

不同电转仪的电转参数、质粒用量和拓扑结构对猪胎儿成纤维细胞转染效率的影响

钟翠丽¹, 李国玲¹, 莫健新¹, 全绒¹, 王豪强¹, 李紫聪¹, 吴珍芳^{1,2}, 张献伟^{1,2}

1. 华南农业大学国家生猪种业工程技术研究中心, 广州 510642;
2. 广东温氏食品集团股份有限公司, 新兴 527400

摘要: 为获得猪胎儿成纤维细胞(porcine fetal fibroblasts, PFFs)最佳的电转染效率, 本研究利用荧光激活细胞分选技术(fluorescence activated cell sorting, FACS)辅助优化 NEPA 21 和 Nucleofector™ 2b 两种电转仪电转染 PFFs 细胞的参数, 比较不同质粒用量和拓扑结构在 ECM® 830、NEPA 21 和 Nucleofector™ 2b 中的转染效率。结果显示: NEPA 21 电转 PFFs 的最佳穿孔参数为脉冲电压 200 V, 脉冲长度 3 ms, 脉冲间隔 50 ms, 脉冲次数 3 次, 脉冲电压衰减幅度 10%; Nucleofector™ 2b 在 U-023 的转染参数下达到最高转染效率。ECM® 830 和 Nucleofector™ 2b 的最适质粒用量都为 10 μg, 而 NEPA 21 为 8 μg; 超螺旋质粒比线性化质粒的转染效率更高, 且 3 种仪器中 Nucleofector™ 2b 转染效果最佳。本研究综合考虑电转仪、电转参数、质粒用量和拓扑结构的影响因素以优化 PFFs 的电转条件, 为高效制备转基因猪及基因编辑猪的研究奠定基础。

关键词: 电转染; 猪胎儿成纤维细胞; ECM® 830; NEPA 21; Nucleofector™ 2b

Effects of parameters, plasmid dosages and topological structures on transfection efficiency of porcine fetal fibroblasts using different electroporators

Cuili Zhong¹, Guoling Li¹, Jianxin Mo¹, Rong Quan¹, Haoqiang Wang¹, Zicong Li¹, Zhenfang Wu^{1,2}, Xianwei Zhang^{1,2}

1. National Engineering Research Center for Breeding Swine Industry, South China Agricultural University, Guanzhou 510642, China;
2. Guangdong Food Group Limited Company, Xinxing 527400, China

Abstract: To obtain an ideal transfection efficiency of porcine fetal fibroblasts, fluorescence activated cell sorting (FACS) was used to optimize parameters for transfection of porcine fetal fibroblasts (PFFs) with ECM® 830, NEPA

收稿日期: 2017-03-06; 修回日期: 2017-04-07

基金项目: 国家转基因重大专项(编号: 2016ZX08006002)课题, 广东省科技厅平台条件建设项目(编号: 2013B070702003)和粤西“扬帆计划”博士后人才扶持基金资助项目(2016)资助[Supported by the National Transgenic Major Project (No. 2016ZX08006002), Department of

Science and Technology of Guangdong Province (No. 2013B070702003) and Yuexi "Flying Sail Program" Postdoctoral Foundation(2016)]

作者简介: 钟翠丽, 硕士研究生, 专业方向: 动物遗传育种与繁殖。E-mail: 1014942996@qq.com

通讯作者: 张献伟, 博士, 在站博士后, 研究方向: 动物遗传育种与繁殖。E-mail: zxianw@163.com

DOI: 10.16288/j.ycz.17-080

网络出版时间: 2017/9/14 9:11:30

URI: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20170914.0911.002.html>

21 and Nucleofector™ 2b in different conditions such as electroporation parameters, plasmid dosages and topological structures. The results show that the optimum poring pulse parameter of NEPA 21 is voltage 200 V, continuous 3 ms, interval 50 ms, 3 times, voltage attenuation range of 10%; and the transfection efficiency of Nucleofector™ 2b is highest under U-023 program. Under the optimum conditions, FACS analysis demonstrates that Nucleofector™ 2b and ECM® 830 have the highest transfection efficiency when transfecting 10 µg supercoiled plasmids into PFFs, and 8 µg for NEPA 21. Supercoiled plasmids show higher transfection efficiencies than linearized plasmids. Moreover, Nucleofector™ 2b has the highest transfection efficiency among the three electroporation instruments. This study paves the way to generate transgenic or gene editing pigs with high efficiency.

Keywords: electroporation; porcine fetal fibroblasts(PFFs); ECM® 830; NEPA 21; Nucleofector™ 2b

随着转基因技术的发展, 转基因猪的制备体系逐渐完善, 但是制备效率低下仍然大大限制了转基因技术的应用。研究表明, 转基因效率与猪体细胞克隆的供体细胞有关^[1], 而目前猪胎儿成纤维细胞 (porcine fetal fibroblasts, PFFs) 是使用最广泛的猪体细胞克隆供体细胞。Liu 等^[2]对比 PFFs、成体成纤维细胞、猪成体脂肪前体细胞和猪成体血间充质细胞的克隆效率发现, 虽然 PFFs 的囊胚率为 30.38%, 低于其他几种细胞 (成体成纤维细胞、猪成体脂肪前体细胞和猪成体血间充质细胞分别为 37.94%、34.65% 和 34.87%), 但是其怀孕率和克隆效率显著高于其他细胞, 分别为 74.19% 和 1.5%; 另外, PFFs 供体细胞制备克隆胚胎后期发育异常率远低于其他几种细胞 (PFFs、成体成纤维细胞、猪成体脂肪前体细胞和猪成体血间充质细胞分别为 10.87%、56.57%、24.39% 和 51.85%)。目前, 已有多篇以 PFFs 细胞为供体的转基因猪的报道, 如 2014 年 Li 等^[3]运用 PFFs 成功制备世界首例 *ROSA26* 定点基因敲入猪; 2016 年 Lai 等^[4]通过 CRISPR/Cas9 介导的基因组编辑技术将 *Oct4-tdTomato* 报告基因转染至 PFFs 并成功制备基因敲入猪。因此, 研究 PFFs 细胞的制备效率对提高转基因效率具有重要意义。

