

线性聚乙烯亚胺(LPEI)介导 DNA 转染的优化研究^①

马兴宇, 叶国根, 乔冰珂, 赵建军, 刘安芳

西南大学 动物科学学院, 重庆 荣昌 402460

摘要: 线性聚乙烯亚胺(LPEI)是一类广泛用于核酸转染或药物传递的阳离子聚合物。为了进一步探究 25 kDa LPEI 的转染条件, 通过凝胶电泳阻滞试验评估 N/P, 聚合 pH 及聚合时间对 LPEI-DNA 复合物形成的影响, 继而利用大范围 N/P 的 25 kDa LPEI 对 HEK293 T 细胞进行绿色荧光蛋白表达质粒转染, 转染 48 h 后通过绿色荧光细胞比例及 MTT 的统计分析, 评估转染效率与 LPEI 造成的细胞毒性。结果表明, N/P 的上升能增强 LPEI-DNA 的电泳阻滞; 随着共孵育 pH 值从 6~8 升高, LPEI-DNA 聚合逐渐减弱; 随着共孵育时间延长, LPEI-DNA 聚合逐渐增强, 孵育 1 h 时达到饱和。随着体外转染 HEK293 T 细胞的 N/P 升高, 转染阳性细胞比例逐渐升高, 当 N/P 达到 40~60 时转染效率达到最高, 进一步提高 N/P 后转染效率极显著下降($p < 0.01$); 随着 N/P 升高, 细胞活力逐渐下降。结果表明, N/P, pH, 聚合时间均可影响 LPEI 聚合核酸能力; 综合考虑 N/P 对 HEK293 T 细胞转染效率及细胞毒性的影响, 确定 25 kDa LPEI 转染细胞适宜的条件为 N/P 为 40~60, 聚合 pH 值为 6.0, 聚合时间为 1 h。

关键词: 线性聚乙烯亚胺; 核酸聚合; 体外转染

中图分类号: Q782

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2019)06-0028-09

核酸传递是生物学研究、转基因和基因治疗必经的重要关键环节。由于核酸酶的广泛存在和核酸的高分子量及生理生化特性, 导致外源核酸很难独立地被递送进靶细胞, 而少量递送入胞质的核酸又易被溶酶体-内涵体系统降解^[1]。因此, 开发利用核酸运载体克服核酸转染屏障是生物学研究的重要问题。目前核酸运载体主要分为病毒类和非病毒类, 尽管前者的转染效率高, 但后者在安全性、稳定性、成本上要优于前者^[2-3]。

聚乙烯亚胺(Polyethylenimine, PEI)是一种水溶性阳离子高分子聚合物, 化学结构中大量胺基正电氮原子使其携带高密度正电荷, 早在 1995 年被用于体外核酸转染^[4-5]。带正电荷的 PEI 利用静电交互作用凝聚带负电的核酸并形成易被细胞摄取的正电小粒径复合体, 这种凝聚核酸的能力极大地影响了转染效率^[6]。PEI 所含的大量胺基具有质子海绵效应, 能促使 PEI-核酸复合物逃离出内涵体和溶酶体继而在胞内释放核酸使目的基因得以表达, 同时 PEI 可与细胞膜结构上的蛋白或磷脂相互作用影响膜的完整性, 产生细胞毒性并影响细胞的转染效率^[7-9]。转染效率的提高及细胞毒性的控制是 PEI 介导核酸转染应用的关键。PEI 的转染效率和细胞毒性受到 PEI 中的 N 元素与质粒 DNA 中 P 元素的摩尔数比(N/P)、PEI 和核酸聚合及转染条件、PEI 的分子量和分枝化等多种因素的影响^[10-11]。低分子量的 PEI 不能有效压缩聚合核酸,

① 收稿日期: 2018-12-20

基金项目: 重庆市基础与前沿研究计划项目(cstc2016jcyjA0386); 中央高校基本科研业务费(XDJK2018D016)。

作者简介: 马兴宇(1993-), 男, 硕士研究生, 主要从事小鼠肝脏功能的研究。

通信作者: 刘安芳, 教授。

导致复合物表面电荷低,难以被细胞摄取^[12]。尽管 PEI 分子量的升高转染效率会升高,但毒性也会增强^[13]。大量研究最终确认 25 kDa PEI 是阳离子转染领域中的“黄金标准”^[14-15]。PEI 含分支化 PEI (Branched PEI, BPEI)和线性 PEI (Linear PEI, LPEI)两大类^[16-17]。研究表明 BPEI 虽然有着相对 LPEI 更强的核酸凝聚能力,但核酸释放能力仍很弱,进入胞内无法再有效释放核酸,同时其毒性也更大^[16]。25 kDa LPEI 是一种相对于传统 PEI 毒性更小、转染效率更高的核酸阳离子载体^[17]。N/P 是影响 PEI 转染效率的最主要因素,但 25 kDa LPEI N/P 筛选研究差异较大,筛选的 N/P 范围(1~20)也较小^[18-19]。PEI 的转染效率也与 LPEI-DNA 复合体聚合程度和转染条件密切相关,研究表明不同 PEI 溶剂、盐离子浓度、冻融、血清、细胞密度等均会影响 PEI 的转运核酸能力^[20-23]。LPEI 作为核酸传递载体具有生物安全性高、操作简便、安全廉价等优点,具有作为基因治疗中核酸传递工具的应用潜力。但 25 kDa LPEI 介导核酸转染的条件缺乏系统性研究,其介导核酸转染的条件需要进一步筛选优化,以提高其携带核酸进行细胞内传递的效率。因此,本研究在前人研究的基础上,以适用性和认可度更好的 25 kDa LPEI 作为试验材料,探究 N/P 比, LPEI 与 DNA 聚合时间,聚合 pH 对 LPEI-DNA 复合体聚合的影响,优化其对细胞转染的能力,为 LPEI 转染条件的完善及利用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 细胞与试剂

