

三种方法转染绿色荧光蛋白质粒的效果评价

孙丽娜 魏建春 张慧娟 张恩民 俞东征 海 荣

摘 要 **目的** 比较常见的真核细胞转染技术,评价采用绿色荧光蛋白为报告基因来观察细胞转染效率高低的办法。**方法** 分别采用磷酸钙法、电穿孔法和脂质体法将 pEGFP-C1 质粒转染 COS-7 细胞,对每种方法的转染效率及对细胞的毒性进行评价。**结果** 脂质体法的转染率为 67%,电穿孔的转染率为 43%,磷酸钙法的转染率为 28%。脂质体法转染对细胞的毒性最小。**结论** 采用绿色荧光蛋白为报告基因的真核细胞转染技术中,脂质体法是效率高、安全性大的方法。

关键词 绿色荧光蛋白 转染 脂质体

Evaluation for Transfection Efficiency of GFP Report Gene in Three Different Ways. Sun Lina, Wei Jianchun, Zhang Huijuan, Zhang Enmin, Yu Dongzheng, Hai Rong. State Key Laboratory for Infectious Disease Control and Prevention, Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China

Abstract Objective To evaluate the efficiency for eukaryotic cell transfection by using GFP as a report gene in common transfection ways. **Methods** COS-7 cell was transfected with pEGFP-C1 by calcium acid phosphate, electroporation and lipofectamine respectively. The transfection efficiency and cell survival rate were evaluated. **Results** The transfection efficiency was 67%, 43% and 28% by lipofectamine, electroporation and calcium acid phosphate. Most cells survived by transfection with lipofectamine. **Conclusion** Using GFP as a report gene in eukaryotic cell transfection, the lipofectamine method could get a higher transfection efficiency and higher survival rate for cells.

Key words GFP; Transfection; liposome

基因转染技术是指将外源分子如 DNA、RNA 等导入真核细胞的技术,它是研究基因表达、调控、突变分析等的常规工具。在基因转染的载体中,绿色荧光蛋白(GFP)载体已经成为一种新型荧光探针工具,以其独特的生物学特性为活细胞内生物大分子在细胞内的定位和相互作用的实时可视化研究提供了可能。此外,增强型绿色荧光蛋白(EGFP)是经过改造的 GFP,使其荧光增强 4~35 倍,EGFP 可以作为报告基因来反应基因的转染效率,其表达产物非常容易被鉴定^[1]。

目前,将外源基因导入细胞常用的方法有:磷酸钙法、电穿孔法和脂质体介导法等^[2]。转染技术的选择对转染结果影响很大,本研究通过采用绿色荧光蛋白为报告基因,瞬时转染 COS-7 细胞,比较磷酸钙法、电穿孔和阳离子脂质体法这 3 种转染方法的转染效率及它们对细胞生长的影响,来确定转染效率高且对细胞毒性小的基因转染方法。

材料与方法

1. 材料:绿色荧光蛋白质粒 pEGFP-C1 由香港中文大学提供,COS-7(非洲绿猴肾成纤维细胞)购自武汉大学细胞库。CaCl₂ 购自 Tiangen 公司,电穿孔仪购自 eppendorf 公司,阳离子脂质体 lipofectamine2000 购自 invitrogen 公司。

2. 方法:(1)pEGFP-C1 质粒的大量提取与纯化:将 pEGFP-C1 质粒转化入 DH5 α ,37℃,摇床 220r/min,过夜培养细菌 250ml,按照试剂说明书,用 QIAGEN-tip500 柱子大提质粒并纯化。测定质粒浓度,用紫外分光光度计分别测 OD₂₆₀、OD₂₈₀ 值,计算 DNA 浓度,并检测其纯度。(OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值一定要在 1.8~2.0 之间)。(2)COS-7 细胞的培养: COS-7 细胞培养于 RPMI1640 完全培养基中,37℃,5% CO₂ 条件下培养,接种量为 1×10⁵ 细胞/毫升,细胞长满至单层后(约 2~3 天),用胰酶消化传代,使细胞保持在对数生长期。(3)3 种不同转染方法:①磷酸钙转染法:指数生长的细胞,转染时细胞的汇合度不能超过 80%,于 5ml 灭菌塑料管内混合 100 μ l 2.5mol/L CaCl₂ 与 25 μ g 质粒 DNA,用 0.1×TE (pH7.6)将体积补至 1ml。室温下将以上 2×钙-DNA 溶液与等体积的 2×HEPES 盐溶液混合。迅速敲弹试管侧壁混匀溶液,静置 1min。立即将磷酸钙-DNA 悬液转移至上述单层细胞的细胞培养基中。每 1ml 培养基加 0.1ml 悬液。轻轻摇动平皿混匀培养基,培养基会变成浑浊的桔黄色。室温下孵育 15min,再加入培养液。将转染的细胞置于含 5% CO₂ 的