转染效率是限制转基因细胞制备的主要因素之一, 据报道 PFFs 的脂质体转染效率为 22.2%^[5]。除了脂质体转染法, 目前 PFFs 转染方法还包括碳酸钙化学法和电穿孔法等。覃兆鲜等^[6]使用脂质体法和碳酸钙法转染成功, 获得 PFFs 阳性细胞, 但转染效率都比较低。与前两种方法相比, 电穿孔法更适用于 PFFs 等难转染的细胞^[7]。电穿孔法主要通过物理

电流击穿细胞膜甚至细胞核, 形成瞬时孔隙, 外源 DNA 可通过这些孔隙进入细胞甚至细胞核内^[8]。这种方法快速、简便易行、毒性小、转染效率较高, 转染效率在 30%~90% 之间^[9~11], 而且不同的电转仪的转染效率差别较大。电转仪种类繁多, 例如早期电转仪 ECM® 830 (BTX, 美国), 近年来出现的新型电转仪 NEPA 21 (NEPA GENE, 日本) 和 Nucleofector™ 2b (LONZA, 德国) 等。NEPA 21 高效基因转染系统含有反向导入及电压衰减的电转程序设计, 具有转染效率高、存活率高和不需要特殊转染试剂的特点。而配合专用转染试剂盒的 Nucleofector™ 2b 则具有转染效率高、DNA 直接入核和简单易用的优势。目前 ECM® 830 是运用比较成熟的电转仪, 虽然可以借鉴 Ross 等^[9]全面优化的 ECM® 2001 电转 PFFs 的最佳参数 (脉冲电压 300 V, 脉冲长度 1 ms, 脉冲次数 3 次), 但仍需进一步探索质粒的用量和拓扑结构对 PFFs 的转染效率的影响。虽然已报道了 Nucleofector™ 2b 转染 PFFs 的最佳程序, 但是没有进一步综合探讨电转程序、质粒的用量和拓扑结构对 PFFs 转染的影响^[10]。此外, NEPA21 主要用于神经干细胞体外电转染, 但目前还没有报道用于 PFFs 的电转染^[11,12], 因此需要进行在电转参数、质粒的用量和拓扑结构等方面的实验优化。本研究通过优化不同电转仪的电转参数、质粒的用量和拓扑结构, 综合评估电转 PFFs 的最佳电转仪及其电转条件, 为高效率、低成本制备转基因猪奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

电转仪 ECM[®] 830 购自美国 BTX 公司; 电转仪 Nucleofector[™] 2b 购自德国 LONZA 公司; NEPA21 购自日本 NEPA GENE 公司。PFFs 细胞由广东温氏食品集团股份有限公司提供; 质粒 pPB-UBC-EGFP (7.6 kb) 由英国 Wellcome Trust Sanger Institute 提供。Opti-MEM[®] I Reduced Serum Medium 购自 Thermo Fisher Scientific(美国); Nucleofector[™] 2b 电转液 Basic Nucleofector Kit for Primary Mammalian Fibroblasts 购自德国 Amaxa 公司; Endo-free Plasmid Maxi Kit 购自美国 Omega; FastDigest[®] Not I 限制性内切酶购自 Thermo Fisher Scientific(美国); 澳洲胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自 Gibco(美国); Countess[®] II FL 全自动细胞计数仪购自 Life invitrogen(美国)。

1.2 方法

1.2.1 质粒准备

pPB-UBC-EGFP 依照 Endo-free Plasmid Maxi Kit 说明书进行抽提, 取部分超螺旋 pPB-UBC-EGFP 质粒 DNA, 用 FastDigest[®] Not I 限制性内切酶酶切, 纯化回收, 制备线性化的 pPB-UBC-EGFP 质粒 DNA 备用。

1.2.2 PFFs 电转染步骤及检测方法

PFFs 细胞经解冻和复苏培养后, 传代至含 10 mL 完全培养基(12%FBS)的 10 cm 培养板, 于 39℃、5%CO₂ 培养箱中培养至汇合度达 80%~90%, 经 0.05%胰酶消化后进行细胞计数。吸取 1×10⁶ 个细胞悬液至新的离心管中, 离心后弃上清, 分别根据表 1 中处理组 1 和处理组 2 对应的电转仪添加相应的电转预混液, 制成单细胞悬液(空白组仅添加 100 μL 相应体积的电转液和水, 不电转)转至 2 mm 间距的无菌电转杯中, 根据不同仪器设定的电转参数进行电转。然

表 1 实验分组情况

Table 1 Experimental groups

组别	电转仪	电转预混液
处理组 1	NEPA	100 μL NEPA 电转液+质粒

空白组 1	不电转	100 μL NEPA 电转液和水
处理组 2	LONZA	100 μL LONZA 电转液+质粒
空白组 2	不电转	100 μL LONZA 电转液和水

注: NEPA 代表 NEPA 21; NEPA 电转液为无血清 Opti-MEM; LONZA 代表 Nucleofector[™] 2b; LONZA 电转液由电转试剂盒 Basic Nucleofector Kit for Primary Mammalian Fibroblasts (Amaxa, 德国)中 Nucleofector[™] Solution 和 supplement(4.5:1)组成。

后转移所有细胞至 6 孔板, 添加 2 mL/孔 12% FBS 的完全培养基, 置于 39℃、5%CO₂ 的培养箱中培养。

电转后立即吸取少量细胞悬浮液进行台盼蓝染色。细胞悬液与 0.4%台盼蓝溶液以 9:1 混合后加样到一次性 Countess[®] 细胞计数板上。在 3 min 内使用 Countess[®] II FL 全自动细胞计数仪(Life Invitrogen, 美国)分析细胞存活率。

