

影响生长抑素重组质粒 pEGS/2SS 转染 HeLa 细胞效果的因素研究

何晓红^{1,4}, 曹少先², 茆达干¹, 杨利国^{3*}

(1. 南京农业大学动物科技学院, 南京 210095; 2. 江苏省农业科学院畜牧研究所, 南京 210014;
3. 华中农业大学动物科技学院, 武汉 430070; 4. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100193)

摘要: 旨在分析生长抑素重组质粒 pEGS/2SS 转染 HeLa 细胞(人宫颈癌上皮细胞)转染效果的影响因素, 探讨最佳转染条件, 为进一步研究生长抑素基因疫苗的作用机制和作用效果奠定基础。以脂质体转染法将带有绿色荧光蛋白(GFP)报告基因的重组质粒 pEGS/2SS 转染 HeLa 细胞, 探讨质粒转染 HeLa 细胞最佳条件的 4 个参数: 质粒 DNA 剂量、脂质体剂量、最佳转染时间和质粒提取方法, 在荧光显微镜下观察细胞转染情况并计算转染率。结果: 在六孔细胞培养板上, 当 DNA/脂质体剂量为 1 μ g/6 μ g 时, 转染效率最高, 在转染后 72 h 达到 34.02%; 当用 Plasmid Maxi Kit 试剂盒提取质粒, 转染时间为 48 h, 转染效率最高, 达到 17.88%。重组质粒 pEGS/2SS 转染 HeLa 细胞条件是: 采用试剂盒(Plasmid Maxi Kit)提取的质粒, DNA 和脂质体的剂量分别为 1 μ g 与 6 μ g, 转染时间 48 h, 此时的转染效率最高, 达 17.88%。

关键词: 脂质体; HeLa 细胞; 生长抑素重组质粒 pEGS/2SS

中图分类号: S813.1; Q343

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2010)03-0279-07

Transient Transfection Factors for Expression of Recombinant Somatostatin Plasmid pEGS/2SS in Cultured HeLa Cells

HE Xiao-hong^{1,4}, CAO Shao-xian², MAO Da-gan¹, YANG Li-guo^{3*}

(1. College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, NanJing 210095, China; 2. Institute of Animal Science, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 3. College of Animal Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; 4. Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract: We aimed to investigate the factors infecting transfection efficiency of somatostatin recombinant plasmid pEGS/2SS introducing into HeLa cells, make preparations for advanced study on somatostatin gene vaccine mechanism and effect of action. Four parameters including transfection reagent (lipofectamineTM) concentration, DNA concentration, cells cultured time after transfection and DNA extracting techniques were analyzed and optimized, and transfection efficiency was evaluated by the percentage of transfected cells with green fluorescence under fluorescence microscope. Based on the optimized lipofectamineTM and DNA concentration, 34.02% transfected HeLa cells could express green fluorescence 72 h after transfection when the concentration of lipofectamineTM and DNA was individually 6 μ g and 1 μ g; Based on the optimized cells cultured time after transfection and DNA extracting techniques, 17.88% transfected HeLa cells

收稿日期: 2008-11-25

基金项目: 国家自然科学基金(30771549)

作者简介: 何晓红(1979-), 女, 黑龙江肇东人, 助理研究员, 硕士, 主要从事动物遗传资源与生物技术研究, 现于中国农业科学院北京畜牧兽医研究所工作, Tel: 010-62815884, E-mail: xhhe@iascaas.net.cn

* 通讯作者: 杨利国, 教授, 博导, 主要从事动物繁育与生物技术研究, Tel: 027-87281813, E-mail: yangliguo2006@yahoo.com.cn

could express green fluorescence protein with Plasmid Maxi Kit extracting DNA 48 h after transfection. Optimal transfection conditions were determined with four parameters, 17.88% HeLa cells could express green fluorescence protein with Plasmid Maxi Kit extracting DNA, 1 μ g DNA and 6 μ g lipofectamineTM 48 h after transfection.

