

一种基于二氧化硅微颗粒的基因载体的制备新方法

林霞, 何晓晓, 王柯敏, 谭蔚泓

(湖南大学化学生物传感与计量学国家重点实验室, 化学化工学院, 生物医学工程中心,
湖南省生物纳米工程技术研究中心, 长沙 410082)

摘要 建立了一种基于二氧化硅微颗粒的基因载体的制备新方法. 首先将正硅酸乙酯在乙醇和氨水环境下水解, 合成得到二氧化硅微颗粒, 然后通过静电作用将多聚赖氨酸修饰到硅微颗粒上, 制备出可有效地结合DNA的基因载体. 所制备的基因载体可将绿色荧光蛋白表达载体 pEGFP导入 COS-7细胞中, 实现了绿色荧光蛋白的高效表达. 本方法简便、快速, 在基因转染与基因治疗研究领域具有较好的潜在应用价值.

关键词 二氧化硅微颗粒; 基因载体; 多聚赖氨酸

中图分类号 O651

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2006)05-0845-04

无论是在基因表达调控与基因功能等基础研究方面, 还是在以基因作为药物进行的临床疾病的治疗即基因治疗方面, 基因转染技术都起着非常重要的作用^[1]. 随着纳米技术的迅速发展, 将纳米技术与生物技术相结合, 构建生物功能化的纳米颗粒作为基因载体, 为基因转染技术的发展与应用带来了新的契机. 目前, 以无机材料制备的二氧化硅纳米颗粒(SiNPs)基因载体由于可重复合成, 稳定性好, 不仅可以抵抗体内各种酶的消化, 而且具有耐受高压灭菌等众多优点, 在基因转染的研究中受到了广泛关注^[2-6]. 但迄今报道的基于 SiNPs构建的基因载体在实际应用中尚存在一定的局限性, 如: SiNPs的合成时间长; 对 SiNPs进行氨基修饰程序复杂; SiNPs表面能大、易团聚以及操作条件要求高等. 同时, 由于 SiNPs基因载体的粒径太小, 不利于其携带的 DNA在细胞表面的富集, 对基因转染效率也有影响^[7]. 因此, 采用粒径稍大的几百个纳米大小的二氧化硅微颗粒, 选择简易的合成方法以及表面修饰方法, 有望获得更有实际应用价值的基因载体以及基因转染技术.

本文发展了一种基于二氧化硅微颗粒的快速、简便的基因载体制备新方法, 并以绿色荧光蛋白表达载体质粒 pEGFP为目标基因, COS-7细胞为靶细胞, 开展了基因转染应用, 获得了目标基因在靶细胞内的高水平表达.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

正硅酸乙酯 (TEOS)与多聚赖氨酸 (PLL) (Sigma公司); 其余试剂均为国产分析纯; 质粒 pEGFP与 COS-7细胞系由本实验室提供.

JEM-1230透射电子显微镜 (JEOL, 日本), LS-55荧光分光光度计 (Perkin Elmer美国), Malvern Zetasizer 3000HS分析仪 (Malvern, 英国), Nu-4750E CO₂培养箱 (NUAIR, 美国), BHC-1300 IIA/B3超净工作台 (中国苏净集团安泰公司), FACS Calibur流式细胞仪 (BD, 美国), E-600倒置荧光显微镜 (尼

收稿日期: 2005-05-25.

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (批准号: 20135010)、国家“九七三”计划项目 (批准号: 2002CB513100-10)、国家科技攻关计划项目 (批准号: 2003BA310A16)、国家科技发展规划项目 (批准号: 2003AA302250)、科技部国际合作重点项目 (批准号: 2003DF000039)及国家自然科学基金 (批准号: 20405005)资助.

联系人简介: 王柯敏 (1957年出生), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 从事生物与化学传感器及纳米尺度上的生物分析化学研究.

E-mail: knwang@hnu.cn

康, 日本).

1.2 实验过程

1.2.1 二氧化硅微颗粒的合成与形貌表征 二氧化硅微颗粒 (SMPs) 参照文献 [8] 方法合成, 在 5 mL 无水乙醇中加入适量的 TEOS 和氨水, 磁力搅拌 30 min 后离心收集颗粒, 并用丙酮、超纯水清洗颗粒数次. 取少量合成的颗粒置入无水乙醇中, 超声波分散 5 min 后, 滴样于镀碳的铜网上, 经自然干燥后, 用透射电子显微镜 (TEM) 对样品的形貌进行表征.