HEK293 T 细胞由中国科学院干细胞库提供; LPEI(25 kDa), Santa Cruz 公司; MTT, Sigma 公司; DMEM 和 F12 细胞培养基, Opti-MEM, 胎牛血清, Gibco 公司; 胰酶细胞消化液, Beyotime 公司; 100x 青霉素-链霉素溶液, Biosharp 公司; 绿色荧光基因质粒 pEGFP 由笔者所在实验室在 pCDNA3.1 载体中插入 EGFP 基因构建而成; DMSO, Sigma 公司; HBS 缓冲液(20 mmol/L), Hepes; 150 mmol/L NaCl(pH 值为 7.1), 其余试剂均为国产分析纯试剂。

1.2 核酸阻碍试验

聚合 N/P 比优化: 按照核苷酸中平均 330 Da 含 1 个 P, LPEI 中平均 43 Da 含 1 个 N, 以此计算不同 N/P 所需的 LPEI 和核酸量^[24]。用 HBS 缓冲液配制特定 N/P(0,1,2,3,4,6,8,10,20)的 LPEI, 经 0.22 μm 滤膜过滤后与质粒混合, 配制总体积为 20 μL 的 LPEI/DNA 混合液, 每份含 1 μg 质粒 pEGFP。上述混合液在室温下静置 30 min 后, 各取 5 μL 在 1% 琼脂糖凝胶上进行电泳, 电泳条件为 $1\times\text{TAE}$ 电泳缓冲液, 电压 5 V/cm, 电泳 10 min 用凝胶成像仪观察 DNA 条带的迁移并拍照。

1.3 聚合时间优化

用 HBS 缓冲液配制特定 N/P(0,1,2,3,4,6,8,10,12,16,20)的 LPEI 与质粒混合液, 分别静置 10 min, 30 min, 1 h, 2 h 后按照上述相同电泳条件进行凝胶电泳阻滞试验。

1.4 聚合 pH 优化

利用 1 mol/mL 的 NaOH 溶液与酸度计精确调整 HBS 缓冲液和 LPEI 溶液的 pH, 按 pH 值为 6, 6.5, 7, 7.5, 8 分为 5 个组, 每组分别配置 N/P 为 2, 4, 6 的 LPEI 与质粒混合液, 按照上述相同电泳条件进行凝胶电泳阻滞试验。

1.5 HEK293 T 细胞培养

HEK293 T 培养在含有双抗(青霉素 100 U/mL 和链霉素 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)和 10% 胎牛血清(FBS)的 DMEM/F12 培养液中。细胞培养条件: 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 , 饱和湿度条件下, 每 2 d 换液 1 次, 待细胞生长达 90% 汇合状态时用胰酶消化法传代细胞。将细胞密度调整至 2×10^5 个/mL, 以每孔 400 μL 细胞悬液接种 24 孔培养板, 培养 24~36 h, 细胞汇合度达到 80% 左右时用于转染试验。

1.6 转染效率检测

按照 N/P 比(0,1,2,6,10,20,30,40,60,80,100)每个处理 5 个平行孔。转染前细胞培养液换为 400 μL

Opti-MEM 培养基, 将且在 pH 值为 6 聚合 1 h 后的无菌 25 kDa LPEI 和 pEGFP 质粒(每孔的质粒量为 1 μ g)混合物滴加到对应的细胞孔中, 轻轻晃动使转染物分布均匀. 细胞继续培养 4 h 后换加 Opti-MEM 新鲜培养基, 48 h 后在荧光倒置显微镜下观察荧光细胞比例并拍照. 利用 Image-J 软件进行绿色荧光阳性细胞计数分析, 计算出转染效率.

$$\text{转染效率} = \text{绿色荧光阳性细胞数} / \text{总活细胞数} \times 100\%$$

1.7 MTT 检测

将 HEK293 T 细胞按照转染效率检测试验的操作和分组均等接种于 96 孔板中, 培养 24 h 后按照不同 N/P 比进行 LPEI 转染, 每孔 200 ng 质粒(方法同 1.6), 每个处理 5 个平行. 转染 48 h 后除去培养液, 在每孔中加入 20 μ L MTT 溶液(5 mg/mL)和 80 μ L 新鲜的 DMEM 培养基, 放入 37 $^{\circ}$ C 培养箱培养 4 h, 移除 MTT 溶液, 加入 150 μ L DMSO 溶解紫色甲瓞结晶, 用酶标仪在 570 nm 波长下测定每个孔的吸光度, 计算细胞存活率:

$$\text{细胞存活率} = \frac{\text{处理孔吸光度值} - \text{空白孔吸光度值}}{\text{对照组吸光度值} - \text{空白孔吸光度值}} \times 100\%$$

1.8 统计学分析

数据统计使用 SPSS 19, 方差齐性通过 Levene 方法检测, 并进行单因素方差分析(one-way ANOVA), Tukey's 检验进行事后多重检验. $p < 0.05$ 表示差异有统计学意义, 数据表示方法均为平均值 $\pm$ 标准差.

