

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200410102574.6

[51] Int. Cl.

C12P 19/34 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 15/79 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

G01N 33/548 (2006.01)

C12M 1/00 (2006.01)

[43] 公开日 2006年7月5日

[11] 公开号 CN 1796567A

[22] 申请日 2004.12.24

[21] 申请号 200410102574.6

[71] 申请人 中国科学院生物物理研究所

地址 100101 北京市朝阳区大屯路15号

[72] 发明人 阎锡蕴 高利增 王太宏 聂 棱

[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司
代理人 程金山

权利要求书1页 说明书12页 附图3页

[54] 发明名称

碳纳米管的生物学应用

[57] 摘要

本发明提供了一种碳纳米管提高基因扩增产率和基因转化(转染)率的新方法,包括:(1)将新型纳米材料-碳纳米管引入基因扩增系统,如DNA聚合酶链式基因扩增反应系统,能够有效促进基因扩增,提高基因扩增产率;(2)在基因导入原核细胞的过程中,加入碳纳米管,能够将原核细胞的基因转化效率提高7倍;(3)在基因导入真核细胞中,使用碳纳米管能够将携带外源基因的载体导入真核细胞,从而为真核细胞转染提供了一种新的方法。本发明不仅为基因扩增和基因导入细胞提供了一种高效、简便、经济的新方法,而且为基因诊断和基因治疗提供了一条新途径。

1. 碳纳米管在提高 PCR 基因扩增产率中的应用，其中在 PCR 反应体系中加入碳纳米管。
- 5 2. 根据权利要求 1 的应用，其中所述碳纳米管是羧基或羟基修饰的碳纳米管。
3. 碳纳米管在提高原核细胞的基因转化效率中的应用，其中在基因转化体系中加入碳纳米管。
4. 根据权利要求 3 的应用，其中所述碳纳米管是羧基或羟基修饰的碳
10 纳米管。
5. 碳纳米管在提高真核细胞的基因转染效率中的应用，其中在碳纳米管的存在下将携带外源基因的载体导入真核细胞。
6. 根据权利要求 5 的应用，其中所述碳纳米管是氨基修饰的碳纳米管。
7. 根据权利要求 1-6 中任何一项的应用，其是用于法医鉴定、疾病诊
15 断、基因治疗和细胞治疗领域。

碳纳米管的生物学应用

5 技术领域

本发明涉及纳米材料学与分子生物学和基因治疗的交叉学科。更具体地，本发明涉及碳纳米管在分子生物学和基因治疗等中的应用。

背景技术

10 在分子生物学和基因治疗的有关技术中，如在基因扩增和基因的转化或转染中，实验产率或效率的提高可以极大地推动相关研究的进展。

体外基因扩增法又称聚合酶链式反应（polymerase chain reaction, PCR），是 80 年代中期开创的一种新技术，它能在一个反应试管中将所要研究的目的基因或 DNA 片段在短短数小时内扩增上百万倍，可以直接用于基因的分离和分析，是分子生物学中一项革命性技术。其原理是利用两种寡核苷酸引物分别与特异性 DNA 区段的正链和负链末端互补，经过模板 DNA 变性，模板 DNA-引物配对，在 DNA 聚合酶作用下发生引物链的延伸反应，三个反应阶段导致新互补链的合成。引物链的延伸产物与原来模板 DNA 经加热变性后，作为模板 DNA 和另一种引物互补，在 DNA 聚合酶作用下又发生引物链的延伸反应，如此反复循环数十次，可使特异性 DNA 区段以几何级数倍增。反应体系包括（参见 J. 萨姆布鲁克，D.W.拉塞尔，《分子克隆实验指南》第二版 672 页）：被检测的 DNA 片段，即模板；两条分别与检测的 DNA 片段正链和负链末端互补的寡核苷酸引物链（一般为 20 个核苷酸左右）；四种 dNTP；DNA 聚合酶；MgCl₂，
25 反应缓冲液和水。基因扩增技术在疾病诊断和法医鉴定方面起着重要作用。例如，在一些感染性疾病中，确定致病病原体（如 HIV 病毒和 SARS 病毒）；在肿瘤患者体内，检测某些癌基因的存在；在法医 DNA 指纹个体识别和亲子关系鉴定等等都涉及基因扩增技术。另外，基因扩增技术在考古研究领域应用极为广泛。因此，提高基因扩增效率是增加基因诊断灵敏度和提高基因治疗成功率的关键，也是研究人员一直探索的一个重要课
30

