

基于超声波下淀粉纳米颗粒 作载体的基因转导

刘俊¹ 刘选明¹* 肖苏尧¹ 童春意¹ 唐冬英¹ 赵李剑¹

¹湖南大学生命科学与技术研究院¹ 化学生物传感与计量学国家重点实验室¹ 长沙 410006 ()

摘要 报道了多聚赖氨酸淀粉纳米颗粒(PLGA)在超声波介导下作基因载体的研究。实验发现PLGA/质粒复合物经过超声波处理不同的时间后的电泳分析显示:结合的质粒受到保护,其生物学性质没有改变。将PLGA/质粒复合物与细胞混合,在1和2的超声波强度下处理(A549细胞表达绿色荧光蛋白的比率最大,达到50%)。这种基于超声波下淀粉纳米颗粒作载体的基因转导方法可被广泛应用于动物转基因技术和人类基因治疗;同样可被广泛应用于植物转基因技术。

关键词 纳米颗粒 基因载体 超声波 基因转导

中图分类号: Q78 文献标识码: B 文章编号: 0253-9838(2006)02-0161-05

以纳米颗粒作基因载体,相对常用的基因载体而言,具有生物亲和性高、稳定性好、易于控制及靶向性强等优点;在基因转导和基因治疗方面显示出巨大的应用前景。但在以纳米颗粒为基因载体将外源基因导入受体细胞时,仍然存在以下方面的问题:基因、纳米颗粒复合物与细胞进行共培养时,细胞膜的屏障使外源基因整合到细胞基因组的中间环节增多,使大部分携带质粒的纳米颗粒难以直接进入细胞,从而直接扩散到细胞核膜上,并穿过核膜孔或在细胞分裂过程中进入细胞核以表达外源基因。因此,有必要寻找提高纳米基因载体转导效率的新方法。研究表明,一定强度的超声波能使细胞壁、细胞膜以至细胞核膜产生瞬间通道,外源质粒可借此进入细胞并进行表达;然而,质粒直接由超声波介导时,超声波对外源质粒有很大的破坏作用。

本文利用淀粉纳米颗粒所具有的良好生物相容性、对质粒的保护作用并结合超声波介导的特点,建立了一种超声波介导纳米颗粒将外源基因直接转入细胞基因组的方法,基本上解决了上述存在的问题。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

2.1.1 蔡司倒置荧光显微镜(德国: NO. 1000) 4.1 Nikon 1a: 显微成像系统(美国 Nikon 公司) 4.2 凝胶图像分析系统(美国 Bio-Rad 公司) 4.3 QSA-100 酶标仪(美国 Biotek 公司) 4.4 琼脂糖凝胶水平电泳仪(北京六一仪器厂) 4.5 超声波发生器(上海新芝生物研究所) 4.6 多聚赖氨酸淀粉纳米颗粒(PLGA) 3.1 质粒(由本实验室制备) 3.2 多聚赖氨酸(PLGA) 购自鼎国生物技术公司 4. 绿色荧光蛋白(GFP) 表达载体 pEGFP-N1 和 pEGFP-N2 细胞取自本实验室。

2.2 实验方法

2.2.1 超声波处理 PLGA/质粒复合物 取 1 mL 离心管,在其中分别加入 100 μL 复合物溶液,再加入质粒溶液,混匀,于室温静置 1 h 后,分为两组。将第一组的 1 个离心管放在超声波发生器上,在 1 和 2 的强度下,分别经超声波处理 1 min。将第二组的 1 个离

心管中的样品经过与第一组相同的处理后, 加入 NaOH 溶液, 摇匀, 用提取 DNA 的方法^[10]洗脱 DNA-PLL-StNP 复合物中的 DNA; 最后, 从每个管中取样, 加入凝胶点样孔, 进行电泳分析, 以经过超声波处理的 DNA 作对照。

1.2.2 超声波处理 DNA-PLL 复合物 在 3 个 150 μL 的离心管中分别加入 PLL 溶液, 再加入 DNA 溶液, 混匀, 于室温静置 30 min, 按 1.2.1 节的方法, 分别经超声波处理 30, 20 和 10 min, 用琼脂糖凝胶电泳分析 DNA 与 PLL 的结合状况, 洗脱复合物中的 DNA, 并进行电泳分析。

