

大载体转染猪胎儿成纤维细胞的电转条件优化

钟翠丽¹, 李国玲¹, 王豪强¹, 莫健新¹, 全绒¹, 张献伟², 李紫聪¹, 吴珍芳^{1,2}, 顾婷¹, 蔡更元^{1,2}

(¹华南农业大学动物科学学院/国家生猪种业工程研究中心, 广州 510642; ²温氏食品集团股份有限公司, 广东新兴 527400)

摘要:【背景】随着生物技术发展,研究的生理机制和生物功能日益复杂,提高大载体的转染效率对多基因共表达系统、基因编辑技术、转基因育种等具有重要的意义。在转基因育种中,使用的转基因载体相对较大,而且转基因动物的制备效率也与供体细胞猪胎儿成纤维(porcine Fetal Fibroblasts, PFFs)细胞的转染效率有关。【目的】研究主要从转染参数、质粒用量和拓扑结构三方面,比较3种电转仪ECM[®] 830/NEPA 21/Nucleofector[™] 2b的大载体转染PFFs的最佳条件。【方法】使用3种不同电转仪将长达26 kb的携带增强型绿荧光蛋白基因的pPXAT-EGFP质粒转染 1×10^6 个PFFs,48 h后使用流式细胞仪测定荧光细胞比例,从电转参数、质粒用量和拓扑结构三方面分别比较瞬时转染效率。【结果】首先比较电转仪不同参数的转染效率,结果显示当电转参数为脉冲电压300 V,脉冲长度1 ms,脉冲间隔50 ms,脉冲次数3次,NEPA 21转染PFFs的效率最高,为 $13.24\% \pm 1.63\%$,而Nucleofector[™] 2b的最佳电转参数为U-023,其转染效率高达 $46.36\% \pm 3.95\%$ 。然后在最佳电转参数下分别比较6、8、10和12 μg 的26 kb超螺旋质粒的转染效率,ECM[®] 830和Nucleofector[™] 2b转染PFFs的最佳质粒用量为12 μg ,其转染效率分别为 $8.44\% \pm 0.90\%$ (电转参数:脉冲电压300 V,脉冲长度1 ms,脉冲次数3次)和 $14.63\% \pm 3.21\%$ (电转参数:U-023),而NEPA 21使用10 μg 质粒转染PFFs时效率达到最高($6.09\% \pm 0.72\%$)。最后比较不同质粒拓扑结构的转染效率,结果显示线性化质粒的转染效率较低,仅为超螺旋质粒转染效率的34.96%—48.39%。【结论】因此Nucleofector[™] 2b转染PFFs的最佳条件为:U-023程序、12 μg 超螺旋质粒;NEPA 21为:脉冲电压200 V,脉冲长度3 ms,脉冲间隔50 ms,脉冲次数3次、10 μg 超螺旋质粒;ECM[®] 830则在脉冲电压300 V,脉冲长度1 ms,脉冲次数3次条件下转染12 μg 超螺旋质粒可获得最佳转染效率。综合比较上述3种电转仪,26 kb大载体转染PFFs的最佳电转仪是Nucleofector[™] 2b。

关键词: 电转染; 大载体; 猪胎儿成纤维细胞; ECM[®] 830; NEPA 21; Nucleofector[™] 2b

Optimizing the Electroporation Condition of Porcine Fetal Fibroblasts for Large Plasmid

ZHONG CuiLi¹, LI GuoLing¹, WANG HaoQiang¹, MO JianXin¹, QUAN Rong¹, ZHANG XianWei²,
LI ZiCong¹, WU ZhenFang^{1,2}, GU Ting¹, CAI GengYuan^{1,2}

(¹College of Animal Science, South China Agricultural University/National Engineering Research Center for Breeding Swine Industry, Guangzhou 510642; ²Wenshi Food Group Co. Ltd., Xinxing 527400, Guangdong)

Abstract: 【Background】 With the development of biotechnology, the physiological mechanisms and biological functions of research are becoming more and more complex, and improving the transfection efficiency of large vectors is of great significance for multi-gene co-expression systems, genome editing, and transgenic breeding. In transgenic breeding, the transgenic vectors is relatively large, and the efficiency of generating transgenic animals is also attributed to the transfection efficiency of porcine fetal fibroblasts (PFFs). 【Objective】 Therefore, this study mainly compared the electroporation efficiency of three electroporation

收稿日期: 2018-09-18; 接受日期: 2018-12-29

基金项目: 国家科技重大专项(2016ZX08006002)、国家自然科学基金(31802036)、广东省自然科学基金(2017A030310001)

联系方式: 钟翠丽, E-mail: 1014942996@qq.com. 通信作者蔡更元, E-mail: cgy0415@163.com. 通信作者顾婷, E-mail: tinggu@scau.edu.cn

apparatus ECM[®] 830/NEPA 21/Nucleofector[™] 2b on various parameters, plasmid dosage and topology, to explore the optimal electroporation condition of large vector in PFFs. 【Method】 We transfected a 26 kb plasmid, namely pPXAT-EGFP, into the PFFs, and then the electroporation efficiencies of various parameters of three electroporation apparatus ECM[®] 830/NEPA 21/Nucleofector[™] 2b, and the dosage and topological structure of the plasmid by the flow cytometry were compared. 【Result】 By comparing the transfection efficiency of different transfection parameters, the results showed that the highest transfection efficiency of NEPA 21 was 13.24%±1.63% at pulse voltage 300 V, pulse length 1 ms, pulse interval 50 ms, pulse number 3 times, and the optimal electrical rotation parameter of Nucleofector[™] 2b was U-023, whose transfection efficiency was 46.36%±3.95%. In addition, the transfection efficiencies of 6, 8, 10 and 12 μ g 26 kb supercoiled plasmids were compared under the optimal electroporation parameters, and the results showed that the optimal plasmid dosage for ECM[®] 830 and Nucleofector[™] 2b transfected PFFs was 12 μ g with 8.44% ± 0.90% efficiency (transfection parameters: pulse voltage 300 V, pulse length 1 ms, pulse number 3 times) and 14.63% ± 3.21% (U-023), while the NEPA 21 achieved the highest efficiency of 6.09% ± 0.72% with 10 μ g plasmid. Finally, we compared the transfection efficiency of different quality topologies and found that the transfection efficiency of linearized plasmids was low, only 34.96%–48.39% of the supercoiled plasmids. 【Conclusion】 Therefore, the optimal electroporation condition of PFFs by Nucleofector[™] 2b was U-023 procedure, 12 μ g supercoiled plasmid; NEPA 21 was pulse voltage 200 V, pulse length 3 ms, pulse interval 50 ms, pulse number 3 times, and 10 μ g supercoiled plasmid; ECM[®] 830 was transfected with 12 μ g supercoiled plasmid at pulse voltage 300 V, pulse length 1 ms, and pulse number 3 times to obtain the highest transfection efficiency. Comprehensive comparison of the above three kinds of electroporation apparatus, the optimum for transfecting PFFs with 26 kb large carrier was Nucleofector[™] 2b.

