

SA 脂质体介导 DNA 转染昆虫细胞的研究

张传溪

吴祥甫

(浙江农业大学应用昆虫学研究所 杭州 310029) (中国科学院上海生物化学研究所 上海 200031)

杆状病毒-昆虫表达系统是 80 年代发展起来的高效真核表达系统,具有表达量高,表达产物后加工较完全等优点,因而备受青睐。传统介导 DNA 转染昆虫细胞的方法是磷酸钙共沉淀法等,转染效率低,操作复杂。Felgher P. L. 等^[1]发现由 DOTMA 即 N-[1-(213-Dioleoyloxy)propyl]-N, N, N-trimethylammonium 和 DOPE 即 Dioleoyl-phosphatidylethanolamine 组成的脂质体 Lipofectin 试剂可以高效介导 DNA 转染真核细胞,将 Lipofectin 应用于介导杆状病毒 DNA 和转移载体 DNA 进入昆虫细胞也十分有效。但由于 DOTMA 是人工合成的阳离子脂,成本高,因而 Lipofectin 试剂价格昂贵。SA 脂质体是由天然的阳离子脂 SA(Stearylamine)和 DOPE 组成的脂质体,已证明可以高效地介导 DNA 转染 CV-1、NIH3T3、C6、CHO 和 COS 等哺乳动物细胞^[2-4],价格便宜,很具推广价值。本文报道应用 SA 脂质体有效地介导 DNA 转染昆虫细胞的试验结果。

1 材料和方法

1.2 SA 脂质体

由中国科学院上海生物化学研究所生物膜的结构与功能课题组按文献[4]制备,浓度为 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。

1.2 DNA 制备

苜蓿丫纹夜蛾(*Autographa californica*)核型多角体病毒(AcMNPV)基因组 DNA 从感染病毒的细胞培养上清中病毒粒子中提取,具体方法参见文献[5]。转移载体 pBlueBacEPO 质粒 DNA 按文献[6]碱法提取后,经 Sepharose 2B 柱分离纯化而得。

1.3 细胞培养

草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)Sf-21 细胞株为本实验室传代培养,培养基为 GIBCO-BRL 公司的 TC-100,补加 10%胎牛血清,27 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养。

1.4 转染和检查方法

35mm 塑料培养皿中接种约 1×10^5 单层 Sf-21 细胞,融合程度约 70%,贴壁生长过夜。第二天吸去旧培养基,据实验要求,换 1ml 新培养基或用无血清培养基漂洗细胞后加 1ml 无血清培养基。病毒 DNA(A)液和 SA 脂质体(B)液按表 1 所列配制,将 A 液和 B 液混匀,共 100 μl 作转染液(表 1),室温静置 15min,逐滴加入培养皿中,27 $^{\circ}\text{C}$ 培养 6h 后,补加培养基至 3ml,并补加胎牛血清至 10%。继续置 27 $^{\circ}\text{C}$ 培养 72h,在 200 倍倒置显微镜下,每培养皿随机检查 10 个视野,统计形成多角体的细胞数量。

1.5 共转染方法和重组鉴定

细胞准备如 1.4 所述。取 1 μg 野生型病毒基因组 DNA 和 2 μg 转移载体 pBlueBacEPO DNA,加无菌水到 50 μl 混匀,另取 SA 脂质体 40 μl 加无菌水至 50 μl ,将 DNA 溶液和 SA 脂质体溶液混匀后静置 15min,逐滴加入用无血清培养基漂洗过的细胞上。27 $^{\circ}\text{C}$ 培养 5d 后,取上清 1 μl 感染单层 Sf-21 细胞 1h,吸去培养基,覆盖上含有 1% 低融点胶、200 μg 的 X-gal 和 10% 胎牛血清的 TC-100 培养基,待胶凝固后,

国家自然科学基金资助项目。

收稿日期:1997-02-28, 修回日期:1997-07-03。

倒置培养皿, 27℃ 恒温培养 5d, 检查多角体斑和蓝斑形成数量。

表 1 共转染液的组成

Amounts of lipid/ μl		10	25	40	55	70
Solution A	AcMNPV DNA $2\mu\text{g}/\mu\text{l}$	8	8	8	8	8
	dd $\text{H}_2\text{O}/\mu\text{l}$	42	42	42	37	22
Solution B	SA liposome/ μl	10	25	40	55	70
	dd $\text{H}_2\text{O}/\mu\text{l}$	40	25	10	0	0

