

猪精子细胞电穿孔及 DNA 转染的新途径*

张弘¹ 王保义¹ 刘长军¹ 王子淑²

1 四川大学电子信息学院 成都 610064

2 四川大学生命科学学院 成都 610064

用动物精子作为外源 DNA 载体已成为转基因的主要方法之一，外源 DNA 通过精子导入后代，有可能简化转基因动物的生产。目前转基因最普遍采用的是微注射法，但其技术要求高、实验设备昂贵、效率低，导致生产成本高。因而寻找一种简单、高效的转基因方法具有重要的意义。

而电穿孔法是促进 DNA 与动物精子结合的一种重要方法。电穿孔法利用高压电场使精子质膜产生暂时性孔洞，从而使外源 DNA 比较容易地进入细胞内。此法用于牛精子和猪精子可使精子摄取 DNA 的数量增加 5~10 倍，体外受精后经 PCR 技术分析有 22%左右的胚胎携带外源基因。在这些报道的电穿孔法中采用的电脉冲由于脉冲幅度很高，都不可避免地会对精子细胞造成损伤，降低其活力。若能在低强度电磁脉冲作用下，精子细胞也能发生电穿孔，则具有更大的意义。

这里采用千兆赫兹横电磁波传输室（GTEM 室）对猪精子细胞进行照射。该系统可以同时处理大量的样品。采用的脉冲信号为矩形脉冲，脉宽 100ns，重复频率 300Hz，幅度 187V，样品所在处场强约 20V/cm。将 GTEM 室内的温度控制在 37℃±0.5℃。

猪精液在照射 20min 和 60min 后，通过台盼蓝染色均能看到一些精子头部有台盼蓝进入形成的深兰色颗粒，而无精子被全染色。在对照组中则无精子被染色，这说明经过照射后的精子有电穿孔出现，因而台盼蓝分子通过细胞膜上的孔进入细胞内，同时细胞仍存活。台盼蓝的透入率约为 5%，该透入率与处理时间无明显差异。

通过扫描电镜观察在各组样品中均发现在精子的头、颈部有明显的穿孔现象，孔径约 0.3~0.6 μm，且穿孔率与照射时间无明显差异。而对照组中没有发现穿孔。

本实验的研究结果表明，低幅度的瞬态电脉冲能对猪精子细胞形成电穿孔，其穿孔的孔径能导入 DNA 类的大分子，这在过去低幅度电磁脉冲对动物血细胞电穿孔以及对真核和原核生物细胞成功地实现了电穿孔的基础上又进了一步。由于精子的结构比较特殊，精子分头、颈、尾三部分，其头部包括顶体和细胞核，而在顶体前端和外侧还有一个头帽，此头帽盖住了顶体和核的前半部，精子外部有一层质膜，其独特的结构能保护其遗传物质不易受外界因素的影响，使其电穿孔较为困难，这也是导致其电穿孔几率很小的一个重要原因。尤其是采用低幅度的电脉冲照射而使其发生电穿孔还未见报道。这为精子介导外源 DNA 转移提供了一条新的途径。由于采用的电场强度很低，具有独特的优势，操作者随时可将手放入 GTEM 室中进行操作，而不会对人体造成损伤。本方法简便、安全，可以保证精子具有很高的存活率，有利于精子作为载体将外源 DNA 导入后代，产生转基因动物。若能找到各种细胞在低幅度电脉冲作用下的最佳穿孔条件，进一步提高穿孔率，则具有更广泛的应用前景。

* 国家自然科学基金资助项目 编号 60071024