Key words: electroporation; large plasmid; porcine fetal fibroblasts; ECM[®] 830; NEPA 21; Nucleofector[™] 2b

0 引言

【研究意义】为满足日益复杂的生物研究需求,运用的载体分子量越来越大(如本试验所用到 26 kb 载体),其主要原因有以下两点:(1)载体中两侧同源臂较大:运用同源重组的原理,需要在载体上根据靶点上下序列设计约 600—6 000 bp 两侧同源臂以定点敲入外源 DNA^[1-3];(2)多基因共表达的应用:多基因共表达系统能够满足研究复杂的生理机制和实现多种生物功能的需求,在肿瘤多基因治疗和蛋白工程等方面具有重大的应用价值。目前主要提高经济性质的转基因模型载体都在 10 kb 以上,如腮腺生物反应器的转基因载体^[4]。因此优化大载体转染条件对多基因共表达系统、基因编辑、转基因育种等具有重要的意义。【前人研究进展】转基因猪的制备效率与大载体转染供体细胞 PFFs 的效率有关,大载体转染至 PFFs 后外源基因可通过随机整合和定点整合两种基因整合方式制备转基因动物。随机整合如 *piggyBac* 系统具有基因转移能力强、整合效率高、转基因稳定表达和遗传等优点,而且整合位点相对安全^[5-8]。据统计 48.8% 的 *piggyBac* 整合位点位于已注释的基因位点^[9];而杜新华等(2013)获得的 8 个 *piggyBac* 转座子的有效整合位点中有 5 个位于牛基因组的非调控区内^[10]。因此可借助增强型绿色荧光蛋白 (enhanced green fluorescent protein, EGFP) 基因报告

载体和 *piggyBac* 系统获得有效整合位点,分析外源基因的表达效果和对内源基因表达的影响等以评估位点的安全性^[11]。而基于同源重组的定点整合技术整合效率较低,效率仅 0.5%—20%,可选的安全位点较少,主要以 *Rosa 26* 为靶点插入外源基因制备转基因动物,如小鼠^[12]、羊^[13]、猪^[11,14],对 20 kb 以上的大片段定点整合仍存在极大的技术难度。目前转染方法主要有碳酸钙化学法、脂质体转染法和电穿孔法等。虽然有研究人员通过脂质体法和碳酸钙法可获得阳性 PFFs 细胞,但是碳酸钙转染效率低,脂质体转染法细胞毒性大^[15]。而电穿孔法主要将额外加入的遗传物质从电击形成的瞬时孔隙导入细胞膜甚至细胞核内的一种转染方式,这种方式快速简易、毒性低、而且转染效率相对较高,约 30%—90%^[16-18]。故相比之下,电穿孔法更适合大载体转染 PFFs。市面上电转仪种类繁多,如 ECM[®] 830、NEPA 21 和 Nucleofector[™] 2b 等。ECM[®] 830 具有方形波电穿孔系统,通过击穿细胞膜将质粒导入细胞质内来实现高效转染,而 NEPA 21 和 Nucleofector[™] 2b 均能击穿细胞膜及核膜。三者相比,ECM[®] 830 转染成本较低;NEPA 21 不需要特殊转染试剂盒,多数用于活体转染^[19-20],甚少用于体外转染,ISHINO 等^[21]使用 NEPA 21 成功转染牛耳成纤维细胞,但效率很低(0.35%)。Nucleofector[™] 2b 虽然根据细胞类型使用专用转染试剂盒,但无需自行摸索电转条件。【本研究切入

点】研究表明上述 3 种电转仪转染 PFFs 的小载体（10 kb 以内）转染效率可以达到 50%以上^[16-17, 22]，但大载体转染 PFFs 的效率较低，且相关研究甚少，因此可通过优化电转仪（如 ECM[®] 830、NEPA 21 和 Nucleofector[™] 2b）、电转参数、质粒用量和拓扑结构的转染条件来提高大载体转染 PFFs 的效率，为新型转基因环保猪的制备提供参考。【拟解决的关键问题】本文比较上述 3 种常用电转仪的电转参数、质粒用量和拓扑结构对 26 kb 质粒转染 PFFs 的影响，以寻找针对猪胎儿成纤维细胞的更高效、合适的大载体转染条件，为多基因共表达系统、基因编辑、转基因育种等的应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

电转仪：ECM[®] 830（BTX，美国）；Nucleofector[™] 2b（LONZA，德国）；NEPA 21（NEPA GENE，日本）。PFFs 细胞：由广东温氏食品集团股份有限公司提供。质粒 pPXAT-EGFP(26 kb)：由国家生猪种业工程技术研究中心提供。

1.2 试验时间和地点

2016 年 7 月广东省广州市华南农业大学国家生猪种业工程技术研究中心。

1.3 方法

1.3.1 质粒准备 pPXAT-EGFP 质粒依照 Endo-free Plasmid Maxi Kit（Omega，美国）说明书进行抽提，取部分超螺旋质粒使用 FastDigest[®] NotI（Thermo Scientific，美国）进行酶切线性化，纯化回收备用（图 1）。

