

- 389: 115—118.
- [31] Bestiny, L. J. et al., 1996, *Cancer Res.*, **56**: 3796—3802.
- [32] Savoyesky, E. et al., 1996, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **226**: 329—334.
- [33] Zhu, X. et al., 1996, *Pro. Natl. Acad. Sci.*, **93**: 6091—6095.
- [34] Kruk, P. A. et al., 1996, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **224**: 487—492.
- [35] Avilion, A. A., 1996, *Cancer Res.*, **56**: 645—650.
- [36] Inoue, S., 1996, *Gan To Kagaku Ryoho*, **23**: 191—201.

核酸转染技术和阳离子脂质体

王 颀 林其谁

(中国科学院上海生物化学研究所分子生物学国家重点实验室 200031)

目前已有多种能将分子传递进入真核细胞的技术和试剂。它们导入的分子通过同细胞组份的相互作用,可以分别导致基因表达、蛋白质合成、细胞分裂或分裂被抑制、细胞结构和形态的改变、细胞不受控制地繁殖或恶性转化(癌变)。但是迄今为止,没有任何一种方法或试剂自认为是最佳的,因此必须按照实验需要针对不同目标选择合适的转染方法。已有许多种技术都可用来传递 DNA、RNA、寡核苷酸、蛋白质或小分子,但通常介导核酸进入真核细胞有如下两种不同的方法:

转染(Transfection) 使目的基因通过生物化学或生物物理学的方法介导进入真核细胞的过程。一般需要使用一些试剂同含有需要表达的基因的质粒 DNA 混合后,导入靶细胞中表达。

感染(Infection) 靶细胞被一个基因组中包含有克隆化序列的病毒所感染而产生介导的过程。通常感染比转染需要更多的步骤和时间,由于依赖病毒的作用,所以这方面还牵涉到安全性的问题。

当前,在基因治疗领域有效性和安全性日益受到重视,研究高效的、非致免疫的且制备容易的非病毒载体成了当务之急,本文就此着重阐述介导核酸进入真核细胞的转染技术和试剂。

转染技术的发展史

转染技术已有三十几年的历史,DEAE-葡聚糖法是在 60 年代末报道的,而磷酸钙共沉淀法则是在 1973 年提出的。今天,这两种转基因方法仍作为通用的、普及的转染 DNA 的技术继续得到应用。

一些物理学方法如显微注射法(1980 年)、电穿孔法(1982 年)、基因枪技术(1990 年)、喷气注射法(1995 年)和脉冲电场(1996 年)等,均能成功地介导核酸进入真核细胞。这些方法有较高的转染效率,但并不是对所有的细胞都有效,而且对细胞有较高的毒性,操作上需要有专门的精密仪器。

到了 80 年代中期,虽然能成功地进行转染的细胞株已显著增加,但高表达的重复性仍很差,还有一些难转染的细胞株。产率较低且重复性并不理想的磷酸钙法仍被广泛地应用。

1987 年,美国生命技术公司推出一种商品化的阳离子脂质体转染试剂——Lipofectin Reagent^[1]。它被证明能显著改进转染效率,在用于多种真核细胞时有瞬时转染和用量少的特点。1990 年,简单运用 LipofectACE Reagent 使一个 T₇/牛痘病毒系统在胞浆中大量表达^[2]。1992 年,制成的 SA 阳离子脂质体被证明

能提供可重复的、持续的、高效的实验结果并且容易操作,在转染某些细胞时有很高的转染效率,其总体转染效率与 Lipofectin Reagent 相当^[3]。SA 脂质体的成本较低,是目前唯一一种由天然脂质构成的阳离子脂质体,在基因治疗领域有很好的应用前景。1993年发现的多聚阳离子脂质体转染试剂——LipofectAMINE 能持续、高效介导 DNA 转染多种细胞^[4]。至 1994—1995年,DMRIE/DOPE 脂质体和 DC-chol/DOPE 脂质体被批准用于基因治疗的临床试验^[5,6]。