Key words: liposome; HeLa cells; somatostatin recombinant plasmid pEGS/2SS

基因疫苗的发现被称为第3次疫苗革命,可以有效地刺激机体产生特异的体液和细胞免疫反应,已经成为免疫学研究的热点之一^[1-3]。近几年,畜牧业上以促进动物生长和繁殖为目的的基因疫苗研究也逐渐成为研究热点^[4-10]。与传统的疫苗相比,基因疫苗具有省时、省力、成本低等优点,且免疫效果可以在动物体内持续较长一段时间,是一种很有潜力的新型疫苗^[11]。目前,国外关于生长抑素(Somatostatin SS)的研究主要集中在基因治疗^[12-15]和SS通过膜受体产生作用的机理上^[16-17],国内有关生长抑素的基因工程苗主要有大肠杆菌中表达的亚单位苗^[18-19]和痘苗病毒表达的活载体苗^[20]等。真核细胞表达的基因疫苗——重组质粒 pEGS/2SS 是由本实验室构建的^[21],它带有生长抑素基因、乙肝表面抗原 S 基因以及绿色荧光蛋白(GFP)报告基因序列,免疫动物可促进其生长。

一般认为基因疫苗的作用机理是:注入的外源基因被周围的组织细胞、APC 细胞(Antigen presenting cells, 抗原递呈细胞)或其他炎症细胞摄取,在外源基因携带的启动子作用下表达外源基因,诱导机体产生细胞免疫和体液免疫^[22],但确切的作用机理目前还并不十分清楚^[23]。将外源基因导入真核细胞是研究外源基因功能及其调控的有效方法,已成为基因治疗^[12,24]、基因疫苗构建^[25-26]及转基因动物生产研究^[27-28]中必要的步骤。然而,很多研究发现转染效率低是制约研究的重要因素,在瞬时表达系统中,外源基因的高效表达可以有效地掩盖内源性表达的干扰,从而有利于研究或观察外源基因表达产物的功能。因此,尽可能提高转染效率是试验成功的关键^[29]。

将 DNA 导入哺乳动物细胞的方法有磷酸钙沉淀法^[30-32]、DEAE-葡聚糖法^[33-34]、电穿孔法^[35-36]及脂质体转染法^[37-38]。前两种方法操作繁琐,转染率低,电穿孔法需要特殊仪器,脂质体法操作简便,可获得满意的转染率,由于近年其产品不断更新、转染效率不断提高及细胞毒性日益减少,越来越受到人们的欢迎^[39]。本研究以 HeLa 细胞作为转染的受

体细胞,采用脂质体转染法,旨在从质粒 DNA 剂量、脂质体剂量、转染时间和质粒提取方法 4 个参数优化生长抑素重组质粒 pEGS/2SS 转染 HeLa 细胞的转染条件,为下一步将质粒 pEGS/2SS 导入目的细胞,探讨生长抑素重组质粒的作用机制和作用效果奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要仪器

MC-15A 型 SANYO 二氧化碳培养箱(日本), 37XA2 倒置显微镜(上海光学仪器厂), 301-185 型 Leica 倒置荧光显微镜(德国), S45 型 Canon Powershot 数码相机(日本)。

1.2 主要试剂

生长抑素重组质粒 pEGS/2SS 由本实验室构建, HeLa 细胞和 DH 5 α 细菌由本实验室保存, 脂质体 lipofectamineTM (2 mg \cdot mL⁻¹) 购自 Invitrogen 公司, 去内毒素质粒抽提试剂盒(3SHL Spin Column Plasmid Maxi-prep Kit V4) 购自申能博彩生物科技有限公司, 大量质粒抽提试剂盒(Plasmid Maxi Kit) 购自上海华舜生物工程有限公司。

1.3 4 种质粒 DNA 抽提方法

比较质粒抽提试剂盒 3SHL Spin Column Plasmid Maxi-prep Kit V4(能去除大肠杆菌分泌的内毒素, 简称方法 1)、试剂盒 Plasmid Maxi Kit(不能去除大肠杆菌分泌的内毒素, 简称方法 2)、试剂盒 Plasmid Maxi Kit 抽提后用酚/氯仿提纯(简称方法 3)以及 SDS 裂解法(简称方法 4)这 4 种质粒抽提方法对转染效果的影响, 抽提的质粒都用分子克隆方法^[40]进行纯化。