1.3.2 电转染 将 PFFs 细胞于 39℃、12%胎牛血清（Fetal bovine serum, FBS）的 DMEM 完全培养基中培养至融合度至 80%—90%，胰酶消化后取 1×10⁶ 个细胞悬液至新的离心管中，弃上清，根据不同试验分组添加电转预混液（由电转液和质粒组成的，不电转的空白组以相应体积的电转液代替电转预混液），轻柔打散成单细胞悬浮液，全部转至无菌的 2 mm 间距电转杯中，根据不同电转参数进行电转，然后转移至含有 12% FBS 的 DMEM 完全培养基 6 孔板，置于 39℃，5% CO₂ 的培养箱中培养。电转 6 h 后更换成含有 1×青链霉素（penicillin-streptomycin solution, PS）、

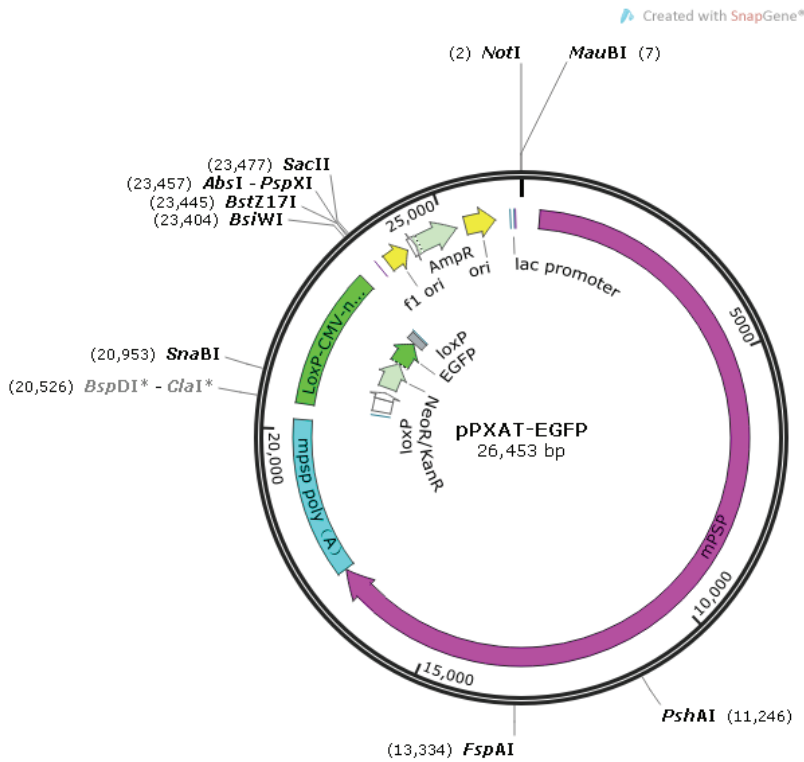


图 1 pPXAT-EGFP 质粒图谱
Fig. 1 The plasmid profile of pPXAT-EGFP

12% FBS 的 DMEM 完全培养基继续培养。电转 48 h 后 0.05%胰酶消化, 90×g 离心 5 min, 添加 1 mL/孔 PBS 重悬后用流式细胞仪检测转染效率[转染效率=(绿色荧光细胞/细胞总数)×100%]。

1.3.3 电转参数优化 ECM[®] 830 电转 PFFs 的最佳电转参数可参考 ROSS 等^[18]研究结果(脉冲电压 300 V, 脉冲长度 1 ms, 脉冲次数 3 次), 而 NEPA 21 和 Nucleofector[™] 2b 转染 PFFs 细胞的电转参数有待优化。

为获得 NEPA 21 最佳电转参数, 分别采用广州市华粤行仪器有限公司(NEPA 21 供货商)提供的 4 种电转参数转染 PFFs, 即分为 4 个处理组(NEPA-1、NEPA-2、NEPA-3 和 NEPA-4, 表 1)和一个空白组(不电转, 100 μL NEPA 电转液代替电转预混液), 每个组 3 个重复, 其他电转步骤及检测见 1.3.2。此外,

NEPA 21 电转参数见表 1, 其电转预混液由 100 μL NEPA 21 电转液和 8 μg 质粒组成, 而 NEPA 21 电转液为无血清 Opti-MEM。

Nucleofector[™] 2b 则选取文献报道中适用于 PFFs 的电转参数进行优化^[17], 即分为 2 个处理组(LONZA-A: A-033 和 LONZA-U: U-023, 表 2)和一个空白组(不电转, 100 μL Nucleofector[™] 2b 电转液代替电转预混液), 每个处理组重复 3 次, 其他电转步骤及检测见 1.3.2。此外, Nucleofector[™] 2b 电转参数为 A-033 和 U-023, 其电转预混液由 100 μL Nucleofector[™] 2b 电转液和 8 μg 质粒组成, 而 Nucleofector[™] 2b 电转液则来自电转试剂盒 Basic Nucleofector Kit for Primary Mammalian Fibroblasts (Amata, 德国)中 Nucleofector[™] Solution 和 supplement 按比例 4.5 : 1 混合的液体。

表 1 NEPA21 的穿孔脉冲参数

Table 1 Poring pulse of NEPA21

编号 Number	脉冲电压 Voltage (V)	脉冲长度 Length (ms)	脉冲间隔 Continuous (ms)	脉冲次数 Times	衰减幅度 Voltage attenuation range (%)	电极 Electrode
NEPA-1	150	5	50	2	10	+
NEPA-2	200	3	50	3	10	+
NEPA-3	275	1.5	50	2	10	+
NEPA-4	300	1	50	3	10	+

