

6 种荧光蛋白基因在蒙古羊成纤维细胞中的表达

关伟军¹, 刘长青^{1,2}, 娜日苏^{1,3}, 陆涛峰¹, 马月辉^{1*}

(1. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100094; 2. 中国海洋大学生命与技术学部, 青岛 266003;
3. 内蒙古农业大学动物科学与医学学院, 呼和浩特 010018)

摘要: 采用脂质体介导法, 将绿色荧光蛋白(pEGFP-C1、pEGFP-N3)、增强型青色荧光蛋白(pECFP-N1、pECFP-mito)、黄色荧光蛋白(pEYFP-N1)和红色荧光蛋白(pDsRed1-N1)等 6 种荧光蛋白基因导入蒙古羊体外培养成纤维细胞中, 对基因的时空表达、阳性细胞生长与增殖状况、细胞凋亡与细胞活力以及提高基因表达率的最佳方法等方面进行了深入的研究。试验结果表明: 6 种荧光蛋白基因在转染后 24、48 和 72h 的转染率在 12.3%~63.3% 之间, 经多重比较, 各试验组之间有较大差异。转染 24 h 后, 6 种荧光蛋白都均匀地充满细胞质和细胞核, 只有囊状小泡没有标记荧光; 转染 48h 后, EGFP、ECFP 和 EYFP 仍在整个细胞中均匀表达, 呈弥散分布状态, 随着表达量的增加, 在细胞核局部呈现块状或颗粒状的基因表达产物; DsRed 荧光蛋白基因则主要在细胞核膜周围呈现由诸多颗粒状表达产物组成的环状轮廓; 在优化的条件下, 细胞凋亡率、阳性细胞的形态、生长与增殖状况与对照组比较差异不显著 ($P > 0.05$)。本研究结果对于标记基因、核移植及转基因动物克隆等研究具有重要的参考价值。

关键词: 蒙古羊; 成纤维细胞系; 荧光蛋白; 细胞定位; 脂质体

中图分类号: S813.3

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2006)11-1141-08

Research on the Six Fluorescent Protein Expression in the Fibroblast Cells of Mongolia Sheep

GUAN Wei-jun¹, LIU Chang-qing^{1,2}, NA Ri-su^{1,3}, LU Tao-feng¹, MA Yue-hui^{1*}

(1. Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094, China; 2. Division of Life Science and Technology, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

3. College of Animal Science and Medicine, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China)

Abstract: To study the exogenous gene space-time expression, the state of positive cell growth and reduplication, apoptosis, survival percentage, and to optimize the method improving the transfection efficiency, we used lipofectin method to transfect six fluorescent protein genes: pEGFP-C1, pEGFP-N3, pECFP-N1, pECFP-mito, pEYFP-N1 and pDsRed1-N1 into the *in vitro* cultured fibroblast cell of Mongolia sheep. The results showed: 24, 48 and 72h after transferring, the expression efficiency of six kind of fluorescent protein genes were between 12.3%~63.8%. Multiple comparison analysis indicated significant difference in six groups. 24h after transferring, the fluorescence could be observed in cytoplasm and nucleus well-distributed except cryptomere vesicle; 48h after transferring, EGFP, ECFP, and EYFP gene still expressed steadily. Granula could be observed in the region of cell nucleus. DsRed gene mainly expressed some granula-expression product surrounding nuclear membrane. In optimized condition, there were no significant effect ($P > 0.05$) on apoptosis ratio, positive cell shape, growth and reduplication state comparing with control group. The research is important to genetic mark, nuclear transplantation and

收稿日期: 2006-08-28

基金项目: 国家自然科技资源平台建设项目 (2005DKA30450); 国家自然科技资源平台建设项目 (2004DKA30450)

作者简介: 关伟军 (1966-) 男, 博士后, 教授, 博导, 主要从事分子生物学研究

* 通讯作者: 马月辉, 博士, 研究员, 博导, 主要从事动物遗传资源研究, Tel: 010-62813463, E-mail: yuehui_ma@263.net

transgenic animal clone etc.

