

下降趋势可推测, 缺氧对神经节苷脂已知的 4 种单一组分均有影响, 至于具体的规律还有待进一步研究.

参 考 文 献

- 1 Leon A, Lipartiti M, Seren Ms *et al.* *Stroke*, 1990; **21** (11 Suppl): III 95
- 2 Irwin L N, Samson F E. *J Neurochem*, 1971; **18**: 203
- 3 Holm M R. *J Neurochem*, 1968; **15**: 821
- 4 Yan Qi, Qiming X. *Molecular and Chemical Neuropathology*, 1991; **14**: 87
- 5 吕国蔚. 见: 潘世威主编. 病理生理学进展. 北京: 人民卫生出版社, 1963: 196
- 6 Ladisch S, Gillard B. *Anal Biochem*, 1985; **146** (1): 220
- 7 Svennerholm L. *Biochim Biophys Acta*, 1957; **24**: 604
- 8 Magal B, Louis J C, Aguilera J *et al.* *J Neurochem*, 1990; **55** (6): 2126
- 9 史美棠, 吕国蔚, 李 凌等. 中国病理生理杂志, 1993; **9** (3): 426

Studies of Gangliosides in the Mice Brain Tissue with Acute and Repeatitive Hypoxia.

Huang Rubin, Yang Dianer, Li Aihua, Pan Ying, Jin Youyu (*Department of Biochemistry, Capital University of Medical Sciences, Beijing 100054, China*); He Jianyu (*Department of Biochemistry, Shanghai Medical University, Shanghai 200032, China*).

Abstract Kumming mice were chosen as ex-

perimental animals. Under the conditions of acute and repeatitive hypoxia and normal, the individual relative percentage of ganglioside GM1, GD1a, GD1b and GT in the brain were measured by the CS-9000 thin-layer-scanning photometer respectively. Comparing with the group A of blank control without exposure to hypoxia, group B of experimental control exposed to hypoxia only once, and group D of another experimental control fed for two days after acute and repeatitive exposure to hypoxia for 4 times, the content of sialic acid significantly decreased and that of GT markedly increased in the experimental animals group C acutely and repeatedly exposed to hypoxia for 4 times; while the contents of ganglioside were also different between group A and D significantly. The results indicate that ganglioside in the brain may be involved in the development of tolerance to hypoxia in animals exposed to acute and repeatitive hypoxia and the proceeding was not a fast response which may be restored.

Key words repeatitive hypoxia, ganglioside, mice, thin-layer-scanning

DNA 对电穿孔转染效率的影响

卢柏松 黄培堂

(军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100850)

摘要 以外源红细胞生成素 cDNA 的表达产物为指标, 研究了运载 DNA 和重组表达质粒的构象对电穿孔转染 CHO 细胞的效率的影响. 结果 250mg/L 的运载 DNA 可使外源基因表达水平提高 3 倍; 线性化质粒 DNA 比超螺旋 DNA 更适合于用电穿孔方法获得永久表达. 这一结果提示, 运载 DNA 的存在和质粒 DNA 的线性化对提高电穿孔转染 CHO 细胞的效率是必须的.

关键词 电穿孔转染, 运载 DNA, DNA 构象

电穿孔转染法 (electroporation)^[1] 是一种简便而有效的物理方法, 其原理是利用高压脉冲电场使细胞膜形成穿孔, 外源基因通过膜穿孔进入细胞, 并进一步整合到染色质 DNA 上. 该方法的优点是能成功地转染多种细胞, 尤其适合于那些用别的方法难以成功的细胞. 电穿孔转染的效率受到多种因素的影响, Potter 等^[2] 研究发现, 对淋巴瘤细胞株 1881, 线性化 DNA 的电穿孔转染效率是超螺旋 DNA 的 20 倍. Chu 等也证明线性化 DNA 比超螺旋 DNA 更利于用电穿孔法获得稳定转化子; 他们的结果还表明: 对 XP12RO 细胞, 小片段运载 DNA 的存在对提高转染效率十分重要^[3]. CHO 细胞是目前真核基因工程的主要受体细胞, 我们认为探索电穿孔转染 CHO 细胞的最佳方案是必要的. 本文以外源红细胞生成素 (EPO) cDNA 的表达为指标, 研究了运载 DNA 以及 DNA 的构象对电穿孔转染 CHO 细胞效率的影响.