电转 6 h 后更换成含有终浓度 100 U/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素、12% FBS 的 DMEM 完全培养基继续培养。电转 48 h 后用 0.05%胰酶消化细胞, 1000 r/min 离心 5 min, 添加 1 mL/孔 PBS 重悬, 利用荧光激活细胞分选技术(fluorescence activated cell sorting, FACS)检测表达绿色荧光细胞数量, 计算转染效率(绿色荧光细胞数/总细胞数)。

1.2.3 电转参数优化

ECM[®] 830 电转 PFFs 的最佳电转参数可借鉴 Ross 等^[9]研究结果(脉冲电压 300 V, 脉冲长度 1 ms, 脉冲次数 3 次), 而 NEPA 21 和 Nucleofector[™] 2b 电转 PFFs 细胞的优化参数尚无报道。为优化 NEPA 21 和 Nucleofector[™] 2b 转染 PFFs 细胞的最佳参数, 本研究首先将转染实验分为两个独立的处理组, 即 NEPA 21 组和 Nucleofector[™] 2b 组, 每组设定 1 个对应的空白组(仅添加 100 μL 相应体积的电转液和水, 不电转)。根据电转仪 NEPA 21 设定的电转参数将 NEPA 21 组又分为 4 个小组(NEPA-1、NEPA-2、NEPA-3 和 NEPA-4)(表 2), 根据电转仪 Nucleofector[™] 2b 推荐的原代动物成纤维细胞电转参数又将其设置为 A-033 组和 U-023 组。每组处理重复 3 次。电转步骤及检测见 1.2.2。此外 NEPA 21 的电转液为无血清 Opti-MEM, 而 Nucleofector[™] 2b 的电转液为 Basic Nucleofector Kit for Primary Mammalian Fibroblasts 中 Nucleofector[™] Solution 和 Supplement 按比例 4.5:1 混合的溶液。

1.2.4 优化质粒用量

为优化电转仪 ECM[®] 830、NEPA 21 和 Nucleofector[™] 2b 的质粒 DNA 最适用量, 使用上述优化的

表 2 NEPA 21 穿孔脉冲参数

Table 2 Poring pulse parameters of NEPA 21

编号	脉冲电压(V)	脉冲长度(ms)	脉冲间隔(ms)	脉冲次数	衰减幅度(%)	电极
NEPA-1	150	5	50	2	10	+
NEPA-2	200	3	50	3	10	+
NEPA-3	275	1.5	50	2	10	+
NEPA-4	300	1	50	3	10	+

注: NEPA 21 电转参数设定分为两部分: 穿孔脉冲和转移脉冲, 其中转移脉冲参数固定不变(脉冲电压 20 V, 脉冲长度 50 ms, 脉冲间隔 50 ms, 脉冲次数 5 次, 电压衰减幅度 40%, 电极+/-)。上述 4 种电转参数由 NEPA 21 供货商(广州市华粤行仪器有限公司)提供, 转染质粒为超螺旋 pPB-UBC-EGFP, 用量 $8 \mu\text{g}/1 \times 10^6$ 个细胞。

$8 \mu\text{g}$ 和 $10 \mu\text{g}$ 的超螺旋质粒电转染 PFFs, 根据电转仪型号将实验设置为 3 个处理组, 即 ECM[®] 830 组、NEPA 21 组和 Nucleofector[™] 2b 组, 每个处理设置 1 个对应的空白组(仅添加 $100 \mu\text{L}$ 相应体积的电转液和水, 不电转), 每个处理组根据超螺旋质粒用量又分为 4 个小组($4 \mu\text{g}$ 、 $6 \mu\text{g}$ 、 $8 \mu\text{g}$ 和 $10 \mu\text{g}$ 组), 每组处理重复 3 次。电转步骤及检测见 1.2.2。ECM[®] 830 电转预混液由 $200 \mu\text{L}$ Cytomix 和质粒组成, 其中 Cytomix 是 25% Opti-MEM 和 75% Cytosalts (120 mmol/L KCl 、 $0.15 \text{ mmol/L CaCl}_2$ 、 $10 \text{ mmol/L K}_2\text{HPO}_4$ 、 $\text{pH } 7.6$ 、 $5 \text{ mmol/L LM MgCl}_2$) 的混合液^[9]。

1.2.5 质粒拓扑结构的影响

为了探索质粒拓扑结构对 PFFs 细胞电转效率的影响, 使用上述 3 种电转仪的最优电转参数和摸索的最适质粒用量, 分别使用超螺旋和线性化的质粒电转 PFFs, 根据电转仪分为 3 个处理组, 即: ECM[®] 830 组、NEPA 21 组和 Nucleofector[™] 2b 组, 每个处理组设置 1 个对应的空白组(仅添加 $100 \mu\text{L}$ 相应体积的电转液和水, 不电转), 每个处理组根据质粒分子结构分为两个小组(超螺旋和线性化质粒), 每组处理重复 3 次, 电转步骤及检测见 1.2.2。

1.2.6 电转仪的转染效率比较

根据 ECM[®] 830、NEPA 21 和 Nucleofector[™] 2b 的最佳电转条件(电转参数、质粒用量和拓扑结构)转染 PFFs 细胞, 每种仪器实验重复 3 次, 比较三者转染效率以探索电转仪对 PFFs 转染效率的影响, 电

NEPA 21 和 Nucleofector[™] 2b 的电转仪参数, 及文献报道的 ECM[®] 830 最适电转参数(脉冲电压 300 V , 脉冲长度 1 ms , 脉冲次数 3 次)^[9], 分别将 $4 \mu\text{g}$ 、 $6 \mu\text{g}$ 、

