

# 外源基因转染真核细胞技术的研究进展

余祖华, 丁轲, 程朝, 张春杰, 李银聚, 吴庭才 (河南科技大学动物科技学院, 河南洛阳471003)

**摘要** 基因转染技术是将外源基因转染真核细胞的一种技术。对外源基因转染真核细胞的目的、意义、转染技术分类、方法及其应用等作一综述。

**关键词** 外源基因; 转染; 真核细胞

中图分类号 S188 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)21-08954-02

## Advances in Technology of Heterologous Genes Transfecting Eukaryotic Cells

YU Zu-hua et al (College of Animal Science and Technology, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471003)

**Abstract** Gene transfection was a technology of transfecting the exogenous genes into the eukaryotic cells. The purpose, significance, classification of transfection technique, methods and their application of transfecting the exogenous genes into the eukaryotic cells were summarized.

**Key words** Heterologous gene; Transfection; Eukaryotic cell

基因转染技术(Gene transfection, Gene transfer, Gene delivery)是采用一定的方法和途径将外源分子如DNA、RNA等导入特定的细胞,并表达目的基因,产生特定功能的蛋白质分子。它是基因功能研究、基因治疗、基因免疫的理论和基础,也是研究基因表达调控、突变分析等的常规工具。随着功能研究的兴起,基因转染技术的应用越来越广泛。

### 1 外源基因转染真核细胞的目的、意义

随着分子生物学技术的不断发展,在真核表达质粒的研究中,为便于检测目的基因的表达情况或研究外源基因的其他功能,常把真核表达质粒在体外转染到一些哺乳动物细胞,通过目的基因在体外培养细胞中的表达来研究其生物学功能。常用的表达系统主要分为两类:一类是采用真核表达载体转染DNA的瞬时表达系统或稳定表达系统;一类是采用病毒载体的表达系统。病毒载体虽然具有高转染率、能够持续、稳定表达外源基因的特点,但由于病毒载体需整合到转染细胞的染色体中才能够使外源基因得以表达,因此具有致癌、致畸的危险。安全性较差这一缺陷已成为限制病毒载体广泛应用的主要原因。真核表达质粒是一种核酸,它不同于病原体,在自然状态下没有感染性,以附加体的形式存在于被转染的靶细胞的胞体内,不被体外培养的细胞吸附,当细胞增殖时独立地表达外源基因。它不需要整合于转染细胞的染色体中,因而具有安全性高的优点。

### 2 常规转染技术分类

常规转染技术可分为两大类:一类是瞬时转染,一类是稳定转染(永久转染)。前者外源DNA/RNA不整合到宿主染色体中,因此一个宿主细胞中可存在多个拷贝数,产生高水平的表达,但通常只持续几天,多用于启动子和其他调控元件的分析。一般来说,超螺旋质粒DNA转染效率较高,在转染后24~96h内(依赖于各种不同的构建)分析结果,常常用到一些报告系统如荧光蛋白、 $\beta$ -半乳糖苷酶等来帮助检测。后者也称稳定转染,外源DNA既可以整合到宿主染色体中,也可能作为一种游离体(Episome)存在。尽管线性DNA比超螺旋DNA转入量低,但整合率高。外源DNA整合到染色体

中概率很小,通常需要通过一些选择性标记,如来氨丙基转移酶(APH,新霉素抗性基因)、潮霉素B磷酸转移酶(HPH)、胸苷激酶(TK)等反复筛选,得到稳定转染的同源细胞系。

### 3 外源基因转染真核细胞的方法

为研究真核表达质粒在真核细胞中的生物学特性,人们一直研究传送质粒DNA的有效途径。目前转染方法除病毒载体外,已经发现多种传递质粒DNA的有效方法,主要有磷酸钙共沉法,DEAE-葡萄糖法,脂质体转染法,电穿孔法及基因枪轰击法等<sup>[1]</sup>。