基金项目:科技部重大专项基金资助(2008ZX10004-008)

作者单位:102206 北京,中国疾病预防控制中心传染病预防控制所/传染病预防控制国家重点实验室

通讯作者:海荣,电子信箱:hairong@icdc.cn

37℃温箱孵育2~6h后,吸去培养基与DNA沉淀。加入5ml 37℃预热的完全培养基,继续培养细胞,荧光显微镜下观察转染效率;②电穿孔转染法:细胞生长到对数期,用胰酶消化,4℃,1000g离心5min。用0.5倍体积的电穿孔液重悬细胞,细胞密度调至 3×10^6 细胞/毫升。将400 μ l的细胞悬液($10^6 \sim 10^7$ 细胞)内加入30 μ g的质粒DNA,用吸管将细胞和DNA轻轻混匀。将混合物加入电转化池中,冰浴。注意:混匀时不要产生气泡。将电转化池移至电极间放电,1~2min后,取出电转化池,冰浴,立即进行下一步操作。用灭菌的吸头将电穿孔的细胞转移至培养皿中,加入细胞完全培养液,置于含5% CO₂ 的37℃温箱孵育,用于转染效率观察;③脂质体转染法:转染前24h,用胰蛋白酶消化收集处于对数生长期的细胞,细胞加入12孔板内,每个孔内加2ml已调整好浓度的细胞悬液,使每个孔内细胞数为 3×10^5 ,37℃,5% CO₂ 培养箱孵育,24h后细胞密度达80%左右,可以用来转染。按照Lipofectamine2000脂质体使用说明书,取3.0 μ g用于转染的质粒加入100 μ l无血清、无抗生素的Opti-MEM液,轻轻混匀。取2 μ l脂质体加入100 μ l Opti-MEM,轻轻混匀,室温下孵育5min。将稀释的质粒和稀释的Lipofectamine2000混合,轻轻混匀,室温下孵育20min。将混合物加到12孔板的每个孔内,每个孔内加入混合物的体积为200 μ l,轻轻混匀。37℃,5% CO₂ 培养箱孵育4~6h后将含有脂质体和质粒的培养液换掉,代之以含有10%小牛血清1640培养液,置于37℃,5% CO₂ 培养箱孵育;④比较3种转染方法对于pEGFP-C1质粒的转染效率:分别用3种方法转染细胞后,利用倒置荧光显微镜观察绿色荧光蛋白的表达,并计数细胞的转染效率。分别用3种方法转染后的24~72h,观察细胞的生长状况。

结 果

1. 绿色荧光蛋白在COS-7细胞中的表达:pEGFP-C1质粒转染的细胞,在倒置荧光显微镜下蓝光(~ 395 nm)激发时,可以见到细胞内发射出均匀明亮的绿色荧光(封三彩图1)。

2. 绿色荧光蛋白在瞬时转染细胞中表达的动力学:将pEGFP-C1质粒转染的细胞后,动态观察从转染后6~72h内,绿色荧光蛋白在细胞内的表达随时间的变化。在20倍视野下,随机计数500个细胞,绿色荧光蛋白的水平用荧光强度来测定。结果显示,最早在转染后的6h可见到EGFP蛋白的表达,它的表达逐渐增高,在21h达到高峰,之后,EGFP的表达随时间的延长而逐渐减低(图1)。

