

细胞转染技术的研究进展

许春琴, 陈建华*

中国药科大学生命科学与技术学院, 江苏 南京

收稿日期: 2022年4月16日; 录用日期: 2022年5月13日; 发布日期: 2022年5月20日

摘要

细胞转染技术是分析细胞内基因及基因产物功能的重要工具, 目前已建立了许多细胞稳定转染的方法, 这些技术被广泛应用于农业、医药和生物制药等领域中, 且在基因治疗、疫苗接种等方面上, 这些技术也为疾病的基础研究和临床治疗提供了有力的保障。本文将按照细胞转染方法的不同, 对外源基因转入受体细胞的转染技术做一个简要概述。

关键词

细胞, 外源基因, 细胞转染技术

Research Progress of Cell Transfection Technology

Chunqin Xu, Jianhua Chen*

College of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing Jiangsu

Received: Apr. 16th, 2022; accepted: May 13th, 2022; published: May 20th, 2022

Abstract

Cell transfection technology is an important tool to analyze the function of gene and gene products. At present, many methods of cell stable transfection have been established. These technologies are widely used in the fields of agriculture, medicine and biopharmaceutical industry. Moreover, on the level of gene therapy and vaccination, these technologies also provide a strong guarantee for basic research and clinical treatment of diseases. In this paper, according to the different methods of cell transfection, we will give a brief overview of cell transfection technology.

*通讯作者。

Keywords

Cell, Foreign Gene, Cell Transfection Technology

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

细胞转染技术是将外源分子如 DNA, RNA 等导入真核细胞的技术, 是研究和控制真核细胞基因功能的常规工具。根据外源基因是否整合到宿主细胞染色体上可将细胞转染技术分为稳定转染(SGE)和瞬时转染(TGE)两类。其中, 稳定转染是指转染的外源 DNA 或 RNA 可以整合到宿主细胞染色体上且宿主细胞可以长期表达目的基因和蛋白, 多用于长期观察基因对于细胞功能的影响以及蛋白之间的相互作用; 而瞬时转染是指外源 DNA 或 RNA 不整合到宿主染色体上且只持续较短的时间, 多用于启动子和其他调控原件的分析[1][2]。根据细胞转染方法的不同, 可分为物理转染法, 化学转染法, 生物学转染法。本文将对不同的细胞转染技术做一个简单介绍。

2. 物理法介导的细胞转染技术

常用的物理法介导的细胞转染技术包括显微注射技术, 电穿孔技术, 基因枪技术等[3]。

2.1. 显微注射技术

显微注射技术是指在显微镜下, 利用管尖极细(0.1~0.5 μm)的玻璃微量注射针将外源基因片段注射进入受精卵的细胞核或细胞质中。1980 年, Gordon [4]等利用原核显微注射法将外源基因成功转入小鼠体内, 并获得了稳定性遗传, 2014 年, Ivics [5]等利用转座子系统将外源基因注射到猪的受精卵细胞质中, 使重组基因得到持续表达。目前, 此法已成功运用于包括小鼠、鱼、大鼠、兔子及许多大型家畜中。该方法在原则上可以将任何外源 DNA 片段转移到任何类型的细胞中, 并且外源 DNA 的转移率和整合效率都非常高。但是, 该方法也存在许多缺点, 如外源基因插入位点的随机性会干扰目的基因的的稳定表达, 且此方法技术要求高, 针头注射会对细胞造成不可逆损伤, 降低细胞存活率, 因此不能广泛应用[1]。

2.2. 电穿孔技术

电穿孔技术是利用高脉冲短时间的高压作用下, 在细胞膜上形成空洞, 使外源基因穿孔进入细胞。1982 年 Neumann [6]等利用电脉冲技术将 TK 基因导入 TK 基因缺陷的鼠淋巴瘤细胞中, 大大提高 DNA 吸附进入细胞的能力。2012 年, Rita Arabsolghar [7]等也采用该技术将 siRNA 转染到体外培养的乳腺癌细胞中, 最终检验发现, 转染率高达 97%, 经 MTT 法检测转染后 24 h 的细胞存活率为 72%。该方法操作简单, 毒性低, 转染效率高, 一次性可转染大量细胞, 是外源基因转染的有效手段之一[8]。但是, 使用该方法时, 细胞转染效率和存活率受脉冲电压、周期等外界条件影响, 因此, 采用该法进行转染时, 要严格控制好实验条件, 确定好最佳实验参数。