转染核酸的技术

转染在原代细胞培养方面是很有用的,因为原代细胞能提供给分化组织中基因表达的信息。表 1 中列举了几种转染技术,各种方法在 DNA 传递的原理、效率、结果的重复性以及操作的方便性之间各有特点,而且不管使用哪一种将 DNA 导入的试剂和操作技术,都会对生物体产生一定的毒性和损伤,因此很难预言哪一项转染技术将是最有效的,瞬时或稳定转染的效率在很大程度上取决于细胞类型。

表 1 各种转染方法的与细胞相互作用的机制以及它们传递分子的类型

转染的方法	与细胞相互作用的机制	传递的分子			
		DNA	RNA	寡核苷酸	蛋白质
阳离子脂质体	通过电荷的相互作用与细胞吸附	☆	☆	☆	☆
磷酸钙共沉淀	共沉淀、细胞的吞噬作用	☆			
电穿孔	膜上打孔的形式	☆	☆		☆
DEAE-葡聚糖	通过电荷的相互作用与细胞吸附	☆			
聚季铵盐	通过电荷的相互作用与细胞吸附	☆			
基因枪技术	膜穿刺	☆	☆		
细胞核直接微注射	膜穿刺	☆	☆	☆	☆

1. 磷酸钙共沉淀 混合 CaCl_2 、DNA 和磷酸缓冲液会导致非常小的 DNA-磷酸钙共沉淀颗粒的形成。这些微粒吸附在细胞膜表面,由细胞内吞作用进入到靶细胞的细胞质中,但形成共沉淀的大小和品质对磷酸钙转染的成功与否是极其关键的。在实验中,必须掌握好条件,因为哪怕仅仅偏离 0.1 个 pH 单位就可能导致磷酸钙转染实验的失败。磷酸钙介导的转染可用于建立带有整合外源 DNA 的细胞系,其中的 DNA 常以首尾相接的串联形式存在。

2. 电穿孔 在多种哺乳动物细胞和植物细胞上施加一个短暂、高压的电流脉冲,暴露在电场下的细胞表面会形成一个过膜电位差,这种过膜电位差在细胞膜上造成一些瞬时的孔。分子可以直接通过这些微孔,或者作为微孔

闭合时所伴随发生的膜组分重新分布的结果而进入细胞质中。最佳的电脉冲和电压参数是转染成功与否的关键,过强的电压和电脉冲会造成细胞膜的不可逆损伤并使细胞融解。电穿孔法既可用于克隆化基因的瞬时表达,又可用于建立整合有外源基因的细胞系。

3. 三重复合 L. Huang 实验室提出了“三重复合”的概念,它是一种多聚赖氨酸结合靶基因配对的方法,包含了质粒、脂质体和能同 DNA 结合的变异目标配体。多聚赖氨酸-抗体配对与 DNA 结合,DNA 上剩余电荷被与多聚赖氨酸-抗体配对同时加入的阳离子脂质体所中和。在三相复合物中,抗体提供了目标专一性,而且可能触发复合物的内吞作用。腺病毒和其它破裂核内体的多肽近来也被用来增加特殊

的DNA-配体-多聚赖氨酸配体结合导向细胞内部传递的效率^[7]。但还没有经过广泛的体内(in vivo)特殊性导向转染的检测。

4. 中性脂质体 人工膜泡(脂质体)作为体内和体外输送的载体的用途,已经研究得十分深入,通常需要将DNA或RNA包裹于脂质体内,然后经脂质体与细胞膜的融合或者细胞的内吞作用导入。脂质体可保护基因不被降解,免疫原性小,并且经表面修饰后,有专一性导向靶细胞的功能。脂质体可快速大量制备,对外源基因的大小无限制,但转染效率较低。

5. 阴离子脂质体 这是近年才发展起来的基因传递的方法,利用带强正电荷的Poly-L-Lysine与需要传递的DNA形成复合物,通过电荷作用与携带配体的阴离子脂质体结合,然后转染细胞。

