

文章编号: 1672-8785(2014)06-0045-04

电转染过程中破损猪肾细胞的 红外光谱研究

单鹏飞^{1,2} 刘 泉^{2,3} 陈建军^{2,3*}

(1. 华中农业大学农业动物遗传育种与繁殖教育部重点实验室, 武汉 430070 ;

2. 华中农业大学理学院物理系, 武汉 430070 ;

3. 华中农业大学应用物理研究所, 武汉 430070)

摘 要: 研究了在电转染过程中利用红外光谱分析技术进行细胞破损检测的可行性。电转染是在进行基因工程实验时利用电穿孔方法将细胞外的基因导入细胞内部并使其表达的一种常用手段。细胞在电转染过程中会因为受到强烈的外界电压刺激而穿孔破损。分别获取了猪肾细胞破损前后的红外光谱, 并结合计算机软件对 $2200\sim 2600\text{ cm}^{-1}$ 区域的光谱数据进行了二阶导数分析处理。在此区域内, 发现细胞破损前后的特征峰区别明显: 破损细胞特征峰的峰形尖锐且强度大, 而正常细胞的峰形较宽且相对强度较弱。这一结果为鉴别细胞破损提供了依据, 并为进一步运用红外光谱技术研究细胞破损提供了参考。

关键词: 红外光谱; 电转染; 细胞破损; 二阶导数

中图分类号: TP311.5 **文献标志码:** A **DOI:** 10.3969/j.issn.1672-8785.2014.06.009

Study of Porcine Kidney Cell Disruption during Electric Transfection Using Infrared Spectroscopy

SHAN Peng-fei^{1,2}, LIU Quan^{2,3}, CHEN Jian-jun^{2,3*}

(1. Key Lab of Agricultural Animal Genetics, Breeding and Reproduction of Ministry of Education, Huazhong Agriculture University, Wuhan 430070, China;

2. College of Science, Huazhong Agriculture University, Wuhan 430070, China;

3. Institute of Applied Physics, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: The feasibility of using an infrared spectral analysis technology to detect cell disruption in the process of electric transfection is studied. Electric transfection is a means commonly used in genetic engineering experiments. It usually uses an electroporation method to incorporate the genes outside a cell into the cell and let them express. In the process of electric transfection, a cell may be perforated and damaged due to the stimulation of strong external voltage. The infrared spectra of porcine kidney cells are obtained before and after their damage respectively. The spectral data in the region from 2200 cm^{-1} to 2600 cm^{-1} are analyzed through second derivation combined with a computer software. It is found that the characteristic peaks of the cells before and after their damage are very different in this spectral region. The shape of the characteristic peak of the damaged cell is sharpen and intensive while

收稿日期: 2014-03-11

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31101692); 中央高校基本科研业务费专项资金资助项目 (2011QC065)

作者简介: 单鹏飞 (1990-), 男, 山东泰安人, 硕士研究生, 主要研究方向为生物光电检测及智能化。

E-mail: shanpengfeirc@163.com * 通讯作者 E-mail: chenjianjun@mail.hzau.edu.cn

the shape of the characteristic peak of the normal cell is wider and its intensity is low. This result provides the basis for the identification of cell damage and is of reference value to the further use of infrared spectroscopy in cell damage research.

Key words: infrared spectrum; electric transfection; cell disruption; second derivative

0 引言

细胞转染技术是指将外部质粒的 DNA 或者以其为载体构建的重组 DNA 导入真核细胞的一种手段。随着近些年细胞生物学以及分子生物学的快速发展, 转染已经广泛应用于真核细胞的基因功能研究。转染方法主要有化学方法和物理方法。两种方法都是使进入宿主细胞的基因片段能够在细胞内部进行复制并表达, 从而实现遗传信息的转移, 使宿主细胞呈现新的遗传特性^[1,2]。化学方法主要有脂质体法与 DEAE-葡聚糖法等。脂质体法是目前实验室最常用的转染方法, 其转染效率较高, 但脂质体对细胞有毒性, 转染时间须控制在 24 h 内。物理方法有基因枪法和电穿孔法等。基因枪法依靠外界动力将带有基因的细小颗粒快速射入细胞内。该方法简单、经济、耗时短, 但基因的转化效率较低。电穿孔法利用瞬间的电脉冲击穿细胞膜并产生可逆的小孔促使外源基因进入细胞内部。这种利用电穿孔法转染的技术即电转染技术。

