

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.33.005

## 脂质体法与电穿孔法转染两种细胞效率的比较\*

张禾璇<sup>1</sup>, 单可人<sup>2△</sup>, 何燕<sup>2</sup>, 张婷<sup>2</sup>, 王婵娟<sup>2</sup>, 官志忠<sup>2</sup>

(1. 贵州省妇幼保健院优生遗传科, 贵阳 550001; 2. 贵州省医学分子生物学重点实验室, 贵阳 550004)

**摘要:**目的 对比脂质体与电穿孔法对 HepG2、SGC7901/ADM 两种细胞的转染效率。方法 以 HepG2、SGC7901/ADM 细胞为研究对象, 采用脂质体法和电穿孔法分别转染 pcDNA3.1-EGFP 质粒, 流式细胞仪计算细胞存活率, 借助绿色荧光标志蛋白 eGFP 测算转染效率。结果 利用脂质体转染 eGFP 质粒至 HepG2 细胞所获得的阳性转染率为 (20.8±2.1)%, 而电穿孔法转染效率增高至 (49.6±2.5)%, 二者比较差异有统计学意义 ( $P<0.05$ )。利用脂质体转染 eGFP 质粒至 SGC7901/ADM 细胞所获得的阳性转染率为 (25.4±1.3)%, 而电穿孔法转染效率增高至 (52.6±2.1)%, 二者比较差异亦有统计学意义 ( $P<0.05$ )。结论 使用电穿孔法能明显提高大片段载体的转染效率。

**关键词:** 电穿孔; 脂质体转染; HepG2 细胞; SGC7901/ADM 细胞; pcDNA3.1-EGFP

中图分类号: R331

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2014)33-4432-02

### Comparison of transfection efficiency of two kinds of cells by lipofection and electroporation\*

Zhang Hexuan<sup>1</sup>, Shan Keren<sup>2△</sup>, He Yan<sup>2</sup>, Zhang Ting<sup>2</sup>, Wang Chanjuan<sup>2</sup>, Guan Zhizhong<sup>2</sup>

(1. Department of Prepotency Division, Guizhou Women and Children Hospital, Guiyang, Guizhou 550001, China;

2. Guizhou Molecular Biological Key Laboratory, Guiyang, Guizhou 550004, China)

**Abstract: Objective** To compare the transfection efficiency between different transfection methods in human HepG2 and SGC7901/ADM cells so as to provide experimental basis for further study. **Methods** To electroporate the enhanced GFP plasmid into HepG2 and SGC7901/ADM cells by lipofection and electroporation methods, respectively. The survival rates and transfection efficiency were analyzed. **Results** The efficiency of eGFP vector transfected into HepG2 cells by lipofection was (23.8±2.1)%, compared with lipofection method, the efficiency of eGFP plasmid transfected by electroporation was up to (49.6±2.5)%, and the difference was statistically significant ( $P<0.05$ ). The efficiency of SGC7901/ADM cells by lipofection was (25.4±1.3)%, compared with lipofection method, the efficiency of electroporation was up to (52.6±2.1)%, and the difference was statistically significant ( $P<0.05$ ). This study provides reliable test parameters for electroporation of HepG2 and SGC7901/ADM cells. **Conclusion** The transfection efficiency of large fragment vector is efficiently improved by electroporation.

**Key words:** electroporation; lipofection; HepG2 cell; SGC7901/ADM cell; pcDNA3.1-EGFP

细胞转染技术是采用一定的途径将外源分子导入细胞、表达目的基因的过程。细胞转染载体有病毒载体和非病毒载体两大类。病毒载体转染效率高, 但由于其转染具有免疫原性和致突变性限制了它的应用; 非病毒载体系统具有低毒、低免疫原性、转移的核苷酸大小范围广和相对靶向性等优点。当用化学或物理方法转染某些类型细胞效率不高或有毒性时, 电穿孔可能是一种有用的方法<sup>[1-2]</sup>。目前, 非病毒载体转染法中运用最广泛的主要有阳离子脂质体 Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000<sup>[3-4]</sup> 和电穿孔法。选择合适的细胞转染方式, 高效率质粒转染肿瘤细胞对于细胞生物学和分子生物学以及肿瘤防治等科学研究有十分重要的意义<sup>[5-6]</sup>。本研究分别采用脂质体法和电穿孔法转染人肝癌细胞株 HepG2、SGC7901/ADM 细胞, 并比较转染效率, 现报道如下。

### 1 材料与与方法

**1.1 材料** HepG2、SGC7901/ADM 细胞株均购自中国科学院上海生命科学研究院细胞库; pcDNA3.1-EGFP 质粒由贵州省医学分子生物学重点实验室周建奖教授惠赠。Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 购自 Invitrogen 公司, 电穿孔仪(美国 Bio-rad Gene Pulser Xcell 真核系统), Bio-rad 0.4 cm 电转杯, 电转 buffer(自