转步骤及检测见 1.2.2。

1.2.7 统计学处理

采用 SPSS18 软件进行单因素分析(Duncan)。数据以 Mean \pm SD 表示, 显著性水平 $P < 0.05$ 则表示差异有统计学显著性意义。

2 结果与分析

2.1 质粒线性化和细胞培养

使用 Not I 限制性内切酶线性化超螺旋质粒 pPB-UBC-EGFP(图 1A), 进行琼脂糖凝胶电泳检测, 在 $6000 \sim 10\,000 \text{ bp}$ 间有一条明显的特异条带, 与预期条带位置相符(图 1B)。复苏并培养 PFFs 至汇合度 $80\% \sim 90\%$ 时进行电转(图 1C)。

2.2 不同电转参数的比较

在 4 种不同的电转参数(表 2)下以 $8 \mu\text{g}$ 质粒电转 PFFs, NEPA 21 的最佳电转参数为 NEPA-2(脉冲电压 200 V , 脉冲长度 3 ms , 脉冲间隔 50 ms , 脉冲次数 3 次)时, 转染效率可高达 $89.43\% \pm 2.25\%$, 但是 4 种电转参数的转染效率无显著差异($P > 0.05$)(图 2)。而 Nucleofector[™] 2b 两种电转参数(A-033 和 U-023)的转染效率分别为 91.32% 和 93.32% ($P > 0.05$, 图 3A), 细胞存活率分别为 96% 和 60% (图 3B)。本试验主要根据转染效率高下来评估转染条件, 故选择在 U-023 下比较其他因素对转染效率的影响。

2.3 不同质粒用量对 PFFs 转染效率的影响

在转染效率最高的电转参数下分别使用 4 μg、6 μg、8 μg 和 10 μg 的 7.6 kb 超螺旋质粒电转 1×10⁶ 个 PFFs, 结果显示, 在一定范围内, 质粒用量和转

染效率成正比(图 4)。在 ECM[®] 830 的 4 种质粒用量中, 10 μg 质粒的转染效率高达 88.03%±0.50% ($P < 0.05$)。NEPA 21 的最佳质粒用量为 8 μg(64.74%±3.54%), 但是与 10 μg 质粒的转染效率(63.73%±0.46%)差异

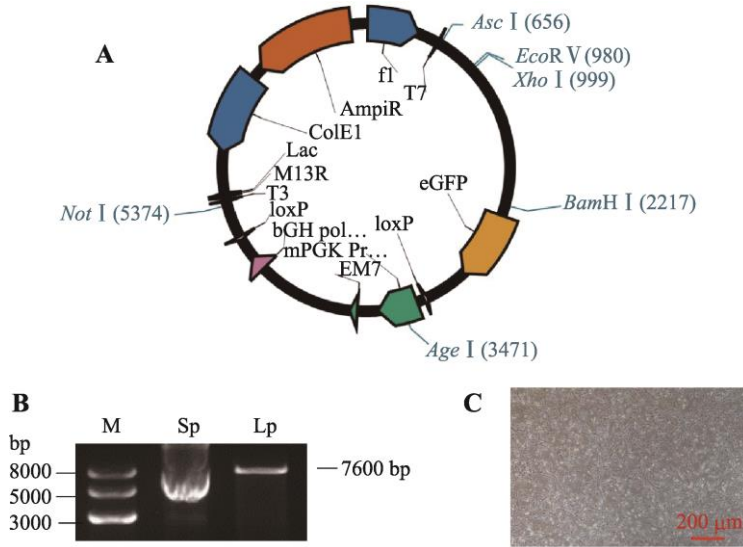


图 1 质粒酶切和 PFFs 显微观察

Fig. 1 Digested plasmids and PFFs observed under a microscope

A: 质粒 pPB-UBC-EGFP 图谱; B: 质粒 pPB-UBC-EGFP 超螺旋和线性化(Not I)结构电泳检测; C: 电转前 PFFs 镜检。M: Marker; Sp: 超螺旋质粒; Lp: 线性化质粒。

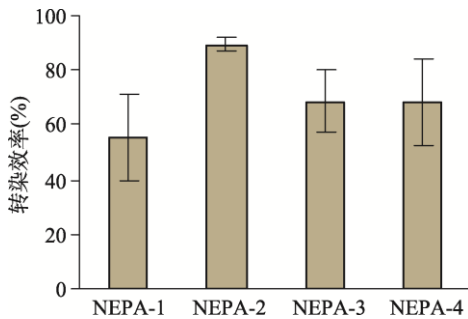


图 2 NEPA 21 4 种不同的电转参数 PFFs 转染效率
Fig. 2 Transfection efficiency of PFFs by NEPA 21 under four different electroporation parameters

NEPA-1~NEPA-4 的电转参数见表 2。

不显著($P > 0.05$); 而 Nucleofector[™] 2b 的最佳质粒用量为 10 μg (98.85%±0.61%), 与 8 μg 质粒的转染效率(96.53%±0.69%)无显著差异($P > 0.05$)。因此 ECM[®] 830 和 Nucleofector[™] 2b 的最佳质粒用量均为 10 μg, 而 NEPA 21 则为 8 μg。

2.4 不同质粒拓扑结构对 PFFs 转染效率的影响

为探索不同质粒拓扑结构对 PFFs 转染效率的影响, 利用 ECM[®] 830、NEPA 21 和 Nucleofector[™] 2b 3 种电转仪, 按照转染效率最高的电转参数分别将 10 μg 超螺旋和线性化质粒电转 PFFs 细胞, 结果显示,

