

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.26.004

抗鼻咽癌质粒 pFY 转化和菌种筛选的研究*

翁闪凡, 刘娜, 张晓林

(佛山科学技术学院医学院医学检验系, 广东佛山 528000)

[摘要] 目的 筛选携带抗鼻咽癌质粒 pFY 的稳定高产菌株。方法 以 CaCl₂ 法制备大肠杆菌 JM109 感受态, 将抗鼻咽癌质粒 pFY 转化 JM109 感受态, 对琼脂平板上获得的菌落进行筛选, 选出符合标准的单菌落为菌种, 进行菌种稳定性实验。用质粒提取试剂盒检测质粒含量。将抗鼻咽癌质粒 pFY 转染到细胞 CNE-2 中, 四氮唑蓝 (MTT) 比色法观察转染试剂及质粒载体对细胞生长增殖的影响。结果 筛选得到菌株的培养液中质粒 DNA 含量为 30 mg/mL, 超螺旋 DNA 比例为 92%。经电泳和酶切鉴定, 该菌株的 50 子代所携带质粒与原代一致。质粒 pFY 对 CNE-2 细胞株生长有明显的抑制作用。结论 成功筛选出携带抗鼻咽癌质粒 pFY 的稳定高产菌株, 为大批量制备临床应用级质粒奠定了基础。

[关键词] 鼻咽肿瘤; 感受态细胞; 质粒; 转化; 筛选**[中图分类号]** R739.6**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2015)26-3613-03

Study on transformation of anti-nasopharyngeal carcinoma plasmid pFY and bacterial strains screening*

Weng Shanfan, Liu Na, Zhang Xiaolin

(Department of Laboratory Medicine, Medical College, Foshan University, Foshan, Guangdong 528000, China)

[Abstract] **Objective** To screen the stable high-producing strains carrying anti-nasopharyngeal carcinoma (NPC) plasmid pFY. **Methods** Competent *E. coli* JM109 was prepared by the CaCl₂ method and transformed with anti-NPC plasmid pFY. The bacterial colonies obtained from the agar plate were screened for selecting the single colony conforming to the standards as the bacterial strain and conducting the stability test. The plasmid content was detected by the plasmid extraction reagent kit. Anti-NPC plasmid pFY was transfected into nasopharyngeal carcinoma cell line CNE-2. The influence of transfection reagent and the plasmid vector on the cell proliferation was detected by MTT. **Results** The DNA concentration of plasmids in the culture solution of bacterial strain obtained by screening was 30 mg/mL. The proportion of supercoiled DNA was 92%. The identification of electrophoresis and restriction enzymes showed that the plasmids harbored in the 50th progeny of this strain were same as those in the primary. Plasmid pFY had the evident inhibiting effect on the growth of CNE-3 cell line. **Conclusion** The stable high-producing strains of *E. coli* carrying anti-NPC plasmid pFY is successfully screened out, which lays the foundation for large-scale preparation of plasmid pFY for clinical utility.

[Key words] nasopharyngeal neoplasms; competent cells; plasmid; transformation; screening

鼻咽癌 (nasopharyngeal carcinoma, NPC) 是发生于鼻咽腔顶部和侧壁的恶性肿瘤, 其发病率居于头颈肿瘤发病率的首位。NPC 具有罕见的地理和种族分布特征。在中国南方 (广东、广西、湖南、福建和江西), 其发病率和病死率均居世界首位^[1]。本实验室构建的质粒 pFY 是一种能在鼻咽癌细胞中高效特异表达靶基因的质粒, 具有潜在的治疗鼻咽癌的应用前景。

目前, 质粒 DNA 作为核酸疫苗和基因治疗载体越来越受到研究者的重视, 国内外已有上千家研究机构进行相关的研究^[2-3]。质粒 DNA 作为基因载体比较安全、使用方便, 但其在靶细胞中基因表达效率低和持续时间较短, 因此质粒介导的基因治疗要求反复给药并需大量药物级质粒 DNA^[4]。而筛选出高产优质的菌种是大批量制备质粒的首要步骤。通过实验, 本文得到一种筛选携带 pFY 的高产优质菌株的方法。