3. 磷酸钙、电穿孔和脂质体法转染pEGFP-C1质粒效率的评定:(1)3种方法转染效率高低的比较:将COS-7细胞培养至对数生长期,经胰酶消化传代,以每孔 4×10^5 细胞接种于6孔板。37℃,5% CO₂ 培养箱孵育20h后,细胞的汇合度约为80%,用上述

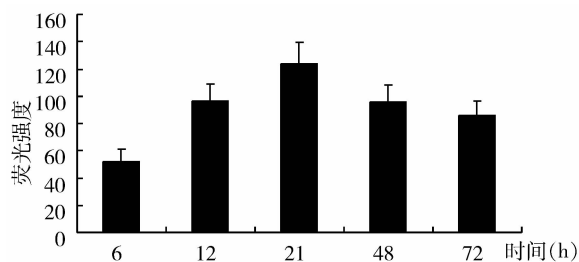


图1 COS-7细胞在转染pEGFP-C1后的6~72h,绿色荧光蛋白表达的水平

3种方法分别进行转染,每 1×10^5 细胞中加入pEGFP-C1质粒1 μ g,具体操作过程同上。在转染后的21h,荧光显微镜下观察,并随机计数500个细胞中,表达EGFP的阳性细胞百分比。结果表明,脂质体法的转染最高,为67%;电穿孔的转染率较高,为43%;磷酸钙法的转染率相对较低,为28%(图2)。(2)3种方法转染pEGFP-C1质粒后,观察细胞的生长状况:结果显示,在用磷酸钙和脂质体法转染后,细胞的生长状态良好,细胞较好贴壁。但是,用电穿孔转染后,从转染后24h起,有将近一半的细胞漂浮,并可见到细胞碎片。另外,在转染后的24~72h,采用台盼蓝法计数活细胞。每种细胞分别取3孔进行计数,计算平均值,分析细胞的生长状况(图3)。细胞计数结果表明,采用脂质体法和磷酸钙转染法的细胞增长状态与未处理的细胞相近,这两种方法对细胞的生长没有明显影响。而电穿孔转染后,活细胞计数明显下降,表明有大量的细胞死亡。

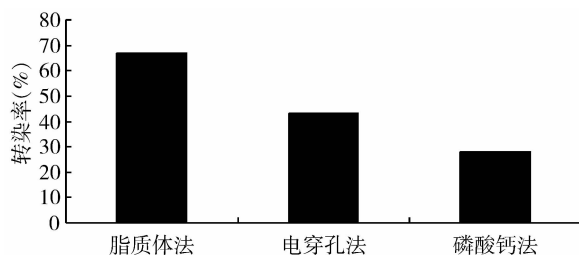


图2 3种方法转染转染效率的比较

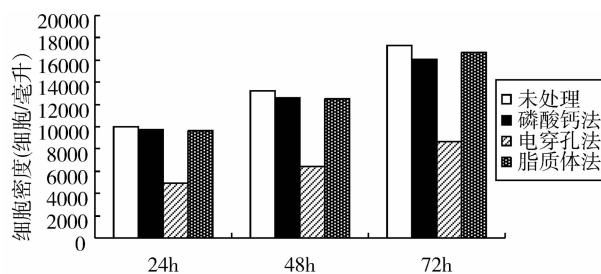


图3 3种方法转染对COS-7细胞生长的影响

讨 论

实验采用 3 种不同的转染方法,将报告基因绿色荧光蛋白瞬时转入真核细胞,结果显示脂质体法的转染效率最高,细胞毒性最小,是一种较为理想的转染方法。

本实验将绿色荧光蛋白的哺乳动物表达载体 pEGFP-C1 转入真核细胞中,观察到 EGFP 发出明亮的绿光,并且 EGFP 的表达和转染的时间有相关性,即从转染后的 6h 开始表达,到 21h 到达高峰,之后,其表达强度随时间延长而逐渐减低。这表明绿色荧光蛋白是非常易于检测的报告基因,并且它的表达具有时效性。