2 结 果

2.1 N/P 对 LPEI-DNA 复合物形成的影响

LPEI 和 DNA 通过静电相互作用结合形成 LPEI-DNA 复合物, 最终复合物正电性越高表明 LPEI 对 DNA 的凝聚效果越好, 越容易被细胞摄取^[1, 6]. LPEI-DNA 复合物所带电荷的差异可以通过电场迁移的差异加以体现, 复合物带正电荷增加会抑制或阻止质粒 DNA 在电场中的迁移. 本研究首先利用凝胶阻滞试验分析了不同 N/P 对 25 kDa LPEI 与质粒 DNA 复合物形成的影响. 结果显示, 随着 N/P 升高, 质粒 DNA 在琼脂糖凝胶电场中迁移能力逐渐受限且电泳条带变弱; 当 N/P 在 1~6 时, 部分质粒 DNA 在凝胶电场中迁移形成拖尾式亮带, 当 N/P 超过 6 以后, 质粒 DNA 甚至被完整滞留在电泳胶孔中(图 1). 表明 25 kDa LPEI 相对于质粒 DNA 的量越多, 起到的 DNA 凝聚效果越好.

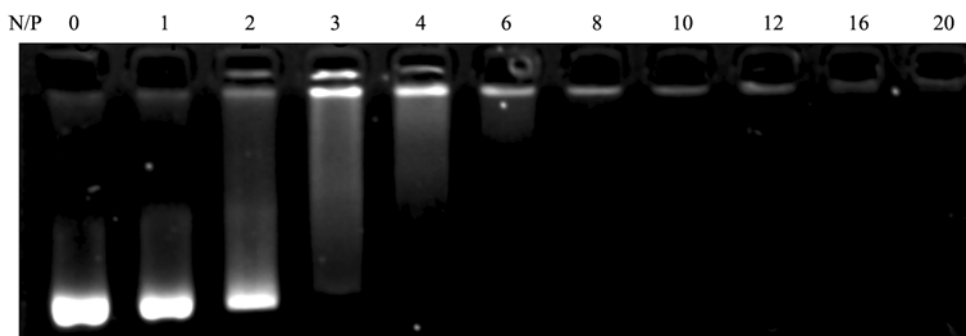


图 1 不同 N/P 的 LPEI-DNA 复合物琼脂糖凝胶电泳图

2.2 聚合时间对 LPEI-DNA 复合物形成的影响

本研究在不同 N/P 条件下利用琼脂糖凝胶电泳分析了 LPEI 和质粒 DNA 共孵育时间对 LPEI-DNA 复合物形成的影响. 结果显示, 当 LPEI 与质粒 DNA 孵育 10 min 进行电泳分析发现, N/P 小于 4 时均未发现明显的核酸阻滞现象. 当 N/P 在 4~10 时仅有微弱核酸阻滞现象, 表明质粒 DNA 没有充分与 LPEI 结合(图 2a); 当 LPEI 与质粒 DNA 孵育时间延长至 30 min 时 LPEI 与质粒 DNA 结合更加充分, N/P 大于 8 时 DNA 在电场中的迁移完全被阻滞(图 2b); 当 LPEI 与质粒 DNA 孵育时间延长至 60 min,

LPEI-DNA 复合物聚合率达到最大, 而孵育至 120 min 时相较于 60 min 泳道出现更严重的拖尾现象(图 2c,d)。以上数据表明, LPEI 与质粒 DNA 共孵育时间会显著影响 LPEI-DNA 复合物的形成及稳定性, 在共孵育 60 min 前随着共孵育时间延长 LPEI-DNA 复合物稳定性增强, 且能达到 LPEI-DNA 最高的结合效果; 共孵育时间 30~60 min 时, 最有利于 LPEI-DNA 复合物的形成, 进一步延长聚合时间反而使 LPEI-DNA 复合物稳定性减弱。