1 材料与方

1.1 仪器与试剂 酵母提取物 (OXIOD); 胰蛋白胨 (OXIOD); 氯化钠、琼脂粉和氯化钙 (均为广州化学试剂厂 AR 级); 氨苄青霉素 (鲁抗); 质粒提取试剂盒 (Qiagen); 四氮唑蓝 (MTT); 脂质体转染试剂。恒温培养箱 (上海精诚); 振荡培养

箱 (太仓华美 HZQ-200); 核酸蛋白检测仪 (eppendorf); 高速离心机 (eppendorf); 凝胶成像系统 (法国 VL 公司); 无菌操作台 (上海精诚); 9 cm 培养皿 (蜀牛); 50 mL 或 250 mL 三角瓶 (蜀牛)。抗鼻咽癌质粒 pFY、大肠杆菌 JM109、人低分化鼻咽癌细胞株 CNE-2 分别为本实验室构建和保存。

1.2 方法

1.2.1 大肠杆菌 JM109 感受态的制备 (CaCl₂ 法) (1) 将保藏的大肠杆菌 JM109 菌种, 接入装有已冷却凝固灭菌 LB 琼脂培养基的培养皿中, 涂布或划线使菌种在培养基生长出单菌落, 将培养皿在恒温培养箱中倒置 37 °C 培养 16~20 h。(2) 从生长有单菌落的培养皿内, 无菌挑取一个直径约为 2~3 mm 的单菌落。接入装有 10 mL LB 肉汤的 50 mL 灭菌三角瓶中, 在摇床培养箱中, 250 rpm, 37 °C 培养 9~10 h (菌体密度 OD₆₀₀ 为 2.0, 此时细菌处于对数生长期)。(3) 在装有 20 mL LB 的 50 mL 灭菌三角瓶中, 无菌接入 OD 为 2.0 的大肠杆菌 JM109 菌液 0.2 mL。在摇床培养箱中, 250 rpm, 37 °C 培养 2~2.5 h (菌体密度 OD₆₀₀ 为 0.4)。(4) 在室温条件下, 将 OD₆₀₀ 为 0.4 的培养液以 4 000 rpm 离心 5 min, 弃上清液, 收集菌体细胞; 再加入 10 mL 冰冷的 0.1 M CaCl₂ 溶液 (已除

* 基金项目: 广东省医学科研基金资助项目 (A2013687); 广东省大学生创新创业训练计划项目 (1184713046) 作者简介: 翁闪凡 (1975-), 本科, 高级实验师, 主要从事鼻咽癌的基础研究。

菌),并轻微摇匀。4℃ 4 000 rpm 离心 10 min,弃上清液,收集菌体细胞。加入 0.8 mL(每 25 mL 培养液加入 1 mL)冰冷的 0.1 M 的 CaCl₂ 溶液,并轻微摇匀。冰浴放置 3 h,用 4 支已灭菌的 1.0 mL EP 管中无菌分装 CaCl₂ 菌体细胞液(0.2 mL/支),备质粒转化使用。

1.2.2 抗鼻咽癌质粒 pFY 转化 (1)将 40 μg 抗鼻咽癌质粒 pFY 无菌加入装有 0.2 mL 大肠杆菌 JM109 感受态的 EP 管中。轻柔混匀后,于冰浴静置 40 min;冰浴好后,把 EP 管放于恒温水浴锅中,42℃ 静置水浴 90 s;再及时把 EP 管迅速转移至冰浴 2~3 min;向 EP 管中加入 0.5 mL 已灭菌的 LB 肉汤,37℃ 放置 60 min,以使细菌细胞复原。(2)无菌取样 0.1 mL 质粒转化菌液,接入到装有凝固 LB 琼脂平板(含有 50 ng/mL 氨苄青霉素)的培养皿中进行涂布,另取 0.1 mL 无菌水涂布做空白对照组,将培养皿在恒温培养箱中倒置 37℃ 培养 16~20 h,观察平板菌落形态,要求每个平板含有菌落 20~40 cfu,空白对照板菌落数为零。