Key words: Mongolia sheep; fibroblast cell; fluorescent protein; cell location; Lipofection

由于绿色荧光蛋白(pEGFP-C1、pEGFP-N3)、红色荧光蛋白(pDsRed1-N1)、增强型青色荧光蛋白(pECFP-N1、pECFP-mito)、黄色荧光蛋白(pEYFP-N1)等6种荧光蛋白基因所具有的结构稳定、高效表达、无种系依赖性,且无需抗体、辅助因子、酶底物等成分即可产生荧光的特点是以以往已报道的lacZ、CAT等基因和普通荧光标记物无可比拟的,因此作为标记基因被广泛应用于活细胞和生物体内动态观察目标蛋白质的表达、分布及作用等研究范畴^[1,2]。本试验采用脂质体介导法,将pEGFP-C1、pEGFP-N3、pECFP-N1、pECFP-mito、pEYFP-N1和pDsRed1-N1等6种荧光蛋白基因导入蒙古羊体外培养细胞中,通过激光共聚焦显微镜观察,并对外源基因在体外培养成纤维细胞的表达、阳性细胞生长与增殖状况、细胞凋亡与细胞活力以及提高基因表达率的最佳方法等方面展开了深入的研究,为充分利用家畜体外培养成纤维细胞进行基因表达与调控、转基因、基因敲除和核移植等研究提供技术支撑和保障。

1 材料与方法

1.1 材料

pEGFP-C1, pEGFP-N3, pECFP-N1, pECFP-mito, pEYFP-N1及pDsRed1-N1,激发光波长范围在433~588nm之间。蒙古羊成纤维细胞为本实验室培养^[3]。

DMEM(High Glucose, Gibco)、胰蛋白酶(Trypsin 1:250, Amresco)、标准胎牛血清(Standard FBS, Hyclone)、台盼蓝(Trypan Blue, Sigma)、阳离子脂质体(Lipofectamine 2000, Invitrogen)、大肠杆菌感受态细胞(DH5, 本实验室保存)、DAPI(Roche)。

1.2 方法

1.2.1 外源基因表达靶细胞的培养 取蒙古羊新鲜耳缘组织,采用组织块贴壁培养法进行培养、传代和冻存^[3-5],建立其成纤维细胞系,为外源基因的表达提供靶细胞。

1.2.2 质粒的制备及鉴定 6种荧光蛋白质粒热击转化大肠杆菌DH5,转化方法参考分子克隆实验指南(第3版)^[6],用Plasmid Midi Kit(Qiagen)提取纯化高质量的质粒DNA,提取方法参考试剂盒使用方法。紫外分光光度计(Ultrospec1100 pro)测定

质粒DNA浓度,用Nhe和Xba双酶切,琼脂糖电泳鉴定酶切结果。

1.2.3 脂质体介导法转染成纤维细胞 采用脂质体介导法^[7],将外源基因pEGFP-C1转入蒙古羊体外培养成纤维细胞中以探讨脂质体和DNA量对转染效率的影响,试验分组如表1所示。

表1 质粒DNA转染分组

Table 1 The groups of gene transfection

组别 Group	1	2	3	4	5	6	7	8	9
溶液 A/ μg	1	1	1	1.5	1.5	1.5	2.0	2.0	2.0
溶液 B/ μL	4	6	8	4	6	8	4	6	8

溶液A:分别将1.0、1.5、2.0 μg DNA溶于100 μL 不含血清的培养液中;溶液B:分别将4、6、8 μL 脂质体与无血清培养液混合至100 μL

Solution A: dissolve 1.0, 1.5 and 2.0 μg DNA in 100 μL culture medium without serum

Solution B: dissolve 4, 6 and 8 μL lipofection in 100 μL culture medium without serum

采用脂质体介导法,将外源基因pEGFP-N3、pECFP-N1、pECFP-mito、pEYFP-N1和pDsRed1-N1按照2.0 μg DNA和6.0 μL 脂质体的优化后的条件对体外培养靶细胞进行转基因研究。

1.2.4 阳性细胞形态观察与台盼兰染色 在低倍镜下用激光共聚焦显微镜对各组阳性细胞进行形态学观察,并用台盼兰对细胞进行染色、计数,计算细胞活率。

1.2.5 阳性细胞凋亡的检测 用DAPI染色液对各试验细胞组进行染色,在高倍镜下用激光共聚焦显微镜对阳性或阴性细胞进行观察,计算凋亡率,分析转基因过程对细胞的影响。

1.2.6 荧光蛋白在阳性细胞中的分布 转染后48h,用DAPI染色液对各试验细胞组进行染色以定位阳性细胞的细胞核,通过在高倍镜下观测各组阳性细胞中的荧光强度来确定荧光蛋白在阳性细胞中的分布。

1.2.7 表达效率的统计 转染后,分别在24、48和72h用激光共聚焦显微镜观察各试验组细胞,每孔挑10个视野拍照,统计每个视野中总细胞数和阳性细胞数,计算转染效率,并利用OriginPro 7.0与Excel软件对试验数据进行多重比较,判断各试验组内和试验组间的差异。