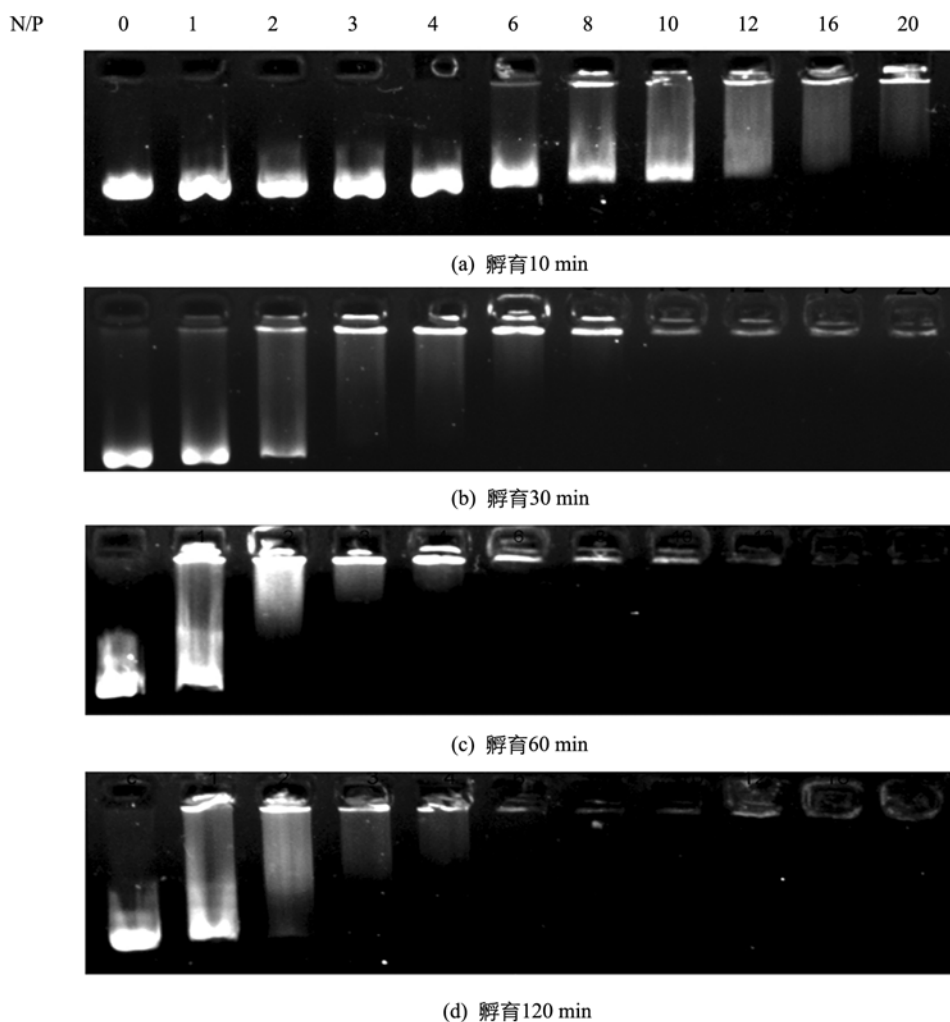


图 2 不同聚合时间下 LPEI-DNA 复合物琼脂糖凝胶电泳图

2.3 pH 对 LPEI-DNA 复合物形成的影响

由于 LPEI-DNA 复合物是通过电荷互作形成的, 因此 LPEI 与 DNA 共孵育的溶液 pH 可能是影响 LPEI-DNA 复合物形成的重要影响因素。本研究通过琼脂糖凝胶电泳阻滞试验分析了不同 pH 条件下 LPEI 与质粒 DNA 聚合规律。结果显示, 当 N/P 为 2 时, 随着 pH 的升高 DNA 在胶孔中滞留减少(图 3); 当 N/P 为 4 和 6 时, 不同 pH 条件下的 LPEI-DNA 复合物大部分滞留在胶孔中, 但同样随着 pH 上升泳道核酸逃逸增多(图 3)。以上结果表明, 随着 pH 的升高 LPEI 聚合 DNA 的能力逐渐下降, 而且随着 N/P 升高 pH 对 LPEI-DNA 复合物形成的影响逐渐减弱。

2.4 N/P 对 LPEI 介导的 DNA 转染效率的影响

为了优化 LPEI 介导的细胞内 DNA 传递, 本研究结合已有的筛选结果, 确定 LPEI 和质粒 DNA 孵育时间为 1 h, 孵育的 pH 值为 6, 进一步筛选 N/P 对 LPEI 介导的 DNA 转染效率及细胞毒性的影响。本研究将不同 N/P 的 LPEI-绿色荧光基因质粒(pEGFP)对 HEK293 T 细胞进行转染, 48 h 后通过在荧光显微镜下观察转染阳性细胞率, 即绿色荧光蛋白表达情况, 同时利用 MTT 法分析了 LPEI 对细胞活性的影响。

结果显示, $N/P < 6$ 时几乎没有绿色荧光信号(图 4a 至图 4c); N/P 超过 10 后绿色荧光细胞数量极显著增加($p < 0.01$), 并随着 N/P 升高绿色荧光细胞数量逐渐增多, 转染效率在 N/P 为 60 达到峰值, 随后有所下降(图 4d 至图 4k); LPEI 对细胞活力影响的分析结果显示, 随着 N/P 的升高细胞相对活力呈逐渐下降趋势(图 4l). 当 N/P 达到 30 时, 细胞活力相对于对照组极显著下降($p < 0.01$), 当 N/P 达到 60 时, 细胞活力进一步极显著下降($p < 0.01$), 并能观察到被转染细胞出现大量悬浮和死亡的现象.

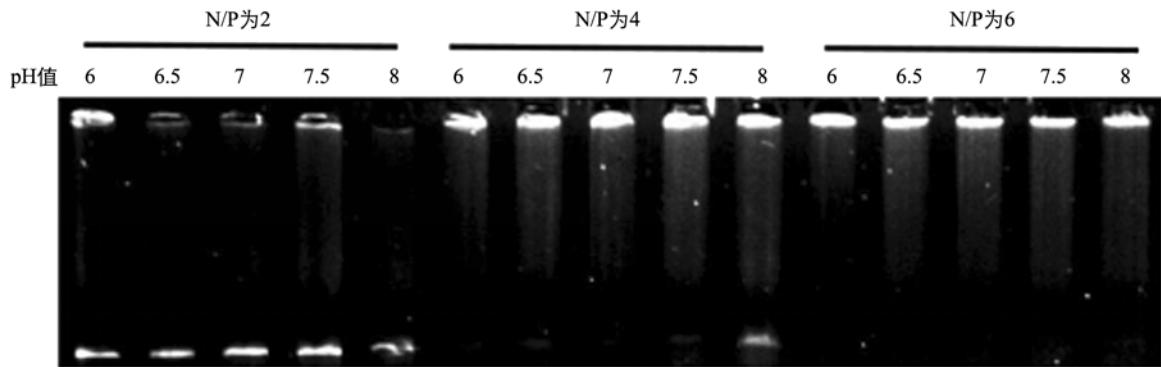


图 3 不同聚合 pH 下 N/P 为 2, 4, 6 的 LPEI-DNA 复合物琼脂糖凝胶电泳图

以上结果表明, 随着 N/P 的上升转染效率呈先升高后降低的趋势, 当 N/P 很低时(N/P 为 0~6), LPEI 无法有效向细胞内传递核酸; 当 N/P 为 40~60 时, 最有利于 25 kDa LPEI 向细胞传递核酸, 而进一步升高 N/P 会造成游离 LPEI 增加, 产生细胞毒性作用, 造成大量细胞死亡.