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒和细胞株

大肠杆菌 RRI, 真核表达载体 pCDS (见图 1), pCDS1 (去掉 pCDS 中 dhfr 基因 5' 端增强子序列而来), 含红细胞生成素 cDNA 的克隆载体 pEPO 以及 CHO-dhfr⁻^[5] 细胞为本室保存, 真核表达载体 pCMV4 由本院王嘉玺教授惠赠.

1.2 工具酶和主要化学试剂

限制性内切酶和其它工具酶分别购自 Promega 和华美公司, 放射性同位素标记物购自福瑞公司和原子能研究所, DMEM 为 BRL 公司产品, 小牛血清为杭州四季青生物制品公司产品, 红细胞生成素 ELISA 试剂盒为 Boehringer Mannheim 产品.

1.3 DNA 常规操作 见文献 [6].

1.4 细胞培养和转染^[7].

CHO-dhfr⁻ 细胞生长于 DMEM 培养基, 补加 10% 小牛血清、100U/ml 青霉素、100mg/L

链霉素、50U/ml 卡那霉素、2mmol/L 谷氨酰胺、0.3mmol/L 次黄嘌呤和胸腺嘧啶核苷, 0.1mmol/L 甘氨酸和脯氨酸, pH 7.2. 待细胞长至对数期, 胰酶消化 2×10^7 细胞, 用 PBS 缓冲液 (NaCl 8g、KCl 0.2g、Na₂HPO₄ 1.44g、KH₂PO₄ 0.24g 溶于 1000ml 去离子水, pH = 7.4) 洗一次后重悬于 0.8ml PBS/DNA 混合液中, 室温静置 10min. 将细胞转移到电击仪 (Bio-Rad) 的细胞槽中, 加以 $U = 250V$, $C = 760\mu F$, $T = 1000ms$ 的脉冲电场, 室温静置 10min 后将细胞转移至 10ml CHO-dhfr⁻ 培养基中, 2d 后换成选择培养基 (DMEM, 含 10% 小牛血清、100U/ml 青霉素、100mg/L 链霉素、50U/ml 卡那霉素、0.1mmol/L 脯氨酸), 4—5d 后细胞以 6×10^3 个/cm² 的密度传代, 并以 $5 \times 10^{-8}mol/L$ 的氨甲喋呤 (MTX) 选择摄入了外源基因的细胞.

1.5 转染效率的分析

用 ELISA (按 B. M. 公司 EPO ELISA 试剂盒说明书进行) 和 ³H-TdR 掺入法^[8] 检测 DNA 转染 CHO 细胞后所得细胞的红细胞生成素表达水平, 以此为指标分析转染效率.

³H-TdR 掺入法: 按文献 [9] 的方法制备小鼠骨髓单细胞悬液, 细胞浓度为 2×10^6 个/L 培养基为 DMEM (含 10% 小牛血清, 100U/ml 青霉素, 100mg/L 链霉素). 将细胞 200 μ l/孔 植入 96 孔培养板, 加入标准 EPO 样品或每孔 1 μ l 待测样品, 37℃ 培养 22h 后每孔加入 1 μ l Ci³H-TdR, 继续培养 2h. 收集细胞于 49 号滤纸上, 烘烤后液闪计数 (LKB 液闪计数仪).

2 结 果

2.1 红细胞生成素真核表达质粒的构建

将原始克隆质粒 pEPO 上的红细胞生成素 cDNA 用 *Ava*II-Taq I 双酶解, 回收含红细胞生成素编码区的 688bp 片段, 补平后分别平端插入 pCDS 的 *Sal* I 和 pCMV4 的 *Bgl*II 位点 (图 1).

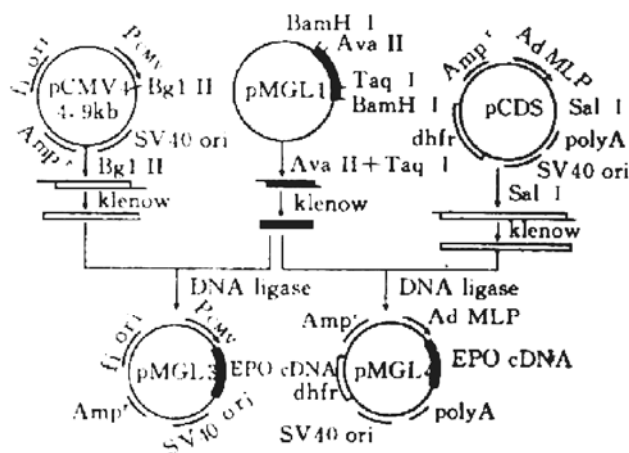


图1 红细胞生成素真核表达质粒的构建

采用菌落原位杂交法筛选得到一组杂交阳性转化子,对阳性菌落进一步作如下酶切鉴定:
pCMV4-EPO: Kpn I
pCDS EPO: Kpn I /EcoR I 和 Kpn I /Xba I
结果证明得到了红细胞生成素 cDNA 正向插入的 pMGL3和 pMGL4 (图2)。

