

EGFP 报告基因 PiggyBac 载体在三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞系电转染条件优化

王佩佩^{1,2}, 章笑甜¹, 凌志明¹, 王文娟¹, 刘秀盈¹, 王建勋^{1,3} (1. 北京中医药大学生命科学院, 北京 102488; 2. 中国医学科学院肿瘤医院山西医院, 太原 030000; 3. 深圳北京中医药大学研究院, 广东深圳 518118)

摘要: **目的** 设置不同电转染条件, 探讨含增强型绿色荧光蛋白 (EGFP) 报告基因稳定转入人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 细胞的优化条件。 **方法** 构建含 EGFP 报告基因的 PiggyBac (PB) 转座子系统, 并控制电转染 MDA-MB-231 细胞时的波形、电压、电击时间、电击次数、质粒浓度、细胞密度、转座子与转座酶比例等转染条件, 采用流式细胞术荧光异硫氰酸荧光素 (FITC) 通道检测其转染效率, 并于激光扫描共聚焦显微镜下观察荧光蛋白表达情况, 验证 EGFP 报告基因电转染效率与表达情况, 分析不同电转染条件下 MDA-MB-231 细胞的电转效率。 **结果** MDA-MB-231 细胞的电转染优化条件为电压 280V, 波形为指数波, 电击 1 次, 转座子质粒浓度 1 000 ng/ μ l 左右, 转座子比转座酶质量比例 1:1, 细胞数量为 2×10^6 个, 电转染率可达 $60.23\% \pm 5.63\%$, 且 MDA-MB-231 细胞状态良好。 **结论** 成功优化 MDA-MB-231 细胞的电转染条件, 达到稳定高效转染, 为 MDA-MB-231 细胞株的相关基础研究提供高效电转实验参数。

关键词: 三阴性乳腺癌; 电转染; MDA-MB-231; PiggyBac 转座子

中图分类号: R737.9; R730.43 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2025) 03-189-06

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2025.03.035

Optimization of Electroporation Conditions of EGFP Reporter Gene PiggyBac Vector in Triple Negative Breast Cancer MDA-MB-231 Cell Line

WANG Peipei^{1,2}, ZHANG Xiaotian¹, LING Zhiming¹, WANG Wenjuan¹, LIU Xiuying¹, WANG Jianxun^{1,3}
(1. School of Life Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China; 2. Shanxi Hospital, Cancer Hospital of Chinese Academy of Medical Sciences, Taiyuan 030000, China; 3. Shenzhen Research Institute, Beijing University of Chinese Medicine, Guangdong Shenzhen 518118, China)

Abstract: **Objective** To explore the optimal conditions for stable transfer of reporter gene containing enhanced green fluorescent protein (EGFP) into human breast cancer cells MDA-MB-231 cells under different electroporation conditions. **Methods** A PiggyBac (PB) transposon system containing EGFP reporter gene was constructed, and transfection conditions such as waveform, voltage, shock time, shock times, plasmid concentration, cell density, transposon to transposase ratio were controlled during electroporation of MDA-MB-231 cells. The transfection efficiency was detected by flow cytometry fluorescein isothiocyanate (FITC) channel. The expression of fluorescent protein was observed under laser scanning confocal microscope, the electroporation efficiency and expression of EGFP reporter gene were verified, and the electroporation efficiency of MDA-MB-231 cells was analyzed under different electroporation conditions. **Results** The optimal transfection conditions of MDA-MB-231 cells were as follows: voltage 280V, exponential wave, electric shock once, concentration of transposon plasmid about 1 000 ng/ μ l, mass ratio of transposon to transposase 1:1, number of cells 2×10^6 , electroporation rate up to $60.23\% \pm 5.63\%$. The state of MDA-MB-231 cells was good. **Conclusion** The electroporation conditions of MDA-MB-231 cells were successfully optimized to achieve stable and efficient transfection, which provided efficient electroporation experimental parameters for the relevant basic research of MDA-MB-231 cell line.