3 讨 论

25 kDa LPEI 是一种有效的核酸和药物传递载体, 制备方便, 价格低廉, 其核酸转染功能被广泛应用^[25-26]. 为了更有效地利用 25 kDa LPEI 这一核酸转染工具, 本研究通过凝胶阻滞试验研究 N/P , LPEI 与 DNA 聚合 pH, 聚合时间对 25 kDa LPEI 聚合 DNA 能力的影响, 并通过细胞转染试验研究了大范围 N/P 对 LPEI 介导的 DNA 转染效率及细胞毒性的影响.

PEI 聚合核酸的能力与其化学骨架中携带阳离子的胺基量密切相关. 有研究表明, 胺基相对于核酸的量, 即 N/P 升高时, PEI 与核酸形成的正电复合体表面电势变大, 粒径变小, PEI 对核酸的吸附和压缩能力增强^[24]. 本研究中不同 N/P 的 25 kDa LPEI-DNA 复合物凝胶阻滞试验表明, 随着 N/P 的增加, 核酸在电泳中受到的阻滞作用越强. 当 N/P 较高时, 核酸在琼脂糖凝胶中的迁移被完全抑制. 表明 N/P 的增加有助于 25 kDa LPEI 对核酸的聚合及阳离子化, 这符合大多数 PEI 或修饰性 LPEI 传递核酸的规律^[27-28].

本研究中不同聚合时间下 25 kDa LPEI-DNA 复合物凝胶阻滞试验表明, 25 kDa LPEI 与 DNA 共孵育 10 min 无法有效形成稳定的 LPEI-DNA 复合物, 而在共孵育 60 min 时 LPEI 与 DNA 聚合达到饱和, 120 min 时出现核酸逃逸现象. 表明 25 kDa LPEI 与核酸聚合反应时间低于 10 min 或超过 1 h 均不利于形成 LPEI-DNA 复合物, 最适聚合时间为 1 h. 研究表明 22 kDa LPEI 与 DNA 共孵育时间过长, LPEI-DNA 复合物粒径将迅速变大, 并逐渐趋于不稳定^[29-30].

PEI 与核酸共孵育环境可以通过离子强度、渗透压来影响聚合物表面电势及粒径^[31-32]. 本研究中不同聚合 pH 下 25 kDa LPEI 和 DNA 复合物凝胶阻滞试验表明, 较低的 pH 有利于 LPEI 对核酸聚合, 最适聚合 pH 值为 6. 有研究报道酸性条件可以增加 PEI 电势, 但对细胞转染效率无显著影响^[33]. 本文推测尽管 pH 的降低有利于 LPEI 对核酸的聚合, 但聚合过程中 LPEI 的 H^+ 过度富集导致 LPEI 阳离子缓冲性减弱, 最终可能影响 LPEI-DNA 复合物逃逸溶酶体, 这一推测还需研究验证.

研究表明阳离子载体的质子缓冲能力越强其对细胞的核酸递送能力越强, 而前人研究已表明 LPEI 的质子缓冲能力与 N/P 密切相关^[1,34]. 本研究中不同 N/P 对 HEK293 T 细胞的转染试验表明, N/P 小于 10 时 LPEI 难以介导核酸转染, 随 N/P 升高转染效率逐渐增强, 在 N/P 为 60 时转染阳性细胞达到峰

值, 这与人得出的 PEI, BPEI, 10 kDa LPEI 的最佳转染 N/P 为 6~10 的结论有所不同, 本文推测这可能与试验采用的 LPEI 分子以及聚合条件不同有关, 同时前人试验中认为 LPEI 的毒性过强会影响转染效率导致 N/P 的筛选范围过小^[28,35-36]。