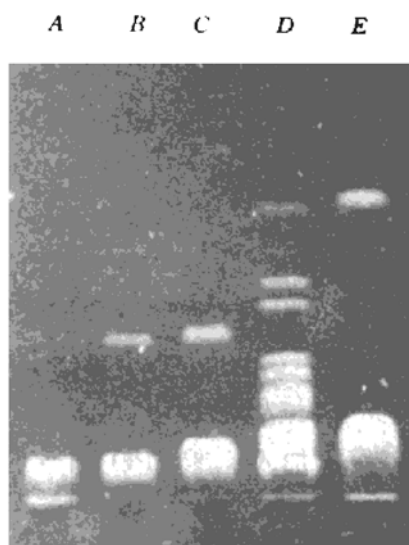


图2 重组表达质粒 pMGL3和 pMGL4的酶切鉴定

A: pMGL4 + EcoR I; B: pMGL4 + Xba I + Kpn I; C: pMGL4 + EcoR I + Kpn I;
D: λ DNA: HinfI + BamHI; E: pMGL3 + Kpn I.

2.2 运载 DNA 对电穿孔转染效率的影响

将 200 μ g EcoR I 线性化的 pMGL4 转染

CHO 细胞,并以 200 μ g EcoR I 线性化的 pMGL4 和 200 μ g 鲑精 DNA 共转染 CHO 细胞为对照.转染后 20d 左右两种转染都有大量克隆出现,表明转染效率较高.将所得克隆在 MTX 浓度逐步提高的培养基中混合培养 3 个月,ELISA 检测混合细胞 24h 上清中的红细胞生成素浓度,结果见表 1.

表1 ELISA 比较有无运载 DNA 共转染的混合细胞的表达水平

样品	稀释倍数	A	$c_{EPO}/\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
无运载 DNA	1:50	0.89	100
	1:200	0.26	
有运载 DNA	1:50	1.43	400
	1:200	0.84	
阴性对照	1:50	0.00	0
标准品	1:1	0.45	0.5
	1:1	0.68	1

可见两种细胞都有红细胞生成素表达,有运载 DNA 共转染的细胞其表达水平是无运载 DNA 共转染的细胞的 4 倍。

2.3 质粒 DNA 构象对电穿孔转染效率的影响

分别将 EcoR I 线性化的 pMGL4 200 μ g 和超螺旋的 pMGL3 200 μ g (与 pCDS1 以 20:1 的比例共转染)转染 CHO 细胞,克隆出现后同样在 MTX 浓度逐步提高的选择培养基中混合培养以扩增外源基因的拷贝数.3 个月取 24h 上清 ELISA 测定其红细胞生成素浓度,结果线性化 pMGL4 转染的细胞有产物表达,而超螺旋 pMGL3 与 pCDS1 共转染的细胞在加压扩增了几个月后几乎检测不到产物表达 (表 2)。

表2 线性化 pMGL4 与超螺旋 pMGL3 转染后细胞表达水平的比较

样品	稀释倍数	A
线性化 pMGL4	1:50	0.89
	1:200	0.26
超螺旋 pMGL3	1:50	0.05
	1:200	0.02

注:阴性对照和标准品 A 值同表 1。

为了排除 pMGL3 与 pCDS1 不能成功地共转染的可能, 我们将 pMGL3 与 pCDS1 共转染 CHO 细胞, 待克隆出现后挑取单个克隆分别在 96 孔板扩增, 细胞 75% 铺满孔底后取 24h 上清 ^3H -TdR 掺入法测定红细胞生成素浓度, 结果约 20% 的克隆有明显表达 (图 3 中 cpm 值大于 500 的克隆)。