我们比较了磷酸钙法、电穿孔法和脂质体法对于绿色荧光蛋白瞬时转染的效率。结果显示,脂质体法的转染效率最高,对细胞生长影响的不良反应最小。综合比较这 3 种转染方法,磷酸钙法是磷酸钙-DNA 复合物黏附到细胞膜并通过胞饮进入目的细胞的细胞质^[3]。电穿孔是通过将细胞暴露在短暂的高场强电脉冲中转导分子的方法^[4]。阳离子脂质体转染是带负电的 DNA 自动结合到带正电的脂质体上,形成 DNA-阳离子脂质体复合物,被俘获的 DNA 就会被导入培养的细胞。通过实验,我们可以看到磷酸钙法优点为价格低,细胞毒性小,但是,该实验对技术的要求较高,且实验的重复性较差。每种试剂都必须小心校准,保证质量,因为甚至偏离最优条件 1/10 个 pH 值,都可能导致磷酸钙转染的失败^[5]。电穿孔法虽然很多报道表明电穿孔转染效率很高,但是,一般情况下成功的电穿孔过程都伴随高度(50%或更高)的毒性,会引起细胞的死亡。另外,高强度的电场脉冲也能引起细胞融合,可能会影响到细胞的性状和生

长^[6]。阳离子脂质体介导的转染方法是因转染效率高、安全、细胞毒性小、无免疫原性、操作简单,成为较理想的转染方法^[7]。

此外,采用阳离子脂质体法为保证转染的成功,在操作的过程中需要注意选用对数期生长的细胞,尽可能地提纯用于转染的质粒 DNA,去除内毒素的污染可保证理想的转染效果,应按照转染说明书适量配比用于转染 DNA 量和脂质体量,并进行预实验找到最佳的比例等。

总之,在以绿色荧光蛋白为报告基因的真核细胞转染系统中,脂质体法是相对转染效率高、毒性小的理想的转染方法。

参考文献

- 1 Welsh S, Kay SA. Reporter gene expression for monitoring gene transfer. *Curr Opin Biotechnol*, 1997, 8 (5): 616-617
- 2 Colosimo A, Goncez KK, Holmes AR, *et al.* Transfer and expression of foreign genes in mammalian cells. *Biotechniques*, 2000, 29 (2): 314-318
- 3 Fu H, Hu Y, McNelis T, *et al.* A calcium phosphate-based gene delivery system. *J Biomed Mater Res A*, 2005, 74 (1): 40-48
- 4 Odani N, Ito K, Nakamura H. Electroporation as an efficient method of gene transfer. *Dev Growth Differ*, 2008, 50 (6): 443-448
- 5 Kejnovsky E, Kypr J. Millimolar concentrations of zinc and other metal cations cause sedimentation of DNA. *Nucleic Acids Res*, 1998, 26 (23): 5295-5299
- 6 Sandri M, Bortoloso E, Nori A, *et al.* Electrotransfer in differentiated myotubes: a novel, efficient procedure for functional gene transfer. *Exp Cell Res*, 2003, 286 (1): 87-95
- 7 Dass CR, Walker TL, Burton MA. Liposomes containing cationic dimethyl dioctadecyl ammonium bromide: formulation, quality control, and lipofection efficiency. *Drug Deliv*, 2002, 9 (1): 11-18

(收稿:2009-09-16)

(修回:2009-12-03)

基于 UPLC-Q-TOF 的经前期综合征 肝气逆证大鼠模型代谢表征研究

张惠云 罗国安 孙 鹏 乔明琦 黎 莉 黄 浩 魏 娜 魏 盛

摘 要 目的 研究经前期综合征(PMS)肝气逆证大鼠代谢指纹差异,以期 PMS 肝气逆证在代谢层次上的发病机制寻

基金项目:“十一五”国家科技支撑计划“调肝方药干预经前期综合征肝气逆证的代谢机制”(2006BAI08B05-10)

作者单位:250355 济南,山东中医药大学中医药经典理论教育部重点实验室(张惠云、孙鹏、乔明琦、魏盛);100084 北京,清华大学生命科学与医学研究院中药现代化研究中心(罗国安、黎莉);300071 天津,南开大学药学院(黄浩);300071 天津,南开大学生命科学学院(魏娜)

通讯作者:张惠云,电子信箱:zhuiyun@163.com