NEPA 21 电转参数参考分为两部分: 转移脉冲和穿孔脉冲, 其中转移脉冲参数不变(脉冲电压 20 V, 脉冲长度 50 ms, 脉冲间隔 50 ms, 脉冲次数 5 次, 电压衰减幅度 40%, 电极+/-)。上述 4 种电转参数由 NEPA 21 供货商广州市华粤行仪器有限公司提供。NEPA 21 电转液为无血清 Opti-MEM。The electroporation parameter of NEPA 21 is divided into two parts: transfer pulse and poring pulse. The transfer pulse remains fixed(pulse voltage of 20 V, pulse length 50 ms, pulse interval 50 ms, pulse number 5 times, Voltage attenuation range 40%, + / -). And the above 4 kinds of poring pulse are provided by Guangzhou Hua Yue Enterprise Holdings Ltd which is the supplier of NEPA 21. In addition, the transfection mixture of NEPA 21 is Opti-MEM without serum

表 2 优化 Nucleofector[™] 2b 电转参数的试验分组

Table 2 Grouping of optimizing the parameters of Nucleofector[™] 2b

组别 Group	电转参数 Parameters	电转预混液 Transfection mixture
处理组 1 Group 1	LONZA-A ¹⁾	100 μL Nucleofector [™] 2b 电转液 ³⁾ +8 μg 质粒
处理组 2 Group 2	LONZA-U ²⁾	100 μL the transfection mixture of Nucleofector [™] 2b and 8 μg plasmid
空白组 Blank group	不电转 Non transfection	100 μL Nucleofector [™] 2b 电转液 Only 100 μL the transfection mixture of Nucleofector [™] 2b

¹⁾ A-033; ²⁾ U-023; ³⁾ Nucleofector[™] 2b 的电转液由电转试剂盒 Basic Nucleofector Kit for Primary Mammalian Fibroblasts (Amata, 德国)中 Nucleofector[™] Solution 和 supplement (4.5 : 1)

¹⁾ A-033; ²⁾ U-023; ³⁾ The transfection mixture of Nucleofector[™] 2b is composed of Nucleofector[™] Solution and supplement(4.5 : 1) which is from Basic Nucleofector Kit for Primary Mammalian Fibroblasts(Amata, Germany)

1.3.4 优化质粒用量 使用上述优化的 NEPA 21 和 Nucleofector[™] 2b 电转仪参数, 及 ECM[®] 830 电转参数(脉冲电压 300 V, 脉冲长度 1 ms, 脉冲次数 3 次)^[18], 分别使用 6、8、10 和 12 μg 的超螺旋质粒进行转染,

即根据电转仪分为 3 个处理组(ECM[®] 830、NEPA 21 和 Nucleofector[™] 2b)和对应的 3 个空白组(不电转, 相应电转液代替电转预混液), 每个处理组根据质粒用量分为 4 个小组(6、8、10 和 12 μg 的超螺旋质粒),

每个处理小组重复 3 次,电转步骤及检测见 1.3.2。此外 ECM[®] 830 电转预混液由 200 μ L 的 ECM[®] 830 电转液和质粒组成,其中电转液是 25% Opti-MEM 和 75% cytosalts (120 mmol·L⁻¹ KCl, 0.15 mmol·L⁻¹ CaCl₂, 10 mmol·L⁻¹ K₂HPO₄; pH 7.6, 5 mmol·L⁻¹ MgCl₂) 的混合液^[18]。

1.3.5 质粒拓扑结构的影响 使用 3 种电转仪的最优电转参数和摸索的最适质粒用量,分别使用超螺旋和线性化的质粒进行转染,即根据电转仪分为 3 个处理组 (ECM[®] 830、NEPA 21 和 Nucleofector[™] 2b) 和对应的 3 个空白组 (不电转,相应电转液代替电转预混液),每个处理组根据质粒分子结构分为 2 个小组 (超螺旋质粒和线性化质粒),每个处理小组重复 3 次,电转步骤及检测见 1.3.2。

1.3.6 比较电转仪的转染效率 根据上述探索的 ECM[®] 830, NEPA 21 和 Nucleofector[™] 2b 的最佳电转

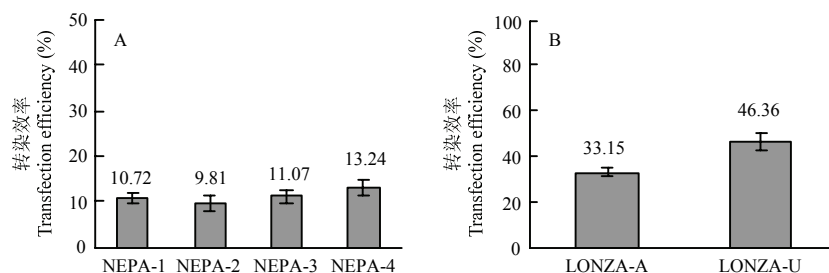
条件 (电转参数、质粒用量和结构) 转染 PFFs 以探索电转仪对转染效率的影响,即分为 3 个处理组和对应的 3 个空白组 (不电转,相应电转液代替电转预混液),每个处理组重复 3 次,电转步骤及检测见 1.3.2。

1.3.7 统计学处理 采用 SPSS 18 软件进行单因素分析 (Duncan)。数据以 Mean \pm SD 表示,显著性水平 $P < 0.05$ 则表示差异有统计学显著性意义。

2 结果

2.1 不同电转参数的比较

分别在不同的电转参数下以 8 μ g 质粒转染 PFFs,研究结果表明 NEPA 21 的最佳电转参数为 NEPA-4 (脉冲电压 300 V, 脉冲长度 1 ms, 脉冲间隔 50 ms, 脉冲次数 3 次), 转染效率为 13.24% \pm 1.63% ($P > 0.05$, 图 2-A)。在 Nucleofector[™] 2b 的最佳电转参数为 U-023, 其转染效率高达 46.36% \pm 3.95% ($P < 0.05$, 图 2-B)。



A: 4 种 NEPA21 电转参数的转染效率比较, NEPA-1~NEPA-4 的电转参数见表 2; B: 2 种 Nucleofector[™] 2b 电转参数的转染效率比较, LONZA-A: A-033; LONZA-U: U-023

A: Comparison of transfection efficiency between 4 kinds of NEPA21 electroporation parameters which are shown in Table 2; B: Comparison of transfection efficiency between two kinds of Nucleofector[™] 2b electroporation parameters, LONZA-A: A-033; LONZA-U: U-023