**3.1 磷酸钙法转染** 其原理是把含基因DNA的质粒或已克隆化的基因作为转染物,与磷酸钙转染液混合,加入到被转染的培养细胞环境中,在磷酸钙转染液的媒介下能使转染的DNA被整合到受体细胞的基因组中。磷酸钙法转染细胞简单、实用,但有一定的局限性,对细胞有一定的选择性,平均每个培养皿中约有10%的细胞捕获了外源转染DNA。影响磷酸钙转染效率的主要因素有:DNA-磷酸钙共沉淀物中DNA的数量,共沉淀物与细胞接触的保温时间,以及甘油或DMSO等促进因子作用的持续时间等。一般说来,在磷酸钙转染实验中,使用高浓度的DNA(10~50  $\mu\text{g/ml}$ )。在共沉淀物中,DNA的总浓度会显著地影响细胞对DNA的捕获效率。据推测,这很可能是因为DNA总量影响了磷酸钙沉淀物的性质,从而改变了可被细胞捕获的外源DNA的比例。Graham于1973年首先提出了在中性条件下形成磷酸钙沉淀物的最佳钙离子浓度(125  $\text{mmol/L}$ )和DNA浓度(5~30  $\mu\text{g/ml}$ ),并确定了沉淀反应的最佳时间(20~30  $\text{min}$ )和随后细胞在沉淀物中的最佳暴露时间(5~24  $\text{h}$ )。

**3.2 DEAE-葡聚糖介导法转染** 该方法最初是用来促进脊髓灰质炎病毒、SV40和多瘤病毒导入细胞的。其原理是带正电的DEAE-葡聚糖与核酸带负电的磷酸骨架相互作用形成的复合物被细胞内吞。其方法是先制备出葡聚糖混合液,加入目的基因混合后转染入培养细胞。该方法转染效率较高,但突变性也较高,不适用分离稳定的转染细胞。DEAE-葡聚糖用于克隆基因的瞬时表达,不能使细胞稳定转染,它对BSC1、CV-1、COS等细胞系非常有效,但对其他类型的细胞转染效果不太理想。DEAE-葡聚糖转染所用DNA量较磷酸钙法少,0.1~1.0  $\mu\text{g}$ 超螺旋质粒DNA可以转染 $10^5$ 猿细胞,DNA量增多(大于2  $\mu\text{g}$ )反而会抑制转染。影响转染效率

基金项目 河南科技大学青年基金项目(NO2006QN003)。

作者简介 余祖华(1977-),女,河南信阳人,硕士,讲师,从事动物传染病与免疫学研究。

收稿日期 2008-03-31

的因素主要有: DEAE-葡聚糖的浓度及作用于细胞的时间。可以用相对高浓度(1 ng/ml)短时间(0.5~1.5 h)作用细胞或用低浓度(250 μg/ml)长时间(直至8 h)作用细胞。促进剂。利用促进剂如DMSO、氯、甘油、聚乙胺或其他增加细胞渗透性、促进内吞作用的物质处理细胞,DEAE介导的瞬时转染效率可提高50倍,但是不同细胞系对促进剂与DEAE-葡聚糖复合物的敏感度有很大的不同。

**3.3 脂质体介导的基因转染** 脂质体是由天然脂类和类固醇组成的微球,根据其结构所包含的双层膜层数可分为单室脂质体和多室脂质体,含有1层类脂双分子层的囊泡称单室脂质体,含有多层类脂双分子层的囊泡称为多室脂质体。脂质体转染法可能的机理是阳离子脂质体与带负电的基因借静电作用形成脂质体基因复合物,此复合物因阳离子脂质体的过剩正电荷而带正电,借助静电作用吸附与带负电的细胞表面,再通过与细胞膜融合或细胞内吞作用而进入细胞内;脂质体基因复合物在细胞质中可能进一步传递到细胞核内释放基因,并在细胞内获得表达<sup>[2]</sup>。

脂质体介导的基因转移包括两个步骤,首先是脂质体与DNA形成复合物,然后介导与细胞作用,将DNA释放到细胞中。脂质体介导基因转移的机理可能存在两种模式:细胞内吞作用介导的脂质体-细胞融合<sup>[3]</sup>;脂质体与质膜直接融合。脂质体作为基因转移载体具有以下优点:易于制备,使用方便,不需要特殊的仪器设备;无毒;与生物膜有较大的相似性和相容性,可生物降解;目的基因容量大,可将DNA特异性传递到靶细胞中,使外源基因在体外细胞中有效表达。但也存在不足:表达量较低,持续时间较短,稳定性欠佳。脂质体转染所需的DNA用量与磷酸钙法相比大为减少,而转染效率却高5~100倍,具有广谱、高效、快速转染的特点。