1.2.2 基于二氧化硅微颗粒的基因载体的制备及表面氨基分析 将 PLL、合成的 SMPs 分别分散于无血清培养基中后, 再将 PLL 与合成的 SMPs 溶液混合均匀, 于室温下共培育 5 min, 获得 PLL-SMPs 复合物即基因载体. 参照文献 [9] 方法, 用荧光胺实验对 PLL-SMPs 基因载体的表面氨基进行直接检测; 同时用 Malvern Zetasizer 3000HS 分析仪测定 PLL-SMPs 基因载体的 电位, 对载体的表面氨基进行间接分析, 均以 SMPs 作为对照.

1.2.3 PLL-SMPs 基因载体的 DNA 结合实验 将 PLL-SMPs 基因载体与质粒 DNA 共培育, 采用琼脂糖凝胶电泳考察其能否结合 DNA, 同时以 SMPs 作为对照.

1.2.4 PLL-SMPs 基因载体介导的基因转染实验 将生长良好的 COS-7 细胞以每孔 5.0×10^4 个细胞接种于 24 孔培养板中, 置于体积分数为 5% 的 CO_2 培养箱中于 37 下培养至细胞覆盖率达 50% ~ 70% 后, 转染质粒 pEGFP. 转染程序如下: 先将 PLL-SMPs 基因载体分散于无血清培养基中, 然后加入质粒 pEGFP 溶液, 于室温下共培育 5 min, 得 PLL-SMPs-DNA 复合物. 用无血清培养基漂洗细胞 2 次后, 将 PLL-SMPs-DNA 复合物溶液缓缓加入培养液中, 摇匀, 置于 37 培养箱中培养 4 h 后, 替换为含 10% 小牛血清的完全培养基, 继续培养 24 h 后, 检测转染结果. 采用倒置荧光显微镜进行观察拍照, 并采用流式细胞仪进行定量分析. 所有实验均重复 3 次, 同时以文献 [5] 方法合成的 PLL-SMPs 基因载体作为对照.

2 结果与讨论

2.1 二氧化硅微颗粒的大小形貌表征

利用 TEOS 在氨水的催化下于醇类环境中水解获得二氧化硅颗粒是制备 SMPs 的常用方法, 其粒径大小可根据氨水的用量以及醇环境的选择而控制. 该方法所需试剂种类少, 实验装置简单, 成本低, 操作容易, 周期短, 可大大缩短实验时间. 本文合成的 SMPs 颗粒为球形 (图 1), 大小在 550 nm 左右.

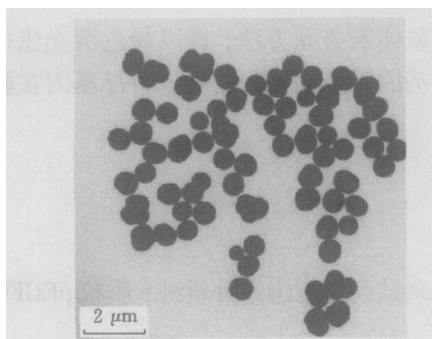


Fig 1 TEM image of SMPs

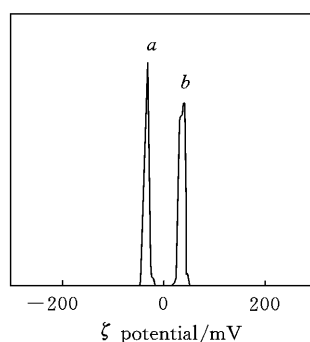


Fig 2 potentials of SMPs (a) and PLL-SMPs (b)

2.2 PLL-SMPs 基因载体的表面氨基分析

用荧光胺实验对 PLL-SMPs 的表面氨基进行了检测. 荧光胺的丙酮溶液本身并无荧光, 加入 SMPs 后也无荧光峰出现, 但是, 加入 PLL-SMPs 后, 在 470 nm 处出现明显的荧光峰, 表明 SMPs 颗粒已修饰上了富含氨基的 PLL 分子.

采用 Malvern Zetasizer 3000HS 分析仪检测 PLL-SMPs 的电位, 结果如图 2 所示. 在超纯水环境下, PLL-SMPs 的电位为 35.4 mV, 而同样条件下 SMPs 的电位为 -34.6 mV. 这是因为 SMPs 表面富含羟基基团, 在 pH 中性的环境下能产生净负电荷, 所以 电位为负值; 而当 SMPs 与 PLL 共培育后, 其表面修饰了富含带正电荷的氨基 PLL 分子, 因而形成的 PLL-SMPs 复合物的 电位为正值. 该

结果为 PLL-SMPs与带负电荷的 DNA 静电结合,从而为携带并传递 DNA 的载体提供了理论依据.

