维普资讯 http://www.cqvip.com

130-132

6

重组质粒电穿孔转染条件探讨*

Q782

病毒性肝炎研究所 周 智** 张定凤 任 红

提 要 目的:为优化电穿孔转染质粒的条件,提高转染率。方法:以不同条件用电穿孔方法将重组质粒PLXSN－S转入p815、pA317、HepG2、EL4等真核细胞,探讨电压、电容及电转缓冲液温度对转染率的影响。结果(1)低电压(200～300V)、高电容(900～1000uF)能高效转染实验所用真核细胞;(2)冰浴可提高转染率;(3)电击时间以15～30ms较合适。结论:电穿孔是一种高效的基因转染方法,通过优化其条件,可以提高转染率。

关键词 电穿孔; 基因转染; 真核细胞
中图分类号 Q782

重组质粒

体外基因转移方式有病毒载体基因转移、非病毒载体基因转移。后者又包括化学(磷酸钙、脂质体及葡聚糖等)及物理方法。电穿孔是一种高效、简便的基因转移系统,具有其它转移方法无可比拟的优点,但由于系统本身成本较高,国内使用尚不普及。本文探讨了不同条件包括电压、电容、电转液的温度、电击时间等对真核细胞转染率的影响,以期用最适条件提高转染率,现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 质粒、菌株及细胞

PLXSN够于第三军医大学分子生物学教研室,受体菌RR1,本所保存。PBKS$^+$－S由任红教授提供;细胞系P815、PA317、HepG2、EL4等购于上海细胞生物研究所。

1.2 试剂

工具酶EcoRI、BamHI、T4DNA连接酶Promega公司;质粒抽提试剂盒Qiagen公司;质粒回收试剂盒上海华顺公司。

1.3 电穿孔仪 Gene Pulser^{R}Ⅱ Electroporation System(BIO－RAD)

1.4 电转方法及转染率

电转前收集细胞计数,电穿孔缓冲液用无牛血清的1640、全培养基(含双抗、牛血清)及DHanks液。电转杯用0.4cm,体积0.8ml,选择不同的电压、电容及冰浴,电穿孔后48小时10:1传代,加选择培养基(含G418),2周后Gimsa染色计数抗性克隆数,并计算转染率。

$$转染率=\frac{抗性克隆数/载体DNA量(\mu g)}{受体细胞数}$$

2 结果

2.1 重组质粒PLXSN－S的构建,鉴定

以BamHⅠ、EcoRⅠ分别双酶切PLXSN－S、PBKS$^+$－S两质粒,PLXSN回收大片段,PBKS$^+$－S回收小片段,按一定比例混合,T4DNA连接酶14°C连接过夜,转化RR1菌。挑取抗性克隆,抽提质粒酶切鉴定,中量纯化质粒,用于电穿孔转染细胞(重组质粒PLXSN－S的构建鉴定另文报道)。

2.2 不同条件下电转率比较

P815细胞系在不同条件转染率如表1:

根据以上条件,我们同时还对HepG2、EL4等细胞转染率进行了探讨,得到相似的结果。

3 讨论

电穿孔是指在高压电脉冲的作用下使细胞膜上暂时出现微小孔洞,致使细胞吸收外界环境中的各种生物分子,在微孔开启期间细胞外界中的生物分子便会穿孔而入,并最终进到细胞核内。其主要特点是操作简便、持续时间短,整个过程约需2～3分钟,转染率高。

* 本研究由国家自然科学基金,卫生部课题基金及重庆市科研项目资助(编号3967034)

** 男,1966－03出生,主治医师,博士

维普资讯 http://www.cqvip.com

表1 不同条件下P815转染率

电压(V)	电容(UF)	时间(MS)	冰浴(M)*	转染率
200	950	16.3	(—)	2×10^{-5}
200	950	20.1	10	4×10^{-5}
250	950	14.3	(—)	5×10^{-5}
250	975	21.7	10	7×10^{-5}
300	975	13.4	(—)	8×10^{-5}
1800	250	0.4	(—)	3×10^{-6}
1800	250	0.9	10	5×10^{-6}

* 冰浴指电穿孔前后冰浴10min

表2 不同条件下PA317转染

电压(V)	电容(UF)	时间(MS)	冰浴(M)	转染率
200	975	15.4	(—)	9×100^{-5}
200	950	14.7	(—)	7×100^{-5}
250	950	20.4	(—)	2×100^{-4}
250	950	21.5	10	4×100^{-5}
300	9501	3.2	(—)	1×100^{-5}

表3 电转缓冲液

电转缓冲液	电压	电容(UF)	电转率
无牛血液1640	200	950	9×100^{-6}
DHanks液	200	950	7×100^{-6}
完全培养基	200	950	7.5×100^{-5}

对于某种细胞应根据细胞大小、细胞膜的组成成分及电穿孔时使用的缓冲液等优化电穿孔的条件，才能获得高的转染率[1]。本文探讨了不同条件(电压、电容、时间、温度)对真核细胞转染率的影响，实验发现低电压200～300V、高电容900～1000 uF、时间15～30ms对实验所用真核细胞都能高效转染。同时比较不同缓冲液包括无牛血清1640、DHanks液及完全培养基对转染率的影响，实验发现对于某种特定细胞，缓冲液要求并不十分严格，只要重组质粒能很好溶解，缓冲液不影响细胞生长即可。主要一点是尽可能简便，若操作时间太长细胞活力受损，将影响转染率。电击的最大电压和电击持续的时间是影响转染率的两个主要因素，电压太小和(或)持续时间太短、则转染率太低；如果电压太大和(或)持续时间太长，则电击后细胞不能存活，也影响转染率。如实验中P815细胞在250～300V时，转染率为$7\sim8\times10^{-5}$；而在200V或1800V时转染率明显降低(表1)细胞类型不同，转染率也有差异。