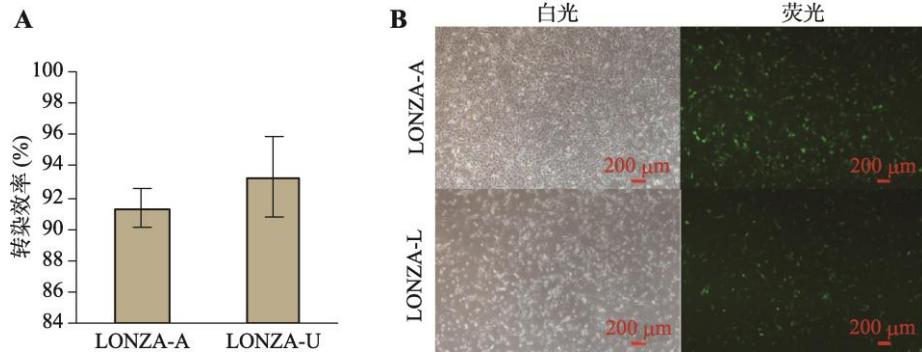


图 3 Nucleofector™ 2b 两种电转参数的 PFFs 转染效率

Fig. 3 Transfection efficiency of PFFs by Nucleofector™ 2b under two different electrical parameters

A: 两种不同电转参数下 Nucleofector™ 2b 的转染效率; B: Nucleofector™ 2b 电转 PFFs 显微观察结果(48 h)。LONZA-A: A-033; LONZA-U: U-023; 白光: 白光视野下 PFFs 细胞的形态和分布; 荧光: 488 nm 蓝色激发光视野下 PFFs 中绿色荧光蛋白表达情况。

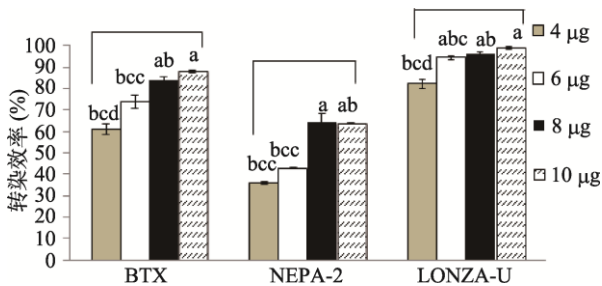


图 4 不同质粒用量条件下的转染效率

Fig. 4 Transfection efficiency of different plasmid dosages

BTX, 即 ECM® 830, 固定电转参数为脉冲电压 300 V、脉冲长度 1 ms、脉冲次数 3 次; NEPA-2, 即 NEPA 21 电转仪, 固定电转参数为脉冲电压 200 V、脉冲长度 3 ms、脉冲间隔 50 ms、脉冲次数 3 次, 脉冲电压衰减幅度 10%; LONZA-U, 即 Nucleofector™ 2b, 电转参数为 U-023。

3 种电转仪分别使用线性化质粒和超螺旋质粒的转染效率为 $20.71\% \pm 0.20\%$ 和 $37.61\% \pm 0.69\%$ 、 $31.37\% \pm 4.50\%$ 和 $63.88\% \pm 0.31\%$ 、 $42.09\% \pm 2.14\%$ 和 $72.64\% \pm 0.32\%$ (图 5)。由此可知, 线性化质粒的转染效率显著低于超螺旋质粒($P < 0.05$), 仅为超螺旋质粒转染效率的 49.11%~57.94%。因此, 超螺旋质粒 DNA 比线性化的质粒 DNA 更适合电转染。

2.5 不同电转仪对 PFFs 转染效率的影响

利用上述各仪器转染效率最高的电转参数 (ECM® 830: 脉冲电压 300 V, 脉冲长度 1 ms, 脉冲次数 3 次; NEPA 21: 脉冲电压 200 V, 脉冲长度 3 ms, 脉冲间隔 50 ms, 脉冲次数 3 次, 脉冲电压衰减幅度 10%; Nucleofector™ 2b: U-023) 和 8 μg 超螺旋质粒, 分别电转 PFFs 并比较不同电转仪最佳转染效率的差异。结果显示, 3 种电转仪的转染效率均在 70% 以上(图 6), 其中 Nucleofector™ 2b 转染效率最高, 达 $93.32\% \pm 2.54\%$, 其次是 NEPA 21 ($89.43\% \pm 2.25\%$) 和 ECM® 830 ($76.50\% \pm 1.41\%$)。此外, 观察图 6B 细胞荧光强度可知, ECM® 830 荧光细胞的平均荧光强度远远低于 NEPA 21 和 Nucleofector™ 2b。

3 讨论

本研究探索了 ECM® 830、NEPA 21 和 Nucleofector™ 2b 3 种不同电转仪对 PFFs 转染效率的影响, 优化了包括电转参数、质粒用量和质粒拓扑结构的电转条件, 得到 NEPA 21 和 Nucleofector™ 2b 转染的最适参数和质粒的最佳用量, 并且证实超螺旋质粒 DNA 比线性化质粒 DNA 具有显著的转染优