6. DEAE-葡聚糖和聚季铵盐(Polybrene)转染法 DEAE-葡聚糖和聚季铵盐(Polybrene)都被证明可用于DNA转染。两种试剂都同带负电的DNA分子聚合,通过一个渗透压震扰作用传递进入细胞内。DEAE-葡聚糖通常只用于克隆化基因的瞬时表达,而不用于细胞的稳定转化,它对转染BSC-1、CV-1和COS等细胞系有效,但对许多其它型别的细胞却不尽人意。聚阳离子Polybrene可把低分子量的DNA有效而稳定地导入CHO细胞,但对稳定转化其它类型细胞系的报道较少。

7. 原生质体融合 采用大量目的质粒拷贝的细菌原生质体同培养的哺乳动物细胞直接融合,通过聚乙二醇的促融合作用,细菌内容物传入真核细胞的细胞质中,质粒DNA被转移至细胞核。原生质体融合的方法在通常用来测定瞬时表达的细胞系中不如转染有效,且往往会产生质粒DNA以多个拷贝串联整合于宿主染色体的情况,但它在DNA内吞效率较低的细胞中比较有用。

8. 物理方法 细胞核直接微注射法和“基因枪”技术。微注射可以直接将DNA、RNA以及小分子蛋白导入细胞质或细胞核中而不同

其他细胞器(诸如pH较低的内含体)接触,但它所导入的DNA量不足以进行生化分析,因此微注射只是作为以建立整合有目的DNA拷贝的细胞系的一种方法。“基因枪”是通过瞬间高速微量发射核酸分子,并使之导入细胞的技术。

阳离子脂质体

1. 阳离子脂质体介导DNA转染的原理

大多数的转染方法或多或少都还存在着问题——细胞毒性、重复性差、使用不方便,效率不高。阳离子脂质体介导的转染不同于其它转染技术,容易获得重复性的结果,并且能使大部分真核细胞得到高表达^[1,2],再者,有一些运用其它手段转染有困难的细胞,用阳离子脂质体有可能成功。阳离子脂质体介导DNA转染与Ca₃(PO₄)₂法不同在于,它只需要不带载体的DNA,因而相对来说所用的DNA量比较小。

阳离子脂质体的表面带有正电荷,因而能被DNA的磷酸根链所吸附形成脂质体-DNA复合物,同样也能被表面带负电荷的细胞膜吸附^[1,8]。阳离子脂质体介导传递的方法与从前使用中性脂质体包裹DNA完全不同。如图1所示,阳离子脂质体介导的转染是基于DNA和阳离子脂质体之间的离子相互作用,DNA通过形成一个脂质体-DNA复合物再被细胞捕获并最后表达的。一般认为一个5kb大小的质粒可结合二到四个脂质体,而DNA进入细胞的机制尚有待阐明。

2. 常用的阳离子转染试剂

LipofectAMINE试剂 LipofectAMINE试剂是按照由人工合成的聚阳离子脂(DOSPA)和中性的二油酰磷脂酰乙醇胺(DOPE)以3:1(w/w)的专利配方合成的。聚阳离子试剂——LipofectAMINE比那些用单阳离子类试剂能成功转染更多细胞株,通常可获得更高的转染效率^[4],这主要是由于它含有带强正电荷的精胺极性头——DOSPA。Lipo-

fectAMINE 试剂稳定转染 NIH3T3 细胞可获得 1% GENETICIN-抗性的克隆,而对于 CHO 细胞则高达 2.5%。实验表明无论 CHO-K1、BHK-21、Hela、COS-7 和 NIH3T3 等一般类型