生长速率及生长期均影响电转率[2,3]。生长快的细胞比生长慢的细胞转化率高；细胞处于有丝分裂期时更易感受外源DNA。细胞大小也是重要的因素，一般情况下细胞越大、需要的电压越小，细胞越小，需要的电压越大。实验中PA317比P815大，电压200V时电转率即为9×10^{-6}，而P815细胞在300V电压下转染率为8×10^{-5}。冰浴可以稳定细胞膜，增加细胞膜的收缩。在电击前后冰浴10分钟可以提高转染率。另外DNA的量及电转缓冲液对转染率也有一定影响。对于Gene Pulser^{R} II电转仪，操作者可设的两个参数为电压、电容。两个参数设定时间就定了。但是还可通过改变电击缓冲液的温度及体积，改变电击时间。在电压电容一定时，温度越低，时间越长，这一点从本实验中亦得到证实。电击缓冲液容积越大，所需时间越短，在冷的蔗糖磷酸缓冲液中，电转时间与容积的关系见图。

总之，电穿孔基因转移有其它方法无可比拟的优越性，其操作简便、快速、高效，深受使用者喜爱，通过优化条件，可以取得较高的转染率。

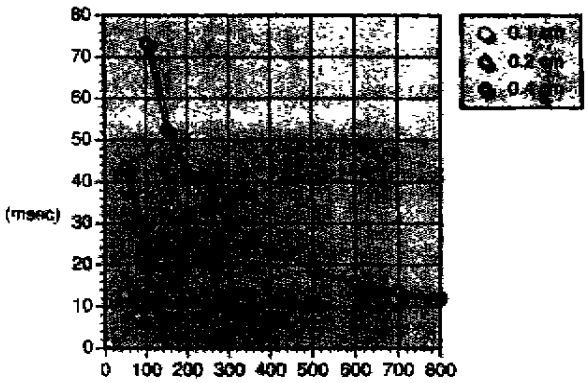


图 样品体积对时间的影响

维普资讯 http://www.cqvip.com

参 考 文 献

1.Gene Gulser® II Electroporation System Instruction Mannual Bio－RAD
2.卢圣栋，主编.现代分子生物学实验技术 高等教育出版社 396
3.Fredick M, Ausubel, 3 rd ed. Short protocol in Molecular Biology 1995;9

(收稿日期 1998－10－06)

The optimal electroporation condition of recombinant plasmid

Zhou Zhi, et al
The institute of viral hepatitis

To seek for the optimal condition and improve the rate of recombinant plasmid transfection by electroporation. Methods: PLXSN－S was transfected into several eukaryotic cell lines including p815, pA317, $HepG_2$, El_4 by electroporation and the effects of a few factors (such as voltage, capacity and the temperature of media et al) on the rate of transfection were investigated .Result (1) Low voltage (200～300v), high capacitance (900～1000uF) is a favaorable condition for the eukaryotic cells above. (2) Ice bathing may improve the rate of transfection. (3) the optimum time is in the range of 15～30ms .Conclusion:Electroporation was a highly effective method and by optimizing the condition, the rate of transfection may be markedly improved

KEY WORDS Electroporation; Gene transfection; Eukaryotic cell

132-134

免疫亲和色谱定向偶联方法的研究

7

医学检验系生物分析化学教研室 黄 昕*
中心实验室 邱宗荫

R392.11

提 要 将初步纯化属小鼠IgG_1亚类的抗G_3单克隆抗体(MG_{3t}—随机偶联于CNBr－Sepharose 4B凝胶，并成功地定向偶联于rProtein A－SepharoseFF凝胶，两种偶联反应的结合率分别达到91.7%和86.6%。MG_{3t}－rProtein A Sepharose FF的抗原结合容量是MG_{3t}－CNBr－Sepharose 4B的1.8倍，因此，单克隆抗体通过其Fc区与rProtein A结合，留出正确定向的抗原结合位点，能够提高免疫亲和吸附剂的结合容量。

关键词 免疫亲和色谱；定向偶联方法；单克隆抗体
中图分类号 R392.33

免疫亲和色谱(immunoaffinity chromatography, IAC)具有特异性好，结合容量大和洗脱条件温和等优点[1]，能从复杂的生物样品中有效分离目的蛋白。因此，该方法被广泛地应用于生物工程产品的纯化。在IAC中，单克隆抗体与基质偶联有多种不同的方法，至今为止最常用的是溴化氢法(随机偶联)，但此法制备的免疫亲和吸附剂存在结合抗原效率差的问题[2]。我们以属小鼠IgG_1亚类的抗GM－CSF/IL－3融合蛋白(G_3)单克隆抗体作为配体，对单抗(IgG_1)定向偶联于rProtein A基质进行研究，获得了满意的偶联效率，并且与溴化氢法相比，可明显提高免疫亲和吸附剂的抗原结合容量。

1 材料和方法

1.1 抗G_1单克隆抗体(MG_{3t}) 自行研制，属小鼠IgG_1亚类[3]。

1.2 rProtein A－Sepharose FF和CNBr－Sepharose 4B凝胶 购自Pharmacia公司。

1.3 主要试剂

1.3.1 二甲基庚二酸亚胺脂－二盐酸化物 购自Sigma公司。

* 男，1967－11出生，讲师