题。

而基因的转化或转染是指把外源基因导入宿主细胞并使其在宿主细胞中发挥作用，将外源基因导入原核细胞称为转化，将外源基因导入真核细胞称为转染，这是生命科学研究领域中一种常用的重要技术和方法，也是基因治疗的首要 and 关键技术(附图 1)。因此，开发新的细胞转染方法和提高基因的转化效率一直是生命科学研究和基因治疗临床研究的重要课题。目前用于原核细胞基因转染的常用技术是氯化钙法和电穿孔法，转化率最高可达 10^9 。用于真核细胞基因转染的方法包括磷酸钙转染法、DEAE-葡聚糖转染法、聚阳离子-DMSO 转染法、脂质体转染法、电穿孔法、显微注射法、原生质体融合法、病毒介导的转染法。这些方法都是通过物理和化学成分影响细胞膜，改变细胞膜的通透性，使外源基因进入细胞，但转化效率不高。表 1 将各种转染方法的主要特点进行了比较。

表 1.几种常用转染方法的主要特点的比较

转染方法	主要应用	特点
DEAE-葡聚糖法	瞬时转染	操作简便、重复性较好。但对细胞有一定的毒副作用，而且对转染细胞系有限制
磷酸钙法	稳定转染、瞬时转染	操作简便但重复性差,不适用于原代细胞，而且对转染细胞系有限制
阳离子脂质体法	稳定转染、瞬时转染	方法简单，可携带大片段 DNA，能转染各种类型的细胞，但毒性较大
阳离子聚合物	稳定转染、瞬时转染	转染效率高，操作简单，适用各种类型的细胞，易重复，细胞毒性低
病毒介导法	稳定转染、瞬时转染	用于难转染的细胞，携带基因不能太大，安全性低

显微注射法	稳定转染、瞬时转染	操作技术性强，转染细胞数有限，多用于工程改造或转基因动物的胚胎细胞
电穿孔法	稳定转染、瞬时转染	操作简便，但需要特定的仪器设备；适用性广，除了质粒外，还可转染大的基因组；适用各种类型的细胞，但细胞致死率高

真核细胞转染方法在基因表达、基因治疗和 DNA 疫苗的应用中都具有重要意义，在开发新的转染方法时，不仅要考虑转染的效率的高低，还要考虑转染材料对细胞乃至活体的毒性大小，所以尽管目前开发的真核细胞转染方法已经有很多，但都具有缺陷，不能满足现在实验和临床的需要。

- 5 比如目前常用的脂质体 Lipofectamine 2000 转染试剂，虽然具有较高的转染效率，但对细胞毒性比较大，因此仅比较适合体外细胞转染。新的转染方法的开发和建立有助于这些问题的解决。

发明内容

- 10 针对上述研究背景，本发明人通过深入研究，突破了化学和分子生物学的局限性，从一个新的视角把新型碳纳米管（carbon nanotube, CNT）材料引入分子生物学技术，有效地提高了基因扩增的产率和基因转化或转染的效率。

- 15 因此，本发明的一个目的是提供碳纳米管在提高 PCR 基因扩增产率中的应用，其中在 PCR 反应体系中加入碳纳米管。优选所述碳纳米管是羧基或羟基修饰的碳纳米管。

本发明另一个目的是提供碳纳米管在提高原核细胞的基因转化效率中的应用，其中在基因转化体系中加入碳纳米管。优选所述碳纳米管是羧基或羟基修饰的碳纳米管。

- 20 本发明还有一个目的是提供碳纳米管在提高真核细胞的基因转染效率中的应用，其中在碳纳米管的存在下将携带外源基因的载体导入真核细胞。优选所述碳纳米管是氨基修饰的碳纳米管。

本发明的上述应用可以是用于法医鉴定、疾病诊断、基因治疗和细胞治疗领域。

本发明与传统的 PCR 反应相比,其特点在于 PCR 反应中引入了碳纳米管材料。这种策略是基于两点理论基础:(1)碳纳米管与 DNA 相互作用。碳纳米管表层是碳原子组成的六元环或五元环,能够与 DNA 形成 π - π 键,同时碳纳米管表面的羧基能够与 DNA 形成氢键(Nature Materials, 2003, 2, 338-342);(2)碳纳米管与 PCR 反应中的酶相互作用(Nanotechnology 15:154, 2004)。碳纳米管可与蛋白酶的疏水界面通过疏水作用与之结合,亦可借助羧基或羟基与蛋白酶形成氢键。这一新技术的发明不仅推动纳米生物学的发展,而且为控制疾病的传播途径、明确癌症的诊断和治疗、指导临床用药提供了新方法和新途径。