**3.4 电穿孔法转染** 电穿孔(Electroporation)是指在高压脉冲的作用下使细胞膜上出现微小的孔洞,从而导致不同细胞之间的原生质膜发生融合作用的细胞生物学过程。同时,电穿孔可促使细胞吸收外界环境中的DNA分子。在高压电场的作用下,细胞膜因发生临时性破裂所形成的微孔,可使大分子及小分子从外界进入细胞内部,或反向流出细胞。细胞膜上微孔的关闭是一种衰减过程,此过程在0下会被延缓进行。微孔开启时,细胞外的DNA分子便穿孔而入,最终进入细胞核内部。具有游离末端的线性DNA分子,易于发生重组,因而更容易整合到寄主染色体,形成永久性转化子。超螺旋的DNA比较容易被包装进染色质,对于瞬时基因表达更有效。该方法的主要特点是操作简便、持续时间短、转染率高<sup>[4]</sup>。

影响电穿孔转染效率和存活效率的主要因素是脉冲的最大电压、电容、持续时间,电转液的温度与组成,DNA浓度,所用的细胞类型与数量,因此当转染不同细胞时须进行个别优化,最后得到最佳的转染条件。周智等对重组质粒电穿孔转染条件进行了探讨,结果表明,低电压(200~300 V),高电容(900~1 000 μF)能高效转染实验所用真核细胞<sup>[4]</sup>。陈枫等用电穿孔法将HBV-前C区反义基因真核表达质粒转染2.2.15细胞时发现:在电压210 V,电容975 μF,温度4℃,DNA

终浓度0.125~0.750 μg/μl时,细胞转染生长情况最佳<sup>[5]</sup>。

**3.5 基因枪法转染** 基因枪技术最早是一种在植物中应用的基因转移方法<sup>[6]</sup>,这项技术通过提供给包裹有DNA的微小金颗粒(或钨粉)很高的初速度,使其穿透植物细胞壁而达到转移外源质粒子DNA的目的。由于纯金没有化学活性,不会对机体产生毒性,所以这项技术后来被用到哺乳动物类实验系统中。研究者们用基因枪把报告基因和功能基因成功地转入了各种培养细胞中和各种活体组织中。基因枪技术作为转移基因的一种方式,具有以下优点:技术很简单,能够迅速、方便地转移基因;对靶细胞几乎没有要求;对基因的大小要求不严格,大大拓宽了可转移基因的范围;容易获得高水平的多基因共转移;安全性很高;可以获得持续时间较长的瞬时表达。

不同细胞所需粒子直径不同,范围从适于细胞器的0.6 μm至适于哺乳动物细胞的1.6 μm。一般用金或钨制作的粒子将DNA导入细胞,钨粒子大小不规则,对某些细胞有毒性,而且易于氧化,容易导致DNA降解。金的毒性较小,延展性好,易于制备适当直径的规则粒子。但与钨相比,金与DNA结合率低,而且费用较贵。

总之,外源基因的转染效率受多种因素影响,主要有细胞培养物、血清、载体构建、DNA质量、转染技术等,因此如要获得成功的转染并得到较高的转染效率应从多方面考虑,以获得较好的实验结果。

#### 4 外源基因转染真核细胞的应用研究

随着基因功能、基因治疗、基因免疫的理论和基础不断发展,将外源基因转染真核细胞技术的应用将越来越广泛。比如在核酸疫苗研究方面,研究人员首先将重组质粒体转染于哺乳动物细胞中,以验证目的基因是否表达,检测表达产物的活性,从而为核酸疫苗的进一步的动物实验提供依据。彭大新等提取马立克氏病病毒(MDV) Rspense株感染的鸡胚成纤维细胞(CEF)总DNA,运用磷酸钙-DNA沉淀转染CEF,成功地得到MDV的病变空斑<sup>[7]</sup>。张婷婷等采用DEAE-葡聚糖法将构建的编码肾综合症出血热病毒核蛋白基因的真核表达载体pEF-BOS/HIV-NP瞬时转染NH373细胞,在转染后24 h检测到表达的蛋白<sup>[8]</sup>。姚为民等成功构建了狂犬病病毒糖蛋白真核表达载体pcDNA3.1(A)/G,采用脂质体法转染COS7细胞后,在COS7细胞中检测到狂犬病病毒糖蛋白的表达<sup>[9]</sup>。顾炳泉等将构建的马冠状病毒核衣壳蛋白基因片段重组质粒pGEX-ECV-N亚克隆到的杆状病毒转移载体pFastBac1,获得重组穿梭质粒Bacmid-ECV-N,然后用脂质体法转染Sf9昆虫细胞,结果ECV-N在Sf9细胞中得到了很好的表达<sup>[10]</sup>。胡永轩等将构建日本血吸虫组织蛋白酶B肽链内切酶基因重组体pcDNA3.1(+)/Sjcb2用电穿孔法转染HeLa细胞,免疫细胞化学检测其能在HeLa细胞浆内表达<sup>[11]</sup>。