1.2.3 菌种筛选 初筛:在培养好的平板中,无菌挑取单菌落 20 个,分别接入装有 50 mL LB(含有 50 ng/mL 氨苄青霉素)的 250 mL 灭菌三角瓶中,并编 1~20 号,放入摇床培养箱中,250 rpm,37℃ 培养 12 h,分别无菌取 1 mL 菌液,用 1 mL 的 30%甘油在 1.5 mL 的 EP 管中混合,编写与三角瓶对应的号码,标上日期,放在 -20℃ 冰箱保存。同时分别检测菌液的 OD₆₀₀ 值和 pH 值,用试剂盒检测质粒含量。复筛:以质粒含量(mg/mL)及质粒含量比 OD₆₀₀ 值(mg/mL/OD)为指标,选取上述指标前 10 位的单菌落,分别从对应的甘油管保藏菌液中,取 0.05 mL 接入装有 50 mL LB(含有 50 mg/mL 氨苄青霉素)的 250 mL 灭菌三角瓶中(条件同上)培养 10 h,如此摇床筛选反复几次,筛选出每次摇床培养中上述指标都最好的单菌落为菌种,并做稳定性实验。

1.2.4 菌种稳定性实验 将筛选出的菌种,以传代培养进行菌株产质粒稳定性的检测。从平板生长的菌落接入 LB 液体培养基中震荡培养 12 h 的菌液为第 0 代,再将以 0 代菌种经过 12 h 摇床培养的菌液为第 1 代。如此依次接种传代摇床培养,分别为第 1、2、3...50 代。第 0、第 5、第 10、第 15、第 20、第 25、第 30、第 35、第 40、第 45、第 50 代取样检测 OD₆₀₀、pH、质粒含量和进行凝胶电泳成像。摇床培养条件为 250 rpm,37℃ 培养 12 h。

1.2.5 检测方法 菌体密度 OD₆₀₀ 值:以无菌水为空白样,在吸收波长 600 nm 处检测菌液吸收值,样品稀释至 OD 值为 0.2~0.8 范围内;质粒含量(mg/mL):取 1 mL 菌液,离心收集菌体细胞,用(QIAGEN Plasmid Mini Kit)公司质粒提取试剂盒检测质粒含量。琼脂糖凝胶电泳:1%的琼脂糖凝胶,电压 75 V,时间 40~60 min。通过凝胶成像系统分析质粒超螺旋比例。

1.2.6 细胞培养及转染 将 CNE-2 细胞株常规传代于 RPMI-1640 培养液中,取对数生长期细胞用于实验,按照转染试剂操作手册进行转染实验。

1.2.7 抗鼻咽癌质粒 pFY 对细胞 CNE-2 的生长抑制率 将质粒 pFY 转染到细胞 CNE-2 中,MTT 比色法观察转染试剂及质粒载体对细胞生长增殖的影响。实验设未处理组、脂质体组、PFY/脂质体组,质粒浓度为 2 mg/L,转染 48 h 后,每孔加入 10 mg/L MTT 10 μL,培养 4 h 后,加二甲亚砜 100 μL,测定波长 570 nm 和 630 nm 处的吸光度 A 值。每组设 4 个平行孔,结果取平均值。细胞生长抑制率的计算公式为:(1-实验孔 A 值)/对照孔 A 值。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 进行统计学处理,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,进行单因素方差分析和差异显著性检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 菌落筛选结果 在质粒转化、初筛过程中,通过电泳成像和质粒含量检测发现,挑选出的菌落产质粒能力有 3 种类型,第 1 种类型如图 1 中的样品 1,其产质粒能力低,且质粒超螺旋比例低;第 2 种类型如图 1 中样品 2,其产质粒能力好,且质粒超螺旋比例高;第 3 种类型如图 2 中样品 3,其产质粒能力好,但质粒超螺旋比例较低。具体实验结果如表 1 所示。

