

基因枪介导真核表达质粒转染体外培养的 COS-7 细胞系的实验研究

张亮¹, 阎瑾琦¹, 马继尧², 王浩¹, 刘宁¹, 贾锐¹, 韩刚², 董金凯², 田仁礼², 于继云¹

1. 军事医学科学院 基础医学研究所, 北京 100850; 2. 解放军总医院 泌尿外科, 北京 100853

[摘要] 目的: 建立基因枪子弹制备及转染体外培养 COS-7 细胞系的方法。方法: 以亚精氨、氯化钙沉淀法制备子弹(DNA+金颗粒), 利用原子力显微镜观察子弹制备情况; 采用基因枪方法分别将真核表达质粒 pVax-Dsred-IRES-EGFP 转染对照组和实验组 COS-7 细胞, 转染后 24 h, 利用激光扫描共聚焦显微镜观察细胞中红、绿荧光蛋白的表达。结果: 制备了基因枪子弹, DNA 紧密包裹在金颗粒周围; 基因枪介导的 pVax-Dsred-IRES-EGFP 被转染入体外培养的 COS-7 细胞, 转染后 24 h 可检测到红、绿荧光, 而对照组则没有荧光蛋白的表达。结论: 国产新芝 SJ-500 型基因枪能够有效介导外源基因转移, 基因枪转染的 COS-7 细胞能够有效表达报告基因。

[关键词] 基因枪; 细胞转染; 真核表达载体; 荧光蛋白; COS-7 细胞系

[中图分类号] Q78

[文献标识码] A

Empirical Study of Gene Gun-Mediated Eukaryotic Expression Vector Transfection of COS-7 Cell Lines in Vitro

ZHANG Liang¹, YAN Jin-Qi¹, MA Ji-Yao², WANG Hao¹, LIU Ning¹,
JIA Rui¹, HAN Gang², DONG Jin-Kai², TIAN Ren-Li², YU Ji-Yun¹

1. Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850;

2. Department of Urology, PLA General Hospital, Beijing 100853; China

[Abstract] Objective: To establish a preparation method of cartridge for gene gun and to observe the gene gun-mediated gene transfection to COS-7 cell lines in vitro. Methods: The cartridge(microcarrier+DNA) was prepared by precipitation method of spermidine and calcium chloride. Using atomic force microscope to observe the detail of the cartridge. The recombinant eukaryotic expression vector pVax-Dsred-IRES-EGFP was transfected into COS-7 cell lines by gene gun. The expression of report gene was observed through laser scan confocal microscopy. Results: The cartridge of gene gun was successfully prepared, DNA-coated gold microcarriers was achieved. Red and green fluorescent protein could be detected in the transfected COS-7 cell lines after 24 hours, when no fluorescent protein was detected in control group. Conclusion: SJ-500 gene gun-mediated gene transfer is effective and practicable. The report gene can be expressed through gene gun mediated transfection to cell lines in vitro.

[Key words] gene gun; cell transfection; eukaryotic expression vector; fluorescent protein; COS-7 cell lines

基因治疗在多种疾病,尤其是恶性肿瘤、遗传性疾病、传染性疾病的治疗中具有巨大的应用前景^[1-2],但关键在于如何建立一个安全、高效的基因导入系统。为此,人们试验和尝试发展了数十种病毒型和非病毒型载体运用于临床研究。然而,2000年美国宾州大学以重组病毒为载体的基因治疗药物临床试验造成了受试者死亡^[3],后来的研究发现病毒型载体有可能改变被转染细胞的主要功能和局部环境^[4],从而引发了人们对病毒型载体安全性的忧虑。因此,以非病毒为载体的基因转移研究显得越发重要,其中基因枪法因具有其他方法所不具备的高效和便捷的特点,日益受到研究者瞩目^[5]。本研究室近期引进了国产新芝 SJ-500 型手提式基因枪,用于肿瘤免疫基因治疗的实验研究。本研究的主要目的是验证该设备导入外源基因的有效性。

1 材料和方法

1.1 材料

重组真核表达质粒 pVax-Dsred-IRES-EGFP 由本室构建,为含有红、绿荧光蛋白报告基因的双顺反子真核表达载体,可以在转染的真核细胞中同时表达红、绿荧光蛋白;COS-7 细胞由本室保存;DMEM 培养基为 Gibco BRL 公司产品;新生牛血清购自杭州四季青责任有限公司;新芝 SJ-500 型手提式基因枪、吹氮干燥仪购自宁波新芝生物科技股份有限公司;金粉购自 AIFa Aesar 公司;氦气、无水乙醇均由军事医学科学院科研条件处供