2.3 PLL-SMPs基因载体的 DNA 结合实验

图 3 为 PLL-SMPs基因载体的 DNA 结合实验结果,可见, PLL-SMPs已结合质粒 DNA,可成为有效的基因载体.在电泳过程中,自由的质粒 DNA 由于电压的作用会在凝胶中迁移(图 3 泳道 1);与 PLL-SMPs共培育的 DNA 因为吸附在 PLL-SMPs复合物上而与其一起滞留在点样孔中(图 3 泳道 3);而与 SMPs共培育的 DNA,由于不能被带负电荷的 SMPs结合,依然能在泳道中迁移(图 3 泳道 2).表明只有经过 PLL 修饰的 SMPs即 PLL-SMPs才具有结合 DNA 的能力.

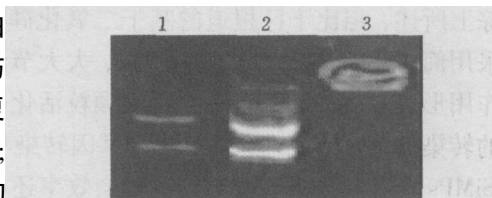


Fig 3 Agarose gel electrophoresis of plasmid DNA

1. Free; 2. incubated with SMPs; 3. incubated with PLL-SMPs

2.4 PLL-SMPs基因载体介导的基因转染

以 PLL-SMPs为基因载体,介导 pEGFP转染 COS-7细胞,其转染结果之荧光成像图如图 4 所示,可见,大量的细胞发绿色荧光,说明绿色荧光蛋白表达载体质粒 pEGFP已被导入细胞,并在细胞内合成了绿色荧光蛋白(GFP).图 4 中,细胞发出荧光的强弱有所不同,主要是因为细胞在表达 GFP 上存在时间差异.此结果表明所制备的 PLL-SMPs基因载体介导的基因转染成功有效.作为对照实验,以 PLL-SiNPs(为 60 nm 左右的球形颗粒,电位为 39.1 mV)作为基因载体的基因转染实验也是成功的,但是与 PLL-SMPs介导的基因转染相比,可观察到的发绿色荧光的细胞要少一些.

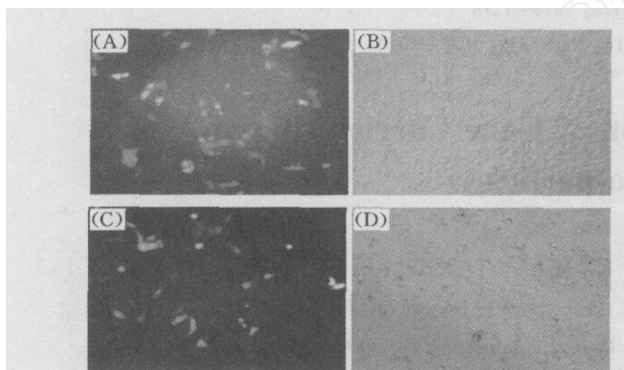


Fig. 4 Fluorescent(A, C) and optical(B, D) images of transfected COS-7 cells by PLL-SiMPs(A, B) and PLL-SiNPs(C, D)

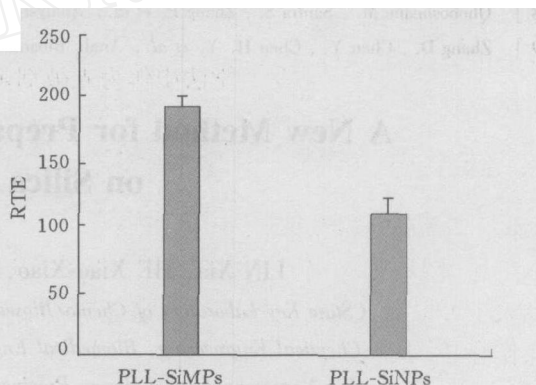


Fig. 5 Comparison between relative transfection efficiencies(RTE) of PLL-SiMPs and PLL-SiNPs

采用流式细胞仪更精确地比较了 PLL-SMPs与 PLL-SiNPs作为载体的优劣性.为扣除其它因素如质粒以及细胞等对转染效率的影响,以裸 DNA 的转染效率为参比,采用相对转染效率(Relative Transfection Efficiency, RTE)表示.图 5 结果表明, PLL-SMPs与 PLL-SiNPs获得的 RTE 分别为 191.00 ± 11.25 和 109.25 ± 16.50 .进一步表明, PLL-SMPs介导的基因转染效率明显优于 PLL-SiNPs,前者获得的转染效率约为后者的 1.7 倍.