的细胞,还是一些难转染的细胞类型(如 PC-12 和原代传代培养的人的成纤维细胞等),应用 LipofectAMINE 试剂转染均可获得暂时性的高表达。

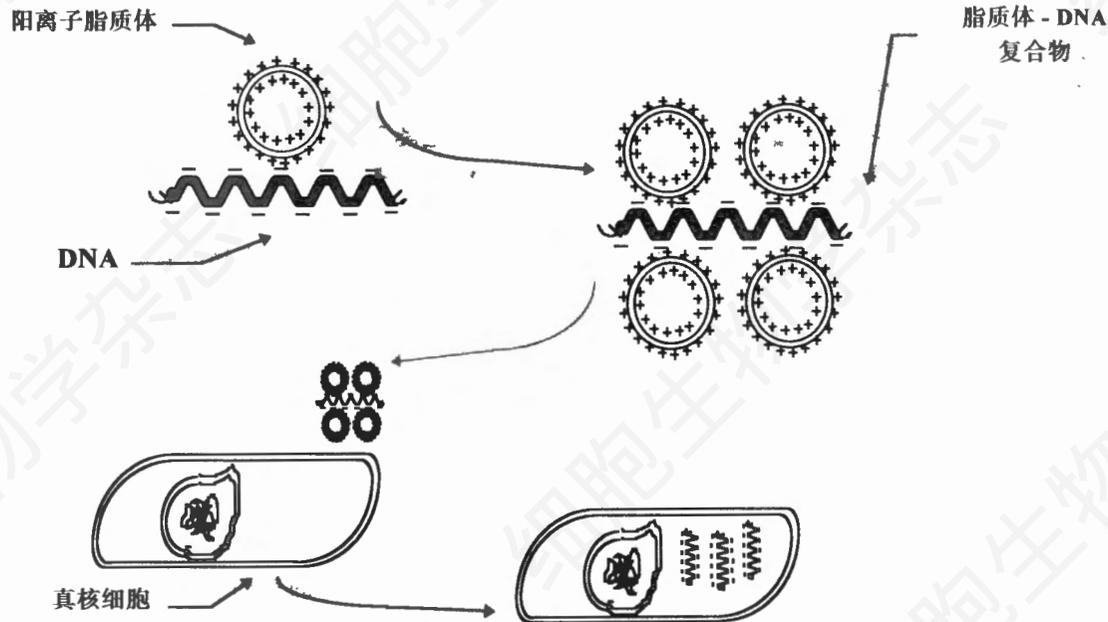


图1 阳离子脂质体介导核酸转染真核细胞的机制^[9]

Lipofectin 试剂 Lipofectin 试剂是按照由人工合成的阳离子脂(DOTMA)和中性的二油酰磷脂酰乙醇胺(DOPE)以 1:1(w/w)的比例配制而成的。Lipofectin 试剂在转染 DNA、RNA、寡核苷酸、一些蛋白质、部分转录因子和 T7RNA 聚合酶等方面都获得了成功^[10]。不少细胞株和细胞系使用 Lipofectin 试剂都能得到成功介导 DNA 转染;Lipofectin 试剂还能在一些难于转染的细胞系中使 RNA 得到了高效率的转染。使用 Lipofectin 试剂体外转录的 RNA 后,约 90%的 BHK-21 细胞可明显看到有 LacZ 基因的表达^[11]。

LipofectACE 试剂 LipofectACE 是按照由人工合成的阳离子脂(DDAB)和中性的二油酰磷脂酰乙醇胺(DOPE)以 1:2.5(w/w)的比例配制而成的,它在 Hela 细胞、BHK-21 细

胞^[2]和小鼠 L-细胞的牛痘/T7 瞬时表达的分析中使用。

SA liposome 试剂 由硬脂胺 SA (Stearylamine)/DOPE (1:1W/W)制备的脂质体是目前已知的完全由天然脂质所构成的阳离子脂质体^[3]。SA 的结构很简单,有一条 18 碳原子的饱和脂肪酸的疏水链和一个氨基极性头,与 DOPE 一起形成稳定脂质体。SA 脂质体能高效转染绝大部分的细胞株^[12],它转染 CV-1 细胞的效率是 lipofectin 试剂的 10 倍,细胞的毒性是 Lipofectin 试剂的 1/4,对机体的免疫原性小,可能会有利于体内的基因治疗^[13],对日益发展的基因转染技术起着补充作用。