注: 总体积为 $100\mu\text{l}$

2 结果与讨论

2.1 SA 脂质体的用量对转染效率的影响

病毒基因组 DNA 为 138 kb 的野生型 AcMNPV, 含有多角体蛋白基因, 该基因是一个表达量很高的晚期基因, 表达产物(多角体蛋白)在感染晚期可达整个细胞中总碱性可溶蛋白的 17% 以上, 感染晚期所形成的病毒多角体充斥整个细胞核, 在显微镜下非常容易识别。图 1 为 SA 脂质体介导的 AcMNPV DNA 转染 Sf-21 细胞后, 在细胞中形成多角体的状况。

在病毒基因组 DNA 用量相同条件下, SA 脂质体用量对转染效率有很大的影响(图 2)。同样转染 $2\mu\text{g}$ DNA, 当 SA 脂质体用量为 $10\mu\text{l}$ 时, 转染效率很低, 转染 3d 后, 在倒置显微镜 200 倍视野下, 随机检查 10 个视野, 只有 2 个视野共 24 个细胞的核中明显可以观察到多角体, 仅占细胞总量的 0.6%。当 SA 脂质体用量为 40 和 $55\mu\text{l}$ 时, 介导的转染效率最高, 检查的几个视野中形成多角体的数量分别达到 3145 和 3297 个, 占细胞总量的 78.6% 和 82.6%, 当 SA 脂质体用量为 $70\mu\text{l}$ 时, DNA 和脂质体形成的絮状复合物大且多, 漂浮于单层细胞之上, 而转染效率即很低, 10 个视野中仅见到 20 个细胞的核中出现多角体。但细胞并未出现裂解现象, 病毒未感染的细胞仍有分裂, 因此 SA 脂质体对 Sf-21 细胞毒性似不很明显。

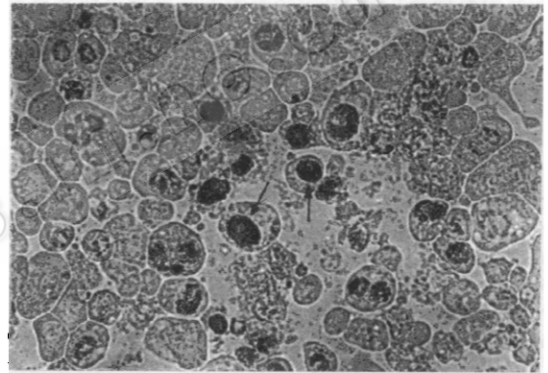


图 1 SA 脂质体介导 DNA 转染昆虫细胞(Sf-21)3d 后在细胞核中形成的 AcMNPV 多角体
箭头所指的细胞内含有多角体

2.2 血清存在对转染效率的影响

在培养基中有 10% 胎牛血清存在条件下, 用 $55\mu\text{l}$ SA 脂质体介导 $2\mu\text{g}$ AcMNPV DNA 转染 Sf-21 细胞, 72h 后在 200 倍倒置显微镜下随机检查 10 个视野, 共有 2796 个细胞的核中出现明显的多角体, 占细胞总量的 60%, 转染效率稍低于无血清培养基条件下转染的效果。结果说明, SA 脂质体在有血清培养基中亦能较有效地介导 DNA 转染昆虫细胞, 而 Lipofectin 试剂要求在无血清存在条件下介导 DNA 转染细胞。一般脂质体在有血清培养基中不稳定, 主要是血清中的载脂蛋白产生脂交换作用而使脂质体的膜结构不稳定易降解。而 SA 脂质体在血清中较稳定, 这与 SA 脂质体为天然成分可能有关。同时与 SA 脂质体易被细胞吸附, 主要通过内存传送 DNA 进入细胞, 而 Lipofectin 主要通过融合传送 DNA^[3], 两者作用机制不同也可能有关, 有待进一步研究。