2 结果

2.1 蒙古羊成纤维细胞的培养

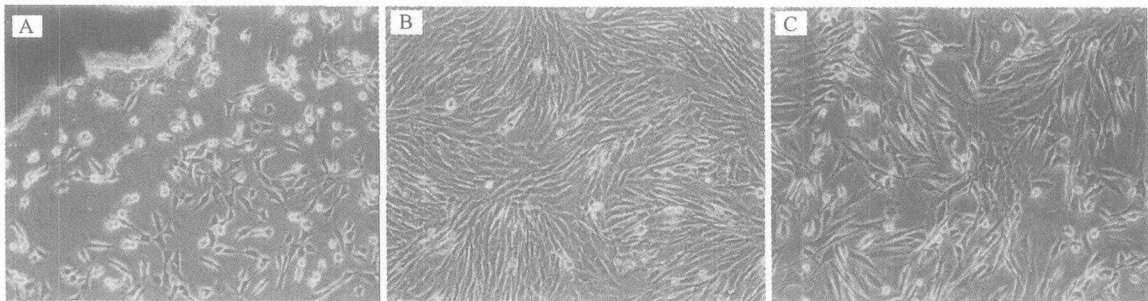
本试验成功构建了蒙古羊成纤维细胞系(如图1),为6种荧光蛋白基因在细胞中的表达提供了良好的体外培养靶细胞。

2.2 6种荧光蛋白基因的抽提

按照 Plasmid Midi Kit (Qiagen) 质粒提取盒说

明书,提取、纯化6种荧光蛋白基因。经紫外分光光度计测定质粒浓度,得到的6种荧光蛋白质粒浓度均在 $0.25 \sim 0.36 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 质粒 DNA 之间, $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 值在 $1.80 \sim 1.86$ 之间,表明质粒较纯,无 RNA、无水乙醇和蛋白质等杂质。再 *Nhe* 和 *Xba*

双酶切后,用1%琼脂糖电泳鉴定酶切结果,可以得到约750 bp和4 kb两条谱带。根据荧光蛋白质粒酶切图谱分析所获质粒为所需荧光蛋白质粒。



A. 蒙古羊原代培养细胞 B. 蒙古羊继代培养细胞 C. 蒙古羊复苏后细胞
A. Primary cultured cells of Mongolia sheep B. Subcultured cells of Mongolia sheep
C. Mongolia sheep cultured cells after recovery

图1 蒙古羊耳缘组织成纤维细胞的培养

Fig. 1 Fibroblast cell culture of the ear marginal tissue from Mongolia sheep

2.3 pEGFP-C1 基因转染条件的优化

通过对 pEGFP-C1 基因在细胞中表达规律的研究,结果表明:在转染后初期,部分细胞有皱缩,极少数细胞崩解死亡;转染12 h后,可见发淡绿色荧光的细胞;转染24 h后,阳性细胞明显增多;48~72 h左右阳性细胞最多,荧光强度增强,多为明亮的绿色荧光,少数发出弱荧光,未转染细胞区未见绿色荧光。

通过对 pEGFP-C1 基因在细胞中表达效率的研究,结果(表2)表明:随着脂质体剂量增大,转染效率升高,6 μL 脂质体组转染率最高,但如果继续增加脂质体浓度,转染率没有明显的提高,反而出现部分细胞死亡;当质粒的量小于2 μg 时,随着质粒剂量增加,转染率提高,当质粒的剂量为2 μg ,转染率最高,大于2 μg ,细胞有部分死亡现象,转染率并没有明显的变化。得出结论:6 μL 脂质体介导2 μg 重组质粒转染8 h可获得较满意的转染效率,为最佳优化组合,转染后72 h效率最高,可达60.2%。