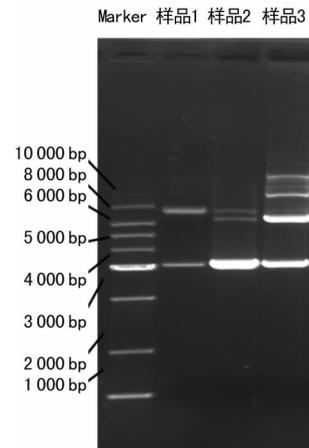


图 1 转化后菌种携带的质粒

表 1 3 种不同类型菌落的产质粒能力的比较

类型	超螺旋比例	质粒含量	近似拷贝数
类型 1	<50%	<10 mg/mL	<2 mg/mL/OD
类型 2	>90%	>25 mg/mL	>5 mg/mL/OD
类型 3	<60%	<20 mg/mL	>4 mg/mL/OD

在初筛的试验结果中,为了得到具有高产优质能力的菌种,以第 2 种类型菌落进行复筛。经过 3 轮以上的复筛,在以 LB 为培养基,37℃、250 rpm 振荡培养 12 h,最终筛选出产质粒含量为 30 mg/mL,近似拷贝数为 6.5 mg/mL/OD,超螺旋比例为 92% 的菌株。

2.2 稳定性实验结果 以筛选出具有高产优质的菌株为母菌,扩增培养,甘油保种,建立种子库;并做菌种传代的质粒稳定性实验,电泳检测结果如图 2,图 3。图 2 为菌种传代后产质粒能力的稳定性实验结果,分别在菌种摇床培养的第 1、2、5、10、15、20、30、40、50 代取样,提取质粒,进行电泳检测和分析,结果为:菌液质粒含量为(30.0±0.1)mg/mL,近似拷贝数为(6.50±0.02)mg/L/OD,超螺旋比例为(92.0±0.1)%。同时取 PCR 扩增的 pFY 质粒和该菌株的第 0、25、50 代菌提取的 pFY 质粒进行 Kpn I 酶切,电泳检测结果如图 3 所示,PCR 扩增的 pFY 质粒和该菌种产的质粒酶切片段一致,提示了该菌种携带的 pFY 质粒是正确的。以上结果说明筛选出的菌株从 0 代到 50 代产质粒能力没退化,质粒 pFY 为该菌株稳定携带。因此利用该菌株作为母菌,进行扩增培养,建立了种子库,可用于发酵等其他实验或生产。

2.3 抗鼻咽癌质粒 pFY 对细胞 CNE-2 的生长抑制率 处理组、脂质体组、PFY/脂质体组的 MTT 结果见表 2。

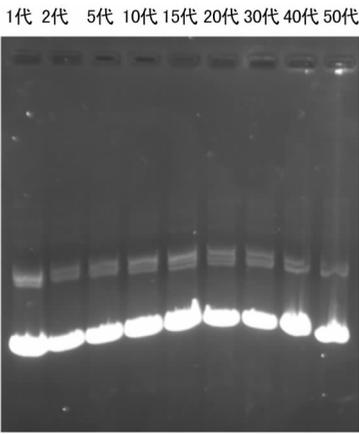


图 2 质粒稳定性的电泳图

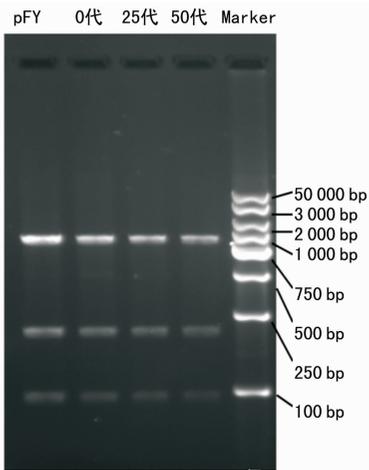


图 3 pFy 质粒的 Kpn I 酶切

表 2 脂质体介导的质粒 PFY 对细胞 CNE-2 生长抑制作用

组别	A570/630	抑制率(%)
未处理组	0.72±0.02	—
脂质体组	0.70±0.03	2.27±4.30
PFY/脂质体组	0.38±0.03	45.12±5.32*

* : P<0.05, 与未处理组比较。

3 讨 论

在质粒转化实验中,目前国内外已有不少相关方面研究。Zhu 等^[9]通过上调 LMP1 DNA 内的 miR-155 显示有助于增加鼻咽癌细胞的增殖,另外还有通过磁性纳米复合耦合物吸附质粒方法提高基因转染效率,以获得更高效的扩增目标^[10]。而本研究通过将质粒 pFY 转染到细胞 CNE-2 方法来达到扩增质粒的目标。