本发明的特色在于利用碳纳米管与 DNA 相互作用以及碳纳米管与细胞膜相互作用的特点,建立了以碳纳米管为介质的新的转染方法,并把这种方法应用于原核和真核两个基因转化系统,通过碳纳米管的作用促进基因的转化或转染,从而有效提高基因转化率。本发明应用于原核细胞的基因转化,能够使基因转化效率提高 10 倍。本发明应用碳纳米管成功地实现了真核细胞的基因转染,建立了一种新型的真核细胞基因转染方法。本发明适用于任何一种基因在不同细胞中的转化。本发明与传统基因转化或转染方法相比,使原核基因转化率明显提高,而且碳纳米管应用于真核细胞转染是一种新型的转染方法,这不仅丰富了分子生物学技术,而且在基因治疗中具有重要的应用价值。

附图说明

下面结合附图和具体实施方式对本发明作进一步的详细描述,但不应当理解为是对本发明进行限定。

图 1. 基因转化或转染在生物和医学中的应用;

图 2. 羧基修饰的多壁碳纳米管对 PCR 扩增产率的影响, A. 琼脂糖凝胶电泳分析各组 PCR 扩增产物; B. 分析各组 PCR 产物中的 DNA 含量。图中的 0、1、2、3、4、5、6、7 分别代表不同的组,与表 2 中的组相对应;

图 3. 羟基修饰的多壁碳纳米管对 PCR 扩增产率的影响, A. 琼脂糖凝胶电泳分析各组 PCR 扩增产物; B. 分析各组 PCR 产物中的 DNA 含量。图中的 0、1、2、3、4、5、6 分别代表不同的组, 与表 3 中的组相对应;

图 4. 羧基修饰碳纳米管促进原核细胞 BL21 基因转化, A. 碳纳米管促进转化的实验对比图; B. 转化菌落数计数的对比分析;

图 5. 羟基修饰的碳纳米管促进原核细胞 TOP10 基因转化, 菌落计数对比分析;

图 6. 氨基修饰的多壁碳纳米管介导的细胞转染荧光观察 (细胞放大倍数 200), 左: 对照组; 右: 实验组。

10

具体实施方式

下面结合附图对理解本发明作进一步的详细描述, 但并非对本发明作限定。

15

实施例 1 碳纳米管提高基因扩增产率

本发明所采取的研究策略是在 PCR 基因扩增反应体系中加入适量的碳纳米管, 提高基因的扩增效率, 电泳分析鉴定基因扩增产率。

20

一、羧基修饰的多壁碳纳米管提高基因扩增产率

在本实验中使用的扩增模板是 T 载体 (PROMEGA 公司, 商品号 A1360) 上鼠抗体重链可变区 (吴小平 等, 抗肿瘤血管三结构域单链抗体 VH/L 的构建与表达, 生物工程学报 17 (1): 50-54, 2001), 引物长为 26 个碱基 (5'-GGAACATATGGAGGTGAAACTGCAGG-3', 5'-

25

ACTAGCTAGCTGAGGAGACGGTGACC-3'), 扩增产物为 386 bp, (Taq 酶购自 PROMEGA 公司)。本实验中使用的碳纳米管是羧基修饰的多壁碳纳米管 (多壁碳纳米管购自深圳纳米港有限公司, 根据文献常规操作将多壁碳纳米管经强酸处理后离心烘干即可得到羧基修饰的多壁碳纳米管, *Acc. Chem. Res.* **2002**, 35, 1096)。PCR 仪是 MJ RESEARCH PTC-200 (MJ

30

RESEARCH 公司)。

在本实验中，设计 8 组实验（0 组为不含碳纳米管的对照组，1-7 组为含有不同量羧基修饰多壁碳纳米管的实验组），研究羧基修饰的多壁碳纳米管对 PCR 产率的影响。在这 8 组 PCR 反应管中分别加入不同的组分（表 2）。

5 表 2. 羧基修饰的多壁碳纳米管对 PCR 产物影响的实验设计

组分 \ 实验	对照组	实验组						
	0 组	1 组	2 组	3 组	4 组	5 组	6 组	7 组
10 ng/ μ l 模板(μ l)	1	1	1	1	1	1	1	1
10 μ M 引物 1(μ l)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
10 μ M 引物 2(μ l)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
10 x 缓冲液(μ l)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
50 mM MgCl ₂ (μ l)	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8
25 mM dNTP(μ l)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
超纯水(μ l)	19	19	19	19	19	19	19	19
Taq 酶(5 U/ μ l)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
羧基修饰多壁碳纳米管(ng)	0	0.001	0.1	1	10	50	100	500