图 2 不同电转参数条件下的转染效率

Fig. 2 The transfection efficiency of different parameters

2.2 不同质粒用量的比较

在最佳电转参数下使用 3 种电转仪分别转染 6、8、10 和 12 μ g 的 26 kb 超螺旋质粒。由图 3 可知当质粒用量为 12 μ g 时, ECM[®] 830 和 Nucleofector[™] 2b 转染效率最高, 分别为 8.44% \pm 0.90% ($P < 0.05$) 和 14.63% \pm 3.21% ($P > 0.05$)。而 NEPA 21 使用 10 μ g 质粒转染 PFFs 时效率达到最高 (6.09% \pm 0.72%), 但与 12 μ g 质粒的转染效率差异不显著 (5.12% \pm 1.96%, $P > 0.05$)。

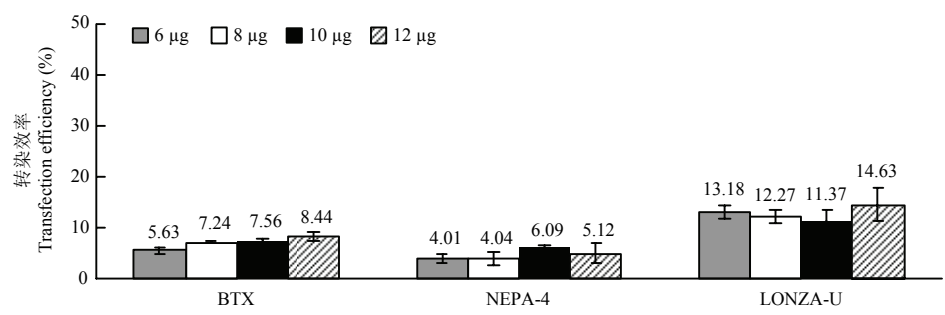
2.3 不同质粒拓扑结构的比较

在上述摸索的最佳参数下 ECM[®] 830, NEPA 21 和 Nucleofector[™] 2b 分别将 12 μ g 超螺旋和线性化质粒转染 PFFs 细胞。结果显示 3 种电转仪分别使用超

螺旋和线性化质粒的转染效率为: 16.18% \pm 1.45% 和 7.83% \pm 1.27%; 5.64% \pm 1.12% 和 2.20% \pm 0.23%; 33.15% \pm 1.30% 和 11.59% \pm 1.20% (图 4)。由此可知线性化质粒的转染效率为显著低于其超螺旋结构 ($P < 0.05$), 且仅为超螺旋质粒转染效率的 34.96%—48.39%。

2.4 不同电转仪的比较

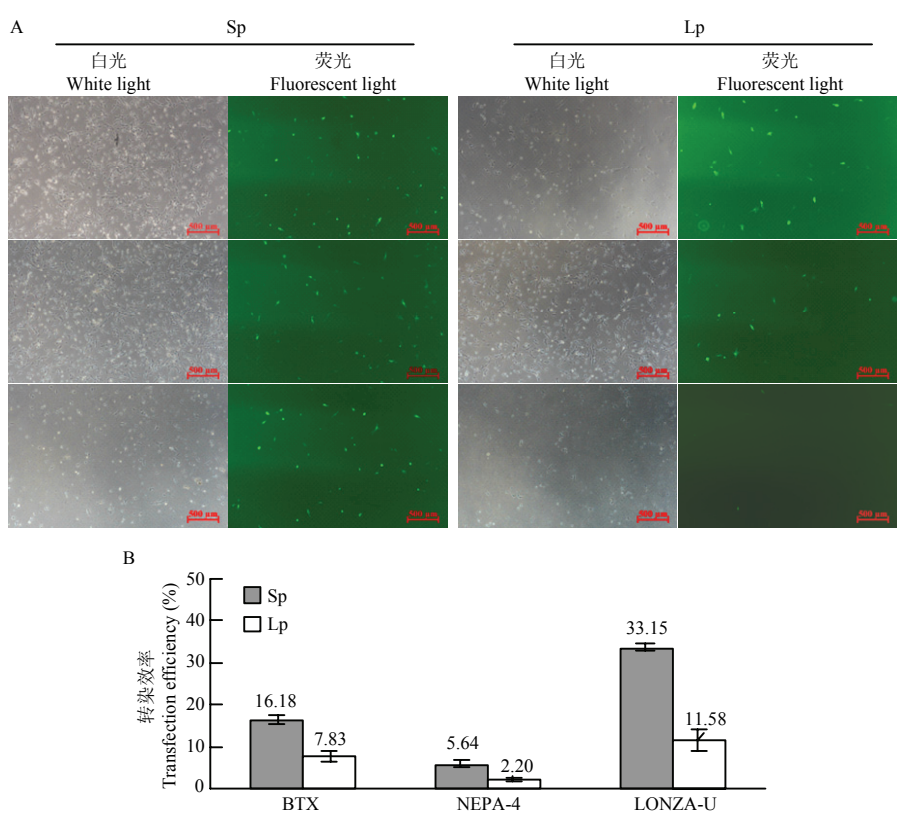
在最佳电转参数下比较 ECM[®] 830、NEPA 21 和 Nucleofector[™] 2b 转染 12 μ g 超螺旋质粒的效率。结果显示 3 种电转仪的转染效率分别为: 16.18% \pm 1.45%、5.64% \pm 1.12% 和 33.15% \pm 1.30%, 即 3 种电转仪中 Nucleofector[™] 2b 转染 PFFs 的转染效率最高 (图 5)。



BTX: ECM[®] 830 的最佳电转参数 (脉冲电压 300 V, 脉冲长度 1 ms, 脉冲次数 3 次); NEPA-4: NEPA 21 的最佳电转参数 (脉冲电压 200 V, 脉冲长度 3 ms, 脉冲间隔 50 ms, 脉冲次数 3 次); LONZA-U: Nucleofector[™] 2b 的最佳电转参数 (U-023)
BTX: The better parameter of ECM[®] 830(voltage 200 V, continuous 3 ms and 3 times); NEPA-4: The better parameter of NEPA 21(voltage 200 V, continuous 3 ms, interval 50 ms and 3 times); LONZA-U: The better parameter of Nucleofector[™] 2b(U-023)