2.3. 基因枪技术

基因枪技术又称为微粒轰击技术或生物弹道技术, 是将裹着外源基因的性质稳定的纳米级金颗粒或

钨颗粒, 用一种微粒加速器装置射入受体细胞或组织的一种转染技术。目前, 该技术已成功用于肿瘤、皮肤组织、神经组织、脑组织等实验研究中[9]。该方法操作简单, DNA用量少, 能够迅速将目的基因转染到宿主细胞内, 且受体基因类型广泛, 无宿主细胞限制。但是, 该技术也存在多种缺点, 如使用基因枪法时需要特殊的设备且纳米级的金颗粒或钨颗粒价格昂贵, 不能被普遍应用; 同时, 目的片段射入的随机性以及射入时可能导致基因片段断裂, 降低细胞转染率。

3. 化学法介导的细胞转染技术

常用的化学法介导的细胞转染技术包括磷酸钙共沉淀技术, 脂质体介导的转染技术等。

3.1. 磷酸钙共沉淀技术

该方法基本原理是将 DNA、CaCl₂、磷酸缓冲液混合, 形成 DNA-磷酸钙沉淀, 并粘附到细胞膜表面, 通过细胞膜的内吞作用进入靶细胞, 使得目的基因得以表达[10][11]。影响磷酸钙转染效率的主要因素有: DNA-磷酸钙共沉淀物中 DNA 的数量, 共沉淀物与细胞的接触时间、甘油等促因子作用的持续时间等。因此, 采用该方法时, 要进行多次试验, 选择最佳实验条件。该技术操作简单, 且化学试剂价格低廉, 因而被广泛用于瞬时转染和稳定转染, 但是该方法对受体细胞具有一定的选择性, 其中贴壁细胞为首选的受体转染细胞, 因此该方法不能广泛应用。

3.2. 脂质体介导的转染技术

脂质体是通过在水中疏水作用力缔合形成的磷脂有序排列的组合物, 封闭的微囊由一个或多个脂质样双分子膜构成, 其特殊的结构使得脂质体具有低毒、良好的生物相容性、可降解性、易于制备等优点。当 DNA 等外源基因被脂质体包封进入人体后, 脂质体能有效的防止 DNA 被核酸酶降解, 并能促进内体的逃逸以有效辅助基因转移[12]。

阳离子脂质体是当前最常使用的非病毒基因传递载体[13]。其介导的细胞转染过程主要包括两个步骤, 首先是脂质体与 DNA 作用, 由于阳离子脂质体带正电, 而 DNA 带负电, 因此可将 DNA 包裹到阳离子脂质体内部, 其次脂质体-DNA 复合物与宿主细胞相互作用, 将 DNA 释放到细胞中[14]。采用该方法介导的细胞转染操作方便, 不需要太复杂的设备, 无毒, 与生物膜有较大的相似性和良好的相容性, 目的基因容量大, 靶向性好。但该方法稳定性低, 持续时间短。

4. 生物方法介导的转染技术

目前最常用的生物法介导的细胞转染技术是病毒介导的转染技术。

病毒介导的转染技术

该法的基本原理是将目的基因片段插入到改造完成的病毒载体中, 然后包装成产生含有目的基因的重组病毒, 再将重组病毒感染细胞, 从而将目的基因导入宿主细胞, 实现特定目的基因的转染过程[15]。通常使用的病毒载体包括修饰后的慢病毒、腺病毒、疱疹病毒等[16]。由于改造后的病毒载体与野生病毒一样, 易感染体细胞, 因此, 病毒介导的转染技术的转染率较高, 是目前常用的转染方法之一。但是, 此方法仍具有许多难以克服的缺陷, 如病毒载体可携带的目的基因通常受野生型病毒基因组大小的限制, 而且病毒载体制备复杂, 有较严格的储备运输要求, 成本高, 最重要的还是安全问题, 所携带的基因序列有可能重组到宿主基因组中, 有致癌风险以及免疫原性[17]。

5. 总结与展望

理想的细胞转染技术应该具有转染效率高, 细胞毒性小, 安全性高等优点[18]。通过上文的介绍, 无

论是物理、化学还是生物学方法, 每一种技术都各有其优点, 同时也存在众多缺陷。目前, 随着科技的不断发展, 细胞转染技术也在飞速发展, 即使是同一种方法, 每年也会推出细胞转染效率更高, 细胞毒性更小的新技术和新产品, 但是离理想的细胞转染技术仍有差距, 因此, 在未来的发展过程中, 我们应该致力于开发更有效, 更安全的细胞转染技术。总之, 基于现在的细胞转染技术水平, 我们在选择转染方法时, 必须根据自己的实验目的选择最佳的实验方法。