[收稿日期] 2007-12-11

[基金项目] 国家自然科学基金(30772002);国家高技术研究发展计划(2006AA02A237,2007AA02Z451)

[作者简介] 张亮(1979-),男,硕士研究生

[通信作者] 于继云,(E-mail)yujyun@126.com

应。

1.2 实验分组

将传代培养的 COS-7 细胞在转染前一天分至直径 60 mm 的细胞培养皿中培养,使其在转染当天生长密度达到 80%~90%。对照组和实验组各 3 块培养板。

1.3 基因枪子弹制备

精确称取 60 mg 金粉,加入 1 mL 无水乙醇,超声波粉碎机超声 3-5 min,待手感发烫时 12 000 r/min 离心去除上清;在沉淀中加入 1 mL 无水乙醇,混匀,12 000 r/min 离心去除上清;重复上述过程 2 次;离心后在沉淀的金粉中加入 1 mL 无水乙醇重悬,4 °C 冰箱保存。

制备子弹时,取 400 μ L 上述混合液离心,去除上清后加 0.1 mol/L 亚精氨 160 μ L,轻轻混匀,然后加入 1.5 μ g/ μ L 的 pVax-Dsred-IRES-EGFP 质粒 50 μ L (对照组加入等量的去离子水),涡旋轻混时,逐滴加入 2.5 mol/L 的氯化钙 400 μ L,混匀后室温沉淀 10 min,待上清液变清亮离心 15 s,去除上清,加入 1 mL 无水乙醇重悬沉淀,12 000 r/min 离心 5 s,去上清;重复上述过程 2 次;加入 3 mL 无水乙醇重悬沉淀;将金颗粒-质粒 DNA 乙醇溶液(对照组无金颗粒-质粒 DNA)吸入 Tefzel 管中,使金颗粒沉淀在管的内表面上,吸去乙醇,用氮气将管吹干,将管切成约 1.5 cm 的小段即制成子弹。

1.4 基因枪介导的 pVax-Dsred-IRES-EGFP 转染体外培养的 COS-7 细胞系

转染时,将培养皿中的细胞培养液倒掉,将基因枪连接至氦气钢瓶,将压力调为 1 000 kPa,距离设定为 2 cm,轰击培养的 COS-7 细胞系一枪,对照组和实验组各轰击 3 块培养皿。转染 pVax-Dsred-IRES-EGFP 后,将细胞置 37 °C、5% CO₂ 孵箱继续培养。轰击后 24 h,取对照组和实验组的细胞系在激光扫描共聚焦显微镜下观察荧光表达情况。

2 结果

2.1 重组质粒 pVax-Dsred-IRES-EGFP 的酶切鉴定

pVax 载体是被美国食品药品监督管理局(FDA)认可的用于疫苗临床使用的真核表达载体,它具有卡那霉素抗性,非常适合于人体应用。制备基因枪子弹之前,先对构建的真核表达载体 pVax-Dsred-IRES-EGFP (5.1 kb,图 1)进行了双酶切鉴定。经 Nsi 和 BssH 双酶切,切下了大小约 745 bp 的 EGFP 基因片段;经 BamH 和 Xho 双酶切,切下了大小为 2 131 bp 的 DsRed-IRES-EGFP 片段,结果见图 2。

2.2 基因枪子弹的制备

对于采用亚精氨、氯化钙沉淀法制备基因枪子弹时金颗粒与 DNA 的结合方式问题,国内外文献均没有明确报道。我们将用亚精氨-氯化钙沉淀法制备的金颗粒-质粒 DNA 乙醇溶液稀释至 1/100,点样至云母上,进行原子力显微镜扫描,发现金颗粒为表面光滑的圆形,直径约 1.5 μ m(图 3A);DNA 包裹、缠绕在金颗粒的周围,使得金颗粒表面变得不再光滑,边界不再清楚,而呈现出不规则的椭圆形(图 3B)。