电转染技术已经被证实对采用传统转染方法难以成功转染的细胞具有很好的效果, 且能较好地提高悬浮生长细胞如植物原生质体等的转染效率^[3]。电穿孔法具有可重复、效率更高、可大量样本处理、无毒性以及容易使用(不需要孵育时间)等优点。但电穿孔转染因受脉冲强度、脉冲时间和脉冲次数等多种因素的影响, 有时会对细胞产生不可避免的较强损伤, 从而引起细胞破损^[4,5]。因此需要用一种实时无损的检测方法对破损的细胞进行检测。

近红外光谱(Near Infrared, NIR)检测技术在近年来得到飞快发展。作为一种无损、快捷和高效的检测技术, 它在农产品、果蔬和肉制品等方面的检测应用都有独特的优势和广阔的发展前景。此外, 在细胞试验中, 近红外光谱检测以其

分析速度快、分析过程简化以及仪器自动化程度高等优势得到广泛应用。本实验研究了采用近红外光谱检测技术进行细胞破损检测的可行性^[6]。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

实验材料有 PK15 猪肾脏细胞、DMEM 培养基(含有 10% 胎牛血清)和 PBS 磷酸盐缓冲液和胰酶; 实验仪器有 Electroporator 2510 电转化仪、离心机、尼康(Nikon)TE2000-S 显微镜和红外光谱仪(AVATAR 330 FT-1R)。

1.2 方法与步骤

电穿孔前 24 h 进行细胞传代, 使细胞在转染前处于对数生长期。用 PBS 洗细胞 2 次, 然后使用胰酶进行消化 1 min; 待细胞变圆后, 用 DMEM 培养基终止消化。轻轻吹细胞使之成单细胞悬液, 再在室温下以 1200 rpm 转速离心 5 min。完全弃去上清, 根据细胞数量加入适量的电转缓冲液重悬细胞(一般为 0.5~0.6 ml 左右); 上下吹打均匀, 置于显微镜下观察, 并进行红外检测。加入适量相应浓度的待转染核酸至相应的终浓度, 吹打均匀^[7]。电转杯中只加入电缓冲液。按照预定条件设置参数, 加大电压, 进行电击操作^[8,9]。电击完成后, 将电转杯置于恒温箱中约 10 min, 然后将细胞悬液取出, 置于显微镜下并进行红外检测。

1.3 光谱处理

用计算机软件对正常细胞和破损细胞的 2200~2600 cm^{-1} 范围内的红外光谱图进行一阶导数和二阶导数处理, 绘制出 2200~2600 cm^{-1} 范围内的二阶导数光谱。

2 结果与讨论

正常细胞与破损细胞的红外光谱如图 1 所示。正常细胞与破损细胞在 $2200\sim 2600\text{ cm}^{-1}$ 内的光谱差别放大如图 2 所示, 正常细胞与破损细胞在 $2200\sim 2600\text{ cm}^{-1}$ 内的二阶导数光谱如图 3 所示。

