

文章编号:1005-6947(2004)01-0034-03

· 实验研究 ·

## Dosper 和 Lipofectamine 转染特点的比较

孙维佳<sup>1</sup>, 张翼<sup>1</sup>, 劳学军<sup>1</sup>, 张阳德<sup>2</sup>

(中南大学湘雅医院 1. 普外科 2. 肝胆肠外科研究中心, 湖南 长沙 410008)

**摘要:**目的 探讨 Dosper 和 Lipofectamine 两种脂质体转染载体的特点, 为广泛应用打下基础。方法 将新构建载体分别用 Dosper 和 Lipofectamine 在有血清和无血清情况下转染包装细胞 PA317, 通过 NIH3T3 细胞检测各组病毒滴度。结果 在无血清组, Lipofectamine 转染效率略高于 Dosper, 但两者无显著性差异 ( $P > 0.05$ ); 在有血清组, Dosper 组转染率显著高于 Lipofectamine ( $P < 0.01$ )。两者在有血清组的转染率均低于无血清组。结论 在无血清存在下, Dosper 和 Lipofectamine 转染效率都较高。

**关键词:** 基因转染; 转染, 脂质体; Dosper; Lipofectamine

**中图分类号:** R394; Q343.1 **文献标识码:** A

## Comparision of the transfection characteristic of Dosper and Lipofectamine

SUN Wei-jia<sup>1</sup>, ZHANG Yi<sup>1</sup>, LAO Xue-jun<sup>1</sup>, ZHANG Yang-de<sup>2</sup>

(1. Department of General Surgery 2. Hepatobiliary and Enteric Surgery Research Center, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

**Abstract: Objective** To evaluate the transfection characteristic of Dosper and Lipofectamine to establish the basis for future massive application. **Methods** The retroviral vector inserted SV40LT antigen gene was transfected into PA317 cell lines by Dosper or Lipofectamine mediation with or without serum. The viral titer was determined with the NIH3T3 cells. **Results** In without-serum condition, the transfection efficiency in Lipofectamine group was higher than that in Dosper group, but no significant difference ( $P > 0.05$ ); in with serum condition, the transfection efficiency in Dosper group was significant higher than that in Lipofectamine group ( $P < 0.01$ ). And the transfection efficiency in both groups with serum were significant lower than that in both without serum groups.

**Conclusions** Transfection efficiency are high in using Dosper and Lipofectamine in without serum condition.

**Key words:** GENE TRANSFECTION; TRANSFECTION, LIPOSOME; DOSPER; LIPOFECTAMINE

**CLC number:** R394; Q343.1 **Document code:** A

目前基因转染的方法有多种, 其中阳离子脂质体因其操作简单、安全而受到广泛关注<sup>[1]</sup>。Lipofectamine 是一种新的阳离子转染脂质体, 其独特的精胺基因强负电子头部可自发地与 DNA 形成复合物, 因而其有很强的转染能力<sup>[2]</sup>。Lipofectamine 在体外作为基因转染的载体已经有很多文献报道<sup>[3]</sup>。然而由于它的相关毒性反应较大, 从而促使研究者寻找新的更好的阳离子脂质体, Dosper 是目前公认

的替代品。笔者将新构建载体用这两种脂质体转染包装细胞 PA317, 并进行转染滴度的测定, 通过比较, 了解他们的转染特点, 以为其运用打下基础。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 材 料

Lipofectamine 购自 GIBCO BRL 公司; Dosper 购自瑞士 Roche 公司; 含 SV40LT 抗原基因的新构建逆转录病毒载体(简称新建载体)由肝胆肠外科中心实验室构建; PA317 细胞及 NIH3T3 细胞由广州医学院欧阳小明博士惠赠; DMEM 和 OPTI-MEMI Reduced Serum Medium 购自 GIBCO BRL 公司; 胰酶、Po-