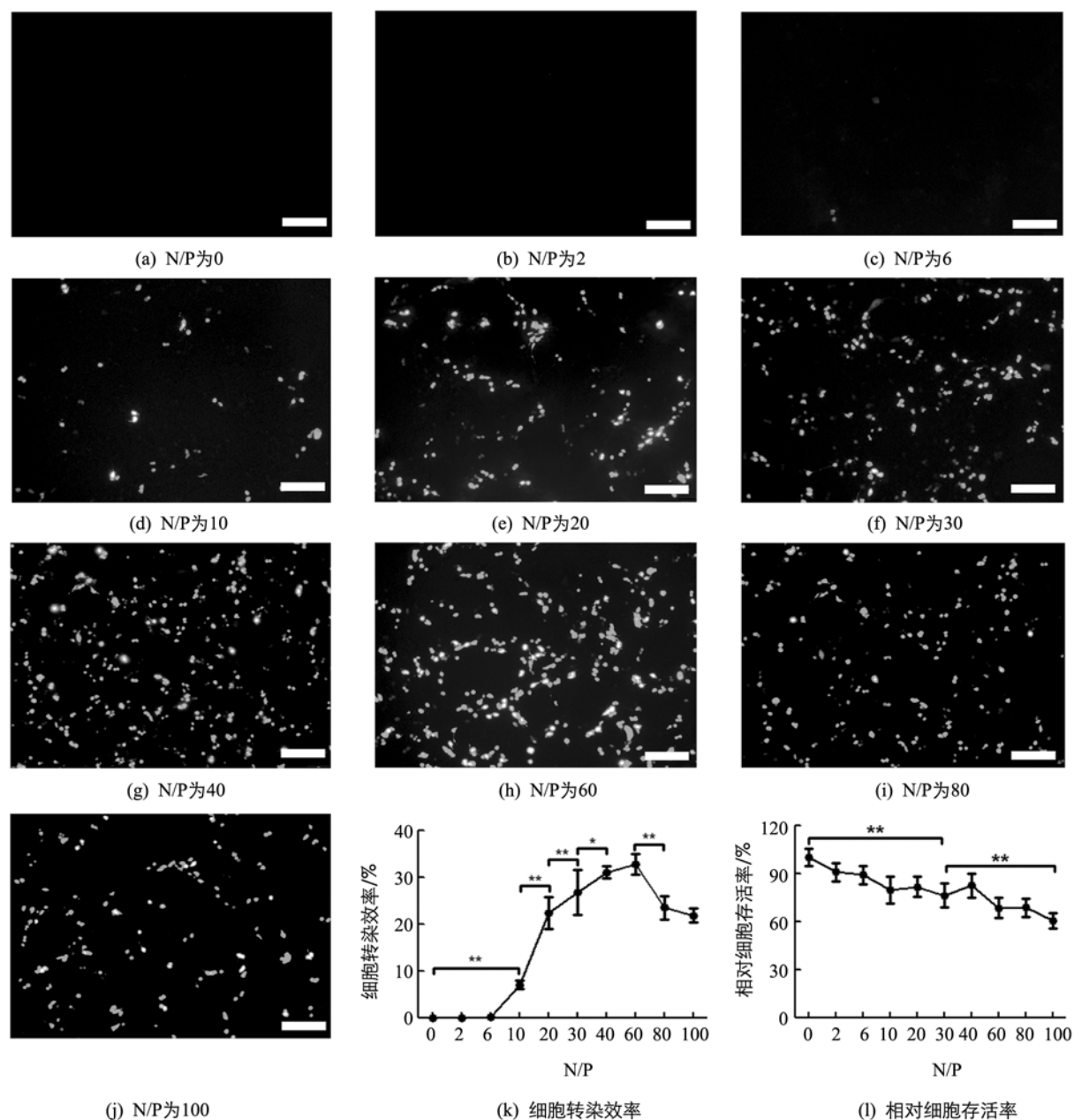


图 4 不同 N/P 的 LPEI-DNA 转染 HEK293 T 细胞 48 h 后细胞荧光图

一定浓度的游离 LPEI 可在细胞表面吸附和聚集引起膜结构的融合、改变, 也可以渗透入核造成 DNA 损伤, 最终导致细胞死亡, 而 DNA 与 LPEI 聚合后反而会降低毒性, 因此恰当的 N/P 选择对细胞活率尤为重要^[34,37]。有研究表明, 细胞毒性过大, 进而造成细胞死亡降低转染效率^[38]。而本研究显示, 随 N/P 增加细胞毒性增大, 当 N/P 大于 60 后转染效率下降, 但细胞活率变化不明显, 表明转染效率的降低与细胞毒性的增加没有相关性。本研究还推测 N/P 过大造成转染效率降低的原因可能是过量 LPEI 过度结合 DNA, 导致 DNA 无法脱离 LPEI-DNA 复合体, 从而 DNA 难以进入细胞核表达, 这一推测还需研究验证。本研究表明, 满足转染效率的同时并结合细胞活率筛选确定 N/P 为 40~60 可能是细胞转染的最佳 N/P 范围。

除此之外,科学家还通过对 LPEI 进行修饰、交联、螯合等不同方式提高转染效率或降低细胞毒性^[39-41]。随着 LPEI 优化研究的不断深入,多项研究表明该系统具有治疗肝癌、结肠癌、膀胱癌等重大疾病的重大潜力^[42-44]。本研究对 25 kDa LPEI 介导核酸转染的优化以及合适转染 N/P 范围的筛选能为后续生物学与基因治疗研究提供参考依据以及应用基础。

参考文献:

- [1] ELSABAHY M, NAZARALI A, FOLDVARI M. Non-Viral Nucleic Acid Delivery: Key Challenges and Future Directions [J]. *Curr Drug Deliv*, 2011, 8(3): 235-244.
- [2] WILLIFORD J, ARCHANG M, MINN I, et al. Critical Length of PEG Grafts on LPEI/DNA Nanoparticles for Efficient in Vivo Delivery [J]. *ACS Biomater Sci Eng*, 2016, 2(4): 567-578.
- [3] GOYAL R, TRIPATHI S K, TYAGI S, et al. Linear PEI Nanoparticles: Efficient pDNA/siRNA Carriers in Vitro and in Vivo [J]. *Nanomedicine-Uk*, 2012, 8(2): 167-175.
- [4] TANG M X, REDEMANN C T, SZOKA F J. In Vitro Gene Delivery by Degraded Polyamidoamine Dendrimers [J]. *Bioconjug Chem*, 1996, 7(6): 703-714.
- [5] BOUSSIF O, LEZOUALC'H F, ZANTA M A, et al. A Versatile Vector for Gene and Oligonucleotide Transfer Into Cells in Culture and in Vivo: Polyethylenimine [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, 92(16): 7297-7301.
- [6] GODBEY W T, WU K K, MIKOS A G. Poly(Ethylenimine) and Its Role in Gene Delivery [J]. *J Control Release*, 1999, 60(2-3): 149-160.
- [7] PATTI A, JENNIFER M, MIN-SUNG K, et al. Transient Mammalian Cell Transfection with Polyethylenimine (PEI) [J]. *Methods Enzymol*, 2013, 529: 227-240.
- [8] PACK D W, HOFFMAN A S, PUN S, et al. Design and Development of Polymers for Gene Delivery [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2005, 4(7): 581-593.
- [9] KASPER J C, SCHAFFERT D, OGRIS M, et al. Development of a Lyophilized Plasmid/LPEI Polyplex Formulation with Long-Term Stability-A Step Closer from Promising Technology to Application [J]. *J Control Release*, 2011, 151(3): 246-255.
- [10] FISCHER D, BIEBER T, LI Y, et al. A Novel Non-Viral Vector for DNA Delivery Based on Low Molecular Weight, Branched Polyethylenimine: Effect of Molecular Weight on Transfection Efficiency and Cytotoxicity [J]. *Pharm Res*, 1999, 16(8): 1273-1279.
- [11] 曹慧玲, 曹慧玲, 滕凤猛, 等. PEI 与脂质体介导基因转染的比较研究 [J]. *国际检验医学杂志*, 2015(3): 328-330.
- [12] GODBEY W T, WU K K, MIKOS A G. Size Matters: Molecular Weight Affects the Efficiency of Poly(Ethylenimine) as a Gene Delivery Vehicle [J]. *J Biomed Mater Res*, 1999, 45(3): 268-275.
- [13] NEU M, FISCHER D, KISSEL T. Recent Advances in Rational Gene Transfer Vector Design Based on Poly(Ethylene Imine) and Its Derivatives [J]. *J Gene Med*, 2005, 7(8): 992-1009.
- [14] GODBEY W T, WU K K, MIKOS A G. Size Matters: Molecular Weight Affects the Efficiency of Poly(Ethylenimine) as a Gene Delivery Vehicle [J]. *J Biomed Mater Res*, 1999, 45(3): 268-275.
- [15] NEU M, FISCHER D, KISSEL T. Recent Advances in Rational Gene Transfer Vector Design Based on Poly(Ethylene Imine) and Its Derivatives [J]. *J Gene Med*, 2005, 7(8): 992-1009.
- [16] BRISSAULT B, KICHLER A, GUIZ C, et al. Synthesis of Linear Polyethylenimine Derivatives for DNA Transfection [J]. *Bioconjug Chem*, 2003, 14(3): 581-587.
- [17] VON HARPE A, PETERSEN H, LI Y, et al. Characterization of Commercially Available and Synthesized Polyethylenimines for Gene Delivery [J]. *J Control Release*, 2000, 69(2): 309-322.
- [18] 余冰菲, 张 垚, 陈瑞川, 等. 线性与分枝状聚乙烯亚胺介导基因体外转染的比较与研究 [J]. *厦门大学学报(自然科学版)*, 2008, 47(2): 36-39.
- [19] 王春晓, 林 超, 赵 鹏, 等. 生物还原响应的葡聚糖修饰的线性聚乙烯亚胺基因释放载体的研究 [J]. *青岛科技大学学报(自然科学版)*, 2015, 36(6): 605-611.