1.2.3 超声波处理 COS-7 细胞 取 COS-7 细胞接种于培养瓶中, 在含体积分数为 5% 的 CO_2 和于 37 $^\circ\text{C}$ 的培养箱中培养至细胞覆盖率达 50%~70% 后, 倒掉培养基, 用 D-Hanks 液洗涤细胞后, 以胰酶消化 5 min, 加入新鲜培养基制成细胞悬浮液, 取 15 个 1 mL 的离心管, 在每个离心管中加入 800 μL 细胞悬浮液, 将实验平均分为 3 组, 和分别在 300 W 和 40 kHz; 180 W 和 40 kHz 及 120 W 和 40 kHz 的强度下进行超声波处理, 将每组的 5 个离心管在同一强度下分别处理 15, 10, 5, 2 及 1 min, 将处理后的细胞接种于 36 孔培养板中培养 48 h 后, 用 Benchmark Plus 酶标仪检测细胞的成活率。

1.2.4 超声波介导 PLL-StNP 的基因转导 取 COS-7 细胞接种于 6 孔培养板中, 在含体积分数为 5% 的 CO_2 和 37 $^\circ\text{C}$ 的培养箱中培养, 当细胞覆盖率达 50%~70% 后, 倒掉培养基, 用 D-Hanks 液洗涤细胞后, 用胰酶消化 5 min, 加入新鲜培养基制成细胞悬浮液, 在悬浮液中加入 DNA-PLL-StNP 溶液, 用超声波处理 2 min, 培养 24 h 后, 在荧光显微镜下观察。对照实验设计如下: 在经胰酶消化后的细胞悬浮液中加入无小牛血清的培养基, 再加入 DNA-PLL-StNP 溶液, 与细胞进行共培养, 6 h 后替换为含小牛血清的完全培养基。

2 结果与讨论

2.1 PLL-StNP 对 DNA 的保护

将多聚赖氨酸淀粉纳米颗粒与 DNA 结合, 质量分数为 1% 的凝胶电泳表明, PLL-StNP 具有很强的 DNA 富集能力(图 1 中第 2 道)。DNA-PLL-StNP 复合物分别经超声波处理 10~30 min 后, 其电泳条带(图 1 中第 3~5 道)与没有进行超声波处理的复合物的电泳条带相同(图 1 中第 2 道), 将经过超声波处理的 DNA-PLL-StNP 复合物中的 DNA 洗脱下来并以凝胶电泳考察(图 1 中第 6~8 道), 发现与对照质粒 DNA 条带(图 1 中第 1 道)相同。表明超声波处理不影响 PLL-StNP 对 DNA 的结合, PLL-StNP 可保护 DNA, 防止被超声波破坏。而未与 PLL-StNP 结合的 DNA 经超声波处理 5 min 后的电泳泳道没有明显的条带而呈连带状(图 1 中第 9 道), 表明 DNA 已被超声波破坏。

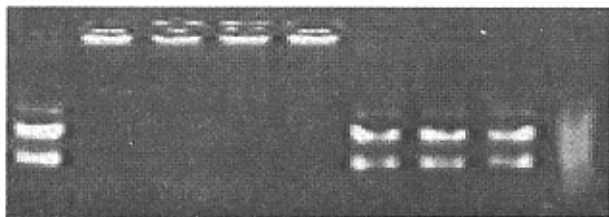


Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of plasmid DNA and DNA-PLL-StNP complexes

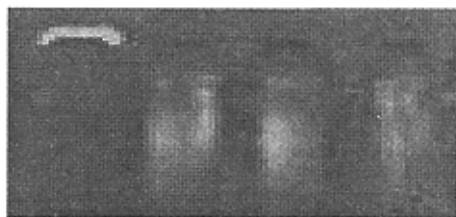


Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of DNA-PLL complexes

将多聚赖氨酸与 DNA 结合, 并经过超声波处理, 质量分数为 1% 的凝胶电泳显示, PLL 仍结合有 DNA, 滞留在凝胶点样孔中(图 2 中第 1 道)。洗脱经超声波处理的 DNA-PLL 复合物的 DNA, 电泳实验发现只有连片状的亮带(图 2 中第 2~4 道), 表明复合物中的 DNA 已被超声波破坏。

上述结果表明, PLL-StNP 可避免 DNA 受到超声波的破坏, 而单一 PLL 却不能避免 DNA 受超声波的破坏。这可能因为纳米颗粒具有特殊的体积效应, 结合 DNA 后空间构型发生了变化, 从而不受超声波的破坏。

2.2 超声波处理对 COS-7 细胞存活率的影响

将 COS-7 细胞悬浮液置于离心管中, 在不同的超声波强度下处理不同时间, 转入 36 孔培养板上,

24 h 后通过酶标仪检测细胞的成活率, 结果见表 1. 由表 1 可知, 在不同超声波强度下处理不同的时间, 细胞的存活率不同, 当超声波强度较大或处理时间较长时, 细胞存活率较低; 当超声波强度较小或处理时间较短时, 细胞存活率较高. 综合细胞成活率和纳米颗粒的导入率, 选择在 120 W 和 40 kHz 强度下处理 2 min, 用于超声波作用下基因转导较为合适.