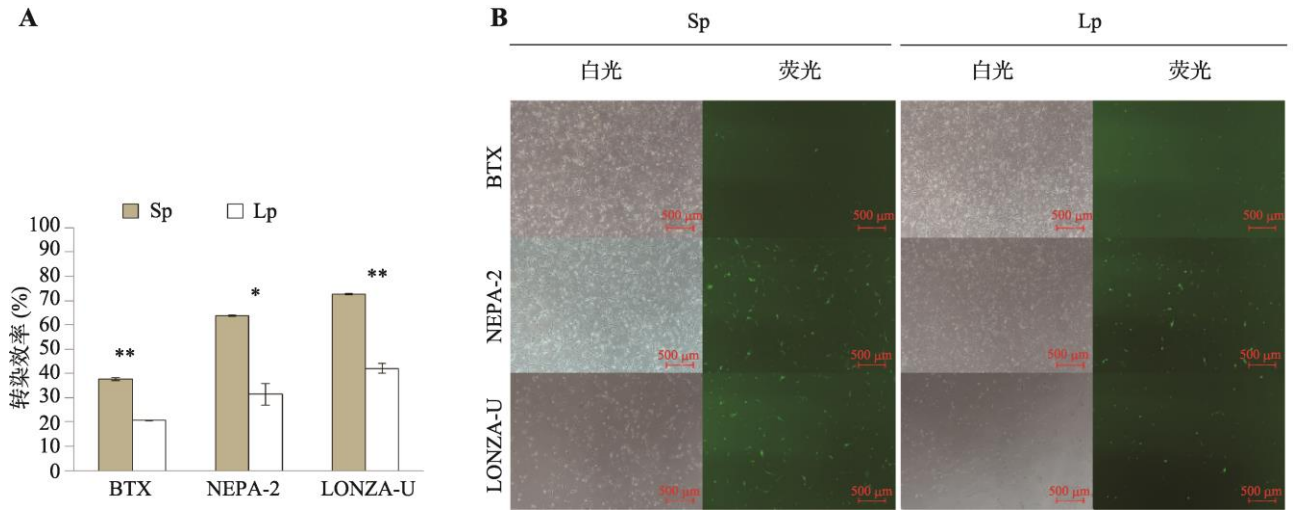


图 5 不同拓扑结构质粒的转染效率

Fig. 5 Transfection efficiency of plasmids with different structures

A: 超螺旋和线性化质粒转染效率比较结果; B: 超螺旋和线性化质粒的转染效率镜检(质粒用量 10 μg)。Sp: 超螺旋质粒; Lp: 线性化质粒; *表示 $P < 0.05$, **表示 $P < 0.01$; BTX: ECM[®] 830, 其电转参数为脉冲电压 300 V、脉冲长度 1 ms、脉冲次数 3 次; NEPA-2: NEPA 21, 电转参数为脉冲电压 200 V、脉冲长度 3 ms、脉冲间隔 50 ms、脉冲次数 3 次, 脉冲电压衰减幅度 10%; LONZA-U: Nucleofector[™] 2b, 电转参数为 U-023。白光: 白光视野下 PFFs 细胞的形态和分布; 荧光: 488 nm 蓝色激发光视野下 PFFs 中绿色荧光蛋白表达情况。

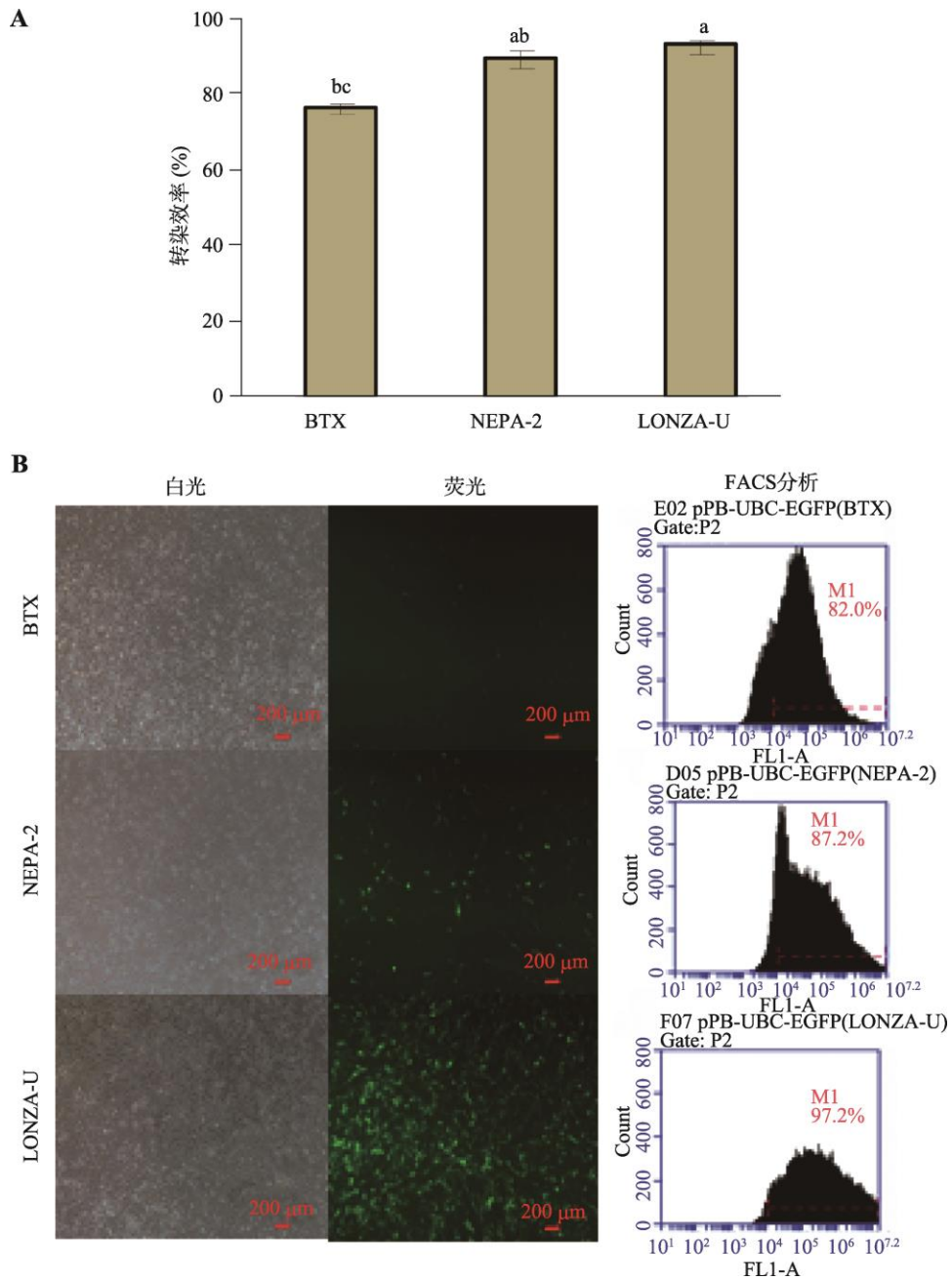


图 6 3 种电转仪的转染效率

Fig. 6 Transfection efficiency using three types of electroporation instruments

A: BTX、NEPA-2 和 LONZA-U 转染效率比较结果; B: BTX、NEPA-2 和 LONZA-U 转染效率镜检及流式分析统计结果。BTX: ECM® 830, 其电转参数为脉冲电压 300 V、脉冲长度 1 ms、脉冲次数 3 次; NEPA-2: NEPA 21, 其电转参数为脉冲电压 200 V、脉冲长度 3 ms、脉冲间隔 50 ms、脉冲次数 3 次, 脉冲电压衰减幅度 10%; LONZA-U: Nucleofector™ 2b; , 其电转参数为 U-023 白光: 白光视野下 PFFs 细胞的形态和分布; 荧光: 488 nm 蓝色激发光视野下 PFFs 中绿色荧光蛋白表达情况。

