DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.02.008
第26卷第2期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 2
104 2004年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)02-0104-03

Nucleofector™与脂质体转染PA317细胞效率的比较

代 飞,吴 军,陈希炜,贺伟峰,张小容 (第三军医大学西南医院全军烧伤研究所,创伤烧伤复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

提 要:目的 比较传统的脂质体转染技术与Nucleofector™转染技术将pLXSN-CTLA4Ig-TRES2-EGFP重组质粒转染入PA317细胞的效率。方法 分别用脂质体技术与Nucleofector™转染技术将pLXSN-CTLA4Ig-IRES2-EGFP重组质粒转染PA317细胞,应用倒置荧光显微镜、流式细胞仪检测转染后PA317细胞绿色荧光蛋白表达情况及阳性细胞率,比较两种方法的转染效率。结果 脂质体转染后4、8 h未观察到阳性细胞,转染后12 h阳性率为(0.59±0.2)%,转染后24 h阳性率为(4.39±2.43)%;Nucleofector™转染技术转染后约4 h观察到阳性细胞,转染后12 h阳性率为(12.27±3.38)%,转染后24 h阳性率为(50.16±2.41)%。两者比较,在转染后12、24 h,后者阴性率显著高于前者($P<0.01$)。结论 Nucleofector™技术与传统的脂质体技术比较,是一种具有转染速度快、效率高的新的转染技术。

关键词:CTLA4Ig;Nucleofector™技术;脂质体
中图法分类号:Q813;R394-33 文献标识码:A

Comparison of transfection efficiency of Nucleofector™ and liposome transfection techniques for transfection of recombinant plasmid into PA317 cells

DAI Fei, WU Jun, CHEN Xi-wei, HE Wei-feng, ZHANG Xiao-rong (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burns, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To compare the traditional transfection efficiency of liposome transfection technique and Nucleofector™ technique for the transfection of PLXSN-CTLA4Ig-TRES2-EGFP recombinant plasmid into PA317 cells. **Methods** Liposome transfection technique and Nucleofector™ technique were employed for the transfection of pLXSN-CTLA4Ig-TRES2-EGFP recombinant plasmid into PA317 cells, respectively. The expression of green fluorescent protein (EGFP) by PA317 cells and the positive cell rates were detected with inverted fluorescence microscope and flow cytometer for the comparison of the transfection efficiency by the two methods. **Results** Positive cells were not observed at 8 h after liposome transfection. Liposome transfection technique resulted in positive cell rates of (0.59±0.2)% and (4.39±2.43)% at 12 h and 24 h, respectively. However, Nucleofector™ technique revealed positive cells at 4 h, and resulted in positive cell rates of (12.27±3.38)% and (50.16±2.41)% at 12 h and 24 h, respectively. **Conclusion** Compared with the traditional liposome transfection technique, Nucleofector™ technique is a transfection technique with faster speed and higher efficiency.

Key words: CTLA4Ig; Nucleofector™ technique; liposome

德国Amaxa公司的Nucleofector™细胞转染技术是将转染的电穿孔技术和专用的转染试剂结合起来,针对不同的细胞类型,采用最优化的转染程序,以达到最理想的转染效率的一种方法。具有转染效率高、转染速度快和操作简便等优点;尤其是在转染原代细胞和现有方法难于转染细胞系的转染方面具有优势[1]。阳离子脂质体是一种本身带正电的脂质囊泡,它与带负电的DNA分子稳定结合并能通过细胞的质膜,从而将目的基因传递到细胞内与基因组整合;被认为是一种具有广泛应用前景的细胞转染载体[2]。本研究用上述两种方法分别将pLXSN-CTLA4Ig-IRES2-EGFP质粒转染入PA317细胞中,比较了两种方法的转染效率。