**项目基金:** 国家科技部“863”青年科学基金资助(1998-164)。

**收稿日期:** 2003-07-03; **修订日期:** 2003-09-04。

**作者简介:** 孙维佳(1956-), 男, 湖南长沙人, 中南大学湘雅医院教授, 博士, 主要从事普外基础与临床方面的研究。

lybrene、G418 购自 Sigma 公司。

## 1.2 方法

1.2.1 脂质体介导转染 PA317 细胞 首先将 PA317 细胞以每孔  $3 \times 10^5$  加入 24 孔培养板中培养,转染前 4h 改用加血清或不加血清的培养基培养<sup>[4]</sup>。A 组(Dosper 转染方法):配置转染反应液,A 溶液以  $1.5 \mu\text{g}$  新建载体用 HBS 定容为  $50 \mu\text{l}$ ,即  $30 \mu\text{g}/\text{ml}$ ;B 溶液以  $6 \mu\text{g}$  Dosper 用 HBS 定容为  $50 \mu\text{l}$ ,即  $120 \mu\text{g}/\text{ml}$ 。溶液 A 和 B 轻轻混匀后,在室温下放置 15 min,待 Dosper/DNA 复合物形成后,将  $100 \mu\text{l}$  Dosper/DNA 复合物加入培养板中与 PA317 细胞混合培养。B 组(Lipofectamine 转染方法):A 溶液以  $3 \mu\text{g}$  新建载体加入到  $100 \mu\text{l}$  OPTI-MEMI Reduced Serum Medium 中;B 溶液以  $10 \mu\text{l}$  Lipofectamine 加入到 OPTI-MEMI Reduced Serum Medium 中,两者混匀后,室温下静置 45 min 以形成 Lipofectamine/DNA 复合物,用 PBS 洗涤培养板中细胞 1 次,弃洗涤液,加入复合物共培养。转染的 PA317 细胞经 G418 ( $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) 筛选培养,2 周可形成克隆,所获得克隆随机挑取 8 支进行扩大培养,收集上清液离心过滤后备用。

1.2.2 病毒滴度测定 将 NIH3T3 细胞以  $2 \times 10^5$  接种于 50ml 培养瓶中培养,24h 后加 Polybrene 至终浓度  $6 \mu\text{g}/\text{ml}$ ,加  $20 \mu\text{l}$  的新建载体假病毒悬液继续培养,消化、收集细胞并计数,将细胞分装接种于数个 250ml 培养瓶中,经 G418 筛选培养,2 周形成克隆,计细胞克隆数。最后根据病毒悬液用量和细胞稀释的比例计算病毒滴度。病毒滴度 = 每瓶的平均克隆数  $\times$  传代比例/所用病毒上清体积。

## 1.3 统计学处理

实验数据用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,用 SPSS10.0 版进行;3 组间均数用 Scheffe 法检验,  $P < 0.05$  为有显著性差异。

## 2 结果

### 2.1 Dosper 和 Lipofectamine 的转染效率比较

在无血清组,Lipofectamine 略高于 Dosper,但无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。在有血清组,Dosper 转染效率高于 Lipofectamine,有显著性差异 ( $P < 0.01$ )。

### 2.2 血清对脂质体转染效率的影响

Lipofectamine 在无血清组转染后病毒平均滴度高于有血清组,有显著性差异 ( $P < 0.01$ );Dosper

在无血清组转染后病毒平均滴度高于有血清组,也有显著性差异 ( $P < 0.05$ ) (附表,图)。

附表 两种脂质体在有血清和无血清下转染后病毒平均滴度 (cfu/ml)

组别	滴度
Lip1	$(12.70 \pm 3.65) \times 10^5$
Lip2	$(4.06 \pm 2.58) \times 10^5$ <sup>1)</sup>
Dos1	$(11.10 \pm 2.17) \times 10^5$ <sup>2)</sup>
Dos2	$(3.79 \pm 1.11) \times 10^5$ <sup>3)4)</sup>

注:Lip1 为无血清 Lipofectamine,Lip2 为有血清 Lipofectamine,Dos1 为无血清 Dosper,Dos2 为有血清 Dosper;1)与 Lip1 比较  $P < 0.01$ ;2)与 Lip1 比较  $P > 0.05$ ;3)与 Dos1 比较  $P < 0.05$ ;4)与 Lip2 比较  $P < 0.01$

Lip1:无血清 Lipofectamin;Lip2:有血清 Lipofectamin;Dos1:无血清 Dosper;Dos2:有血清 Dosper

附图 两种脂质体在有血清和无血清状态下的转染滴度

## 3 讨论

阳性脂质体介导的基因转染过程中,阳性脂质体首先通过所带正电荷与带负电荷的 DNA 结合形成复合物<sup>[5]</sup>。脂质体如何进入细胞的机制现在还存有许多争论,公认的机制是细胞通过胞饮将脂质体/DNA 复合物摄入到胞浆中,脂质体复合物与细胞膜接触时最先出现的相互作用是静电学的作用。因此,脂质体/DNA 的全部电荷量是很重要的。转染时的重要参数是阳电荷的脂质体与阴电荷的 DNA 的重量比<sup>[6]</sup>。在本研究的两种脂质体转染 PA317 细胞的检测中,由于 Dosper/DNA 复合物较小,因此在有血清存在的情况下也能达到较高转染效率。