势, 为高效获得 PFFs 核供体细胞奠定基础。

本研究结果显示, PFFs 转染效率与电转仪有关。在电转参数为脉冲电压 300 V、脉冲长度 1 ms、脉冲次数 3 次的条件下, 本研究 ECM® 830 转染 pPB-

Ubc-EGFP(7.6 kb 超螺旋质粒, 用量为 4~10 μg) 的效率为 37.61%~88.03%(图 4~图 6), 略高于 Ross 等^[9]使用 ECM® 2001 转染 pCAGG-EGFP(5.8 kb 超螺旋质粒, 用量为 2.5 μg) 的效率(60%~70%), 这可能

与质粒大小和用量有关。而本研究首次使用 NEPA 21 电转 PFFs, 最优电转条件是电转参数 NEPA-2(脉冲电压 200 V、脉冲长度 3 ms、脉冲间隔 50 ms、脉冲次数 3 次, 脉冲电压衰减幅度 10%), 使用 8 μg 超螺旋质粒, 转染效率为 64.74%~89.43%(图 4 和图 6), 略高于 ECM[®] 2001 转染 pCAGG-EGFP(5.8 kb 超螺旋质粒, 用量为 2.5 μg)的效率^[9], 表明 NEPA 21 转染效果较优。与上述两种电转仪相比, 适用性强的 Nucleofector[™] 2b 电转 PFFs 细胞、猪耳皮成纤维细胞和猪肾细胞等都可获得比较高的转染效率^[11,12]。Nakayama 等^[10]利用 Nucleofector[™] 2b, 在 U-023 下使用 pmaxGFP(3.5 kb 超螺旋质粒, 用量为 10 μg)的转染效率为 79%, 而本研究在同一电转参数下使用 7.6 kb 超螺旋质粒的转染效率相对较高(72.64%~98.85%, 图 3~图 6)。Nucleofector[™] 2b 两种程序电转效率均高达 90% ($P>0.05$, 图 3A), 高于上述两种电转仪的转染效率, 具有明显优势且应用价值更高, 进一步分析两种程序的细胞存活率, 结果显示为 A-033 和 U-023 分别为 96%和 60%(图 3B), 即对于小载体转染试验而言, A-023 细胞存活率较高, U-023 转染效率较高, 因此可结合两种程序的优势和不同试验需求来选择适合的电转参数。此外, Nucleofector[™] 2b 适用于电转 PFFs 的电转程序除了 A-033 和 U-023, 还有 U-012、V-013 等^[10,11]。综合比较 3 种电转仪可知, Nucleofector[™] 2b 虽然转染效率最高, 操作简便, 但其转染试剂价格高昂, 实验运行成本较高; 而 NEPA 21 对转染试剂要求不严格, 以 Opti-MEM 为电转液即可获得高达 89.43%的转染效率(图 6), 仅次于 Nucleofector[™] 2b, 具有明显的价格优势。同样 ECM[®] 830 的电转液(25% Opti-MEM 和 75% cytosalts)也容易配制, 并且在对效率要求不高的实验中, 仍优于脂质体的转染效率。

根据电转仪的工作原理将上述 3 种电转仪分为膜转型(ECM[®] 830)和核转型(Nucleofector[™] 2b 和 NEPA 21), 其中核转型电转仪除了转染效率较高, 细胞荧光强度也明显强于膜转型。这可能与以下两点有关: (1)与外源 DNA 导入细胞的位置有关, 因为外源 DNA 需要克服核酸酶的降解和核膜屏障后才能进入细胞核启动转录^[13], 所以直接将外源 DNA

导入细胞核内的核转型相对容易转录和表达; (2)进入细胞核的外源 DNA 量可能是影响外源基因瞬时表达量的主要原因之一, 故核转型电转仪细胞荧光强度可能与导入细胞核的外源 DNA 摩尔数有关。

此外, 质粒的拓扑结构也是影响 3 种电转仪转染 PFFs 主要因素之一。由图 5 可知, 线性化的质粒转染效率较低, 仅为超螺旋质粒的 49.11%~57.94%。但是在宿主细胞内随机断裂的超螺旋质粒难以在基因重组时确保外源 DNA 的完整性^[14,15], 而且细胞裂解液中更稳定的线性化质粒有利于外源 DNA 同源重组^[16], 因此进一步提高线性化质粒的转染效率有利于提高转基因阳性率。针对上述情况提出以下两种策略: (1)脂质体包裹线性化质粒以减少空间位阻。进入细胞的线性化质粒数目比超螺旋和开环质粒少^[17], 而且与脂质体结合后在原子力显微镜下观察发现线性化质粒的空间结构比超螺旋和开环质粒大^[18], 这可能是由于空间位阻较大而难以进入细胞, 最终影响线性化质粒的转染效率。Von 等^[18]研究表明, 提高线性化质粒的脂质体包裹程度可提高转染效率; (2)改变转染方式, 如电转、Effectene、Lipofectamine 2000 等组合转染。潘俊杰等^[19]研究表明, 组合转染如电转与 Effectene、电转与 Lipofectamine 2000 分别提高 18.36%和 34.48%的电转效率。

参考文献(References):