2.5 PLL-SMPs基因载体的优势分析

考察了 PLL-SMPs基因载体制备的全过程,以分析其优势.在实验时间方面,从在反应瓶中添加反应试剂开始合成 SMPs算起,30 min 的合成时间加上颗粒洗涤的时间(可在 20 min 内完成),再加上硅颗粒与 PLL 共培育获得载体所需要的时间为 5 min,整个过程可在 1 h 内完成.不仅相比于 PLL-SiNPs 基因载体的制备^[5](至少需 2 d)有了根本性的改善,而且与其它方法获得氨基化 SiNPs 载体的制备方法^[2-4,6](1~2 d)相比,也大大缩短了时间.在反应试剂方面,制备 PLL-SMPs 基因载体所需试剂比文献报道的载体制备方法所需试剂种类少,如无需表面活性剂等,实验成本显著降低.在所需仪器方面,PLL-SMPs 基因载体所采用的是微颗粒,其粒径大于纳米颗粒,采用普通离心机,在较低的转速以及较短的时间内即可完成颗粒的收集与洗涤工作.对颗粒表面进行 PLL 修饰也是基于简单的静电吸

附原理,不需要额外的设备;而文献报道的方法不仅在纳米颗粒的收集方面需要昂贵的高速离心机,并且在颗粒表面修饰时还需要低温摇床或者旋转蒸发仪来完成,不但增加了仪器成本,而且实验步骤繁琐.此外,在转染效率方面,新方法获得转染效率明显高于文献[5]报道的方法.

综上所述,相比于已报道的基于二氧化硅颗粒的基因载体的制备方法,本文方法具有以下优势:

(1)采用简单易行的方法合成微颗粒,大大节约了实验时间和实验成本;(2)微颗粒与PLL通过静电吸引作用形成基因载体,省去复杂的颗粒活化以及修饰步骤,操作简便;(3)所获得的基因载体具有更高的转染效率.因此,本文方法在基因转染与基因治疗研究领域将具有较好的潜在应用价值.但是由于SMPs本身属于无机材料,其转染效率还有待于进一步提高,而且由于其不具有可降解性,其在细胞以及体内代谢的问题仍有待于深入研究.

参 考 文 献

- [1] LU Sheng-Dong(卢圣栋). *Current Experimental Technology for Molecular Biology*, 2nd Ed (现代分子生物学实验技术, 第二版) [M], Beijing: Publishing House of Peking Union Medical College, 1999: 392
- [2] He X. X., Wang K. M., Tan W. H. *et al.* *J. Am. Chem. Soc* [J], 2003, **125**: 7168—7169
- [3] He X. X., Wang K. M., Tan W. H. *et al.* *Chinese Sci Bull* [J], 2003, **48**(3): 223—228
- [4] Roy I., Ohulchansky T. Y., Bharali D. J. *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA* [J], 2005, **102**(2): 279—284
- [5] Zhu S. G., Lu H. B., Xiang J. J. *et al.* *Chinese Sci Bull* [J], 2002, **47**(8): 654—658
- [6] Kneuer C., Sameti M., Bakowsky U. *et al.* *Bioconjugate Chem.* [J], 2000, **11**: 926—932
- [7] Luo D., Saltzman W. M. *Nat Biotechnol* [J], 2000, **18**: 893—895
- [8] Qhobosheane M., Santra S., Zhang P. *et al.* *Analyst* [J], 2001, **126**: 1274—1278
- [9] Zhang D., Chen Y., Chen H. Y. *et al.* *Anal Bioanal Chem.* [J], 2004, **379**: 1025—1030

A New Method for Preparation of Gene Carriers Based on Silica Micro-particles

L N Xia, HE Xiao-Xiao, WANG Ke-Min^{*}, TAN Wei-Hong

(State Key Laboratory of Chemo/Biosensing and Chemometrics, College of Chemistry and Chemical Engineering, Biomedical Engineering Center, Engineering Research Center for Bio-Nanotechnology of Hunan Province, Hunan University, Changsha 410082, China)

Abstract A new method for the preparation of gene carriers based on silica micro-particles (SMPs) was reported. Silica micro-particles were synthesized by the hydrolysis of tetraethoxy-silane in ethanol and ammonia, and then modified with poly-L-lysine (PLL) molecules via the electrostatic interaction to form PLL-SMPs complexes as the gene carriers. These gene carriers can deliver pEGFP into COS-7 cells to accomplish GFP expression. This new method is simple and rapid and will be of great potential to be widely applied in gene transfection and gene therapy.

Keywords Silica micro-particle; Gene carrier; Poly-L-lysine

(Ed: K, G)