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。在本实验中,笔者将 Lipofectamine 和 Dosper 转染 PA317 细胞,结果显示,在无血清存在下,两者都有较高的

转染效率,无明显区别;在有血清组,虽然 Dosper 转染效率高于 Lipofectamine 组,但均低于无血清组。与文献报道一致<sup>[7]</sup>。这说明,血清对不同阳离子脂质体的影响不同,对 Lipofectamine 影响较大,而对 Dosper 影响则较小。结果表明,在今后的基因转染中,使用脂质体可以根据细胞对血清的耐受情况加以选择。

#### 参考文献:

- [1] 张阳德,蔡素娜,廖允军. 阳离子脂质体及其在基因转移和基因治疗中的应用[J]. 中国现代医学杂志,2001,11(7):28-30.
- [2] Ciccarone V, Hawley-Nelson P, Gebeyehu G, *et al.* Cationic lipid-mediated transfection of eukaryotic cells: high efficiency nucleic acid delivery with Lipofectin and Lipofectamine reagents [J].

FASEB J,1993,7(5):454-463.

- [3] Vitiello L, Chonn A, Wasserman JD, *et al.* Condensation of plasmid DNA with polylysine improves liposome-mediated gene transfer into established and primary muscle cells [J]. Gene Therapy, 1996,3(5):396-404.
- [4] 鄂征. 组织培养和分子细胞学技术[M]. 北京:北京出版社,第2版.1999.78-111.
- [5] Felgner JH, Kumar R, Sridhar CN, *et al.* Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations [J]. J Biol Chem, 1994, 269(4):2550-2561.
- [6] Dodd E, Dunckly MG, Naujoks K, *et al.* Lipofection of cultured mouse muscle cells: a direct comparison of Lipofectamine and Dosper [J]. Gene Therapy, 1998,5(4):542-551.
- [7] Miller AD, Buttmore C. Redesign of retrovirus packaging cell lines to avoid recombination leading to helper virus production [J]. Mol Cell Biol, 1986,6(8):2895-2902.

文章编号:1005-6947(2004)01-0036-01

## · 病例报告 ·

# 腹腔引流管移位 Y 肠袢误诊胰瘘 1 例

陈刚, 丁华

(山东省滕州市中心医院 外科, 山东 滕州 277500)

**关键词:**胰腺/损伤; 腹腔引流/并发症; 病例报告

**中图分类号:**R576      **文献标识码:**D

**患者** 23岁,男性。楼梯上摔下3d,伴腹痛、恶心入院。体查:血压100/60mmHg,脉搏100次/min,痛苦面容,卷曲体位。腹部平坦,全腹压痛,腹肌紧张,反跳痛可疑,以左上腹为重。腹穿抽出少量不凝血。B超:腹腔积液少量,由于气体干扰,胰腺、十二指肠显示不清。行剖腹探查,术中见腹腔内少量血性液,大网膜可见皂化斑,切开胃结肠韧带,见胰体中上部断裂,行近端胰腺残端闭合,远端与空肠袢行 Roux-en-Y 吻合术,胰腺断端附近

放置质地较硬的粗引流管2根。术后经过顺利,20d后,引流管流出少量澄清液体,约20ml/d,带引流管出院。出院后1个月中来我院复查4次,引流量逐渐减少,约7~8ml/d,准备拔除引流管。术后大约53d时,自述夜晚一阵咳嗽后,突感腹痛,引流管一夜引流出700ml混浊液体,随后引流量一直很多,约1000ml/d,以后半年中一直不见减少。引流液淀粉酶很高。B超检查未见胰腺囊肿及腹腔积液。ERCP检查:怀疑胰腺近端瘘。再次手术,术中发现两腹腔引流管已穿入远端胰腺Y肠袢,且该肠袢扩张、肥厚,近端胰腺残端无胰瘘,闭合肠袢引流管穿孔,中

新放置软质腹腔引流管2根,术后引流量一直很少,为淡红色血性液,2周后拔除引流管,康复出院。

**讨论** 本例系腹腔引流管过粗,放置时间过长所致。放置质地较硬的引流管于胰腺吻合口旁,如时间长可能压迫肠袢,并逐渐穿入其中。因此,在肠袢附近放置引流管时,应选用软质管。再者,放管时间不宜过长,如腹腔引流量若<10ml/24h,可拔除。本例B超检查无腹腔积液及囊肿形成,若由腹腔引流管造影检查,则不难发现引流管在Y肠袢中,夹管数日拔除即可痊愈,有可能避免再次手术。

**收稿日期:**2003-10-08。

**作者简介:**陈刚(1971-),男,山东滕州人,山东省滕州市中心医院住院医师,主要从事肝胆外科方面的研究。