Keywords: triple-negative breast cancer; electroporation; MDA-MB-231; PiggyBac transposon

三阴性乳腺癌 (triple-negative breast cancer, TNBC) 是乳腺癌的一种亚型, 约占乳腺癌诊断的 15% ~ 20%^[1], 其定义为缺乏雌激素受体 (estrogen receptor, ER)、孕激素受体 (progesterone recep-

tor, PR) 和人表皮生长因子受体-2 (HER2) 的表达^[2-3]。与其他乳腺癌亚型相比, TNBC 更具侵袭性, 发生复发和转移的可能性更大, 预后较差, 患者的生存率较低^[4-7]。MDA-MB-231 细胞系是一种人类

基金项目: 北京中医药大学高层次人才科研启动经费项目 (批准号: 9011451310032)。

作者简介: 王佩佩 (1993-), 女, 博士, 研究员, 研究方向: 肿瘤免疫治疗, E-mail: 1974333166@qq.com。

章笑甜 (1999-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 肿瘤免疫治疗, E-mail: zhangxiaotian0821@163.com。共同第一作者。

通讯作者: 王建勋 (1973-), 男, 美籍, 特聘教授, 博士生导师, 研究方向: 肿瘤免疫治疗, E-mail: jianxun.wang@bucm.edu.cn。

乳腺癌细胞系，为 TNBC 细胞系，是从一名白人女性乳腺癌患者的胸腔积液中分离建立的，通常用于研究 TNBC 的生物学特性和治疗方法。

细胞基因工程是探讨某特定基因表达调控的重要方法，其中细胞转染是其关键技术之一^[8-10]，可用于基因功能研究、调控基因表达、突变分析和蛋白质生产等生物学试验服务中。电穿孔转染是一种高效且简便的基因转移系统，可用于将外源基因如 DNA，RNA，蛋白、染料及病毒颗粒等导入至原核和真核细胞内，借助不同载体达到稳定转染和瞬时转染的效果^[11-12]。但多个因素影响电转染效率，不同细胞的最佳电转染的优化条件不同，为明确目前常用 TNBC 细胞系 MDA-MB-231 转染条件，本次实验通过摸索含 EGFP 报告基因的 PB 载体电转染条件，优化 MDA-MB-231 细胞系的电转参数，且含 EGFP 报告基因的细胞系可为基础实验研究提供精准高效、简便快捷的定量标准。

1 材料与方法

1.1 研究对象

1.1.1 菌株：大肠埃希菌感受态菌株 DH5 α （南京诺唯赞生物科技股份有限公司）。

1.1.2 质粒及细胞：PB-EF1 α -SV40polyA 转座子质粒，PB 转座酶质粒由中国农业大学吴森教授课题组惠赠；MDA-MB-231 细胞系（美国模式培养物集存库）。

1.2 仪器与试剂

1.2.1 主要试剂：Leibovitz's L-15 培养液（江苏凯基生物科技股份有限公司）；Opti-MEMTM I 减血清培养液（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）；胶回收试剂盒、质粒小提试剂盒（南京诺唯赞生物科技股份有限公司）；中量质粒提取试剂盒（德国 QIAGEN 公司）；Kpn I 限制性内切酶，BamH I 限制性内切酶 [美国 NEW ENGLAND Biolabs（NEB）公司] 。

公司）；中量质粒提取试剂盒（德国 QIAGEN 公司）；Kpn I 限制性内切酶，BamH I 限制性内切酶 [美国 NEW ENGLAND Biolabs（NEB）公司] 。

1.2.2 主要仪器：电转仪（BIO-RAD Gene Pulser XcellTM），0.4cm 电转杯，荧光分子成像系统（美国 Bio-RAD 公司），倒置荧光显微镜（日本 Olympus 公司），流式细胞仪（美国 Beckman Coulter）；细胞计数仪（美国 Thermo Fisher Scientific 公司），微量核酸测定仪（美国 Molecular Devices 公司）。

1.3 方法

1.3.1 增强型绿色荧光蛋白 -piggyBac（enhanced green fluorescent protein-piggyBac，EGFP-PB）转座子质粒载体构建：使用 Kpn I 和 BamH I 限制性内切酶进行双酶切，获得线性化 PB 转座子载体片段，根据 EGFP 目的基因序列，使用 <https://crm.vazyme.com/cetool/simple.html> 设计引物 EGFP-For：5'-GTC-GATCGACGGTACCTAGCCACCATGGTGAGG-CAAGGGCGAG-3'，EGFP-Rev：5'-GGATCCCTTG-TACAGCTCGTCCATGCC-3'。以本实验室现有质粒 pLenti-EGFP 为模板进行聚合酶链式反应（PCR），使用分子克隆技术进行载体和目的片段连接、重组、转化及测序，构建成 pB-EF1 α -EGFP-SV40polyA，测序正确后扩增菌液，提取质粒，使用紫外分光光度计测定质粒浓度和纯度。

1.3.2 优化 MDA-MB-231 细胞电转染条件：哺乳动物细胞电转染使用 0.4cm 电击杯，设置基础电转染参数：波形为指数波，电击电压为 260V，PB 转座子质粒浓度为 1 000ng/ μ l，转座子与转座酶质量均为 6 μ g，细胞数量为 1 $\times$ 10⁶ 个，电击次数 1 次。优化基础电转染参数的转染条件，见表 1。