1.4 细胞培养

将冻存的 HeLa 细胞从液氮中取出, 于室温解冻, 迅速加入 37 $^{\circ}$ C 含 10% 血清的培养液, 移液器轻轻吹散细胞, 于离心机中离心, 去上清, 用培养液将细胞再洗一遍, 于含 10% 血清的 1640 生长培养基中, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ (体积分数) 的培养箱中培养。

1.5 试验设计与分组

1.5.1 DNA 和脂质体对转染效率的影响 试剂盒 1 抽提质粒 DNA,DNA 3 个剂量:0.5、1.0、2.0 μg ,脂质体 3 个剂量:2、4、6 μg ,按两因素(3 \times 3)析因试验设计,共 9 组,每组试验 3 个重复孔,转染 72 h 检测细胞转染率。

1.5.2 质粒 pEGS/2SS 转染 HeLa 细胞的最佳转染时间和质粒提取方法 分别用方法 1~4 这 4 种质粒抽提方法制备的 DNA 1 μg 与 6 μg 脂质体转染 HeLa 细胞,每个试验组 3 个重复孔,于 24、48、72 h 检测 4 种方法提取质粒的转染效率。

1.6 细胞转染分组及步骤

① 按 LipofectamineTM 试剂说明,将 1×10^5 HeLa 细胞接种于六孔细胞培养板,培养 24~48 h,待细胞生长至 60%~70% 汇合时,用无血清 1640 培养液洗细胞 2 次,每孔加 800 μL 无血清 1640 培养液。②将适量 DNA 及脂质体分别溶于 100 μL 的无血清 1640 培养液中,将两者混匀,室温放置 20 min,加入培养板,37 $^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 (100%湿度)培养 5 h。③将培养液换成含 10% 血清的 1640 培养液,继续培养。④转染后 72 h 荧光显微镜下计算转染率。

1.7 转染率计算

在荧光显微镜下,在可见光先固定一个视野,记总细胞数,然后换成荧光计数能发出绿色荧光的细胞,以能发出绿色荧光的细胞数除以总细胞数为转染效率。

转染率(%)=发出荧光细胞数/细胞总数 \times 100%

表 1 不同剂量 DNA 和脂质体转染 HeLa 细胞后 72 h 细胞转染率

Table 1 Different transfection efficiency of HeLa cells with different concentration of plasmid pEGS/2SS and LipofectamineTM seventy-two hours after transfection ($\bar{x} \pm \text{SD}$)

脂质体剂量/ μg Volume of plasmid used	DNA 剂量/ μg Amount of DNA	转染率/% Transfection efficiency	P 值 P value
2	0.5	10.72 \pm 2.54	0.000 1**
	1	7.97 \pm 5.25	
	2	4.73 \pm 1.77	
4	0.5	14.82 \pm 5.07	
	1	14.80 \pm 1.86	
	2	15.27 \pm 3.63	
6	0.5	14.60 \pm 3.63	
	1	34.02 \pm 8.28	
	2	24.85 \pm 5.03	
2		7.81 \pm 4.16 ^C	0.002 1**
4		14.96 \pm 3.54 ^B	
6		24.49 \pm 9.90 ^A	
	0.5	13.38 \pm 4.13 ^B	0.000 1**
	1	18.93 \pm 12.57 ^A	
	2	14.95 \pm 9.15 ^B	
两因子互作			0.000 1**

同行肩标字母不同表示差异显著($P<0.05$)。*, $P<0.05$; **, $P<0.01$ 。下同

Values with different superscripts in the same row are significantly different($P<0.05$). *, $P<0.05$; **, $P<0.01$. The same as below

1.8 统计分析

应用 SAS 软件进行两因子方差分析,用 DUN-CAN 法进行多重比较。

2 结果

转染后 12 h 开始,在荧光显微镜下陆续观察到发出绿色荧光的细胞,48 h 后,发出绿色荧光的细胞数量最多(图 1),而对照组未发现发出绿色荧光的细胞。

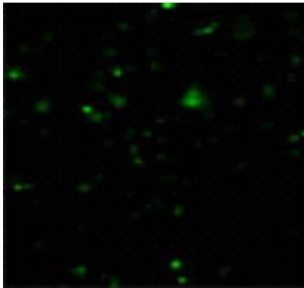


图 1 1 μg pEGS/2SS 和 6 μg 脂质体转染 HeLa 细胞后 48 h 细胞荧光照片(200 \times)