1 材料与方法

1.1 材料

pLXSN-CTLA4Ig-IRES2-EGFP由本室构建和保存[8];PA317细胞由本室培养和保存;DOTAP脂质体试剂购自Roche公司

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30300090)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30300090)
作者简介:代 飞(1971—),男,重庆市人,博士,主治医师,主要从事移植免疫及组织工程方面的研究,发表论文5篇。电话:(023)68752688
通信作者:吴 军,电话:(023)68754006,Email:Juneupro@cqct.com.cn
收稿日期:2003-08-25;修回日期:2003-11-01

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

(美国); Nucleofector™ 转染试剂购自深圳达科为公司; 质粒提取试剂盒购自 Omega 公司(美国); 其余试剂为进口或国产分析纯。

1.2　方法

1.2.1　提取 pLXSN-CTLA4Ig-IRES2-EGFP(简称: PLCIE)质粒　将含 PLCIE 的冷冻保存的 JM109 菌落解冻后涂 AmprLP 板, 37 ℃ 过夜; 挑阳性克隆入 Ampr 培养液 37 ℃、150 r/min 摇过夜; 应用 Omega 质粒提取试剂盒提供的方法提取质粒, 进行酶切鉴定、DNA 浓度和纯度鉴定。

1.2.2　PA317 细胞培养和转染准备　将液氮保存的 PA317 细胞株复苏, DMEM + 10% NCS 培养基培养。在 DOTAP 转染前 1 天传代于 6 孔板中, 接种密度为 1.5× 10^5/ml; 次日细胞生长至 60%~80% 融合时进行 DOTAP 转染。Nucleofector™ 转染技术的细胞不需特殊处理。

1.2.3　细胞转染方法　DOTAP 介导的转染方法: 取6 μg PLCIE 入无菌 EP 管①中, HBS 液稀释至 60 μl(DNA 浓度为 0.1 μg/μl); 取 36 μl DOTAP 液入另一 EP 管②中, HBS 液稀释至 120 μl; 将①和②轻柔混合后室温孵育 15 min; 然后与 6 ml 培养基混合备用。观察 6 孔板中的细胞已 80% 融合, 吸去所有培养基, 每孔中加入 1 ml 转染液进行转染, 6 h 后更换培养基继续培养。Nucleofector™ 转染方法: 消化、离心收集 PA317 细胞, 细胞数为 10^6, 选择针对 NIH3T3 细胞的转染液 100 μl 重旋细胞(因为 PA317 是缺陷型逆转录病毒感染后的 NIH3T3 细胞), 加入2 μg PLCIE 混合后移入 Amaxa 特制小杯; 然后将小杯放入 Nucleofector™ 转染仪中, 选择 NIH_3T_3 细胞转染程序电转 3 s, 取出小杯用 500 μl 培养基冲洗后移入 6 孔板的一孔中培养。按上述方法重复转染 5 次, 分别移入 6 孔板其余 5 孔, 最后每孔加入 1 ml 培养基培养。

1.2.4　荧光显微镜观察及流式细胞仪检测　转染后每 4 h 进行倒置荧光显微镜观察; 转染后 12、24 h 分别取 6 孔板中的 3 孔细胞作流式细胞仪检测。

1.2.5　统计学处理　转染率以($\bar{x} \pm s$)%表示, 用 SPSS 统计软件行 t 检验。

2　结果

2.1　PLCIE 质粒提取及鉴定

应用 Omega 质粒提取试剂盒提取质粒后, 分光光度计测定质粒浓度为 0.198 μg/μl, 纯度大于 95%(A_{260}/A_{280} 为 1.93)。PLCIE 质粒经 *Xho*Ⅰ 单酶切出现 9.2 kb 单一片断; *Xho*Ⅰ、*Stu*Ⅰ 双酶切出现(5.6+3.6)kb 两个片断。与理论值相符。