在本研究中,其中用 CaCl₂ 法制备大肠杆菌 JM109 感受态过程中,笔者发现国外 CaCl₂ 试剂,其最佳有效浓度是 0.07 M,或者采用磷酸钙^[11]进行制备。而国产(如广州化学试剂厂)的 CaCl₂ 试剂用量为 0.1 M。但 CaCl₂ 浓度超过上述量时,会使菌体凝结,降低质粒转化效率,与文献^[5-6]报道一致。根据文献^[7]报道和作者的经验,每 OD 菌体感受态的制备,加入质粒量至少为 0.5 μg,才能保证每个菌体细胞进入质粒数是充足的,以便提高质粒的产量。

而在质粒转化后,37 °C 培养 16 h 生长在琼脂平板上的菌落直径多为 2~3 mm。挑选菌落时,应选择分布均匀,大小一

致,边缘整齐的菌落进行摇床培养筛选。但实验过程中发现,质粒含量高的菌株其对应菌落直径反而相对较小,如直径 1~2 mm 菌落质粒的含量一般比直径 2.5~3 mm 菌落的高 5 mg/mL,其超螺旋比例也较高。这可能是由于菌体细胞内要携带的外源质粒越多,其质粒合成代谢的负担也就越大,导致菌体生长的速率就比较慢,在琼脂平板上生长形成的菌落也就越小^[8]。

本研究成功筛选出产质粒含量高及超螺旋比例高的菌株,这种方法对其他的质粒转化和菌种筛选有较好的借鉴作用,能大幅度地提高菌种携带质粒能力,为发酵、提取质粒及其他相关研究工作奠定坚实的基础。

参考文献

- [1] 贾卫华,曾益新.鼻咽癌易感基因研究[J].肿瘤杂志,2004,19(4):270-272.
- [2] Yang SS, Sun J, Liao XP, et al. Co-location of the erm(T) gene and blaROB-1 gene on a small plasmid in Haemophilus parasuis of pig origin[J]. Antimicrob Chemother, 2013,4(11):110-115.
- [3] Sonnevend A, Al Baloushi A, Ghazawi A. Emergence and spread of NDM-1 producer Enterobacteriaceae with contribution of IncX3 plasmids in the United Arab Emirates [J]. Med Microbiol, 2013,4(11):206-210.
- [4] Zhu JH, Yuan Y, Li D, et al. Targeting nuclear factor-κB suppresses the negative effect of toll-like receptor 4 signaling on antimetastasis therapy based on targeting αvβ3 [J]. Cancer Sci, 2012,103(7):1319-1326.
- [5] 孟玲,谭德勇,王焕校. CaCl₂ 法质粒转化最佳条件的探讨 [J]. 云南大学学报:自然科学版,1996,18(2):106-108.
- [6] 王伟伟,李旭业,张伟伟.优化感受态细胞制备方法提高转化效率的研究[J].齐齐哈尔大学学报,2009,25(3):86-90.
- [7] 王园园,蔡仕英,姚志建.几种制备感受态细胞及质粒转化方法的比较[J].军事医学科学院院刊,1999,15(2):152-155.
- [8] Roychoudhury A, Basu S, Sengupta DN. Analysis of comparative efficiencies of different transformation methods of E. coli using two common plasmid vectors[J]. Indian J Biochem Biophys, 2009,46(5):395-400.
- [9] Zhu X, Wang Y, Sun Y, et al. MiR-155 up-regulation by LMP1 DNA contributes to increased nasopharyngeal carcinoma cell proliferation and migration[J]. Eur Arch Oto-Rhino-Laryng, 2014,271(7):1939-1945.
- [10] Liu T, Ma D, Ke B, et al. Gene transfection of magnetic nanocomposite loading plasmid modified by folic acid targeted to nasopharyngeal carcinoma[J]. Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 2014,94(10):772-775.
- [11] Liu T, Tang A, Zhang G, et al. Calcium phosphate nanoparticles as a novel nonviral vector for efficient transfection of DNA in cancer gene therapy[J]. Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals, 2005,20(2):141-149.