Table 1 The viability of COS-7 cells charged with ultrasound*

Ultrasound condition	<i>t</i> /min				
	15	10	5	2	1
120 W, 40 kHz	10.6	49.8	95.7	98.1	98.6
180 W, 40 kHz	0	11.4	51.3	97.6	98.2
300 W, 40 kHz	0	0	10.8	65.5	98.1

* Using MTT method to detect the viability of COS-7 cells in microplate spectrophotometer.

2.3 超声波介导多聚赖氨酸淀粉纳米颗粒的基因转导

基于超声波介导的纳米颗粒载体能有效地将外源 GFP 基因转入受体 COS-7 细胞中, 并能得到高效表达(见图 3). 由图 3 可见, 大部分细胞发出绿色荧光, 但所见细胞发出荧光的强弱有所不同, 主要

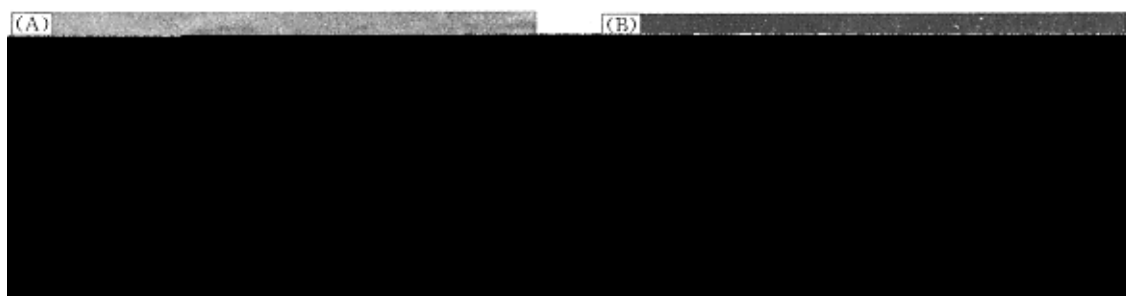


Fig. 3 pIRGFP plasmid DNA-PLL-StNPs treated with ultrasound and carried into the COS-7 cells mediated by ultrasound, and GFP gene expressed GFP at a frequency of about 70%

(A) Optical image; (B) fluorescence image(200 fold).

是因为细胞表达 GFP 在时间上存在差异. 用显微镜观察时, 聚焦的平面有所不同, 也会造成差异, 经计数统计分析, 建立的该基因转导法所得到基因的转导率约为 70%, 而对照未经超声波介导的纳米颗粒载体的基因转导率约为 40%. 结果表明, 借助超声波的作用可显著提高纳米颗粒基因载体的基因转导率. 这可能归因于以下原因: 多聚赖氨酸淀粉纳米颗粒(PLL-StNPs)的粒径(约 50 nm)较小, 结合有 DNA 的 DNA-PLL-StNPs 的粒径(50~100 nm)也较小^[9], 而在超声波作用下, 细胞膜和细胞核膜产生微米级大小的瞬间通道^[8], 因此, DNA-PLL-StNPs 易于穿过这些瞬间通道; 超声波对单纯的 DNA 有破坏作用, 可能是因为超声波的空化作用将 DNA 片段打碎, 而纳米颗粒具有特殊的体积效应, 结合到颗粒上的 DNA 的空间构型发生了变化, 从而有效地防止了超声波的破坏, 在超声波的介导作用下, 纳米颗粒-DNA 复合物较易通过细胞膜和细胞核膜, 从而使外源基因直接整合到细胞基因组内, 显著提高基因转导效率. 该方法与目前国际上采用的病毒载体法^[11]和脂质体载体法^[12]相比较, 具有以下优点: (1) 具有良好的细胞相容性, 因为淀粉为可降解的生物材料, 故淀粉纳米颗粒对细胞的毒性极小; (2) 不具有免疫原性, 这是病毒载体所不能比拟的, 因为病毒载体本身能编码免疫蛋白; (3) 具有良好的稳定性, 而脂质体在体内不稳定, 也具有细胞毒性; (4) 在超声波的介导下, DNA 直接整合到细胞基因组内的机会增加.

3 结 论

通过用超声波处理多聚赖氨酸淀粉纳米颗粒-DNA 复合物和在超声波的作用下由多聚赖氨酸淀粉纳米颗粒将外源基因转入 COS-7 细胞这一系列的实验表明, 多聚赖氨酸淀粉纳米颗粒不仅能有效地结合 DNA, 而且能完全保护 DNA 免受超声波的破坏, 在超声波作用下, 淀粉纳米颗粒基因载体的基因转导效率明显提高. 此方法具有操作简便、转导效率高及不要求有受体细胞特异性等优点, 可望广泛应用于动物和植物转基因技术.