反应程序：94℃变性 10 分钟，55℃复性 1 分钟使模板与引物配对，72℃延伸 1 分钟，94℃变性 1 分钟，然后再复性延伸循环 24 次，最后在 72℃充分延伸 10 分钟，产物保存于 4℃。

10 PCR 反应结束后，从每个反应管中取 10 μ l PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳鉴定。具体操作如下：取样 10 μ l PCR 样品与 2 μ l 6X 上样缓冲液混合，加样于 1% 琼脂糖凝胶，在 100 V 电压下电泳，DNA 从负极向正极方向迁移。电泳结束后通过凝胶成像系统（Gel Doc2000™ Chemi Doc™，BIO RAD）对 PCR 产物进行分析，鉴定每个 PCR 反应的 DNA 含量，分析碳纳米管在基因扩增中的作用以及促进 PCR 反应的最佳浓度。

15 从图 2 可以看出，当羧基修饰的多壁碳纳米管含量在 1 ng 时（实验组 3）对 PCR 产率的促进最为明显，说明在上述反应体系中加入 1 ng 的多壁碳纳米管是促进 PCR 扩增和增加基因扩增产率的最佳浓度。当多壁碳纳米管量较少或较多时都不利于 PCR 反应，尤其是当多壁碳纳米管含量超过 100

ng 后, PCR 反应将不能进行 (实验组 7)。通过凝胶成像分析软件 Quantity one 1.0 进行 DNA 定量分析, 发现与常规的 PCR 方法 (实验组 0) 相比, 实验组 3 的 PCR 产物量提高至少 3 倍。由此得出结论: 在该扩增体系中碳纳米管在一定浓度范围内可以增强 PCR 扩增效率, 最佳浓度为 0.04 ng/ μ l。

5

二、羟基修饰的碳纳米管提高基因扩增产率

在本实验中使用的扩增模板是 T 载体 (PROMEGA 公司, 商品号 A1360) 上鼠抗体重链可变区 (吴小平 等, 抗肿瘤血管三结构域单链抗体 VH/L 的构建与表达, 生物工程学报 17 (1): 50-54, 2001), 引物长为 26 个碱基 (5'-GGAACATATGGAGGTGAAACTGCAGG-3', 5'-ACTAGCTAGCTGAGGAGACGGTGACC-3'), 扩增产物为 386 bp, (Taq 酶购自 PROMEGA 公司)。本实验中使用的碳纳米管是羟基修饰的多壁碳纳米管 (多壁碳纳米管购自深圳纳米港有限公司, 多壁碳纳米管经强碱处理即可得到富含羟基的多壁碳纳米管)。PCR 仪是 MJ RESEARCH PTC-15 200 (MJ RESEARCH 公司)。

在本实验中, 设计 7 组实验 (0 组为不含碳纳米管的对照组, 1-6 组为含有不同量羟基修饰多壁碳纳米管的实验组), 研究羟基修饰的多壁碳纳米管对 PCR 产率的影响。在这 7 组 PCR 反应管中分别加入不同的组分 (表 3)。

20

表 3. 羟基修饰的多壁碳纳米管对 PCR 产物影响的实验设计

组分 \ 实验	对照组	实验组					
	0 组	1 组	2 组	3 组	4 组	5 组	6 组
10 ng/ μ l 模板(μ l)	1	1	1	1	1	1	1
10 μ M 引物 1(μ l)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
10 μ M 引物 2(μ l)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
10 x 缓冲液(μ l)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
50 mM MgCl ₂ (μ l)	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8
25 mM dNTP(μ l)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
超纯水(μ l)	19	19	19	19	19	19	19

Taq 酶(5 U/ μ l)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
羟基修饰多壁碳 纳米管(ng)	0	10	20	100	200	500	1000

反应程序：94℃变性 10 分钟，55℃复性 1 分钟使模板与引物配对，72℃延伸 1 分钟，94℃变性 1 分钟，然后再复性延伸循环 24 次，最后在 72℃充分延伸 10 分钟，产物保存于 4℃。

PCR 反应结束后，从每个反应管中取 10 μ l PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳鉴定。具体操作如下：取样 10 μ l PCR 样品与 2 μ l 6X 上样缓冲液混合，加样于 1% 琼脂糖凝胶，在 100 V 电压下电泳，DNA 从负极向正极方向迁移。电泳结束后通过凝胶成像系统（Gel Doc2000™ Chemi Doc™，BIO RAD）对 PCR 产物进行分析，鉴定每个 PCR 反应的 DNA 含量，分析碳纳米管在基因扩增中的作用以及促进 PCR 反应的最佳浓度。