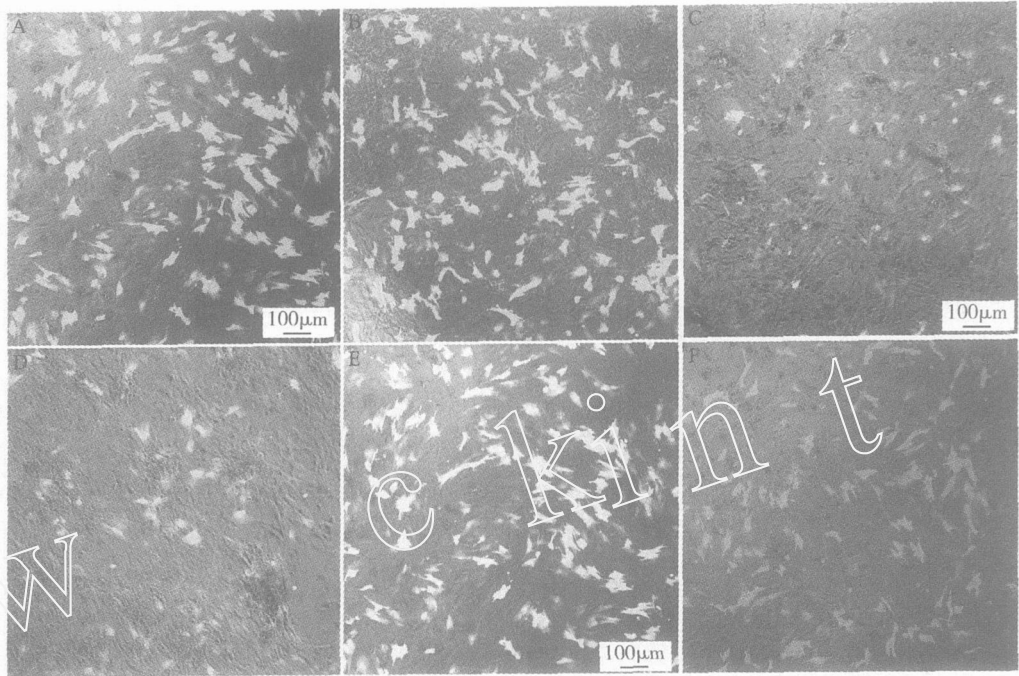
表2 绿色荧光蛋白转染条件优化

Table 2 Condition optimized table of pEGFP transfection

质粒 DNA 用量/ μg Plasmid DNA	转染时间/h Time	脂质体用量/ μL Lipofectamine		
		4	6	8
1.0	24	18.5	22.3	24.5
	48	24.4	31.6	31.4
	72	26.7	32.5	31.2
1.5	24	22.7	31.6	35.1
	48	37.3	44.2	43.2
	72	41.7	51.5	49.2
2.0	24	34.8	39.1	36.3
	48	50.1	56.6	59.5
	72	53.7	60.2	58.7

2.4 6种荧光蛋白基因转基因效果比较

转染24、48、72 h时,分别将各试验组细胞在特定波长激发光下用激光共聚焦显微镜观察,试验结果如表3,可以发现:6种荧光蛋白均能在体外培养靶细胞中得到良好的表达(如图2)。



A. pEGFP-C1 ;B. pEGFP-N₃ ;C. pECFP-N1 ;D. pECFP-mito ;E. pEYFP-N1 ;F. pDsRed1-N1

图 2 6 种荧光蛋白 48 h 转染

Fig. 2 Comparative figures of six fluorescent protein transfection in 48 h

6 种荧光蛋白基因之间转染效率相比较(如表 3):绿色荧光蛋白(pEGFP-C1 与 pEGFP-N₃)获得的转染效率无论在 24,48 还是 72 h 都是最高的(图 2),尤其 pEGFP-N₃ 在转染 48 h 达到了 63.3%,其次是绿色荧光蛋白 pEGFP-C1 在转染 72 h 与黄色

荧光蛋白 pEYFP-N1 在转染 48 h 转染率也分别达到了 60.2%与 56.1%,而转染率相对最低的青色荧光蛋白 pECFP-mito 在 72 h 的转染率也为 31.7%。表明:各种荧光蛋白基因均获得了较高的基因表达率。

表 3 6 种荧光蛋白基因转染率

Table 3 Comparative table of Six fluorescent protein transfection ratio

转染时间/h	6 种荧光蛋白基因 Six fluorescent protein genes						%
Time	pEGFP-C1	pEGFP-N ₃	pECFP-N1	pECFP-mito	pEYFP-N1	pDsRed1-N1	
24	39.1	48.7	13.8	12.3	36.3	31.4	
48	56.6	63.3	28.2	25.5	56.1	40.3	
72	60.2	56.7	33.3	31.7	51.6	53.2	

表 4 6 种荧光蛋白基因转染后 24 h 转染效率多重比较

Table 4 Multiple comparison table of transfection ratio in six fluorescent proteins after transfection 24 h

质粒 DNA Plasmid DNA	均值 Average	差数 Margin				
pEGFP-N ₃	48.7	36.4**	34.9**	17.3	12.4	9.6
pEGFP-C1	39.1	26.8**	25.3**	7.7	2.8	
pEYFP-N1	36.3	24.0*	22.5*	4.9		
pDsRed1-N1	31.4	19.1*	17.6			
pECFP-N1	13.8	1.5				
pECFP-mito	12.3					

*. P<0.05, ** . P<0.01。下同

表5 6种荧光蛋白基因转染后48h转染效率多重比较

Table 5 Multiple comparison table of transfection ratio in six fluorescent proteins after transfection 48 h