Fig. 1 Fluorescence photo of HeLa cells transfected with 1 μg plasmid pEGS/2SS and 6 μg LipofectamineTM forty-eight hours after transfection (200 \times)

2.1 质粒 DNA 和脂质体剂量对转染效率的影响

两因子方差分析(3 \times 3)结果表明:不同剂量的 DNA 和脂质体对 HeLa 细胞的转染率有极显著影响($P<0.01$, $P<0.01$)。两者之间存在互作($P<0.01$),如表 1。

表 2 不同质粒提取方法和转染时间条件下 HeLa 细胞转染率($\bar{x}\pm SD$, $n=6$)

Table 2 Different transfection efficiency of Hela cells with four plasmid DNA extracting methods twenty-four, forty-eight and ninety-six hours after transfection ($\bar{x}\pm SD$, $n=6$)

方法 Method	转染时间/h Transfection time	转染率/% Transfection efficiency	P 值 P value
1	24	8.10±3.44	0.161 7
	48	8.77±2.40	
	96	9.53±2.24	
2	24	8.67±3.11	
	48	17.88±8.60	
	96	8.20±3.28	
3	24	10.47±2.16	
	48	14.14±4.43	
	96	7.83±2.22	
4	24	11.78±3.97	
	48	10.85±4.57	
	96	11.82±4.54	
1		8.80±2.65	0.007 1**
2		11.58±6.99	
3		10.81±3.96	
4		11.48±4.13	
两因子交互	24	9.57±3.37 ^B	0.012 4*
	48	12.91±6.21 ^A	
	96	9.35±3.39 ^B	

不同 DNA 剂量组之间的多重比较发现,DNA 剂量为 1 μg 组细胞转染率显著高于 0.5 和 2.0 μg 转染组。不同脂质体剂量组之间的多重比较发现,转染率随脂质体剂量增高而增大,4 和 6 μg 组转染率显著高于 2 μg 组。6 μg 转染组显著高于 4 μg 组,此时细胞的转染率最高。由上可知,当脂质体/DNA 剂量为 6 μg /1 μg 时,HeLa 细胞的转染率最高,达到 34.02%。

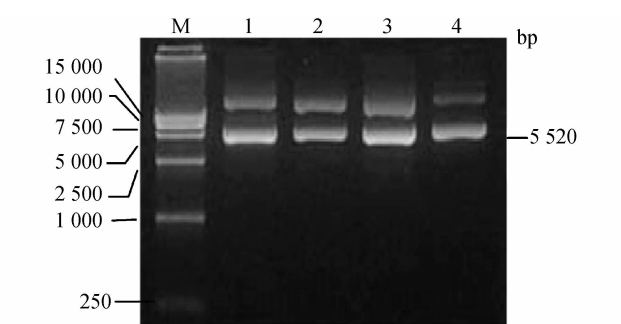
2.2 转染时间和质粒提取方法对转染效果的影响

2.2.1 质粒 DNA 提取物纯度 应用电泳方法分析提取纯化后的质粒 DNA,发现泳道 1、2、3、4 的分子量在 5 000~7 500 bp,大约 5 500 bp,证明提取到的是目的质粒。4 种质粒抽提方法提取的 DNA 没有明显的基因组 DNA 污染(图 2)。

2.2.2 质粒提取纯化方法对转染效率的影响 两因子方差分析(3×4)结果表明:不同转染时间对细胞的转染率有极显著影响($P<0.01$)。不同质粒提取方法对细胞的转染率没有显著影响($P>0.05$),转染时间和质粒提取方法间存在互作($P<0.05$)。