参考文献

- [1] 张克佩, 王小平, 朱武洋. 外源基因转染细胞技术的研究进展[J]. 国际病毒学杂志, 2016, 23(3): 212-214. <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.1673-4092.2016.03.019>
- [2] Glover, D.J., Lipps, H.J. and Jans, D.A. (2005) Towards Safe, Non-Viral Therapeutic Gene Expression in Humans. *Nature Reviews Genetics*, **6**, 299-310. <https://doi.org/10.1038/nrg1577>
- [3] 李秋芬, 曲克明, 幸福言, 袁有宪. 虾池环境生物修复作用菌的分离与筛选[J]. 应用与环境生物学报, 2001, 7(3): 281-285.
- [4] Gordon, J.W., Scangos, G.A., Plotkin, D.J., Barbosa, J.A. and Ruddle, F.H. (1980) Genetic Transformation of Mouse Embryos by Microinjection of Purified DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **77**, 7380-7384. <https://doi.org/10.1073/pnas.77.12.7380>
- [5] Ivics, Z., Garrels, W., Mates, L., Yau, T.Y., Bashir, S., Zidek, V., et al. (2014) Germline Transgenesis in Pigs by Cytoplasmic Microinjection of Sleeping Beauty Transposons. *Nature Protocols*, **9**, 810-827. <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.010>
- [6] Neumann, E., Schaefer-Ridder, M., Wang, Y., et al. (1982) Gene Transfer into Mouse Lyoma Cells by Electroporation in High Electric Fields. *The EMBO Journal*, **1**, 841-845. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1982.tb01257.x>
- [7] Arabsoolghar, R. and Rasti, M. (2012) Optimal Electroporation Condition for Small Interfering RNA Transfection into MDA-MB-468 Cell Line. *Iranian Journal of Medical Sciences*, **37**, 187-193.
- [8] McMahon, J.M. and Wells, D.J. (2004) Electroporation for Gene Transfer to Skeletal Muscles: Current Status. *Bio BioDrugs*, **18**, 155-165. <https://doi.org/10.2165/00063030-200418030-00002>
- [9] 王友冰, 余兴龙. 基因枪技术发展综述[J]. 现代科学仪器, 2003(3): 37-41.
- [10] Alam, J. and Cook, J.L. (1990) Reporter Genes: Application to the Study of Mammalian Gene Transfection. *Analytical Biochemistry*, **188**, 245-245. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(90\)90601-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(90)90601-5)
- [11] Chen, C.A. and Okayama, H. (1988) Calcium Phosphate Mediated Gene Transfer: A Highly Efficient Transfection System for Stably Transforming Cells with Plasmid DNA. *Biotechniques*, **6**, 632-638.
- [12] Jin, L., Zeng, X., Liu, M., Deng, Y. and He, N. (2014) Current Progress in Gene Delivery Technology Based on Chemical Methods and Nano-Carriers. *Theranostics*, **4**, 240-255. <https://doi.org/10.7150/thno.6914>
- [13] 王象设. 池塘生态若干问题的探讨[J]. 浙江水产学院学报, 1997, 16(1): 55-59.
- [14] 李鹏, 尚明美, 宋海峰. 非病毒基因递送技术研究进展[J]. 中国新药杂志, 2008, 17(10): 809-814.
- [15] Steiner, M.S. and Gingnch, J.R. (2000) Gene Therapy for Prostate Cancer: Where Are We Now? *Journal of Urology*, **164**, 1121-1136. [https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(05\)67127-3](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(05)67127-3)
- [16] Kurian, K.M., Watson, C.J. and Wyllie, A.H. (2000) Retroviral Vectors. *Molecular Pathology*, **53**, 173-176. <https://doi.org/10.1136/mp.53.4.173>
- [17] Huang, Q., Li, S., Ding, Y.F., Yin, H., Wang, L.-H., and Wang, R. (2018) Macrocyclic-Wrapped Polyethyleneimine for Gene Delivery with Reduced Cytotoxicity. *Biomaterials Science*, **6**, 1031-1039. <https://doi.org/10.1039/C8BM00022K>
- [18] 刘文祥, 汪涛, 侯鹏. 应用表达谱芯片筛选 HCV NS5B 基因转染 Hun 7.5 细胞所致表达差异的糖、脂类代谢基因[J]. 国际病毒学杂志, 2013, 20(5): 215-219.