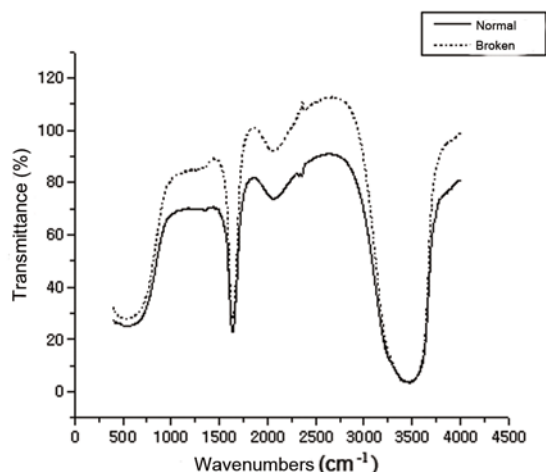


图 1 正常细胞与破损细胞的红外光谱

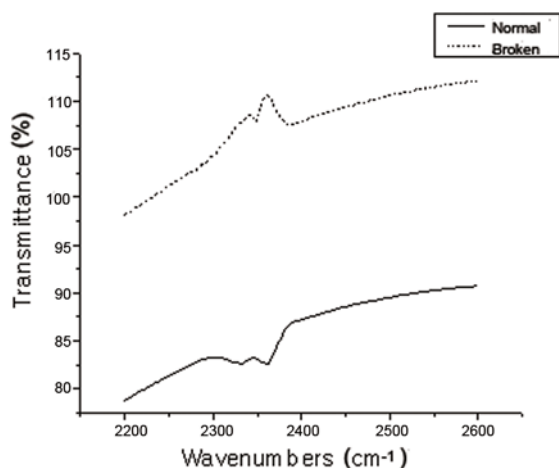


图 2 正常细胞与破损细胞在 $2200\sim 2600\text{ cm}^{-1}$ 内的光谱差别放大图

由图 1 与图 2 可知, 虽然正常细胞与破损细胞光谱曲线的走势相似, 但在 $2200\sim 2600\text{ cm}^{-1}$ 内还是存在一些细微差别, 特别是在 2300 cm^{-1} 左右, 可以发现正常细胞显著呈现的是倒吸收峰, 而破损后则是正吸收峰。经探讨与猜测, 我们初步猜想这可能与 P-H 基团相关。当细胞破损时, 胞内的磷酸等能量物质会分解并扩散到

破损溶液中。对于吸收峰差别不明显的光谱图需要进行分离和校正。运用计算机软件对此特殊波段的相应数据进行一阶导数和二阶导数处理, 可以得到精确的对比结果^[10]。

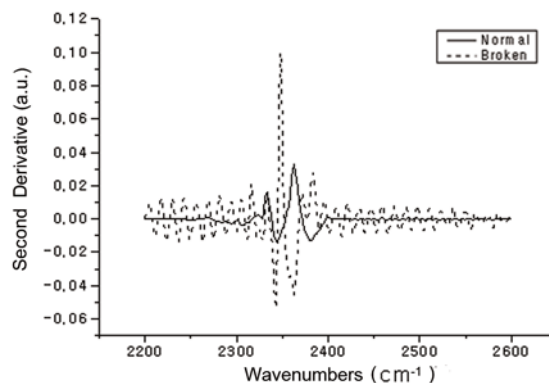


图 3 正常细胞与破损细胞在 $2200\sim 2600\text{ cm}^{-1}$ 内的二阶导数光谱

由图 3 可以很明显地看出, 对 $2200\sim 2600\text{ cm}^{-1}$ 的光谱进行二阶导数处理后, 正常细胞与破损细胞在此区域内的区别变得非常明显: 在 $2300\sim 2400\text{ cm}^{-1}$ 内的二阶导数光谱中, 破损细胞特征峰的峰形尖锐且强度大, 而正常细胞的峰形较宽且相对强度较弱。这一发现可作为红外光谱鉴别正常细胞和破碎细胞的标准。

实验过程中, 对细胞 $2300\sim 2400\text{ cm}^{-1}$ 的红外光谱进行二阶导数处理后, 若该范围内的吸收峰尖锐且强度大, 则表明细胞已经受到破坏; 若该范围内的吸收峰较宽且相对强度较弱, 则表明该细胞处于正常状态, 没有受到破坏。

3 结束语

如今, 红外光谱分析技术各个领域已经得到了越来越广泛的应用。对细胞电转染过程中细胞破损的情况进行了初步的红外分析。当得到的红外光谱区别不明显时, 借助计算机软件对数据进行了分离和校正, 从而使细胞破损前后的特征光谱产生明显的区别。在 $2300\sim 2400\text{ cm}^{-1}$ 内的二阶导数光谱中, 破损细胞特征峰的峰形尖锐且强度大, 而正常细胞的峰形较宽且相对强度较弱。这一明显的差异可作为鉴别正常细胞和破碎细胞的标准, 同时表明红外光谱鉴别技术在生物细胞实验中应用是可行的。