2.2　荧光显微镜观察及流式细胞仪检测

DOTAP 介导 PLCIE 转染 PA317 细胞后 4、8 h 倒置荧光显微镜下未见 EGFP 表达; 转染后 12 h 见少量 EGFP 阳性表达细胞, 流式细胞仪检测阳性率为: (0.59±0.2)%; 24 h 后阳性率为: (4.39±2.43)%。Nucleofector™ 转染 4 h 后即见到较多 EGFP 阳性表达细胞, 转染 8 h 后见到更多阳性细胞; 12 h 后流式细胞仪检测阳性率为: (12.27±3.38)%, 见图 1; 24 h 后阳性率为: (50.16±2.41)%, 见图 2。Nucleofector™ 技术转染 PA317 细胞的转染率在转染后不同时相点均显著高于 DOTAP 介导转染, 见表 1。



图 1　倒置荧光显微镜观察 **PA317** 细胞 **EGFP** 表达情况　(Nucleofector™ 转染后 12 h× 100)

Fig 1　EGFP expression of PA317 cells at 12 h after Nucleofector™ transfection　(Inverted fluorescence microscope × 100)



图 2　倒置荧光显微镜观察 **PA317** 细胞 **EGFP** 表达情况　(Nucleofector™ 转染后 24 h× 100)

Fig 2　EGFP expression of PA317 cells observed with inverted fluorescence microscope at 24 h after Nucleofector™ transfection　(× 100)

表 1　流式细胞仪检测 **DOTAP**、**Nucleofector™** 的转染效率(n=3)($\bar{x} \pm s$)%

Tab 1　Transfection efficiency of DOTAP and Nucleofector™ transfection techniques by flow cytometry (n=3) ($\bar{x} \pm s$)%

Type of transfection	Transfection efficiency at 12 h after transfection	Transfection efficiency rate at 24 h after transfection
DOTAP	0.59±0.2	4.39±2.43
Nucleofector™	12.27±3.38▲	50.16±2.41★

▲: $P<0.01$, *vs* DOTAP at 12 h; ★: $P<0.01$, *vs* DOTAP at 24 h

3　讨论

Nucleofector™ 技术是将转染的电穿孔技术和专用的转染试剂结合起来, 针对不同的细胞类型, 采用最优化的转染程序, 以达到最理想的转染效率的一种方法。其在电转仪、针对原代细胞或细胞系特异的转染缓冲液和电转参数上拥有专利。Nucleofector™ 技术与脂质体等非病毒转染载体相比有很多优点: ①前者可以直接将目的基因转染入细胞核; 后者是利用脂质体与细胞膜的亲合性先将目的基因转染入细胞浆, 然后在细

1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

胞分裂时被摄入细胞核。②前者因为结合了电转与转染缓冲液，并在实验室里对特定细胞进行了参数优化；所以其转染率比后者高。③前者转染不依赖于细胞分裂，转染前不需要刺激细胞生长；而且可以成功转染分裂缓慢的细胞如神经元等。而后者转染成功与否及转染率很大程度上依赖于细胞分裂增值活性，转染前需要刺激细胞成长(如转染前1天传代等)，在细胞对数生长期转染才能获得好的效果。④前者还有转染快(电转仅需3 s)、操作简单等优点。目前Nucleofector™技术已成功转染了人的B细胞、T细胞、$CD34^+$造血干细胞、间充质干细胞(MSCs)、树突状细胞(DCs)、动脉平滑肌细胞、血管内皮细胞、软骨细胞、角朊细胞、真皮纤维细胞、表皮黑色素细胞、神经元细胞以及一些细胞系等。均获得了很高的转染效率(40%～80%)；并未发现细胞损伤和功能改变[3~7]。

本实验中比较了Nucleofector™技术与常用的DOTAP分别将PLCTE转入PA317细胞的情况。实验结果显示：Nucleofector™技术转染率显著高于DOTAP介导转染，细胞目的基因表达早而且未见明显的细胞毒性表现。这为包装细胞的克隆筛选提供了方便，大幅度降低了工作量。Nucleofector™技术的诸多优点，为基因转染研究以及基因治疗的临床应用提供了一种新的手段。