质粒 DNA Plasmid DNA	均值 Average	差数 Margin				
pEGFP-N3	63.3	37.8 **	35.1 **	23.0 *	7.2	6.7
pEGFP-C1	56.6	31.1 **	28.4 **	16.3	0.5	
pEYFP-N1	56.1	30.6 **	27.9 **	15.8		
pDsRed1-N1	40.3	14.8	12.1			
pECFP-N1	28.2	2.7				
pECFP-mito	25.5					

表6 6种荧光蛋白基因转染后72h转染效率多重比较

Table 6 Multiple comparison table of transfection ratio in six fluorescent proteins after transfection 72 h

质粒 DNA Plasmid DNA	均值 Average	差数 Margin				
pEGFP-C1	60.2	28.5 **	26.9 **	8.6	7.0	3.5
pEGFP-N3	56.7	25.0 *	23.4 *	5.1	3.5	
pDsRed1-N1	53.2	21.5 *	19.9 *	1.6		
pEYFP-N1	51.6	19.9 *	18.3 *			
pECFP-N1	33.3	1.6				
pECFP-mito	31.7					

由表4、表5、表6可知:pEGFP-C1和pEGFP-N3在转染后24、48和72h转染效率差异不显著;pEGFP-C1和pEGFP-N3在转染后24、48和72h与pECFP-N1和pECFP-mito相比差异显著;pEGFP-C1和pEGFP-N3在转染后24、48和72h与pDsRed1-N1和pEYFP-N1转染效率不显著(除转染后48h pEGFP-N3和pDsRed1-N1差异显著外);pDsRed1-N1和pEYFP-N1在转染后24、48和72h转染效率差异不显著;pECFP-N1和pECFP-mito在转染后24、48和72h转染效率差异不显著。

2.5 阳性细胞形态观察与细胞活率分析

在低倍镜下用激光共聚焦显微镜对各组阳性细胞进行形态学观察,可以发现转染后12h,有少部分阳性细胞皱缩、崩解、脱落甚至死亡。转染细胞形态多为梭状,但生长速度明显比未转染细胞减慢,这与袁莉等研究结果一致^[8]。通过台盼蓝染色分析发现,转染pEGFP-C1, pEGFP-N3, pECFP-N1, pECFP-mito, pEYFP-N1, pDsRed1-N1组的细胞活率(台盼蓝阴性细胞)分别为98.5%, 98.2%, 97.3%, 96.4%, 98.3%与97.6%,与没有转染的对照细胞99.1%无显著差异($P>0.05$)。