图 3 不同质粒用量的转染效率

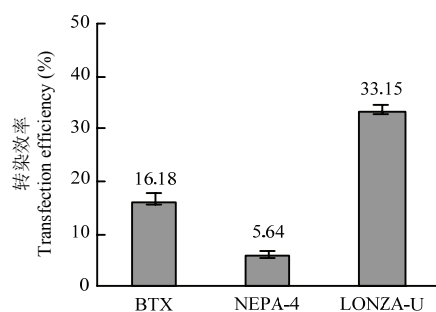
Fig. 3 The transfection efficiency of plasmid with different dosages



A: 荧光显微镜观察转染不同拓扑结构质粒的细胞; B: 比较超螺旋和线性化质粒的转染效率。BTX: ECM[®] 830 的最佳电转参数 (脉冲电压 300 V, 脉冲长度 1 ms, 脉冲次数 3 次); NEPA-4: NEPA 21 的最佳电转参数 (脉冲电压 200 V, 脉冲长度 3 ms, 脉冲间隔 50 ms, 脉冲次数 3 次); LONZA-U: Nucleofector[™] 2b 的最佳电转参数 (U-023); Sp: 超螺旋质粒; Lp: 线性化质粒
A: Cells transfected with the different topological structures of plasmid were observed by fluorescence microscopy; B: Comparison of transfection efficiency between supercoiled plasmid and linearized plasmid. BTX: The better parameter of ECM[®] 830(voltage 200 V, continuous 3 ms and 3 times); NEPA-4: The better parameter of NEPA 21(voltage 200 V, continuous 3 ms, interval 50 ms and 3 times); LONZA-U: The better parameter of Nucleofector[™] 2b(U-023); Sp: Supercoiled plasmid; Lp: Linearized plasmid.*: $P<0.05$; **: $P<0.01$

图 4 不同质粒拓扑结构的转染效率

Fig. 4 The transfection efficiency of plasmid with different topological structures



BTX: ECM[®] 830 的最佳电转参数 (脉冲电压 300 V, 脉冲长度 1 ms, 脉冲次数 3 次); NEPA-4: NEPA 21 的最佳电转参数 (脉冲电压 200 V, 脉冲长度 3 ms, 脉冲间隔 50 ms, 脉冲次数 3 次); LONZA-U: Nucleofector[™] 2b 的最佳电转参数 (U-023)

BTX: The better parameter of ECM[®] 830 (voltage 200 V, continuous 3 ms and 3 times); NEPA-4: The better parameter of NEPA 21(voltage 200 V, continuous 3 ms, interval 50 ms and 3 times); LONZA-U: The better parameter of Nucleofector[™] 2b(U-023)

图 5 不同电转仪的转染效率比较

Fig. 5 The transfection efficiency of different electroporation apparatus

3 讨论

市面上电转仪种类繁多,除了使用广泛的 ECM[®] 830 以外,还出现了很多转染效率高的新型电转仪,如 NEPA 21 和 Nucleofector[™] 2b,本研究主要是与 ECM[®] 830 相比,探索新型电转仪转染 PFFs 的效果并优化大载体转染条件。ECM[®] 830 转染条件借鉴 ROSS 等^[18]研究,文献结果显示在优化的转染参数下将 2.5 μg/200 μL 的 5.8 kb 超螺旋质粒电转 1×10⁶ 个 PFFs,其最高转染效率在 70%左右。据报道使用 NEPA 21 将 7 μg/100 μL 的 9 kb 环状质粒转染至牛耳成纤维细胞,其转染效率仅为 0.35%^[21]。而 NAKAYAMA 等^[17]使用 Nucleofector[™] 2b 的 U-023 程序转染 3.5 kb 超螺旋质粒, PFFs 的转染效率为 79%。

相比之下,本试验结果显示 26 kb 质粒转染至 PFFs 的转染效率最高仅为 46.36%±3.95% (Nucleofector[™] 2b),NEPA 21 的效率不足 10%,而 ECM[®] 830 在 ROSS 等^[18]优化的电转参数下转染 26 kb 超螺旋质粒的效率低于 16%,而明显低于上述小载体的转染效率,表明质粒大小与转染效率成反比的关系。本试验还探索不同拓扑结构的质粒对转染效率的影响,结果显示超螺旋质粒转染 PFFs 的效率高于线性化质粒效率的两倍 (图 4),这可能由于线性质粒的空间位阻较大^[23]。而且有报道显示超螺旋质粒和线性化质粒的细胞死亡率和转染效率分别为: 15%和 35%、76%和 11%^[24]。

推测线性化质粒对细胞的毒性较大,很可能影响后期猪体细胞克隆效率,因此超螺旋质粒更利于转染。

此外,电转仪也是显著影响转染效率的一个重要因素。3 种电转仪相比, Nucleofector[™] 2b 的转染效率显著高于 ECM[®] 830 和 NEPA 21 (图 5),而且应用于小载体转染时效率亦可高达 79%,这可能由于 Nucleofector[™] 2b 的电流同时击穿细胞膜和细胞核膜更利于外源遗传物质转染。因此转染 26 kb 大载体的最佳电转仪是 Nucleofector[™] 2b,而且被广泛大量运用于转染成纤维细胞以制备转基因动物。结合钟翠丽等^[22]研究结果认为电转成本较低且转染效率高 90%的 ECM[®] 830、ECM[®] 2001 等电转仪更适合小载体转染 PFFs。此外 ECM[®] 830 还具有对细胞损伤小的优势,如图 4-A 中虽然 ECM[®] 830 转染 12 μg 线性化质粒的效率低于 NEPA 21 和 Nucleofector[™] 2b,但是存活率较高且荧光细胞总数相对较多。最后,NEPA 21 在本试验中应用于转染 PFFs, 26 kb 超螺旋质粒的转染效率较低 (4%—13%),而 7.6 kb 超螺旋质粒的效率可达 80%以上^[22]。相比之下,NEPA 21 不适合大载体转染 PFFs。