不同转染时间组之间的多重比较发现,48 h 转染组的细胞转染率显著高于 24 和 96 h 转染组。不同质粒提取方法组之间的多重比较发现,按转染率由大到小排列,各种方法分别为:方法 2、方法 4、方法 3、方法 1,转染率分别为:11.58%、11.48%、10.81%、8.80%,各组间差异不显著。综合分析认

为,用方法 2 提取的质粒,转染 48 h 后 HeLa 细胞的转染率最高,达到 17.88%。



1. 去除内毒素试剂盒提取的质粒;2. 含内毒素质粒抽提试剂盒提取,再用酚抽提的质粒;3. 含内毒素质粒提取试剂盒提取的质粒;4. 分子克隆方法提取的质粒;M. DL15000 Marker

1. DNA extracted with 3SHL High pure plasmid Maxi-Prep Kit V4; 2. DNA extracted with Plasmid Maxi Kit then purifying with phenol/chloroform; 3. DNA extracted with Plasmid Maxi Kit; 4. DNA extracted by molecule clone techniques; M. Marker(DL15000)

图 2 不同抽提方法提取质粒 pEGS/2SS 的电泳分析

Fig. 2 Electrophoresis assay of plasmid pEGS/2SS extracted by four extracting techniques

3 讨 论

检测转染效果的方法有很多,常用的有免疫组化染色法^[41-42]、免疫荧光检测法^[43-44]和流式细胞仪检测法^[45-46]等,但所有这些都需要对细胞进行一定的处理,才能对其转染和表达进行检测。本试验采

用的是带有绿色荧光蛋白报告基因的表达载体,可在不对细胞进行任何处理的条件下观察并检测细胞转染、基因表达的效果,十分方便、快捷,且观察后可继续对细胞进行培养。目前已有很多研究都采用这种载体^[47-50]。本研究首次将真核细胞表达的基因疫苗——生长抑素重组质粒 pEGS/2SS 转染 HeLa 细胞,探讨转染质粒 DNA 的剂量、脂质体剂量、最佳转染时间和质粒提取方法的最佳条件,为进一步探讨生长抑素重组质粒的作用机制和作用效果奠定基础。

在瞬时表达体系中,DNA 和脂质体剂量是两个重要的因素^[51],一般,不同的脂质体产品所需的脂质体、DNA 剂量和比例也不相同,一般 DNA 与脂质体的比例范围从 1:1~1:10^[52-54],本试验的脂质体转染试剂盒推荐比例为:DNA/脂质体=1:4。在本试验中比例从 1:1~1:12 范围内,最佳比例为 1:4,与脂质体 LipofectamineTM 产品建议的最佳比例一致。

DNA 的提取方法也是影响转染效果的又一重要因素,提取的 DNA 超螺旋比例越高、纯度越高、提取方法的得率越高,转染的效果越好。如果考虑以后大量提取,既考虑成本因素,用分子克隆方法提取质粒 DNA 是最经济的,但存在 DNA 获得率不高的缺点。试剂盒提取可提高质粒 DNA 的得率,且操作方便、用时短,一般分为不能去除内毒素和能去除内毒素试剂盒两种,前者因没能去除大肠杆菌中的内毒素,可能影响转染效果,降低转染率,一般提倡用后者,但其价格大约是前者的两倍,所以在不显著影响转染效果的前提下,当然用前者更加经济。试验中,方法 1(3SHL High pure plasmid Maxi-Prep Kit)的转染率与方法 2(Plasmid Maxi Kit)和方法 3(Plasmid Maxi Kit 提取再用酚/氯仿抽提)差异不大,显著大于方法 4(SDS 裂解法),说明本试验中是否去除质粒 DNA 中的内毒素对细胞转染率没有显著影响。因方法 2 试剂盒的价格比方法 1 的便宜,比方法 4 操作简单、省时,建议使用。

瞬时表达系统所需的转染时间一般为 24~96 h,依各种不同的质粒结构、不同的转染条件和程序而不同,一般转染 48 h 的较多^[55-57],本试验中最佳的转染时间 48 h,与其它试验结果一致。此外,试验中质粒 pEGS/2SS 两次转染 HeLa 细胞的转染率相差较大,可能和细胞的生长状态不同以及密度有关。