- [20] 谈娟,郝朋,张喜慧,等. 非病毒载体聚乙烯亚胺介导DNA转染的研究[J]. 医学分子生物学杂志, 2007(3): 229-233.
- [21] MERKEL O M, ZHENG M, DEBUS H, et al. Pulmonary Gene Delivery Using Polymeric Nonviral Vectors [J]. Bioconjug Chem, 2012, 23(1): 3-20.
- [22] 李经忠,王青青,余海,等. 聚乙烯亚胺转基因影响因素的测定及其优化[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2004(2): 234-240.
- [23] MERKEL O M, ZHENG M, DEBUS H, et al. Pulmonary Gene Delivery Using Polymeric Nonviral Vectors [J]. Bioconjug Chem, 2012, 23(1): 3-20.
- [24] AHN C H, CHAE S Y, BAE Y H, et al. Biodegradable Poly(Ethylenimine) for Plasmid DNA Delivery [J]. J Control Release, 2002, 80(1-3): 273-282.
- [25] 黄红辉,朱世诚,董国萍,等. 运用CRISPR/Cas9技术对斑马鱼前肾表达基因的敲除研究[J]. 西南大学学报(自然科学版), 2017, 39(5): 54-61.
- [26] ZHOU Z, MURDOCH W J, SHEN Y. A Linear Polyethylenimine (LPEI) Drug Conjugate with Reversible Charge to Overcome Multidrug Resistance in Cancer Cells [J]. Polymer, 2015, 76: 150-158.
- [27] ZHANG B, XINPENG M, SUI M, et al. Guanidinoamidized Linear Polyethyleneimine for Gene Delivery [J]. Chinese Journal of Polymer Science, 2015, 33(6): 908-919.
- [28] 李经忠,王青青,余海. 新型非病毒载体聚乙烯亚胺介导基因转染参数的研究[J]. 中国生物医学工程学报, 2006(4): 481-487.
- [29] 王春晓,林超,赵鹏,等. 生物还原响应的葡聚糖修饰的线性聚乙烯亚胺基因释放载体的研究[J]. 青岛科技大学学报(自然科学版), 2015, 36(6): 605-611.
- [30] 谈娟,郝朋,张喜慧,等. 非病毒载体聚乙烯亚胺介导DNA转染的研究[J]. 医学分子生物学杂志, 2007, 4(3): 229-233.
- [31] 刘少娇,李巍巍,杨黎明,等. PEI介导的大规模基因瞬时转染研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2015, 15(1): 145-148.
- [32] STATHOPOULOS P B, ZHENG L, LI G Y, et al. Structural and Mechanistic Insights Into STIM1-Mediated Initiation of Store-Operated Calcium Entry [J]. Cell, 2008, 135(1): 110-122.
- [33] BOUSSIF O, LEZOUALC'H F, ZANTA M A, et al. A Versatile Vector for Gene and Oligonucleotide Transfer Into Cells in Culture and in Vivo: Polyethylenimine [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995, 92(16): 7297-7301.
- [34] GODBEY W T, WU K K, MIKOS A G. Poly(Ethylenimine) and Its Role in Gene Delivery [J]. Netherlands: Elsevier B V, 1999, 60: 149-160.
- [35] GOYAL R, TRIPATHI S K, TYAGI S, et al. Linear PEI Nanoparticles: Efficient pDNA/siRNA Carriers in Vitro and in Vivo [J]. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 2012, 8(2): 167-175.
- [36] ZHANG B, MA X, SUI M, et al. Guanidinoamidized Linear Polyethyleneimine for Gene Delivery [J]. Chinese J Polym Sci, 2015, 33(6): 908-919.
- [37] FISCHER D, BIEBER T, LI Y, et al. A Novel Non-Viral Vector for DNA Delivery Based on Low Molecular Weight, Branched Polyethylenimine: Effect of Molecular Weight on Transfection Efficiency and Cytotoxicity [J]. Pharm Res, 1999, 16(8): 1273-1279.
- [38] OMIDI Y, KAFIL V. Cytotoxic Impacts of Linear and Branched Polyethylenimine Nanostructures in A431 Cells [J]. BioImpacts, 2011, 1(1): 23-30.
- [39] SUN Q, RADOSZ M, SHEN Y. Challenges in Design of Translational Nanocarriers [J]. J Control Release, 2012, 164(2): 156-169.
- [40] CADETE A, ALONSO M J. Targeting Cancer with Hyaluronic Acid-Based Nanocarriers: Recent Advances and Translational Perspectives [J]. Nanomedicine (Lond), 2016, 11(17): 2341-2357.
- [41] PINNAPIREDDY S R, DUSE L, STREHLOW B, et al. Composite Liposome-PEI/Nucleic Acid Lipopolyplexes for Safe and Efficient Gene Delivery and Gene Knockdown [J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2017, 158: 93-101.

- [42] URNAUER S, MULLER A M, SCHUG C, et al. EGFR-Targeted Nonviral NIS Gene Transfer for Bioimaging and Therapy of Disseminated Colon Cancer Metastases [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(54): 92195-92208.
- [43] URNAUER S, KLUTZ K, GRÜNWALD, GEOFFREY K, et al. Systemic Tumor-Targeted Sodium Iodide Symporter (NIS) Gene Therapy of Hepatocellular Carcinoma Mediated by B6 Peptide Polyplexes [J]. *The Journal of Gene Medicine*, 2017.
- [44] SIDI AA, OHANA P, BENJAMIN S, et al. Phase I/II Marker Lesion Study of Intravesical BC-819 DNA Plasmid in H19 Over Expressing Superficial Bladder Cancer Refractory to Bacillus Calmette-Guerin [J]. *J Urol*, 2008, 180(6): 2379-2383.

Optimization of DNA Transfection Mediated by Linear Polyethylenimine (LPEI)

MA Xing-yu, YE Guo-geng, QIAO Bing-ke,
ZHAO Jian-jun, LIU An-fang

School of Animal Science, Southwest University, Rongchang Chongqing 402460, China

Abstract: Linear polyethylenimine (LPEI) is a cationic polymer which is widely used for nucleic acid transfection and drug transport. In order to further explore the transfection conditions of 25 kDa LPEI, gel retardation assay was used to investigate the combined effect of N/P, co-incubation time of LPEI and DNA and co-incubation pH of LPEI-DNA on the formation of LPEI-DNA complex in this research. Then HEK293 T cell was used to transfect the 25 kDa LPEI with a GFP expression plasmid in a wide range of N/P, and the transfection efficiency and cytotoxicity were assessed with statistic analysis of fluorescent cell percent and MTT after 48-h transfection. The results showed that the gel retardation of LPEI-DNA increased with N/P, LPEI-DNA polymerization gradually decreased with the increase of co-incubation pH from 6 to 8, and LPEI-DNA polymerization gradually increased with the extension of co-incubation time and reached saturation at 1 h. With the increase of N/P in in vitro transfected HEK293 T cells, the proportion of transfected positive cells gradually increased. When N/P reached 40-60, the transfection efficiency reached the maximum. With further increase in N/P, the transfection efficiency sharply decreased ($p < 0.01$). The cell viability gradually decreased with increasing N/P. Conclusion: N/P, polymerization pH and polymerization time all affected the ability of 25 kDa LPEI to polymerize nucleic acid. Considering the effect of N/P on HEK293 T cell transfection efficiency and cytotoxicity, the optimal conditions for 25 kDa LPEI transfection were N/P=40-60, polymerization pH=6.0, and polymerization time =1 h.

Key words: linear polyethylenimine; nucleic acid polymerization; in vitro transfection

责任编辑 周仁惠