配含 10 mmol/L HEPES, 150 mmol/L NaCl, 5 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 6 mmol/L 葡萄糖 pH 7.2 的缓冲液); Ezgene EndoFree Plasmid ezFlow Miniprep Kit 购自 Biomga 公司; DMEM、磷酸盐缓冲液(PBS)、胰蛋白酶、胎牛血清(FBS)购自 Gibco 公司, 细胞培养器皿购自 Corning 公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** HepG2 细胞培养液成分为高糖 DMEM (含 10% FBS, 1% 双抗)。SGC7901/ADM 细胞培养液成分为 RPMI 1640 (含 10% FBS, 1% 双抗), 在细胞培养瓶中培养, 每天换液, 2~3 d 传代 1 次。

**1.2.2 细胞转染** (1) 脂质体转染法: 完全培养基培养 HepG2、SGC7901/ADM 细胞, 转染时取传代 3 次的对数生长期细胞, 以  $5 \times 10^4$  个细胞接种至 6 孔板, 每孔设 2 个复孔, 加入 1 mL 无抗性培养基, 细胞贴壁密度为 50%~80% 时即可进行转染。将 eGFP 质粒用相应脂质体 Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 转染细胞(详细步骤参见 Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 产品说明书)。(2) 电穿孔转染法: 传代 3 次的细胞长满 70%~80% 时可用于转染, PBS 冲洗 3 次, 0.25% 胰酶消化 60 s, 完全培养基终止消化。收集细胞悬液后 1 000 r/min 离心 8 min, 弃上清液, 用无

\* 基金项目: 贵州省科技厅科技计划课题资助(黔科合 LG[2011]024); “十二五”国家科技支撑计划项目(2013BAI05B03)。作者简介: 张禾璇(1987-), 初级检验师, 硕士, 主要从事医学分子生物学的研究。△ 通讯作者, Tel: (0851)6762259; E-mail: shankr2008@yahoo.cn。

血清培养液洗涤 1 次,离心后弃上清液,用电转 buffer 重悬 2 次,以电转 buffer 重悬细胞至  $1 \times 10^7$  个/mL。取  $1 \times 10^6$  个细胞悬液和 pcDNA3.1-EGFP 质粒  $10 \mu\text{g}$  分装入 0.4 cm 电转杯中,小心混匀后  $4^\circ\text{C}$  静置 10 min,以 1 个电脉冲、脉冲时间 20 ms、电压 270 V 方波电转。电转后培养于 12 孔板,电转后转移至  $37^\circ\text{C}$ 、含 15% FBS 的培养基培养,每孔设两个复孔。

**1.2.3 细胞存活率测定** 两种转染实验中均设置未转染的细胞为阴性对照,且各组细胞数量保持一致,完成转染后培养 8 h,胰蛋白酶消化各组细胞,以流式分析细胞计数,各转染组细胞数与阴性对照细胞数的比值即转染 8 h 的细胞存活率。

**1.2.4 转染效率测定** 电转染后培养 48 h,借助绿色荧光标志蛋白 eGFP 判断转染效率。用 PBS 洗涤贴壁细胞 3 遍后置显微镜下观察,由于 eGFP 为绿色荧光,显微参数为 480 nm 激发波长,520 nm 发射波长。每孔共计 5 个高倍镜视野观察计算绿色荧光细胞数。转染效率(%) = 绿色荧光细胞数/总细胞数  $\times 100\%$ ,取 5 个视野平均值。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS18.0 统计软件进行分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用独立样本 *t* 检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 细胞存活率** 重复 3 次以上实验,脂质体法转染 HepG2 细胞存活率为  $(65.7 \pm 1.8)\%$ ,电穿孔法 HepG2 细胞存活率为  $(38.5 \pm 2.4)\%$ ,二者比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。脂质体法转染 SGC7901/ADM 细胞存活率为  $(60.6 \pm 1.4)\%$ ,电穿孔法 SGC7901/ADM 细胞存活率为  $(37.2 \pm 1.6)\%$ ,二者比较差异亦有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

**2.2 细胞转染率** 重复 3 次以上实验,利用脂质体转染 eGFP 质粒至 HepG2 细胞所获得的阳性转染率为  $(20.8 \pm 2.1)\%$ ,而电穿孔法转染效率增高至  $(49.6 \pm 2.5)\%$ ,二者比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。利用脂质体转染 eGFP 质粒至 SGC7901/ADM 细胞所获得的阳性转染率为  $(25.4 \pm 1.3)\%$ ,而电穿孔法转染效率增高至  $(52.6 \pm 2.1)\%$ ,二者比较差异亦有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