#### 5 小总

随着分子生物学研究的不断进步,外源基因转染真核细胞的转染技术将被广泛应用。如果选择较好的转染技术,对条件进行优化,将会得到较高的转染效率。相信随着科学技

淡水中微生物的可培养性约为0.25%，土壤约为0.3%，活性污泥为1%~15%左右<sup>[14]</sup>。1993年 Myzer 等首次将 DGGE 用于微生物生态学研究，使我们对复杂环境微生物信息的了解变得更加丰富和准确。同传统的分离培养方法相比可以不经培养直接对环境样品进行分析，能检测到难以培养或者无法培养的细菌<sup>[15]</sup>。Omar 等证实 PCR DGGE 技术检测极限约为1%~3%，避免了因为培养基的局限性以及人为主观性造成微生物多样性信息的损失<sup>[16]</sup>。

环境样品细菌 DNA 的提取产物往往伴随有大量的腐殖酸、有机物等对 PCR 反应有强烈抑制作用的物质，极大地影响后续实验的推进。该试验在基因组 DNA 提取之前对原始样品进行3次清洗，发现经过清洗的样品  $A_{260}/A_{230}$  (核酸/腐殖质) 比值明显大于未经处理过的样品， $A_{260}/A_{230}$  (核酸/腐殖质) 比值反映了样品中 DNA 和腐殖质的相对含量，比值越大说明 DNA 含量越大，纯度越高。

笔者采用 PCR DGGE 的方法研究了生物基载体经过吸附作用在其表面形成的生物膜同水体之间微生物多样性的差异。由于生物基载体具备可供附着的栖息环境，水体中一部分营附着生活的细菌逐渐在生物膜上形成优势种群。通过动态观察生物膜和水体细菌的多样性变化发现，生物膜上出现了难以在水体中形成优势种群的细菌，表现为水体总的微生物多样性增加。试验结果表明，膜样品中大多数条带也平行地出现在水样的泳道上，这可能是由于生物膜上的微生物种群全部来源于水体，所以在膜上出现的细菌种群在水体样品中均可找到其来源。图6中水体和膜微生物多样性指数在整个试验过程中变化明显。最初膜微生物多样性指数维持在3.4的水平高于水体指数，在第8~17天时随着优势种群的形成，同时部分微生物逐渐消失，此时的膜微生物指数呈下降趋势并且低于水体指数。但随着微生物膜的逐渐成熟和微生物群落的稳定，生物膜上微生物多样性呈高于水体微生物多样性的态势。通过对膜样品中出现的优势条带进行回收和测序，结果显示假单胞菌属和其他2种未经命名的菌种，其相似性均在90%以上。试验期间正值水体出现大量死亡蓝藻，水体污浊、透明度较低，加之水温较高进一步促进了有机物的腐败，给水环境中致病微生物提供了良好的生长条件。对水样出现的特异性条带进行测序分析发现，与弧菌属和爱德华菌属相似性分别为87%和94%，粗略指示了水环境中的优势菌群。从电泳图谱反映的优势菌种数来看，与

罗鹏等<sup>[17]</sup>在凡纳滨对虾咸淡水养殖系统内细菌群落组成的研究中提到的任何环境中的优势种群都十分明显约为2~4种的结论一致。生物基和水体优势种群的分化说明了利用生物基载体在吸附微生物、改善池塘生物多样性方面起到了一定的作用。生物基载体在吸附细菌的同时也为原生动物、藻类等大型水生动植物提供了栖息和觅食的场所，多元的物种可以有效地防止单一种群爆发成为养殖环境里的优势群体，减少由于环境的剧变导致养殖突发性病害的产生。