参考文献:

- [1] WHALEN R G, DAVIS H L. DNA-mediated immunization and the energetic immune response to hepatitis B surface antigen[J]. *Clin Immunol Immunopathol*, 1995,75(1):1-12.
- [2] CAI Y, RODRIGUEZ S, HEBEL H. DNA vaccine manufacture: scale and quality [J]. *Expert Rev Vaccines*, 2009,8(9):1277-1291.
- [3] LU S, WANG S, GRIMES-SERRANO J M. Current progress of DNA vaccine studies in humans[J]. *Expert Rev Vaccines*, 2008,7(2):175-191.
- [4] DAI J W, LIU S C, HAO L L, et al. Simultaneous expression of growth hormone releasing hormone (GHRH) and hepatitis B surface antigen/somatostatin (HBsAg/SS) fusion genes in a construct in the skeletal muscle enhances rabbit weight gain [J]. *Anim Biotechnol*, 2008,19(2):104-116.
- [5] MENG Q Y, CHEN Z Q, YU Z Q, et al. Increased body weight via injecting myogenic expression growth hormone-releasing hormone (GHRH) plasmid DNA into sheep[J]. *Anim Biotechnol*, 2004,15(2):175-192.
- [6] XUE C L, LIANG A X, MAO D G, et al. Effect of genetic adjuvants on immune response, growth and hormone levels in somatostatin DNA vaccination-induced Hu lambs[J]. *Vaccine*, 2010,28(6):1541-1546.
- [7] 甄艳红,韩丽,梁爱心,等.含抑制素重组质粒的减毒猪霍乱沙门氏菌 C500 遗传稳定性研究[J]. *生物技术通报*, 2009,S1:300-304.
- [8] 薛春林,茆达干,杨利国,等.基因佐剂 CpGDNA 对生长抑素 DNA 疫苗 pES/2SS 的作用[J]. *中国农业科学*, 2007,40(4):834-841.
- [9] 曹少先,何晓红,孙延鸣,等.生长抑素基因疫苗 pES/2SS 的构建与表达[J]. *扬州大学学报(农业与生命科学版)*, 2007,2(27):5-8.
- [10] 茆达干,张志杰,杨利国,等.抑制素基因免疫大鼠的免疫应答与基因表达[J]. *畜牧兽医学报*, 2007,38(7):713-717.
- [11] HENKE A. DNA immunization—a new chance in vaccine research? [J]. *Med Microbiol Immunol*, 2002,191(3-4):187-190.
- [12] BALESTRIN R C, BALDO G, VIEIRA M B, et al. Transient high-level expression of ss-galactosidase after transfection of fibroblasts from GM1 gangliosidosis patients with plasmid DNA[J]. *Braz J Med Biol*