DC-chol 脂质体 胆固醇衍生物——DC-chol 是一个三价胺极性基团的阳离子脂质,它有一个稳定的氨甲酰键,可能被生物降

解。DC-chol/DOPE 脂质体能有效地转染许多难被转染的细胞株。与 Lipofectin 试剂相比较,对于人的表皮样癌细胞——A431, DC-chol/DOPE 脂质体的转染活力高 2 到 3 倍,而细胞毒性要低得多。由于转染效率、稳定性和潜在的安全性等特点,DC-chol/DOPE 脂质体已被批准为第一个可应用于人类基因治疗临床试验的阳离子脂质体试剂^[14]。

今天,阳离子脂质体介导核酸转染真核细胞已是最具创新性的、高效率的转染技术,并且逐渐成为基因治疗领域的一种标准方法。

摘 要

阳离子脂质体介导转染是一种具创新性的、高效的转染技术,并且逐渐成为介导核酸进入真核细胞的标准方法。因此,如果在使用其他的转染手段并不理想时,宜试用阳离子脂质体介导的转染技术。

参 考 文 献

- [1] Felgner, P.L. et al., 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**:7413-7417.
[2] Whitt, M.A. et al. 1991, *Focus*, **13**:8-12.

- [3] Yang, J.P. et al. 1995, *Chinese J. Biochem. Biophys.*, **26**:245-253.
[4] Hawley-Nelson, P. et al., 1993, *Focus*, **15**:73-79.
[5] Nabel, G.L. et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**:11307-11311.
[6] Caplen, N.J. et al., 1995, *Nature Medicine*, **1**:39-46.
[7] Plank, C. et al., 1994, *J. Biol. Chem.*, **269**:12918-12924.
[8] Gershon, H. et al., 1993, *Biochemistry*, **32**:7143-7151.
[9] Felgner, P.L. et al., 1989, *Nature*, **337**:387-388.
[10] Gao, X. and Huang, L. 1993, *Nucleic Acids Res.*, **21**:2867-2872.
[11] Ciccarone, V. et al., 1994, *Focus*, **16**:94-98.
[12] Wang, D. et al., 1996, *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **226**:450-455.
[13] Lin, Q.S. et al., 1995, *Biopolymer and Bioproducts (Structure, Function and Applications)* Published for the Organising Committee, 11th FAOBMB Symposium by Samakkhisin (dokya) Public Company Limited, ed. by Jisnuson, S. et al., pp46-53, Kra Buri River, Ranong, Thailand.
[14] Gao, X. and Huang, L. 1995, *Gene therapy*, **2**:710-722.

研究工作

端粒酶 RNA 和端粒酶活性在人生殖道癌细胞株中的表达*

郑伟 石一复 谢幸 程琪 沈敏

(浙江医科大学附属妇产科医院 杭州 310006)

王升启

(军事医学科学院放射医学研究所 北京 100039)

近年来的研究发现,端粒酶的激活与恶性肿瘤细胞的形成和发展密切相关^[1,2]。端粒(Telomere)是位于染色体末端的 DNA 与特殊蛋白质结合的复合体,对于维持染色体的完整性至关重要。端粒酶(Telomerase)是一种 RNA 依赖性核酸蛋白复合体,参与合成端粒 DNA 的重复序列(TTAGGG)^[3]。端粒酶的激活是细

胞阻止端粒重复序列的缩短并获得永生化的必要途径。在许多恶性肿瘤中显示有端粒酶活动。现已知人端粒酶 RNA 成分(human Telomerase RNA, hTR)决定着端粒酶重复序列的合成,并参与端粒酶的活化^[4]。反义端粒酶

*国家自然科学基金资助项目