从图 3 可以看出，当羟基修饰的多壁碳纳米管含量在 10-50 ng 时（实验组 3）对 PCR 产率的促进最为明显，说明在上述反应体系中加入 10ng 的多壁碳纳米管是促进 PCR 扩增和增加基因扩增产率的最佳浓度。当多壁碳纳米管量较多时都不利于 PCR 反应，尤其是当多壁碳纳米管含量超过 100 ng 后，PCR 反应将不能进行（实验组 5、6）。通过凝胶成像分析软件 Quantity one 1.0 进行 DNA 定量分析，发现与常规的 PCR 方法（实验组 0）相比，实验组 2、3 的 PCR 产物量是对照组的 1.3 倍。由此得出结论：在该扩增体系中羟基多壁碳纳米管在一定浓度范围内可以增强 PCR 扩增效率，最佳浓度为 0.8 ng/ μ l。

应当指出，对于类似的 PCR 基因扩增体系，根据本发明的教导，本领域普通技术人员可以容易地确定用于提高 PCR 扩增效率的最佳碳纳米管浓度。

实施例 2 碳纳米管提高基因在原核细胞中的转化效率

基因转化在分子生物学操作中极为重要，是基因的克隆与表达中一个重要步骤，尤其是在基因治疗中，提高转化效率仍是有待解决的问题。在原核转化体系中，常用的是 CaCl₂ 法和电转化法，本发明是在利用 CaCl₂

法制备感受态细胞的基础上，加入羧基或羟基修饰的多壁碳纳米管，观察其转化效率。

一、碳纳米管提高 pET28a 在 BL21(DE3)细菌中的转化效率

5

本实验所用的载体是 pET28a（含卡那霉素抗性），所用的宿主细胞为大肠杆菌 BL21(DE3)，这两种生物材料均已商品化（pET28a 可从 Novagen 购买，BL21（DE3）可从天为时代试剂公司购买）。本实验分为实验组和对照组，对照组是用常规的 CaCl_2 转化法，实验组是在 CaCl_2 转化法的基础上加入羧基修饰的多壁碳纳米管，具体实验设计（表 4）。

10

表 4. 实验组和对照组转化条件的设计方案

	对照组	实验组
0.3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 质粒 (μl)	1	1
超纯水 (μl)	9	9
羧基修饰多壁碳纳米管 (ng)	0	250

实验步骤

1. 将对照组和实验组分别加入等量的 BL21 感受态细胞转化液中，冰上放置 30 分钟；
2. 42°C 放置 90 秒；
3. 冰上放置 1-2 分钟；
4. 分别加入 LB 培养基 800 μl ， 37°C 、225 rpm 培养 45-90 分钟；
5. 对照组和实验组，分别取 100 μl 涂 LB 固体培养基（卡那霉素抗性）
6. 菌落计数，记录对照组和实验组中的细菌菌落数（见附图 4），进行比较。

20

上面结果表明，对照组转化率为 5×10^5 cfu(clone forming unit)/ μg DNA，碳纳米管实验组转化率为 3.3×10^6 cfu/ μg DNA。实验分析发现实验组与对照组相比，转化数提高 7 倍。

25

二、碳纳米管提高 pET28a 在 TOP10 细菌中的转化效率

本实验所用的载体是 pET28a (含卡那霉素抗性), 所用的宿主细胞为大肠杆菌 TOP10, 这两种生物材料均已商品化 (pET28a 可从 Novagen 购买, TOP10 可从天为时代试剂公司购买)。本实验分为实验组和对照组, 对照组是用常规的 CaCl_2 转化法, 实验组是在 CaCl_2 转化法的基础上加入羟基修饰的多壁碳纳米管, 具体实验设计 (表 5)。

表 5. 实验组和对照组转化条件的设计方案

	对照组	实验组
0.3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 质粒 (μl)	1	1
超纯水 (μl)	9	9
羟基修饰多壁碳纳米管 (ng)	0	500

10

实验步骤

1. 将对照组和实验组分别加入等量的 TOP10 感受态细胞转化液中, 冰上放置 30 分钟;
2. 42°C 放置 90 秒;
3. 冰上放置 1-2 分钟;
4. 分别加入 LB 培养基 800 μl , 37°C 、225 rpm 培养 45-90 分钟;
5. 对照组和实验组, 分别取 100 μl 涂 LB 固体培养基 (卡那霉素抗性) 平板, 室温放置 20-30 分钟后, 倒置于 37°C 恒温培养箱, 培养 12-16 小时;
6. 菌落计数, 记录对照组和实验组中的细菌菌落数 (见附图 5), 进行比较。