2.3 基因枪转染体外培养的 COS-7 细胞系

由于我们在红绿荧光蛋白片段间插入了双顺反子表达元件——内部核糖体进入位点(IRES)序列,该序列来源于某些病

毒和细胞的 mRNA 5' 端的一段非翻译区,因此在上游启动子的控制下,转录后为同一条 mRNA;翻译时,IRES 上游基因翻译起始遵循一般的真核生物基因的翻译起始规律,而 IRES 下游基因则通过 IRES 引导核糖体进入,启动基因的翻译,从而实现 2 个基因的同时表达^[6-9]。通过 LipfectAMINE2000 瞬时转染体外培养细胞系证实,pVax-Dsred-IRES-EGFP 能成功转入 COS-7 细胞,并同时表达 DsRed 和 EGFP。

用基因枪轰击细胞 24 h 后,可在激光共聚焦显微镜下观察到红、绿色荧光及共表达的黄光,表明外源基因被转染到细胞中并得到表达(图 4),而对对照组的细胞则没有检测到荧光细胞的表达(图 5)。

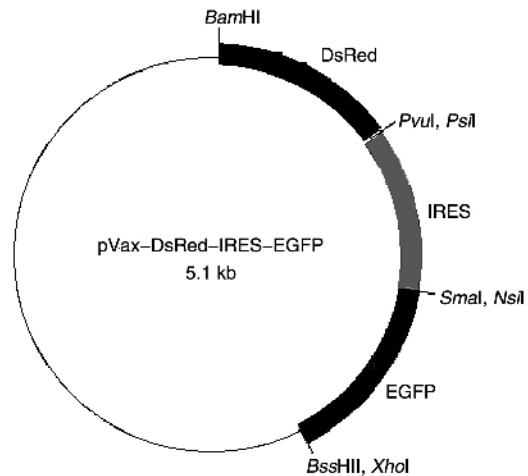


图 1 重组质粒 pVax-DsRed-IRES-EGFP 图谱

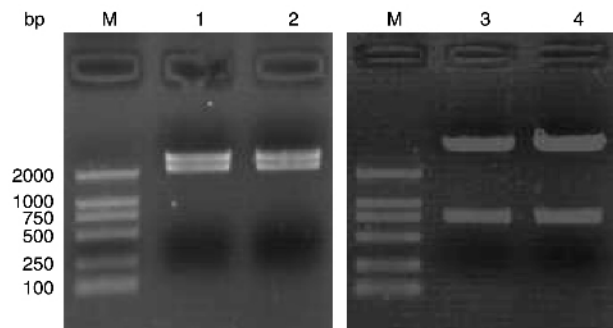


图 2 pVax-DsRed-IRES-EGFP 的双酶切图谱
M: DL2000; 1, 2: 经 BamH /Xho 双酶切; 3, 4: 经 Nsi /BssH 双酶切

3 讨论

基因枪技术又被称为微粒轰击技术 (particle bombardment technology),其基本原理是将外源基因包裹到比重较大而化学性质很稳定的微米级的金或钨上,然后用微粒加速装置打入靶细胞或组织。基因枪技术早期多用于在植物中转移基因,通过提供给包裹有 DNA 的金颗粒很高的初速度,使其穿透植物的细胞壁,使质粒 DNA 有效转入细胞。随后,这项技术被应用于哺乳动物实验系统^[10]。本实验所用的基因枪依靠氦气提供给金颗粒很高的初速度,使其穿透靶细胞表面,将目的基因带入细胞。即使微颗粒被导入细胞之间,作为异物的它们也可能诱导细胞产生吞噬作用,从而进一步增加外源基因进入细胞的概率。