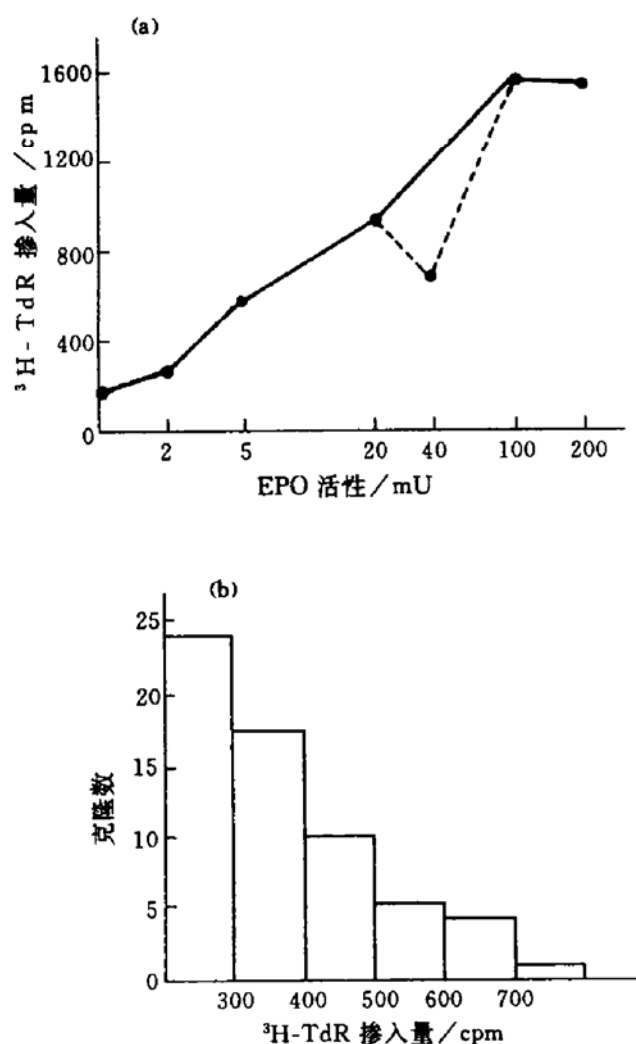


图3 超螺旋 pMGL3 转染 CHO 细胞后所挑取单个克隆的表达

(a) 标准 EPO 活性与 cpm 值的对应关系; (b) cpm 值在某个范围的克隆数。

超螺旋的 pMGL3 转染 CHO 细胞后在克隆形成初期有 20% 左右的克隆表达外源基因, 但克隆混合培养了若干代后混合细胞几乎无表达; 线性化的 pMGL4 转染 CHO 细胞后外源基因的表达并不随混合加压扩增时间的延长而降低, 其原因固然可能与 pMGL3 是和 pCDS1 共

转染有关, 但我们认为更主要的是因为质粒 pMGL3 转染前未线性化 (详见讨论部分)。

3 讨 论

本文对比了在有无运载 DNA 共转染的情况下, 重组表达质粒 pMGL4 在 CHO 细胞中的表达水平, 结果有运载 DNA 共转染时混合细胞的平均表达水平是无运载 DNA 时表达水平的 4 倍。由于两种细胞的转染条件、质粒 DNA 含量完全一样, 唯一的差别在于运载 DNA 的有无, 而且由于检测的是混合细胞因而外源目的基因在染色体上的整合位置对表达的影响不会存在太大的差别, 所以表达水平的差别只能归因于运载 DNA 对转染效率的影响。

Chu 等发现^[3]: 对 XPRO12 细胞, 电穿孔转染效率随运载 DNA 浓度的增加而提高, 到 500mg/L 时达到最高。我们的结果则表明, 对于 CHO 细胞, 250mg/L 的运载 DNA 能提高转染效率到无运载 DNA 的 3 倍。实验发现酵母 RNA 与目的基因共转染, 不能提高转染效率^[3]。综合文献报导和我们的实验结果, 我们认为, 运载 DNA 之所以能提高转染效率, 是因为它的存在减少了宿主细胞 DNA 酶对目的基因的降解。共转染的大量小片段运载 DNA 与目的 DNA 竞争作为宿主核酸酶的底物, 自然减少了核酸酶对目的基因的降解, 增加了其整合到染色体 DNA 上的机会, 因而提高了转染效率。