20

上面结果表明, 对照组转化率为 3×10^6 cfu(clone forming unit)/ μg DNA, 碳纳米管实验组转化率为 9×10^6 cfu/ μg DNA。实验分析发现实验组与对照组相比, 转化数提高 3 倍。

碳纳米管的这种促进作用适合与所有核酸导入细胞的过程。细菌转化过程中加入碳纳米管可以有效提高质粒转化效率, 表明在转化过程中加入

25

碳纳米管具有明显的促进 DNA 转化进入原核细胞的作用。

实施例 3 碳纳米管介导的真核细胞基因转染

随着纳米技术的发展，目前已经出现了利用单壁碳纳米管用于真核细胞转染的报道（Pantarotto, D.; Briand, J.; Prato, M.; Bianco, A. *Chem. Commun.* 2004, 1, 16-17）。本发明的特点在于：（1）使用的碳纳米管是多壁碳纳米管，其结构复杂，更有利与 DNA 形成复合物，从而提高其转染能力；（2）碳纳米管的修饰方法不同。本发明在碳纳米管表面引入-NH-C₆H₂-NH₂ 氨基基团，多壁碳纳米管经过强酸处理后，离心、烘干，再经过亚硫酸氯处理，离心、烘干，过量的己二胺处理后，去离子水洗净，得到氨基修饰的多壁碳纳米管（3）本发明采用的转染方法更为简单，直接将多壁碳纳米管与 DNA 在水中混合即可进行细胞转染。

本发明使用氨基修饰的多壁碳纳米管（*Acc. Chem. Res.* 2002, 35, 1096），这种碳纳米管材料经氨基修饰带有大量正电荷，既可与 DNA 结合，又可与细胞膜结合，与 DNA（含有绿色荧光蛋白的质粒载体 pEGFP-N1）相互作用，以这种多壁碳纳米管为转染介质，将绿色荧光蛋白基因导入真核细胞（A375 细胞），观察细胞内绿色荧光蛋白的表达，从而建立了以多壁碳纳米管为转染介质的新型转染方法。

本实验所用的 DNA 是 pEGFP-N1（美国 Clontech 公司购买），所用的真核细胞为人源黑色素瘤细胞 A375（美国 ATCC 产品，CRL 1619）。本实验分为实验组和对照组，实验组是氨基修饰的多壁碳纳米管与 pEGFP-N1 结合介导细胞转染，对照组是 pEGFP-N1 直接进行细胞转染。

表 6. 真核细胞转染中实验组和对照组的实验设计

	对照组	实验组
(0.3 μg/μl) 质粒 pEGFP-N1(μl)	6	6
超纯水 (μl)	9	9
氨基修饰的多壁碳纳米管 (ng)	0	50

实验步骤:

1. 氨基修饰的多壁碳纳米管与 DNA 预混合: 取一定量的碳纳米管与 DNA 预混合于超纯水中 (见表 6 实验组), 室温作用 10-30 分钟, 对照组按上表对照组配制;
- 5 2. A375 细胞培养与处理: A375 细胞培养于 24 孔板, 细胞密度长至 80-90 % 时去掉原有的培养基 (DMEM (Dulbecco's modification of Eagle's medium Dulbecco, HyClone 公司产品)) 高糖培养基, 10% 胎牛血清, 1% 青霉素/链霉素), 加入不含血清和抗生素的 DMEM 培养基洗涤 1-2 次, 然后加入 500 μ l 含有 10% 血清的 DMEM 培养基;
- 10 3. 将步骤 1 中两组 DNA 混合物分别加入步骤 2 处理的含有 A375 细胞的细胞培养孔中, 在细胞培养箱 (Forma Scientific, CO₂ WATER JACKETED INCUBATOR, USA) 中培养, 5% CO₂, 37°C, 培养 24-48 小时;
4. 细胞在荧光显微镜 (OLYMPUS, IX71, Japan) 下观察, 488 nm 光激发, 524 nm 观察荧光, 记录转染细胞并观察细胞形态。氨基修饰的多壁碳纳米管将 pEGFP-N1 导入 A375 细胞, 见附图 6。
- 15 从附图 6 可以看出, 在实验组中氨基修饰的多壁碳纳米管可以将外源 DNA 导入 A375 细胞, 而对照组中的 DNA 不能进入真核细胞, 这一转染方法以氨基修饰的多壁碳纳米管为介质将外源 DNA 导入真核细胞, 从而建立了以多壁碳纳米管为转染介质的新型转染方法, 在真核细胞转染、基
- 20 因治疗中具有潜在的应用前景。