参考文献：

[1] Martinet W, Schrijvers D, Kockx M. Nucleofection as an efficient nonviral transfection method for human monocytic cells[J]. Biotechnol Lett, 2003, 25(13): 1025－1029.
[2] 成党校，黄桂君. 新型基因转染阳离子脂质体研究进展[J]. 国外医学药学分册，2000，27(5)：257－260.
[3] Harriague J, Bismuth G. Imaging antigen-induced PI3K activation in T cells[J]. Nat Immunol, 2002, 3(11): 1090－1096.
[4] Santourlidis S, Trompeter H I, Weinhold S, *et al*. Crucial role of DNA methylation in determination of clonally distributed killer cell Ig-like receptor expression patterns in NK cells[J]. J Immunol, 2002, 169(8): 4253－4261.
[5] Buttgereit P, Schmidt-Wolf Journal of hemotherapy and stem cell research IG. Gene therapy of lymphoma[J]. J Hematother Stem Cell Res, 2002, 11(3): 457－467.
[6] Murphy L L, Hughes C C. Endothelial cells stimulate T cell NFAT nuclear translocation in the presence of cyclosporin A: involvement of the wnt/glycogen synthase kinase-3beta pathway[J]. J Immunol, 2002, 169(7): 3717－3725.
[7] Chun H J, Zheng L, Ahmad M, *et al*. Pleiotropic defects in lymphocyte activation caused by caspase-8 mutations lead to human immudeficiency[J]. Nature, 2002, 419(6905): 395－399.
[8] 贺伟峰，吴　军，易绍萱等. 人CTLA4Ig和EGFP双基因共表达逆转录病毒载体构建及鉴定[J]. 第三军医大学学报，2002，24(7)：782－785.

(编辑　张　宁)

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2004)02-0106-01

贵阳地区献血者HIV检测结果分析

Results of HIV test among blood donors in Guiyang, China

邱淑华，陆　蓉，李　豫　(贵州省血液中心，贵州省疾控中心艾滋病确证实验室，贵阳 550002)

近年来我国已进入HIV感染流行期和快速增长期，感染人数逐年大幅上升[1]，易感人群也从高危人群转入普通人群[2]，血液是HIV传播的主要途径之一，应引起我们的高度重视。为了防止输血传播HIV，我们对所有献血员的血液都进行了双人双试剂的检测，现将检测结果报告如下。

1　材料与方法

本中心1999年4月至2002年12月无偿献血者标本103 842份。年龄18～55周岁。

Denley Dragon MK2酶标仪、Thermo Labsystems Wellwash 4MK2洗板机，HH. W21. Cu600电热恒温水浴箱(上海医疗器械七厂)，初筛用ELISA法，试剂为厦门新创科技有限公司及上海科华生物工程股份有限公司生产，均为卫生部中检所批批检合格试剂，均在有效期内使用。确证试验由贵州省疾控中心艾滋病确证实验室采用蛋白印迹法(Western blot)，用新加坡Genelabs HIV BLOT 2.2确证。

各试验均严格按试剂操作说明书进行，初筛实验分初检和复检，初检双人双试剂进行，根据说明书所给公式计算CutOff值对结果进行判定，两种试剂阳性为阳性，一阴一阳为可疑，二阴为阴性。初检可疑及阳性复试双孔，二孔均为阳性或一阴一阳，为ELISA检测阳性，送省疾控中心确证实验室，用Genelabs HIV BLOT 2.2确证，根据特异性条带出现与否，进行结果判定，结果包括抗－HIV阴性(－)、可疑(±)及阳性(＋)。

2　结果

献血者抗－HIV检出情况及性别、年龄分布见表1。

(下转111页)

作者简介：邱淑华(1963－)，女，重庆市人，副主任药师，主要从事输血质量管理方面的研究，发表论文10余篇。电话：(0851)5921095

收稿日期：2003-08-12；修回日期：2003-11-27

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net