#### 参考文献

- [1] 李秋芬,曲克明,幸福言,等. 虾池环境生物修复作用菌的分离与筛选[J]. 应用与环境生物学报,2001,7(3):281-285.
- [2] DUBEY S K,TRIPATHI A K,UPADHYAY S N. Exploration of soil bacterial communities for their potential as bioresource[J]. Bioresource Technology, 2006,97:2217-2224.
- [3] 王象设. 池塘生态若干问题的探讨[J]. 浙江水产学院学报,1997,16(1):55-59.
- [4] 颜庆云,余育和,冯伟松,等. 洞庭湖浮游生物群落DNA指纹与理化因子的关系[J]. 水生生物学报,2005,29(6):601-606.
- [5] 王亚军,林文辉,吴淑勤,等. 鳊塘水质与原生动物群落多样性关系的初步研究[J]. 水产学报,2006,30(1):69-75.
- [6] ZHOU J, BRUNS MA, TIEDJE J M. DNA recovery from soils of diverse composition[J]. Applied and Environmental Microbiology,1996,62(2):316-332.
- [7] EMILIE LYAUTEY, BENEDICTE LACOSTE, LOIC TEN HAGE. Analysis of bacterial diversity in river biofilms using 16S rDNA PCR-DGGE: Methodological settings and fingerprints interpretation[J]. Water Research,2005,39:380-388.
- [8] 何丽明,李志勇,蒋群,等. 海绵中可培养与原位微生物组成的 DGGE 指纹分析[J]. 微生物学通报,2005,32(3):51-56.
- [9] 罗海峰,齐鸿雁,薛凯,等. 在 PCR-DGGE 研究土壤微生物多样性中应用 GC 发卡结构的效应[J]. 生态学报,2003,23(10):2170-2175.
- [10] 方卫国,韦宇拓,裴炎. 一种新的 DNA 银染方法[J]. 遗传,2000,22(3):167-168.
- [11] 金则新. 浙江天台山甜槠群落物种多样性研究[J]. 云南植物研究,1999,21(3):296-302.
- [12] 赵兴青,杨柳燕,陈灿,等. PCR-DGGE 技术用于湖泊沉积物中微生物群落结构多样性研究[J]. 生态学报,2006,26(1):3610-3616.
- [13] 叶姜瑜,罗国源. 微生物可培养性低的生态学释因与对策[J]. 微生物学报,2005,45(3):478-482.
- [14] AMANN R, LUDWIG W, SCHLEIFER K H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation[J]. Microbiol Rev,1995,59:143-169.
- [15] MYZER G, WAAL E C, UTTERLINDEN A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16S rRNA[J]. Appl Environ Microbiol,1993,59(3):695-700.
- [16] OMAR NB, AMPE F. Microbial community dynamics during production of the nixican fermented maize dough P<sub>0-201</sub>[J]. Appl Environ Microbiol,2000,66:3664-3673.
- [17] 罗鹏,胡超群,谢珍玉,等. 凡纳滨对虾咸淡水养殖系统内细菌群落组成的 PCR-DGGE 分析[J]. 热带海洋学报,2006,25(2):49-53.

(上接第8955页)

术的不断发展,外源基因转染真核细胞技术在基因和蛋白质功能研究方面将会发挥重要的作用。

#### 参考文献

- [1] 吴乃虎. 基因工程原理[M]. 北京:科学出版社,2001.
- [2] 袁仕善,周智广. 阳离子脂质体与基因转移[J]. 生理科学进展,1997,28(2):163-165.
- [3] WROBEL I, COLLINS D. Fusion of cationic liposomes with mammalian cells occurs after endocytosis[J]. Biochim Biophys Acta,1995,1235(2):296-304.
- [4] 周智,张定风,任红. 重组质粒电穿孔转染条件探讨[J]. 重庆医科大学学报,1999,24(2):130-132.
- [5] 陈枫,钟森,王明勇,等. HBV-前C区反义基因真核表达重组质粒电穿孔转染2.2.15细胞转化方案的优化[J]. 泸州医学院学报,2000,2

(4):267-270.

- [6] KLINT M, FROMM M, WEISSINGER A, et al. Transfer of foreign genes into intact maize cells with high velocity microprojectiles[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998,95(10):4305-4306.
- [7] 彭大新,刘秀梵,张如宽,等. 磷酸钙介导马立克氏病病毒 DNA 转染鸡胚成纤维细胞[J]. 中国兽医科技,1996,26(11):16-17.
- [8] 张婷婷,朱勇,金伯泉,等. HFRSV 核蛋白 pEF-BCS 真核表达载体的构建及表达[J]. 细胞与分子免疫学杂志,1998,14(2):99-101.
- [9] 姚为民,舒适,周华,等. 狂犬病病毒糖蛋白真核表达载体的构建及其在 COS7 细胞中的表达[J]. 中国生物制品学杂志,2007,20(9):656-657.
- [10] 顾炳泉,彭志生,张敬友,等. 马冠状病毒核衣壳蛋白基因片段的克隆及其表达[J]. 检验检疫科学,2007,17(3):3-5.
- [11] 胡永轩,肖建华,黄家芳,等. S<sub>2</sub> DNA 疫苗的构建及其在 HeLa 细胞中的表达[J]. 中国寄生虫病防治杂志,2006,24(5):385-386.