## 3 讨 论

脂质体法是通过脂质双分子层所构成的囊状载体包裹外源基因与细胞膜融合内吞而完成外源基因的导入,该方法操作简便、细胞毒性低,但对细胞具有选择性,转染效率受细胞类型影响。电穿孔法是利用高强度的电场瞬时改变细胞膜的状态和通透性,从而吸收周围介质中的外源分子进入细胞,具有简单易行、可重复性强、安全性高、适用性广等优点<sup>[2]</sup>,但伴随较高的细胞毒性。

本研究选取较大分子带 GFP 绿色荧光蛋白的质粒 eGFP 为转染物,以常用的阳离子脂质体 Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 和电穿孔两种方法分别转染 HepG2、SGC7901/ADM 细胞。脂质体表面带正电荷,与核酸中带负电荷的磷酸根相互吸附形成脂质体核酸复合物,该复合物能与细胞膜表面负电荷相互吸附,通过胞饮作用进入细胞内<sup>[7-8]</sup>。利用脂质体法转染 eGFP 质粒的转染效率为  $(20.8 \pm 2.1)\%$ ,这与朱晓莹等<sup>[9]</sup>的结果相符,用于转染时,脂质体虽具有良好的膜亲和性,但缺点在于其细胞毒性和低转染效率<sup>[10]</sup>。电穿孔法是利用外加电场产生一定的电脉冲,诱导活细胞产生跨膜电位,由于外加电场强度大于细胞膜穿孔的临界值,引起细胞质膜结构暂时性改变,导致细胞膜形成可恢复的孔隙,细胞膜产生小孔,从而使外源基因进

入细胞内。相较脂质体转染技术,电转技术因较大的电压刺激使得电转后细胞的死亡率较高。有研究发现,细胞存活率在 50% 左右时的电场参数可获得最佳的转染效率<sup>[11]</sup>。本研究结果显示,脂质体法转染时细胞存活率较高,电穿孔法转染时细胞存活率虽然偏低,但是电穿孔法转染可使上述两种细胞的转染效率均提高至 50% 左右,提示使用电穿孔法能明显改善大片段载体低转染效率的情况,这与江雪等<sup>[12]</sup>的观点一致。

综上所述,脂质体 Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 更容易包裹吞入片段较小的转染物,电穿孔法操作简单,能将 DNA、RNA、抗体、酶等物质转入细菌、动物细胞、植物细胞等,改善大片段载体低转染效率的情况,更适合用于常规环状质粒转染构建工程细胞。

## 参考文献:

- [1] Green MR, Sambrook J. Molecular cloning a laboratory manual[M]. 3th, USA: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001:1271-1321.
- [2] Takei H, Baba Y, Hisatsune A, et al. Glycyrrhizin inhibits interleukin-8 production and nuclear factor- $\kappa$ B activity in lung epithelial cells, but not through glucocorticoid receptors[J]. J Pharmacol Sci, 2008, 106(3):460-468.
- [3] Ying MG, Zhuo CH, Zang WD. Optimization on cationic liposome mediated cell transfection of plasmid DNA[J]. Chinese German Journal of Clinical Oncology, 2011, 10(5):290-293.
- [4] 周雪雁, 关伟军, 马月辉, 等. 脂质体介导转染法原理及其研究进展[J]. 上海畜牧兽医通讯, 2005, 27(7):43-45.
- [5] 张舟, 邵一鸣. 体内电穿孔技术在 DNA 疫苗及基因治疗领域的应用进展[J]. 中国热带医学, 2013, 13(3):371-374.
- [6] 于哲, 耿捷, 戴霞, 等. 异体肿瘤 mRNA 电转染 DC 瘤苗的特异性抗骨肉瘤免疫学效应[J]. 免疫学杂志, 2013, 29(2):93-98.
- [7] Zabner J, Fasbender AJ, Moninger T, et al. Cellular and molecular barrier to gene transfer by cationic lipid[J]. J Biol Chem, 1995, 270(32):18997-19007.
- [8] 刘爱平, 许红梅. 载体与基因转染的研究进展[J]. 国际生物医学工程杂志, 2008, 31(5):312-315.
- [9] 朱晓莹, 王燕菲. 阳离子脂质体介导 pEGFP-N1 转染 HepG2. 2.15 细胞效率初探 [J]. 右江民族医学院学报, 2012, 3(4):458-460.
- [10] Charudharshini S, Diane B. Optimization and characterization of anionic lipoplexes for gene delivery[J]. J Controlled Release, 2009, 136(1):62-70.
- [11] Chang DC. Experimental strategies in efficient transfection of mammalian cells[J]. Methods Mol Biol, 1997, 62:307-318.
- [12] 江雪, 杨平, 李玥, 等. 人急性淋巴细胞白血病细胞株 T 细胞电转染条件的优化[J]. 重庆医学, 2011, 40(15):163-1465.