本实验中超螺旋 pMGL3 转染 CHO 细胞后, 克隆刚出现时分别挑取单个克隆并扩增能检测到表达产物, 但混合克隆加压扩增了若干代后则几乎检测不到, 而线性化的 pMGL4 转染的细胞, 克隆形成初期和混合克隆加压扩增后都有表达。我们认为这与 pMGL3 未线性化有关, 虽然 pMGL3 质粒本身没有标志基因, 共转染后 MTX 抗性克隆中只有一部分同时表达标志基因和目的基因, 但如果目的基因能稳定整合, 混合加压扩增后应能得到表达外源基因的克隆。Kaufman 等用磷酸钙共沉淀法共转染分别含标志基因和目的基因的两种质粒, 采用

克隆混合加压扩增的策略得到了高表达目的基因的细胞株^[7]。

实验表明,超螺旋 DNA 用电穿孔法转染 XP12RO 细胞后,早期出现的克隆较多,但随着 MTX 浓度的逐步升高,克隆逐步减少,其数目只有线性化质粒 DNA 转染后克隆数的 1/4,这表明超螺旋 DNA 不利于电穿孔转染后的稳定整合^[3]。本实验中我们认为由于超螺旋 pMGL3 用电穿孔法转染 CHO 细胞后不容易稳定整合,在没有选择压力迫使其存在的情形下易于丢失。在混合培养的过程中表达目的基因的细胞由于 pMGL3 的丢失而不断被稀释,以致最终检测不到目的产物的表达。这一结果表明超螺旋 DNA 不利于电穿孔转染 CHO 细胞后外源基因的整合,因而提示我们在真核基因工程研究中,如果采用电穿孔法将外源基因引入 CHO 细胞,重组表达质粒上最好有合适的线性化酶切位点。

参 考 文 献

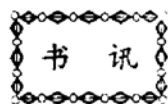
- 1 Spencer S C. Appl Biochem Biotechnol, 1993; 42: 75
- 2 Potter H. Anal Biochem, 1988; 174: 361
- 3 Chu G, Hayakawa H, Berg P. Nucleic Acids Res, 1987; 15: 1311
- 4 Wen D-Y, Boissel J P R, Tracy T E *et al.* Blood, 1993; 82: 1507
- 5 Urlaub G, Chasin L A. Proc Natl Acad Sci USA, 1980; 77: 4216

- 6 Sambrook J, Fritsch E F, Manjatis T. Molecular cloning, a laboratory manual, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; 1: 21—1. 84
- 7 Kaufman R J, Wasley A J, Spiliotes S D *et al.* Mol Cell Biol, 1985; 5: 1750
- 8 Krystal G. Exp Hematol, 1983; 11: 649
- 9 Iscove N N. Cell Tissue Kinet, 1977; 10: 323

The Effects of DNA on Efficiency of Electroporation. Lu Baisong, Huang Peitang (*Institute of Biotechnology, Academy of Military Medicine Sciences, Beijing 100850, China*).

Abstract The effects of DNA conformation and carrier DNA on the efficiency of electroporation are studied using the expression of erythropoietin cDNA in CHO cells as an indicator. It turns out that 250mg/L carrier DNA increases the expression level by 3 fold, and linearized plasmid DNA is more suitable than supercoiled DNA to obtain stable transfection by electroporation. The results suggest that it is essential to linearize plasmid DNA and co-transfect with appropriate carrier DNA to obtain stable and high level expression of foreign genes by means of electroporation.

Key words electroporation, carrier DNA, DNA conformation



《中外医药卫生期刊速查手册》

1995年6月正式出版发行

中外医药卫生期刊种类繁多,令人目不暇接。为帮助广大医药卫生工作者及时准确掌握医药卫生期刊信息,解放军蚌埠坦克学院图书馆联合上海第二医科大学、第四军医大学、同济医科大学、延边医学院图书馆和全国大部分省、自治区、直辖市新闻出版局共同编辑了《中外医药卫生期刊速查手册》一书。编者以《中国图书分类法》第三版为分类依据,详尽介绍了2300余种中、英、法、德、日、俄、朝语医学期刊。正文后附

有中、英文索引,以备速查。可供医学院校、医学科研机构图书馆、资料室、医护人员、科研人员投稿、查询、订阅时参考。

该书62万字,32开,精装,每册35元,(含邮寄费)人民军医出版社出版,书号:ISBN7-80020-547-9/R·483。购买者请与邓运龙同志联系(邮编 233013,安徽省蚌埠市78信箱门诊部)。