参考文献

- [1] 叶美玲, 王少元. 基因转染技术及其在白血病研究中的应用 [J]. *医学综述*, 2010, 6(13): 1934-1936.
- [2] 李进, 洪光祥, 王发斌, 等. Lipofectamine 介导转染神经干细胞的研究 [J]. *中华实验外科杂志*, 2005, 22(3): 357-358.
- [3] Niidome T, Huang L. Gene Therapy Progress and Prospects: Nonviral Vectors [J]. *Gene Therapy*, 2002, 9(24): 1647-1652.
- [4] 肖华娟. 细胞膜电穿孔现象机理研究 [D]. 北京: 中国科学院研究生院 (电工研究所), 2004.
- [5] 董菊子, 赵勇, 高福兴, 等. 电转染效率影响因素的探讨 [J]. *生物技术通讯*, 2006, 17(5): 737-739.
- [6] 刘保良, 王东升, 陈长青, 等. 不同剂量 ^{131}I 照射 Hela 细胞后的红外光谱研究 [J]. *郑州铁路职业技术学院学报*, 2013, 25(2): 51-55.
- [7] 王伟佳, 张秀明, 王前, 等. 急性早幼粒白血病 HL60 细胞电转染条件的优化 [J]. *中国生物工程杂志*, 2010, 30(4): 77-82.
- [8] Hui S W. Effects of Pulse Length and Strength on Electroporation Efficiency Methods [J]. *Molecular Biology*, 1995, 48: 29-40.
- [9] Tekie W, Astumian R D, CHOCK P B. Selective and Asymmetric Molecular Transport Across Electroporated Cell Membrane [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 115.
- [10] 刘建学. *实用近红外光谱分析技术* [M]. 北京: 科学出版社, 2008.

新闻动态 News

加拿大国家光学研究所推出 HRXCAM-16K 型热红外相机核心部件

据 www.newswire.ca 网站报道, 加拿大国家光学研究所 (INO) 最近推出了一款采用微扫描技术、分辨率为 16348×12288 像素的紧凑型热红外相机核心部件 (见图 1)。

由于分辨率是市场同类产品的 16 倍, HRXCAM-16K 型相机核心部件能够在 1 km 甚至更远的距离上对目标特征进行辨别。该部件可以为用户提供独特的监视和情报能力, 以提高其态势感知水平。

HRXCAM-16K 型相机核心部件的微扫描系统可以实现超小的有效像元间距 ($1.0625 \mu\text{m}$), 这对整体的紧凑性具有直接影响。由于采用了基于铝材料的特殊折反射光具, 该部件的尺寸仅为 $11.4 \text{ cm} (\phi) \times 27.6 \text{ cm}$, 重量仅为 1.6 kg。而目前同类产品则需使用比其大 8 倍的光具才能在分辨率性能上与之相媲美。

具有 16 位原始信号的 HRXCAM-16K 型相机核心部件特别适合各种研究人员使用, 因为它能够帮助用户完全访问探测器的配置参数。另外, 由于没有使用制冷装置, 该部件在尺寸和功耗上均降至最低水平。

HRXCAM-16K 型相机核心部件在很多需要高分辨率红外成像能力的场合 (包括国防、安全、军事、运输和航空航天应用) 中将大有用武之地。

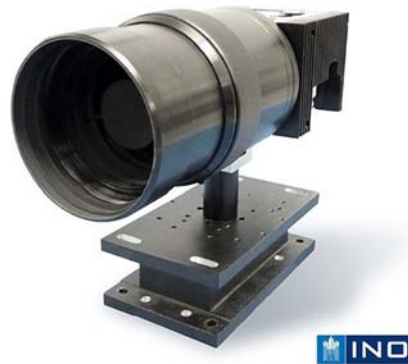


图 1 HRXCAM-16K 型热红外相机核心部件



图 2 分辨率为 16348×12288 像素的红外图像

□ 岳桢干