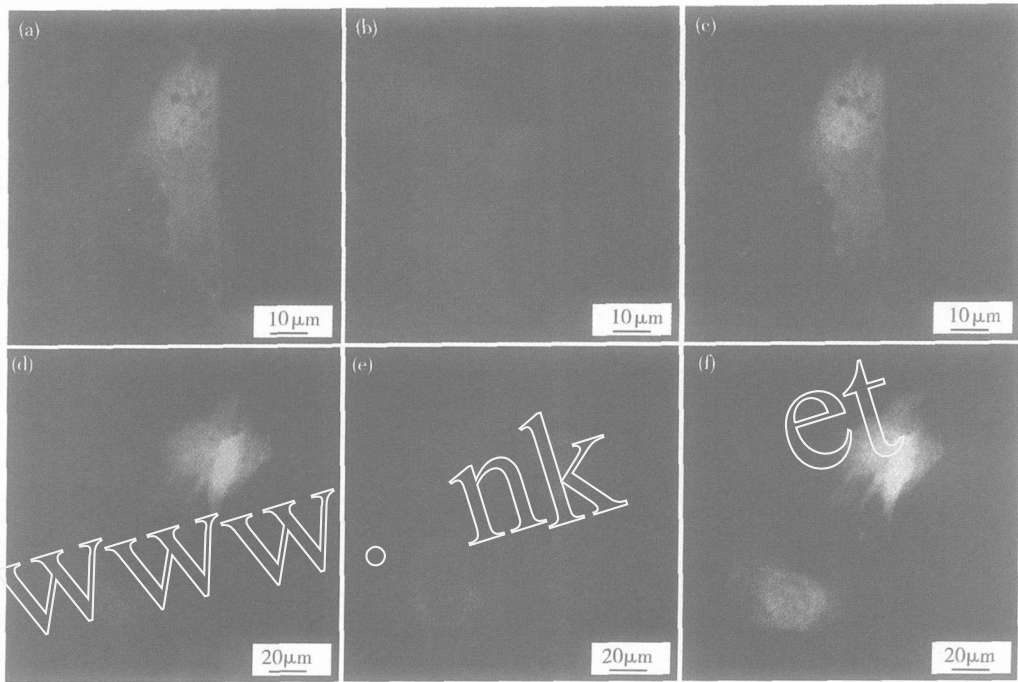
2.6 荧光蛋白在转染细胞中的分布状况

为了确定各种荧光蛋白在蒙古羊成纤维细胞中

的细胞定位,本试验对转染了各种荧光蛋白基因的成纤维细胞分别用DAPI对细胞核进行了染色(图3b)。激光共聚焦显微镜观察结果发现在转染12h左右细胞核中就可可见弥散的荧光,此后荧光明显增强。绿色荧光均匀地充满细胞质和细胞核,只有囊状小泡没有标记荧光,随着表达量的增加,在细胞核局部呈现块状或颗粒状的基因表达产物(图3a);DsRed荧光蛋白基因则主要在细胞核膜周围呈现由诸多颗粒状表达产物组成的环状轮廓(图3e)。EGFP和DsRed基因同时转入细胞时,细胞可同时表达两种荧光蛋白,用488nm激发光激发时可见绿色荧光均匀相对均匀的分布于整个细胞(图3d);用543nm激发光激发时可见红色荧光分布于细胞核膜周围;用488nm与543nm激发光同时激发时,细胞核核周围呈现明显的橙色圆环,细胞质则由于红色与绿色叠加呈现淡黄色(图3f)。

2.7 细胞凋亡的检测

使用DNA的特异性荧光染料DAPI,对各试验组细胞进行染色后,用激光扫描共聚焦显微镜观察可发现绝大多数细胞均呈规则的圆形或椭圆形,其细胞核呈弥散均匀的蓝色荧光,几乎没有不规则的荧光小碎片,即凋亡小体(如图4);而仅有极少数细胞的细胞核或细胞质内可见浓染致密的蓝色颗粒块



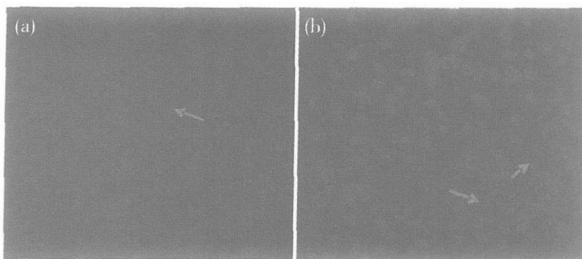
a, d 为 pEGFP 在蒙古羊成纤维细胞中表达,在细胞核与细胞质均有分布(488 nm 激发)。b 为使用 DAPI 对转染绿色荧光蛋白细胞进行细胞核染色(405 nm 激发)。e 为 pDsRed 在蒙古羊成纤维细胞中表达,主要定位于细胞核膜周围,在细胞核和细胞质内分布比较少(543 nm 激发)。c, f 为前面两个图片在共聚焦显微镜的结合图(c 为 488 与 405 nm 同时激发, f 为 488 nm 与 543 nm 同时激发)

a, d are the pEGFP expression in fibroblast cell of Mongolia sheep mainly distributed in both nuclei and cytoplasm(excited at 488 nm)。b is nuclei were stained with DAPI (excited at 405 nm)。e is pDsRed expression in cell mainly distribute around the nuclei. The fluorescent signals were analyzed by confocal microscopy. The overly images produced by merging two signals together(c, f)

图 3 pEGFP 与 pDsRed 在蒙古羊成纤维细胞中的定位

Fig. 3 The cellular location of pEGFP and pDsRed in fibroblast cell of Mongolian sheep

状荧光,凋亡率仅为 0.6%,该情况与未转染的对照组 0.5%的细胞凋亡率相比,可能属正常凋亡现象。



a, b 分别为 pECFP-N1 与 pEGFP-C1 转染细胞 DAPI 染色凋亡检测

a, b are the apoptosis examine of pECFP-N1 and pEGFP-C1 transfect fibroblast cell stained by DAPI

图 4 pECFP-N1 与 pEGFP-C1 转染细胞 DAPI 染色凋亡检测

Fig. 4 Apoptosis examine of pECFP-N1 and pEGFP-C1 transfect fibroblast cell stained by DAPI

3 讨论

EGFP 基因在活细胞、组织或器官中无需任何处理即可表达,且可在荧光显微镜或激光共聚焦显微镜下直接观察到基因表达结果,加之动物体内不产生内源性 GFP,因而它是活细胞的理想标记物^[9]。本研究所采用的 6 种增强型荧光蛋白基因在蒙古羊成纤维细胞中的表达率在 12.3%~63.3% 之间,是一种方便快捷检测基因转染表达、示踪、细胞内定位和实时监测的方法。