- Res, 2008,41(4):283-288.
- [13] TAN G H, SU J M, WANG C C, et al. A recombinant DNA plasmid encoding the human interleukin-5 breaks immunological tolerance and inhibits airway inflammation in a murine model of asthma[J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2008,145(4):313-323.
 - [14] LI M, ZHANG R, LI F, et al. Transfection of SSTR-1 and SSTR-2 inhibits Panc-1 cell proliferation and renders Panc-1 cells responsive to somatostatin analogue[J]. *Journal of the American College of Surgeons*, 2005,201(4): 571-578.
 - [15] SCOTT A, CELINSKI B S, WILLIAM E, et al. Somatostatin receptor gene transfer inhibits established pancreatic cancer xenografts[J]. *Journal of Surgical Research*, 2003,115(1): 41-47.
 - [16] OLIAS G, VIOLLET C, KUSSEROW H, et al. Regulation and function of somatostatin receptors[J]. *Journal of Neuro chemistry*, 2004, 89 (5): 1057-1091.
 - [17] MASTRODIMOU N, KIAGIADKI F, HODJAROVA M, et al. Somatostatin receptors (sst2) regulate cGMP production in rat retina[J]. *Regulatory Peptides*, 2006,13(1-3): 41-46.
 - [18] 曾义祥,杜念兴.生长抑制激素基因在大肠杆菌中的表达[J]. *遗传学报*, 1991,18(3):282-288.
 - [19] 刘永庆,潘杰彦,陈溥言,等.生长抑素基因在大肠杆菌 pThioHis 表达系统中的克隆与表达[J]. *中国生物制品学杂志*, 2003,16(1):19-23.
 - [20] 徐文忠,杜念兴,李光地,等.生长抑素与乙肝表面抗原融合基因重组痘苗病毒的构建及其表达[J]. *南京农业大学学报*, 1992,15(3): 74-80.
 - [21] 曹少先,杨利国,张文伟,等.生长抑素基因疫苗质粒 pEGS/2SS 的构建及表达[J]. *中国兽医学报*, 2005,25(5):499-502.
 - [22] 熊思东,徐 薇. DNA 疫苗的研究进展[J]. *中国处方药*, 2003,2(2):22-26.
 - [23] 程相朝,李银聚,张春杰,等. DNA 疫苗的构建及导入方式和作用机制[J]. *中国畜牧兽医*, 2004,31(11): 12-15.
 - [24] 赵立军,李 强,白 冲,等.肺腺癌组织特异性自杀基因治疗实验研究[J]. *中国肺癌杂志*, 2004,7(4): 290-293.
 - [25] 罗红雨,杨 旭,苏先狮.插入 CpG 序列和 IL-2 基因的 HBV 重组真核表达载体的构建[J]. *中国现代医学杂志*, 2001,11(7): 25-32.
 - [26] MA H B, WANG X J, DI Z L, et al. Construction of targeted plasmid vector pcDNA3. 1-Egr. 1p-p16 and its expression in pancreatic cancer JF305 cells induced by radiation *in vitro* [J]. *World J Gastroenterol*, 2007, 13(31):4214-4218.
 - [27] 杨玉芳,丁彦青,张 玲,等. Plunc 序列启动子转基因小鼠模型的建立[J]. *第一军医大学学报*, 2004,24(2):155-157.
 - [28] BALL B A, SABEUR K, ALLEN W R. Liposome-mediated uptake of exogenous DNA by equine spermatozoa and applications in sperm-mediated gene transfer[J]. *Equine Vet J*, 2008,40(1):76-82.
 - [29] KEOWN W A, CAMPBELL C R, KUCHERLAPATI R S. Methods for introducing DNA into mammalian cells[J]. *Methods Enzymol*, 1990, 185:527-537.
 - [30] 朱 剑,武晓泓,吕京滢,等.重组腺相关病毒介导的 TIMP-1 载体的构建及鉴定[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2005, 25(7):469-472.
 - [31] KULKARNI V I, SHENOY V S, DODIYA S S, et al. Role of calcium in gene delivery[J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2006,3(2):235-245.
 - [32] ORTH P, WEIMER A, KAUL G, et al. Analysis of novel nonviral gene transfer systems for gene delivery to cells of the musculoskeletal system[J]. *Mol Biotechnol*, 2008,38(2):137-144.
 - [33] 龙 洋,鲍 朗,吴悦涵,等.结核分枝杆菌免疫优势抗原 ESAT-6 真核表达载体的构建及蛋白表达的鉴定[J]. *中国呼吸与危重监护杂志*, 2004,3(3):181-184.
 - [34] PILLAI V B, HELLERSTEIN M, YU T, et al. Comparative studies on in vitro expression and in vivo immunogenicity of supercoiled and open circular forms of plasmid DNA vaccines[J]. *Vaccine*, 2008, 26(8):1136-1141.
 - [35] 侯 丽,赵跃然,焦玉莲,等.人 CCL21 基因真核表达载体的构建及表达[J]. *现代免疫学*, 2005, 25(4): 265-268.
 - [36] LUXEMBOURG A, EVANS C F, HANNAMAN D. Electroporation-based DNA immunisation: translation to the clinic [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2007,7(11):1647-1664.
 - [37] 唐 敏,刘松青,王吉刚.脂质体介导 ANG 反义核酸对 A549 细胞作用的研究[J]. *第三军医大学学报*, 2002,24(11):1290-1292.
 - [38] SCHENBORN E T, OLER J. Liposome-mediated transfection of mammalian cells[J]. *Methods Mol Biol*, 2000,130:155-164.
 - [39] RAO N M, GOPAL V. Cell biological and biophysical aspects of lipid-mediated gene delivery[J]. *Biosci*