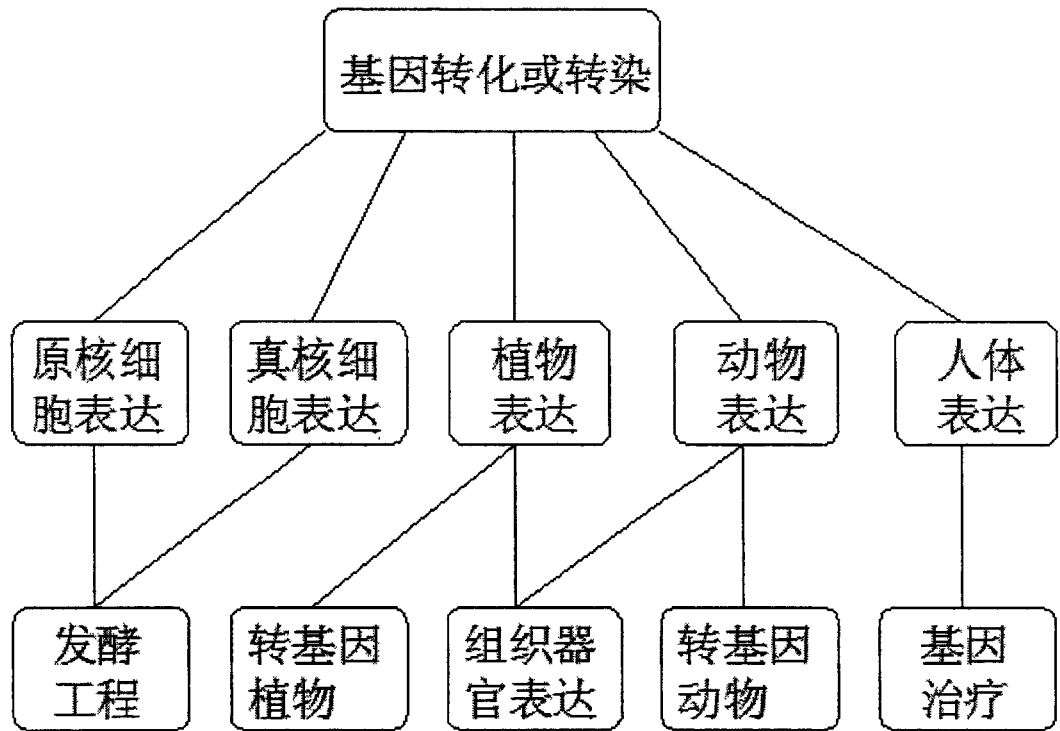


图 1

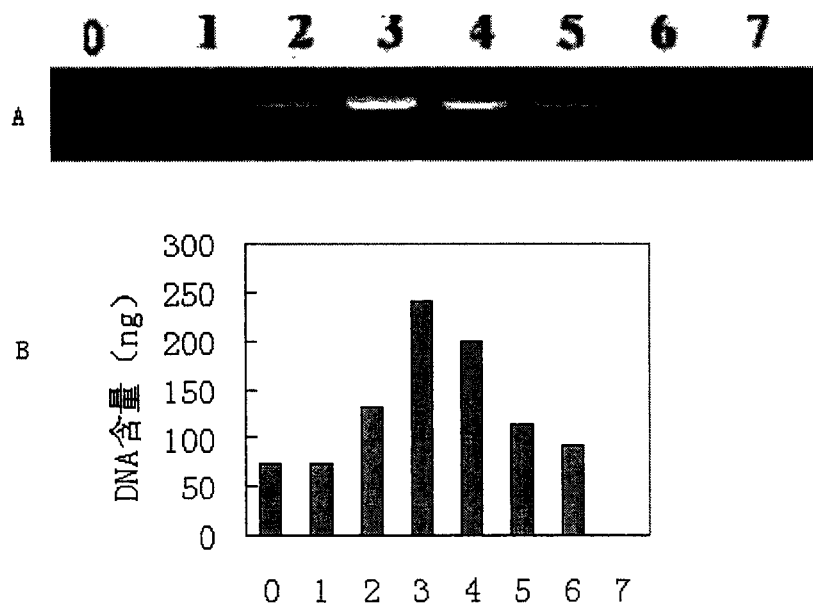


图 2

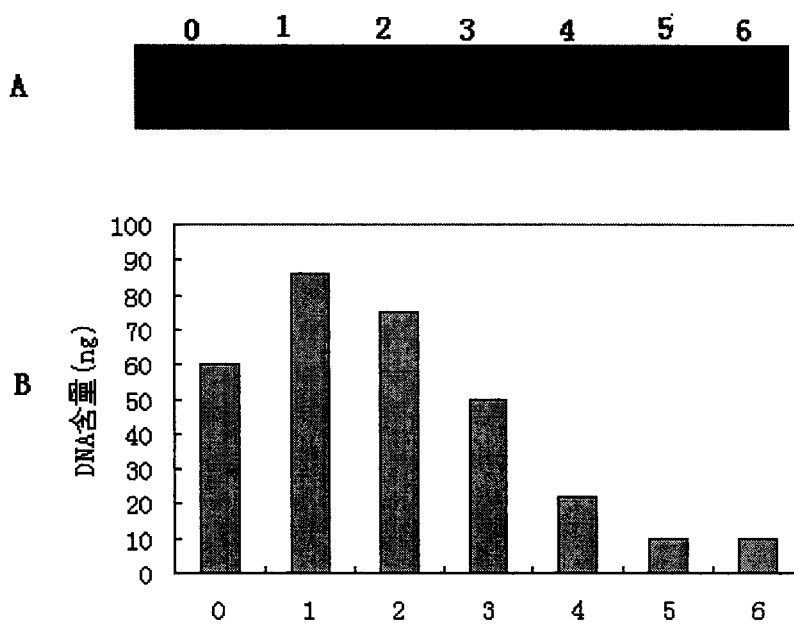


图 3

