Namalwa 和 Vero 细胞.

Baum^[3]用电穿孔法对 19 株细胞进行了转染, 结果所有细胞都得到了转染. 本文中电穿孔法对 Cos-7, Namalwa 和 Vero 细胞都能转染, 说明电穿孔法适用性较广. 电穿孔作用机理为电作用细胞使其细胞膜产生孔洞, 外界物质如 DNA 进入细胞. 由于所有种细胞的细胞膜都是非导体, 电穿孔法理论上可以转染各种细胞^[7].

较低量 DNA 转染 Vero 细胞反得高转染率以及

2.2 Vero 细胞转染情况

用脂质体法和电穿孔法对 Vero 细胞都得到了有效转染. 但用脂质体法时, 脂质体量少如 0.5 μl 时, 细胞转染率也较低, 只有 0.06%. 因此对 Vero 细胞脂质体转染法进行了优化 (图 3). 在六种 DNA 用量中, 按厂商推荐的最低量 DNA 即 0.25 μg 就可得到最高的转染效率, 而且转染率随 DNA 用量增加而降低 (图 3a). 对 Vero 细胞, 脂质体用量越多, 细胞转染效率越高 (图 3b). 在暴露时间对转染效率的影响方面, 细胞暴露于 DNA-脂质体复合物作用时间从 3 h 到 24 h, 如图 3c 所示, 转染率在暴露时间超过 5 h 后急剧降低.

2.3 Namalwa 细胞转染情况

实验中发现, Namalwa 细胞只能用电穿孔法转染. 我们用脂质体法对 Namalwa 细胞进行了大量实验, 采用了不同脂质体量, 不同 DNA 量对其进行转染, 都没有成功. 后改用电穿孔法, 使 Namalwa 细胞得到了转染, 转染率最高达 1.66% (图 2).

细胞转染率随 DNA-脂质体复合物作用时间延长而下降, 是因为 DNA-脂质体复合物对细胞有毒性. 实验发现, 随 DNA 量增加以及 DNA-脂质体复合物作用时间延长, 显微镜观察发现细胞毒性逐渐加重, 细胞存活率下降, 细胞转染率随之下降.

参 考 文 献

- 1 Chang D C, Chassy B M, Saunders J A, *et al.* Academic Press Guide to Electroporation and Electrofusion. San Diego: Academic Press, 1992. 465~470
- 2 Felgner P L, Gadek T R, Holm M, *et al.* Lipofection: a highly efficient lipid mediated DNA transfection procedure. Proc Natl Acad Sci USA, 1987, **84** (21): 7413~7417
- 3 Baum C, Forster P, Hegewisch-Becker S, *et al.* An optimized electroporation protocol applicable to a wide range of cell lines. BioTechniques, 1994, (6): 1058~1062
- 4 Pari G S, Keown W A. Experimental strategies in efficient of mammalian cells. Calcium phosphate and DEAE-dextran. Methods Mol Biol, 1997, **62** (1): 301~306
- 5 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: a

Laboratory Manual. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 24~ 28

- 6 Wang D, Jing N, Lin Q. Stearylamine liposome as a new efficient reagent for DNA transfection of eukaryotic cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, **226** (2): 450~ 455
- 7 Spencer S C. Electroporation technique of DNA transfection. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1993, **42** (1): 75~ 82

Comparison of Lipofection and Electroporation Gene Transfer Into Mammalian Cells. QIAN Feng, XIAO Cheng-Zu (*Institute of Biotechnology, Military Medicine Academy, Beijing 100071, China*).

Abstract The transfection of Cos-7, Vero and

Namalwa cell lines by lipofection and electroporation methods have been examined. The lipofection method was found to be better than electroporation method in terms of higher transfection and convenient use. The electroporation method is superior to the lipofection method in terms of average transfection efficiency for a wider variety of cells lines. It was found that Namalwa cells could only be transfected by electroporation method, while Cos-7 and Vero cells could be transfected by both methods.

Key words transfection, lipofection, electroporation, comparison study

基质金属蛋白酶-2 在酵母系统中表达的初步研究

丁秀云 李春海¹⁾ 朱运峰 孙丽亚 颜春洪 张立新 冯东晓 陈高明

(军事医学科学院附属医院, 北京 100850)

摘要 基质金属蛋白酶-2 (明胶酶 A) 在肿瘤侵袭和转移中具有重要作用, 为进一步研究其作用机制, 在酵母系统中表达了金属蛋白酶-2 通过 PCR 方法获得明胶酶 A 的表达序列, 酶切和测序结果证明序列正确后, 构建明胶酶 A 的表达载体 pPIC9/GelA, 电击法转化酵母得到阳性克隆. 明胶酶谱分析说明表达产物具有明胶底物特异性, SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳表明, 表达产物的分子质量为 66 ku.

关键词 基质金属蛋白酶-2, 酵母, 表达

学科分类号 Q55

基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMPs) 是一类依赖于 Zn^{2+} 的蛋白水解酶类, 现在已经发现有 17 种金属蛋白酶, 按照它们结构、底物特异性和水解特性, 可以分为: 胶原酶、明胶酶、Stromelysin 和膜型的金属蛋白酶 (MT-MMPs). 它们能够降解细胞外基质和基底膜, 参与许多生理和病理过程 (如肿瘤细胞的侵袭和转移, 自身免疫性疾病等). 金属蛋白酶活性存在多水平的调节, 基因转录水平, 蛋白质翻译水平, 酶原激活和特异性的抑制剂 (tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMPs) 等. 明胶酶包括二种: 72 ku 的明胶酶 A (MMP-2, 金属蛋白酶-2) 和 92 ku 的明胶酶 B (MMP-9, 金属蛋白酶-9). 同其他的金属蛋白酶一样, 明胶酶是以酶原的形式分泌的, 在激活时, 需要在 N 端除去大约 80 个氨基酸的前肽. 明胶酶 A 能够降解变性的胶原, 包括 IV、V、VII、X 和 VI 型胶原, 弹性蛋白等. 对于其结构的研究表明, 明胶酶 A 除了具有前肽区, 催化区和 C 端区以外, 在催化区还存在 fibronectin-like 区

域. 目前许多学者致力于明胶酶的区域结构性质和结合催化活性以及激活机制的研究, 研究表明, 明胶酶 A C 端的结构与血红素家族蛋白类似, 这个区域在与 TIMP-1 和 TIMP-2 结合中起着重要的作用, 并且对定位于细胞膜上明胶酶激活因子的作用是必需的. 而对于明胶酶整体的结构特性, 结合催化机理, 激活的机制等, 由于样本量的限制, 未能很好地进行研究. 本研究以 PCR 方法获得明胶酶 A 的表达序列, 构建明胶酶 A 的表达载体 pPIC9/GelA, 在酵母中进行了表达, 为以后明胶酶性质的进一步研究奠定了基础.

1 材料与方法

1.1 材料

各种限制性内切酶均购自华美公司; PCR 产物纯化试剂盒, pGEM-T 连接试剂盒, 质粒提取试剂盒, 测序试剂盒等均购自 Promega 公司; 酵母表

¹⁾ 通讯联系人.

收稿日期: 1998-02-12, 修回日期: 1998-12-15