2.3 SA 脂质体介导 DNA 共转染昆虫细胞的结果

我们构建的转移载体 pBlueBacEPO 含有由多角体蛋白基因强启动子控制下的 EPO 基因和由 AcM-

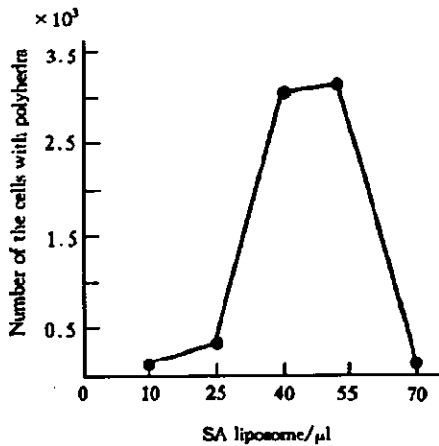


图2 不同SA脂质体用量介导 $2\mu\text{g}$ AcMNPV DNA转染昆虫细胞(Sf-21)的效率

NPV ETL 启动子控制之下的 β -galactosidase 基因, 两者偶联表达, 后者可使同源重组病毒斑在 X-gal 存在下呈蓝色以便于筛选。 β -galactosidase 基因上游和 EPO 基因下游各有 2098bp 和 1925bp 的 AcMNPV 序列, 可供与野生型病毒基因组 DNA 同源重组。 将野生型病毒基因组 DNA $1\mu\text{g}$ 和 pBlueBacEPO $2\mu\text{g}$ 在 $40\mu\text{l}$ SA 脂质体介导下共转染 Sf-21 细胞。 5d 后取 $1\mu\text{l}$ 培养上清铺斑检查共转染后的同源重组率, 结果在一个 35mm 的塑料培养皿中, 共出现 7 个蓝斑, 占有病毒斑总量的 4%。 这说明 SA 脂质体介导的 2 种 DNA 已共转染 Sf-21 细胞, 并在昆虫细胞内发生了同源重组, 同源重组率与磷酸钙共沉淀法和 Lipofectin 试剂法相近。 共转染构建的含 EPO 基因重组病毒感

染昆虫细胞(Sf-21)的效率

试验结果说明, SA 脂质体可以高效地介导长达

138kb 的病毒基因组 DNA 转染昆虫细胞, 介导 $2\sim 3\mu\text{g}$ DNA 转染昆虫细胞时, SA 脂质体以 $40\sim 55\mu\text{l}$ 用量时效率为最高。 在培养基中存在 10% 血清条件下 SA 脂质体仍可有效介导 DNA 转染昆虫细胞。 SA 也可有效介导 2 种 DNA 共转染昆虫细胞, 同源重组率与其它方法相近。

参 考 文 献

- 1 Felgher D L, Gadek T R, Holm M *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1987, **84**: 7413~7417
- 2 杨静平, 孔玉英, 林其淮. 生物化学与生物物理学报, 1993, **25**(3): 231~238
- 3 杨静平, 孔玉英, 林其淮. 生物化学与生物物理学报, 1994, **26**(2): 123~128
- 4 Wang D, Jing N H, Lin Q S. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1996, **226**: 450~455
- 5 Summers M D, Smith G E. A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures. Texas A & M University, 1987.
- 6 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T *et al.* Molecular Cloning: A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

DNA Transfection of Insect Cells Efficiently Mediated by Stearylamine Liposome

Zhang Chuanxi* Wu Xiangfu

(Shanghai Institute of Biochemistry, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031)

(Institute of Applied Entomology, Zhejiang Agricultural University, Hangzhou 310029)*

Abstract SA(Stearylamine) liposome, prepared from stearylamine (an natural cationic lipid), is a new reagent for mediating DNA to transfect mammalian cells. The efficiency of SA liposome in mediating DNA transfection of insect cells was first examined in this report. The baculovirus AcMNPV genome DNA (133.8kb) can be effectively transferred to insect cells (Sf-21) mediated by this new lipid, and the optimal amount for mediating $2\mu\text{g}$ DNA transfection of insect cells in a 35 mm plastic dish was $40\sim 55\mu\text{l}$. The transfection can also effectively be mediated while 10% fetal calf serum was present in the medium. Co-transfection of baculovirus DNA and transfer vector plasmid DNA was also successfully mediated, and the homologous recombinants were observed.

Key words Stearylamine liposome, DNA transfection, insect cell