本试验主要通过优化电转参数、质粒用量和拓扑结构等条件以提高大载体转染效率,对多基因共表达系统、基因编辑和转基因育种等的应用具有重要的意义。大载体的低转染效率是上述技术的难点之一,因此除了通过探索电转条件,还可以通过降低载体大小来提高转染效率。结合本试验结果及前人研究提出以下策略: (1) 构建单启动子表达多基因或无启动子基因打靶载体,其中单启动子载体需要选择一个强启动子以启动多个基因表达,而无启动子基因载体则是借助内源启动子实现多基因表达^[25-26]; (2) 运用 IRES 和 2A 序列等元件构建多顺反子^[27-28]; (3) 缩短同源臂长度 (短至 300 bp)^[29],能大幅度降低载体负载量,有利于提高转染效率,或运用同源臂长度仅 5—25 bp 的微同源重组技术^[30]。

4 结论

针对目前大载体转染 PFFs 的效率较低且优化转染条件的研究甚少的情况,本研究通过在不同的电转仪 (ECM[®] 830/NEPA 21/Nucleofector[™] 2b)、电转参数、质粒用量和拓扑结构的条件下转染 PFFs 以优化大载体的转染条件,为多基因共表达系统、基因编辑、转基因育种等提供参考数据。本研究结果显示 3 种电转仪中, Nucleofector[™] 2b 是大载体转染 PFFs 的理想

电转仪, 且在 U-023 的程序下转染 12 μg 的 26 kb 超螺旋质粒时可达到最高转染效率。

References

- [1] RUAN J, LI H, XU K, WU T, WEI J, ZHOU R, LIU Z, MU Y, YANG S, OUYANG H, CHEN-TSAI R Y, LI K. Highly efficient CRISPR/Cas9-mediated transgene knock in at the H11 locus in pigs. *Scientific Reports*, 2015, 5: 14253.
- [2] 王金霞, 徐影琪, 魏政立, 杨威, 张梅英, 郑志红. 一种能实现蛋白可逆表达的敲入载体构建方法. *辽宁农业科学*, 2016(4): 27-32.
WANG J X, XU Y Q, WEI Z L, YANG W, ZHANG M Y, ZHENG Z H. A method of constructing a knock-in vector which can achieve reversible protein expression. *Liaoning Agricultural Sciences*, 2016(4): 27-32. (in Chinese)
- [3] 张驹. CRISPR/Cas9 系统介导羊 MSTN 基因敲除和定点整合 fat-1 基因的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古大学, 2016.
ZHANG J. Generation of *MSTN* gene knock-out and *fat-1* gene Knock-in goat via CRISPR/CAS9[D]. Huhhot: Inner Mongolia University, 2016. (in Chinese)
- [4] GUAN L Z, SUN Y P, XI Q Y, WANG J L, ZHOU J Y, SHU G, JIANG Q Y, ZHANG Y L. β -Glucanase specific expression in the parotid gland of transgenic mice. *Transgenic Research*, 2013, 22(4): 805-812.
- [5] CLARK K J, CARLSON D F, FAHRENKRUG S C. Pigs taking wing with transposons and recombinases. *Genome Biology*, 2007, 8(Suppl 1): S13.
- [6] DING S, WU X, LI G, HAN M, ZHUANG Y, XU T. Efficient transposition of the *piggyBac* (PB) transposon in mammalian cells and mice. *Cell*, 2005, 122(3): 473-483.
- [7] LI M A, TURNER D J, NING Z, YUSA K, LIANG Q, ECKERT S, RAD L, FITZGERALD T W, CRAIG N L, BRADLEY A. Mobilization of giant *piggyBac* transposons in the mouse genome. *Nucleic Acids Research*, 2011, 39(22): e148.
- [8] WU S C, MEIR Y J, COATES C J, HANDLER A M, PELCZAR P, MOISYADI S, KAMINSKI J M. *piggyBac* is a flexible and highly active transposon as compared to sleeping beauty, Tol2, and Mos1 in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(41): 15008-15013.
- [9] WILSON M H, COATES C J, GEORGE AL JR. *PiggyBac* transposon-mediated gene transfer in human cells. *Molecular Therapy*, 2007, 15(1): 139-145.
- [10] 杜新华, 高雪, 张路培, 高会江, 李俊雅, 许尚忠. *Piggybac* 转座子在牛基因组的整合位点及特征分析. *遗传*, 2013, 35(6): 771-777.
DU X H, GAO X, ZHANG L P, GAO H J, LI J Y, XU S Z. Integration sites and their characteristic analysis of *piggyBac* transposon in cattle genome. *Hereditas*, 2013, 35(6): 771-777. (in Chinese)
- [11] XIE Z, PANG D, WANG K, LI M, GUO N, YUAN H, LI J, ZOU X, JIAO H, OUYANG H, LI Z, TANG X. Optimization of a CRISPR/Cas9-mediated knock-in strategy at the porcine *Rosa26* locus in porcine foetal fibroblasts. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 3036.
- [12] CHU V T, WEBER T, GRAF R, SOMMERMAN T, PETSCH K, SACK U, VOLCHKOV P, RAJEWSKY K, KÜHN R. Efficient generation of *Rosa26* knock-in mice using CRISPR/Cas9 in C57BL/6 zygotes. *BMC Biotechnology*, 2016, 16: 4.
- [13] WU M, WEI C, LIAN Z, LIU R, ZHU C, WANG H, CAO J, SHEN Y, ZHAO F, ZHANG L, MU Z, WANG Y, WANG X, DU L, WANG C. *Rosa26*-targeted sheep gene knock-in via CRISPR-Cas9 system. *Scientific Reports*, 2016, 6: 24360.
- [14] LAI S, WEI S, ZHAO B, OUYANG Z, ZHANG Q, FAN N, LIU Z, ZHAO Y, YAN Q, ZHOU X, LI L, XIN J, ZENG Y, LAI L, ZOU Q. Generation of knock-in pigs carrying oct4-tdtomato reporter through CRISPR/Cas9-mediated genome engineering. *PLoS ONE*, 2016, 11(1). doi:10.1371/journal.pone.0146562.
- [15] 覃兆鲜, 潘天彪, 谢炳坤. 猪成纤维细胞转染方法的比较. *江苏农业科学*, 2011(3): 250-251.
QIN Z X, PAN T B, XIE B K. Comparison of the transfection methods for porcine fibroblasts cell. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2011(3): 250-251. (in Chinese)
- [16] RICHTER A, KUROME M, KESSLER B, ZAKHARTCHENKO V, KLYMIUK N, NAGASHIMA H, WOLF E, WUENSCH A. Potential of primary kidney cells for somatic cell nuclear transfer mediated transgenesis in pig. *BMC Biotechnology*, 2012, 12(1): 84.
- [17] NAKAYAMA A, SATO M, SHINOHARA M, MATSUBARA S, YOKOMINE T, AKASAKA E, YOSHIDA M, TAKAO S. Efficient transfection of primarily cultured porcine embryonic fibroblasts using the Amara Nucleofection System™. *Cloning and Stem Cells*, 2007, 9(4): 523-534.
- [18] ROSS J W, WHYTE J J, ZHAO J, SAMUEL M, WELLS K D, PRATHER R S. Optimization of square-wave electroporation for transfection of porcine fetal fibroblasts. *Transgenic Research*, 2009, 19(4): 611-620.
- [19] BARNABÉ-HEIDER F, MELETIS K, ERIKSSON M, BERGMANN O, SABELSTRÖM H, HARVEY MA, MIKKERS H, FRISÉN J. Genetic manipulation of adult mouse neurogenic niches by in vivo electroporation. *Nature Methods*, 2008, 5(2): 189-196.
- [20] ZOU M, KONINCK P D, NEVE R L, FRIEDRICH R W. Fast gene