非病毒基因递送系统是未来的发展方向,也是现在基因治疗研究的热点。基因枪作为一种纯物理的基因转移方法,已成

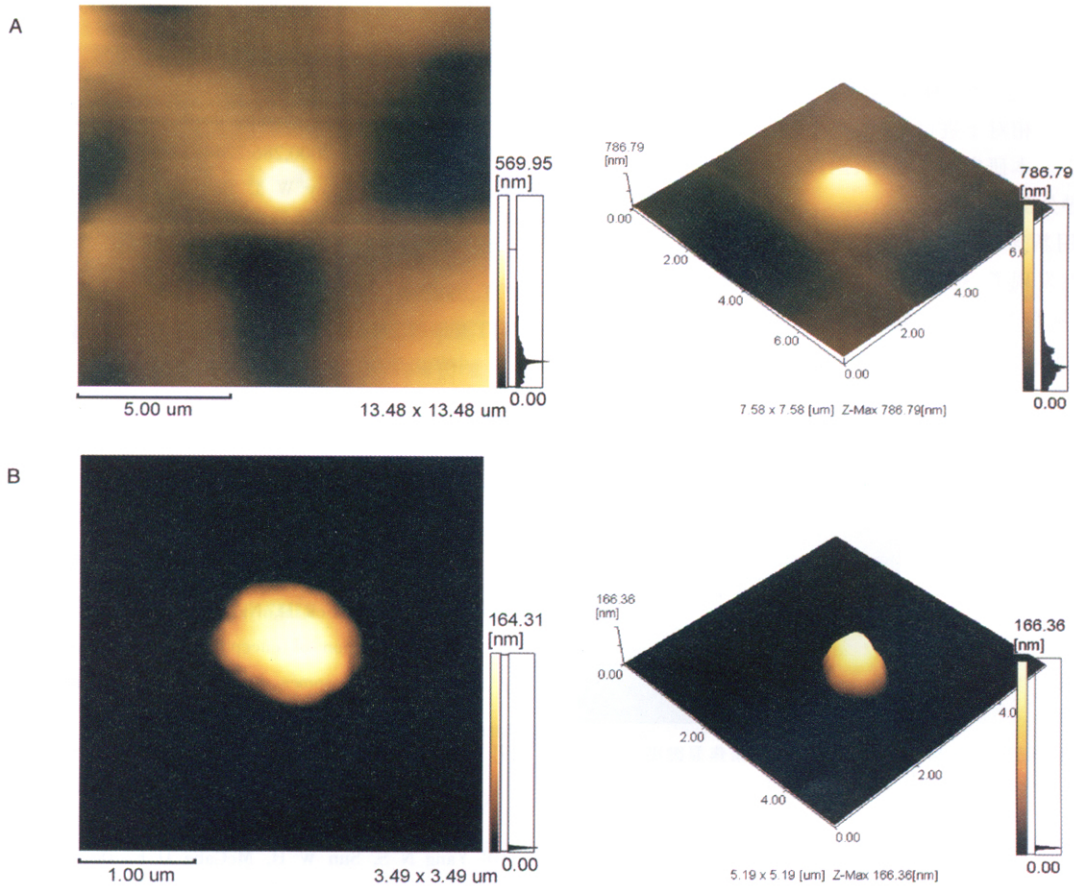


图3 基因枪子弹制备的原子力显微镜扫描图
A:金颗粒;B:DNA包裹金颗粒形成的复合物

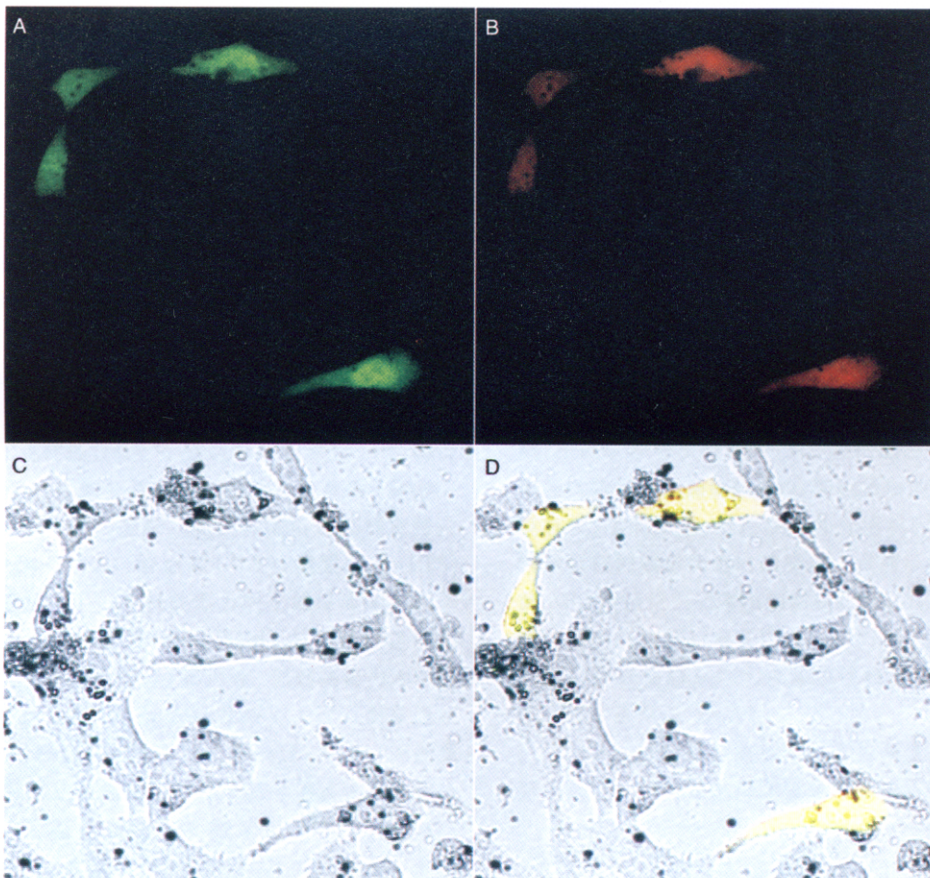


图4 实验组细胞转染24 h后的激光扫描共聚焦显微图
A:绿色荧光;B:红色荧光;C:明场细胞;D:红、绿荧光共表达

功地用于介导多种目的地基因的体内外转移, 在肿瘤基因治疗中发挥着重要作用, 也必将发挥更大的作用。目前研究中较多采用的是美国 BIO-RAD 公司的 Helios 基因枪, 而国产基因枪的应用在国内报道很少。相对于进口枪, 国产基因枪降低了科研成本, 更加有利于推广。本研究结果表明, 国产新芝 SJ-500 型基因枪可以有效地转导外源基因。

我们在使用新芝 SJ-500 型手提式基因枪转染体外培养的细胞系时, 仍然发现了一些不足之处, 特别是转染效率尚不够高, 这可能与金颗粒的大小、每颗子弹的携金量 (MLQ) 及金颗粒上包裹的 DNA 量 (DLR)、轰击枪数、轰击距离、轰击压力等诸多因素有关, 还需要进一步的研究和探索。

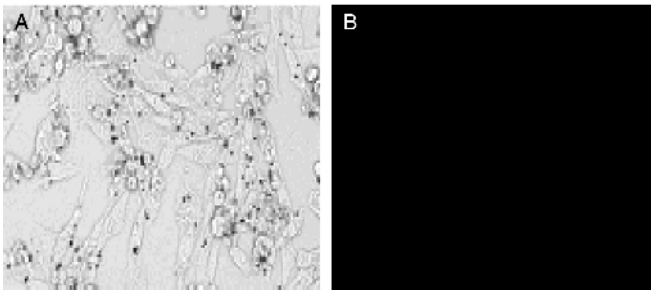


图5 对照组细胞转染 24 h 后的激光扫描共聚焦显微镜图
A: 明场细胞; B: 对照组荧光图

参考文献

- [1] 何保凌, 孙恩杰, 黄文. 基因枪技术及其在基因治疗中的应用进展 [J]. 生物学杂志, 2007,24(2):47-50.
- [2] Miller A D. Human gene therapy comes of age[J]. Nature, 1992, 357:455-460.
- [3] Marshall E. Gene therapy death prompts review of adenovirus vector[J]. Science, 2000,286:2244-2245.
- [4] Alessi S, Ramsey W J, Bornstein S R, et al. Adenoviral vectors can impair adrenocortical steroidogenesis. Clinical implication for natural infection and gene therapy [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002,99(11):7484.
- [5] 查园园, 林晨, 梁萧, 等. 基因枪在肿瘤基因治疗中的应用价值[J]. 中华医学杂志, 2000,80(7):522-525.
- [6] Mountford P, Smith A. Internal ribosome entry site and dicistronic RNAs in mammalian transgenesis[J]. Trends Genet, 1995,11(5):179-184.
- [7] Pelletier J, Sonenberg N. Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA[J]. Nature, 1988,334(6180):320-351.
- [8] Jang S, Krausslich H, Nicklin M, et al. A segment of the 5' non-translated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation[J]. J Virol, 1988,62(8):2636-2643.
- [9] 詹林盛, 饶林, 彭剑淳, 等. HCV IRES 介导萤火虫荧光素酶翻译的双顺反子载体的构建与在小鼠体内的表达[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2004,20(3):330-334.
- [10] Yang N S, Sun W H, McCabe D E. Developing particle-mediated gene-transfer technology for research into gene therapy of cancer [J]. Mol Med Today, 1996,11:476-481.