3.1 影响转染率的各种因素

质粒 DNA 浓度、脂质体浓度、脂质体-DNA 复合物的孵育时间以及血清均对转染率有直接影响。当质粒 DNA 量与转染时间一定时,随着脂质体量的增加,荧光蛋白的表达效率在提高;当脂质体达到一定量时,转染效率不再提高,脂质体由于带有很强的正电荷,对细胞亦有毒性,脂质体浓度过高,也同

样会引起细胞形态和功能异常,甚至坏死,与钱锋等^[10]和李扬^[11]对 Vero 细胞和牛胎儿成纤维细胞的研究结果一致。在脂质体和靶细胞暴露时间一定时,随着 DNA 量的增加,转染效率先升高后降低。当 DNA 浓度过高时,细胞脱落或死亡,这一结论与 Tseng^[12]对 HeLa 细胞研究的结论一致。

脂质体-DNA 复合物孵育时间过长,细胞由于长时间处于营养不足状态,转染效率降低,甚至死亡;转染过程中,一般要求不含血清,因为血清中含有带负电荷的蛋白质,可结合带正电荷的脂质,从而降低了脂质体与 DNA 形成复合物的能力,使转染率降低^[11]。转染时的最优化条件是 DNA-脂质体的配比、剂量和转染时间。作为真核细胞转染方法,脂质体法比病毒载体法更简单、更安全,而且不限制所携带 DNA 的大小^[13,14]。

用 6 μ L 脂质体介导 2 μ g 重组质粒转染 8 h 即可获得较满意的转染效率。因此该载体在优化的条件下是转染成纤维细胞的较为理想的瞬时表达载体。在本试验中我们利用脂质体转染法将外源基因(各色荧光蛋白基因)转移到蒙古羊成纤维细胞内,检测到 6 种荧光蛋白的表达,说明脂质体转染法对成纤维细胞进行基因修饰是可行的,可以介导外源基因进入到蒙古羊成纤维细胞内。

3.2 荧光蛋白在细胞中的定位

对于荧光蛋白转染细胞的研究,大多集中于肿瘤细胞、神经细胞与干细胞等^[15]。在本试验中,24 h 各色荧光均匀地充满细胞质和细胞核,只有囊状小泡没有标记荧光。转染 48 h 后,EGFP、ECFP 和 EYFP 仍在整个细胞中均匀表达,呈弥散分布状态,随着表达量的增加,在细胞核局部呈现块状或颗粒状的基因表达产物;DsRed 荧光蛋白基因则主要在细胞核膜周围呈现由诸多颗粒状表达产物组成的环状轮廓。

在共聚焦显微镜下观察,可见处于增殖、不同分裂时期的转染细胞,而且转染细胞的生长和增殖与对照组比较没有明显的差异,说明在一定范围内转染细胞不受荧光蛋白影响,另外 GFP 转染其他肿瘤细胞系和人成纤维细胞系的研究中也发现,大部分 GFP 的阳性克隆细胞对细胞本身的倍增时间没有影响^[16],均与本研究结果一致。但也有少数皱缩和凋亡的细胞,同时存在细胞碎屑。可能是由于荧光蛋白均以质粒的形式存在于细胞内,并非是细胞固有的成分,它的表达除增加了细胞代谢外,还对细胞

周期调节有一定的干扰。

荧光蛋白如 GFP,并非在所有的细胞系中都如此均匀分布,例如在 COS 细胞中,GFP 集中分布在细胞核中,红色荧光蛋白在 72 h 左右主要围绕细胞核周围形成明亮的环状。由于存在这种例外情况,在分析融合蛋白产生的荧光之前,首先研究各种所需报告基因荧光蛋白在一个未知的细胞系的定位特点显得非常重要^[17]。

尽管荧光蛋白表达对成纤维细胞体外增殖有一定的不良影响,但 6 组细胞均有较高的转染率,较长的维持时间,这对以后的基因标记、转基因动物克隆等技术提供了良好的基础。

3.3 转染细胞凋亡与细胞活率

细胞凋亡是新老细胞生死交替的自然过程,并始终贯穿于机体的整个生命周期。其机制极为复杂,生物体内外的多种因素如激素和生长因子失衡,射线、高温及酸碱理化因素,细菌、病毒等致病微生物及其毒素等因素均与细胞凋亡有一定的关联。凋亡细胞的染色质浓缩成块并凝聚在核膜周围,为了使内含物不外溢,胞膜内陷自行分割为多个由外膜包裹的凋亡小体^[18],这是由于真核细胞染色质由许多核小体以一定的方式包装而成,易受核酸内切酶消化,切割核小体连接区的 DNA,产生长度为 180 ~ 200 bp 左右的寡核苷酸碎片,从而使其基因调控系统阻断而形成凋亡小体。使用 DNA 的特异性荧光染料 DAPI,以非嵌入式与 DNA 的 A-T 碱基区结合,从而对细胞核染色,在激光扫描共聚焦显微镜下正常细胞核呈弥散均匀的蓝色荧光,而凋亡细胞的细胞核或细胞质内可见浓染致密的蓝色颗粒块状荧光。