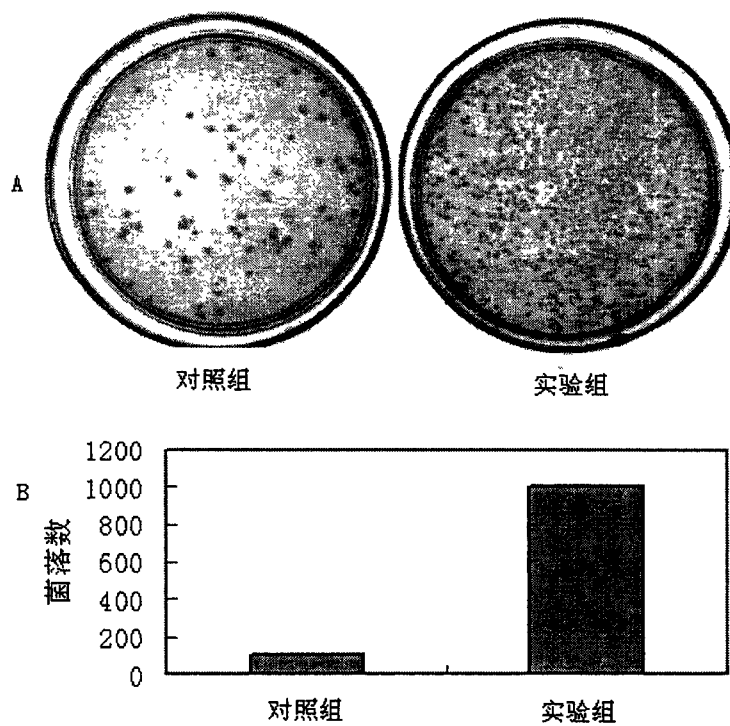


图 4

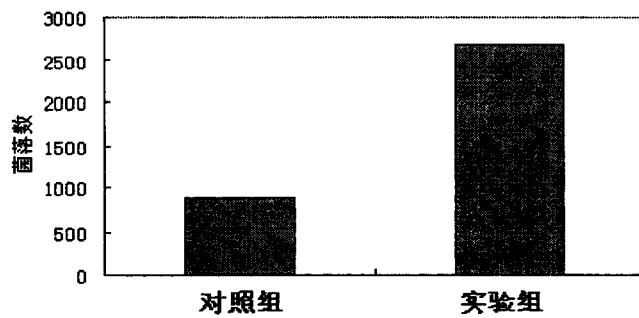


图 5

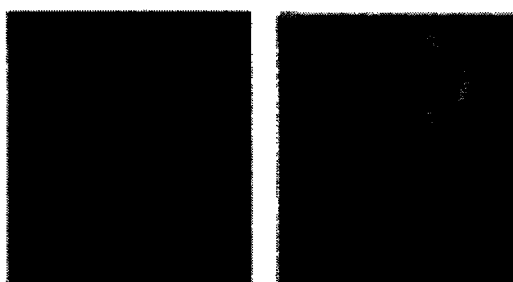


图 6