- Rep, 2006, 26(4):301-324.
- [40] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 DW 著. 分子克隆实验指南 [M]. 第 3 版. 北京: 科学出版社, 2002: 27-30.
- [41] 石 健, 林月秋, 王 力. BMP-2 基因转染人成纤维细胞株 KMB-17 量效关系的研究[J]. 昆明医学院学报, 2002, (4): 32-35.
- [42] 郑少鹏, 田竞生, 徐群渊, 等. LacZ 基因在体内外骨骼肌中的表达[J]. 首都医学院学报, 1995, 16(2): 85-88.
- [43] MIYASHITA T. Confocal microscopy for intracellular co-localization of proteins[J]. *Methods Mol Biol*, 2004, 261: 399-410.
- [44] 潘 蕾, 白雪帆, 黄长形, 等. 汉滩病毒 S 基因在 Vero-E6 细胞中的分段表达[J]. 中国人兽共患病杂志, 2004, 20(2): 88-91.
- [45] 何 奔, 徐迎佳, 王彬尧, 等. ICE 重组质粒转染血管平滑肌细胞及其促凋亡作用的观察[J]. 高血压杂志, 2000, 8(1): 64-67.
- [46] BARBU A, WELSH N. Lipofection of insulin-producing RINm5F cells: methodological improvements [J]. *J Liposome Res*, 2007, 17(2): 49-62.
- [47] CHO H S, KIM K R, KIM Y K, et al. Statistical determination of optimal baculovirus infection condition for recombinant protein production in *Drosophila* S2 cells[J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2007, 142(3): 243-252.
- [48] WANG Y, XU H X, LU M D, et al. Expression of thymidine kinase mediated by a novel non-viral delivery system under the control of vascular endothelial growth factor receptor 2 promoter selectively kills human umbilical vein endothelial cells[J]. *World J Gastroenterol*, 2008, 14(2): 224-230.
- [49] 贾林涛, 于翠娟, 许彦鸣, 等. GFP 共表达检测重组型 Caspase-3 对 HeLa 细胞凋亡的诱导作用[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2001, 17(3): 218-221.
- [50] 廖文俊, 刘彦仿. pEGFP-HPV 16E6/E7 表达载体的构建及转染角朊细胞的瞬时表达[J]. 第四军医大学学报, 1999, 20(8): 659-660.
- [51] RUOZI B, FORNI F, BATTINI R, et al. Cationic liposomes for gene transfection[J]. *J Drug Target*, 2003, 11(7): 407-414.
- [52] MAHATO R I, KAWABATA K, NOMURA T, et al. Physicochemical and pharmacokinetic characteristics of plasmid DNA/cationic liposome complexes[J]. *J Pharm Sci*, 1995, 84(11): 1267-1271.
- [53] SAKURAI F, INOUE R, NISHINO Y, et al. Effect of DNA/liposome mixing ratio on the physicochemical characteristics, cellular uptake and intracellular trafficking of plasmid DNA/cationic liposome complexes and subsequent gene expression[J]. *J Control Release*, 2000, 69(1): 219-220.
- [54] ALEXANDER M Y, AKHURST R J. Liposome-mediated gene transfer and expression via the skin [J]. *Hum Mol Genet*, 1995, 4(12): 2279-2285.
- [55] 张 敏, 白春学, 张 新, 等. 肺腺癌 SPC-A-1 细胞表皮生长因子受体表达水平对其增殖的影响[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2005, 28(5): 337-341.
- [56] 张丽君, 丁焕文, 王 捷, 等. pEGFP2bFGF 重组质粒转染成骨细胞的条件优化[J]. 实用医学杂志, 2001, 19(1): 16-17.
- [57] JACOBSON C, DUGGAN D, FISCHBACH G. Neuregulin induces the expression of transcription factors and myosin heavy chains typical of muscle spindles in cultured human muscle[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(33): 12218-12223.