- transfer into the adult zebrafish brain by herpes simplex virus 1 (hsv-1) and electroporation: methods and optogenetic applications. *Frontiers in Neural Circuits*, 2014, 8(7): 41.
- [21] ISHINO T, HASHIMOTO M, AMAGASA M, SAITO N, DOCHI O, KIRISAWA R. Establishment of protocol for preparation of gene-edited bovine ear-derived fibroblasts for somatic cell nuclear transplantation. *Biomedical Research*, 2018, 39(2): 95-104.
- [22] 钟翠丽, 李国玲, 莫健新, 全绒, 王豪强, 李紫聪, 吴珍芳, 张献伟. 不同电转仪的电转参数、质粒用量和拓扑结构对猪胎儿成纤维细胞转染效率的影响. *遗传*, 2017(10): 930-938.
- ZHONG C L, LI G L, MO J X, QUAN R, WANG H Q, LI Z C, WU Z F, ZHANG X W. Effects of parameters, plasmid dosages and topological structures on transfection efficiency of porcine fetal fibroblasts using different electroporators. *Hereditas*, 2017(10): 930-938. (in Chinese)
- [23] VON GROLL A, LEVIN Y, BARBOSA M C, RAVAZZOLO A P. Linear DNA low efficiency transfection by liposome can be improved by the use of cationic lipid as charge neutralizer. *Biotechnology Progress*, 2006, 22(4): 1220-1224.
- [24] AUER T O, DUROURE K, DE CIAN A, CONCORDET J P, DEL BENE F. Highly efficient CRISPR/Cas9-mediated knock-in in zebrafish by homology-independent DNA repair. *Genome Research*, 2014, 24(1): 142-153.
- [25] 楚素霞, 姚伦广, 邢延豪, 周延清. 多基因表达系统研究进展. *中国生物工程杂志*, 2011, 31(6): 116-123.
- CHU S X, YAO L G, XING Y H, ZHOU Y Q. Progress in research on multiple gene expression system. *China Biotechnology*, 2011, 31(6): 116-123. (in Chinese)
- [26] 李瑞国, 苗朝华, 侯健, 关宏, 安晓荣, 陈永福. 牛 β -酪蛋白座位无启动子基因打靶载体的构建. *华北农学报*, 2010, 25(4): 17-24.
- LI R G, MIAO Z H, HOU J, GUAN H, AN X R, CHEN Y F. Non-promotor gene targeting vector construction for bovine β -casein site. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2010, 25(4): 17-24. (in Chinese)
- [27] 沈俊杰, 单娟娟, 骆菁菁, 刘立, 钱程. 构建多顺反子表达载体系统的新策略[J]. *浙江理工大学学报*, 2009, 26(4): 561-566.
- SHEN J J, SHAN J J, LUO J J, LIU L, QIAN C. New strategy for construction of polycistron expression vector. *Journal of Zhejiang University of Science and Technology*, 2009, 26(4): 561-566. (in Chinese)
- [28] DENG W, YANG D, ZHAO B, OUYANG Z, SONG J, FAN N, LIU Z, ZHAO Y, WU Q, NASHUN B, TANG J, WU Z, GU W, LAI L. Use of the 2A Peptide for Generation of multi-transgenic pigs through a single round of nuclear transfer. *PLoS ONE*, 2011, 6(5): e19986.
- [29] SATO M, KAGOSHIMA A, SAITOH I, INADA E, MIYOSHI K, OHTSUKA M, NAKAMURA S, SAKURAI T, WATANABE S. Generation of α -1, 3-galactosyltransferase-deficient porcine embryonic fibroblasts by CRISPR/Cas9-mediated knock-in of a small mutated sequence and a targeted toxin-based selection system. *Reproduction in Domestic Animals*, 2015, 50(5): 872-880.
- [30] NAKADE S, TSUBOTA T, SAKANE Y, KUME S, SAKAMOTO N, OBARA M, DAIMON T, SEZUTSU H, YAMAMOTO T, SAKUMA T, SUZUKI K T. Microhomology-mediated end-joining-dependent integration of donor DNA in cells and animals using TALENs and CRISPR/Cas9. *Nature Communications*, 2014, 5: 5560.

(责任编辑 林鉴非)