- [1] 魏庆信, 郑新民, 乔宪风, 李莉, 华文君, 肖红卫, 王亚刚. 影响制备转基因猪效率的几个因素研究. 见: 亚洲实验动物学会联合会第三次会议暨中国实验动物学会第八届学术年会论文集. 北京, 2008.
- [2] Liu TB, Dou HW, Xiang X, Li L, Li Y, Lin L, Pang XZ, Zhang YJ, Chen Y, Luan J, Xu Y, Yang ZZ, Yang WX, Liu H, Li FD, Wang H, Yang HM, Bolund L, Vajta G, Du YT. Factors determining the efficiency of porcine somatic cell nuclear transfer: data analysis with over 200, 000 reconstructed embryos. *Cell Reprogr*, 2015, 17(6): 463–471.
- [3] Li XP, Yang Y, Bu L, Guo XG, Tang CC, Song J, Fan NN, Zhao BT, Ouyang Z, Liu ZM, Zhao Y, Yi XL, Quan LQ, Liu SC, Yang Z, G Ouyang HS, Chen YE, Wang Z, Lai LX. Rosa26-targeted swine models for stable gene over-expression and Cre-mediated lineage tracing. *Cell Res*, 2014, 24(4): 501–504.

- [4] Lai SS, Wei S, Zhao BT, Ouyang Z, Zhang QJ, Fan NN, Liu ZM, Zhao Y, Yan QM, Zhou XQ, Li L, Xin JG, Zeng YZ, Lai LX, Zou QJ. Generation of knock-in pigs carrying *oct4-tdtomato* reporter through CRISPR/Cas9-mediated genome engineering. *PLoS One*, 2016, 11(1): e0146562.
- [5] Su WJ, Jiang H, Tang DS, Hong YH. Optimization of parameters of exogene transfection of Luchuan pig fetal fibroblasts in vitro mediated by liposome. *Chin Agric Sci Bull*, 2011, 27(7): 300–303.
粟文俊, 蒋泓, 唐冬生, 洪亚辉. 脂质体转染巴马猪胎儿成纤维细胞条件的优化. *中国农学通报*, 2011, 27(7): 300–303.
- [6] 覃兆鲜, 潘天彪, 谢炳坤. 猪成纤维细胞转染方法的比较. *江苏农业科学*, 2011, 39(3): 250–251.
- [7] Liu W, Chen Y, Yue M, Yuan J, Qiu TW, Xiao D, Gu WW. An efficient method which can be used to transfect Tibetan minipig embryonic fibroblasts. *Chin J Comparat Med*, 2015(3): 64–66.
刘薇, 陈燕, 岳敏, 袁进, 邱添武, 肖东, 顾为望. 一种高效转染西藏小型猪胚胎成纤维细胞的方法. *中国比较医学杂志*, 2015(3): 64–66.
- [8] Lurquin PF. Gene transfer by electroporation. *Mol Biotechnol*, 1997, 7(1): 5–35.
- [9] Ross JW, Whyte JJ, Zhao JG, Samuel M, Wells KD, Prather RS. Optimization of square-wave electroporation for transfection of porcine fetal fibroblasts. *Transgenic Res*, 2010, 19(4): 611–620.
- [10] Nakayama A, Sato M, Shinohara M, Matsubara S, Yokomine T, Akasaka E, Yoshida M, Takao S. Efficient transfection of primarily cultured porcine embryonic fibroblasts using the Amaxa Nucleofection System™. *Cloning Stem Cells*, 2007, 9(4): 523–534.
- [11] Richter A, Kurome M, Kessler B, Zakhartchenko V, Klymiuk N, Nagashima H, Wolf E, Wuensch A. Potential of primary kidney cells for somatic cell nuclear transfer mediated transgenesis in pig. *BMC Biotechnol*, 2012, 12(1): 84.
- [12] Tsuyama J, Bunt J, Richards LJ, Iwanari H, Mochizuki Y, Hamakubo T, Shimazaki T, Okano H. MicroRNA-153 regulates the acquisition of gliogenic competence by neural stem cells. *Stem Cell Rep*, 2015, 5(3): 365–377.
- [13] Zhi HD, Tong GZ. Research progress of synthetic DNA transport system. *Adv Preve Veter Med*, 2001, 3 (2): 1–4.
智海东, 童光志. 合成 DNA 转运系统研究进展. *预防兽医学进展*, 2001, 3(2): 1–4.
- [14] Jarl CI, Rietveld EM. Transformation efficiencies and progeny analysis after varying different parameters of direct gene transfer of *Nicotiana tabacum* protoplasts. *Physiol Plant*, 1996, 98(3): 550–556.
- [15] 常淑伟, 严云勤, 佟慧丽, 刘丹, 胡倩, 王彬, 高鹏, 曹允考. 转基因动物细胞中外源基因整合位点的分析. *畜牧与兽医*, 2015, 47(11): 40–45.
- [16] Chancham P, Hughes JA. Relationship between plasmid DNA topological forms and in vitro transfection. *J Liposome Res*, 2001, 11(2–3): 139–152.
- [17] Xie TD, Sun L, Zhao HG, Fuchs JA, Tsong TY. Study of mechanisms of electric field-induced DNA transfection. IV. Effects of DNA topology on cell uptake and transfection efficiency. *Biophys J*, 1992, 63(4): 1026–1031.
- [18] Von Goll A, Levin Y, Barbosa MC, Ravazzolo AP. Linear DNA low efficiency transfection by liposome can be improved by the use of cationic lipid as charge neutralizer. *Biotechnol Prog*, 2006, 22(4): 1220–1224.
- [19] Pang JJ, Shi HM, Luo XP, Li J, Liang W, Zhang J, Ma R. Comparison of the transfection efficiency of U937 monocytes by different methods. *Fudan Univ J Med Sci*, 2010, 37(5): 594–597.
潘俊杰, 施海明, 罗心平, 李剑, 梁旺, 张进, 马端. U937 单核细胞几种不同转染方法的比较. *复旦学报(医学版)*, 2010, 37(5): 594–597.

(责任编辑: 任军)