转染细胞活力检测结果表明,细胞死亡率为 1.5% ~ 3.6% 之间,与没有转染的对照组没有明显的差异,说明转染过程中所优化的条件及细胞内表达的荧光蛋白对转染细胞的形态,生长与增殖状况没有明显的影响。

参考文献:

- [1] Heim R, Cubitt A B, Heim R A, *et al.* Improved green fluorescence [J]. *Nature*, 1995, 373(6516): 663 ~ 664.
- [2] 程根阳,陈香美,白雪源,等. 绿色荧光蛋白与人肾脏 NaDC3 融合基因的构建及其在肾小管上皮细胞中的定位[J]. *细胞生物学杂志*, 2003, 25(3): 170 ~ 173.
- [3] 关伟军,马月辉,丁 鸿,等. [J]. 小尾寒羊耳组织成

- 纤维细胞系的建立与生物学特性研究[J]. 畜牧兽医学报, 2005, 36(5): 511 ~ 516.
- [4] Freshney R I, *et al.* Culture of animal cells: A manual of basic technique [M], 4th ed. New York: Wiley-Liss, 2000. 149 ~ 175.
- [5] 马月辉, 周向梅, 关伟军, 等. 用胶原酶消化法培养德保矮马耳缘组织成纤维细胞初探[J]. 中国农业科学, 2005, 38(6): 1 282 ~ 1 288.
- [6] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂等, 译. 第 3 版, 北京: 科学出版社, 2002: 87 ~ 99.
- [7] Tsuchiya R, Yoshiki F, Kudo Y, *et al.* Cell type-selective expression of green fluorescent protein and the calcium indicating protein, yellow cameleon, in rat cortical primary cultures. Brain Research, 2002, 956(2): 221 ~ 229.
- [8] 袁 莉, 付 博, 陈香美, 等. 三种基因转导方法在不同代龄复制性衰老细胞中的比较研究[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2004, 20(2): 257 ~ 263.
- [9] Chishima T, Yang M, Miyagi Y, *et al.* Governing step of metastasis visualized in vitro [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94: 11 573 ~ 11 576.
- [10] 钱 锋, 肖成祖. 影响非洲绿猴肾细胞脂质体转染效率的因素[J]. 生物技术通报, 1998, 5: 31 ~ 35.
- [11] 李 扬, 昊凯峰, 郭旭东, 等. 脂质体介导外源基因体外转染牛胎儿成纤维细胞条件的优化[J]. 遗传, 2002, 24(6): 653 ~ 665.
- [12] Tseng W C, Haselton F R, Giorgio T D. Mitosis enhances transgene expression of plasmid delivered by cationic liposomes [J]. Biochim Biophys Acta, 1999, 5(1): 53 ~ 64.
- [13] Gill D R, Southern K W, Moford K A, *et al.* A placebo-controlled study of liposome-mediated gene transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis [J]. Gene Ther, 1997, 4(3): 199 ~ 209.
- [14] Escriou V, Carriere M, Bussone F, *et al.* Critical assessment of the nuclear import of plasmid during cationic lipid-mediated gene transfer [J]. J Gene Med, 2001, 3(2): 179 ~ 187.
- [15] Jung S, Ackerley C, Ivanchuk S, *et al.* Tracking the invasiveness of human astrocytoma cells by using green fluorescent protein in an organotypical brain slice model [J]. Neurosurg, 2001, 94: 80 ~ 89.
- [16] 黄 倩, 李川源. 绿色荧光蛋白质粒 DNA 作为活细胞标记基因的研究[J]. 中华肿瘤杂志, 2001, 21: 264 ~ 266.
- [17] 冯 红, 徐文琳, 战 锐, 等. pEGFP-N1 质粒转染小鼠心肌细胞的分布及效率[J]. 中国应用生理学杂志, 2005, 21(1): 112 ~ 115.
- [18] 吴翰桂. 细胞凋亡的研究进展[J]. 安徽大学学报(自然科学版), 2001, 25(4): 102 ~ 106.