参 考 文 献

- [1] Indrajit R., Susmita M., Amarnath M. *et al.*. International Journal of Pharmaceutics[J], 2003, **250**: 25—33
- [2] Hood D., Ednarski M., Frausto R. *et al.*. Science[J], 2002, **296**: 2404—2407
- [3] HE Xiao-Xiao(何晓晓), WANG Ke-Min(王柯敏), TAN Wei-Hong(谭蔚泓) *et al.*. Chinese Science Bulletin(科学通报)[J], 2002, **47**: 1365—1369
- [4] Boussif O., Lezoulch F., Zanta M. *et al.*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA[J], 1995, **92**: 7297—7301
- [5] Mini T., Klibanov M. Proc. Natl. Acad. Sci. USA[J], 2003, **100**(16): 9138—9143
- [6] Luo D., Saltzman M. Nature Biotechnology[J], 2000, **18**: 33—37
- [7] HUANG Shi-Wen(黄世文), ZHUO Wen-Xi(卓文禧). Chinese Science Bulletin(科学通报)[J], 2003, **48**: 405—409
- [8] Unger E. C., Hersh E., Vannan M. *et al.*. Echocardiography[J], 2001, **18**: 355—361
- [9] Liu Xuan-Ming, Xiao Su-Yao, Liu Jun *et al.*. CN 1 462 763A[P], 2003
- [10] LU Sheng-Dong(卢圣栋). Current Experimental Technology for Molecular Biology, 2nd Ed. (现代分子生物学实验技术, 第二版)[M], Beijing: Publishing House of Peking Union Medical College, 1999: 107
- [11] Shiver J. W., Fu T. M., Chen L. *et al.*. Nature[J], 2002, **415**(6869): 331—335
- [12] Song Y., Liu F., Chu S. *et al.*. Hum. Gene Ther. [J], 1997, **8**: 1585—1594

Starch Nanoparticle as Transgenic Vehicle Mediated by Ultrasound

LIU Jun, LIU Xuan-Ming*, XIAO Su-Yao, TONG Chun-Yi,

TANG Dong-Ying, ZHAO Li-Jian

(State Key Laboratory of Chemo-Biosensing and Chemometrics,

The College of Life Science and Biotechnology, Hunan University, Changsha 410082, China)

Abstract A method in which poly-*L*-lysine-starch nanoparticle(PLL-StNP) could act as gene vehicle mediated by ultrasound was described in this paper. It was found that when pIRGFP plasmid DNA-PLL-StNP complexes were treated with ultrasound for different time, electrophoresis analysis showed that the biological characteristics of DNA could be well-kept, when DNA-PLL-StNP complexes were transferred into COS-7 cells mediated by ultrasound for 2 min at 120 W and 40 kHz, the cells were expressed GFP at a frequency of about 70%. This method may(will) provide a wide application not only in animal transgenic technique and in human gene therapy, but also in plant transgenic technique.

Keywords Nanoparticle; Gene vehicle; Ultrasound; Gene transfer

(Ed.: A, G)

2004 年度国家自然科学基金重点学术期刊评审揭晓

经专家评审, 国家自然科学基金委员会委务会议审定, 2004 年度共有 31 种学术期刊获得国家自然科学基金重点学术期刊专项基金资助。资助期限为两年, 资助强度分别为每年 10 万元和 12 万元, 总经费 696 万元。为了进一步提高评审工作的科学性、权威性、公正性, 2004 年的评审程序做了相应调整, 以 SCI-JCR 和 CJCR 检索数据的定量测评为主, 辅以函评专家的定性评审意见。评审结果按科学部统计情况为: 数理科学 5 刊, 化学科学 5 刊, 生命科学 9 刊, 地球科学 4 刊, 工程与材料科学 3 刊, 信息科学 2 刊, 管理科学 1 刊, 综合类 2 刊(详见下表)。

序号	期刊名称	序号	期刊名称	序号	期刊名称	序号	期刊名称
1	数学学报(英)	9	中国化学工程学报(英)	17	生物化学与生物物理学报	25	材料科学技术(英)
2	物理学报	10	化学通报	18	中华医学杂志	26	金属学报
3	中国物理快报(英)	11	中国药理学报(英)	19	中国中西医结合杂志	27	计算机科学技术学报(英)
4	天体物理学报(英)	12	世界胃肠病学杂志(英)	20	地质学报(英)	28	电子学报
5	力学学报(英)	13	植物学报(英)	21	地球物理学报	29	管理科学学报
6	高等学校化学学报	14	细胞研究(英)	22	地理学报	30	科学通报(英)
7	化学学报	15	作物学报	23	大气科学进展(英)	31	中国科学
8	分析化学	16	中国农业科学	24	稀有金属材料与工程		