表 1 电转染参数优化

优化条件		优化参数							
波形		方波				指数波			
电压（V）	200	220	240			260	280	300	
电击时间（ms）		20					10		
质粒浓度（ng/ μ l）	500		1 000			2 000		3 000	
细胞数量（个）		1 $\times$ 10 ⁶				2 $\times$ 10 ⁶			
转座子质量与转座酶质量比例（ μ g/ μ g）	2.5 : 2.5 5 : 5	7.5 : 7.5	10 : 10	4 : 2	6 : 3	7.5 : 3.75	8 : 4		

1.3.3 MDA-MB-231 细胞电转染：根据分组条件计算电转所需质粒体积及质粒量，打开电转仪器，选择哺乳细胞电击模式，调节不同电压、电容、波形、电击次数、间隔时间等。电击完成后，将 MDA-MB-231 细胞转移至 T25 培养瓶，放置 37℃ 培养箱稳定贴壁培养。待细胞稳定增长后使用倒置荧光显微镜观察 EGFP 发光情况，流式细胞仪 FITC 通道检测其转导效率，比较不同电转染参数电转染 MDA-MB-231 细胞时，EGFP 报告基因电转染效率与表达情况，优化 TNBC 细胞系 MDA-MB-231 细

胞电转染条件。

1.4 统计学分析 利用 GraphPad Prism 9 软件对转染效率数值进行统计分析。计量资料以均数 $\pm$ 标准差（ $\bar{x}\pm s$ ）表示，组间样本两两比较采用独立样本 *t* 检验，多组间样本比较采用单因素方差分析，*P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 优化电转染电压条件 见图 1，2。280V 电压条件下获得较大转染效率为 60.23% $\pm$ 5.63%。与低电压 200V 相比，高电压均可提高转染效率，差异

具有统计学差异 ($F=29.3$, $P=0.004$)。但当电压升至 300V 时, 电脉冲对细胞的损伤程度较大, 细

胞死亡率上升, 表现为转染效率下降, 故优化电转电压为 280V。

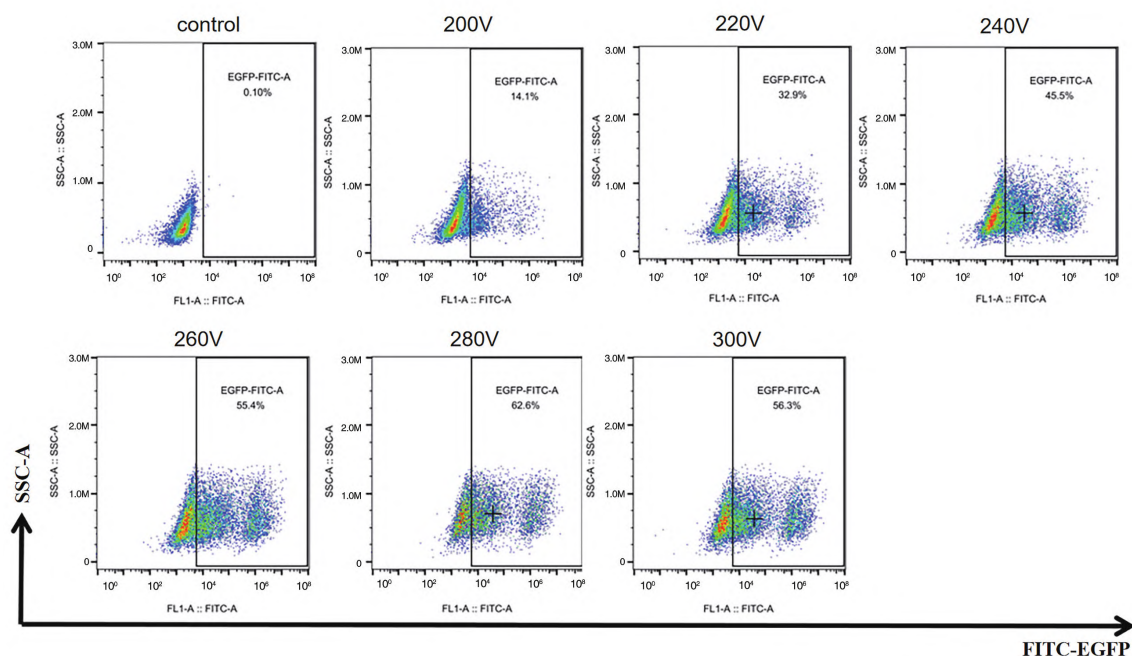
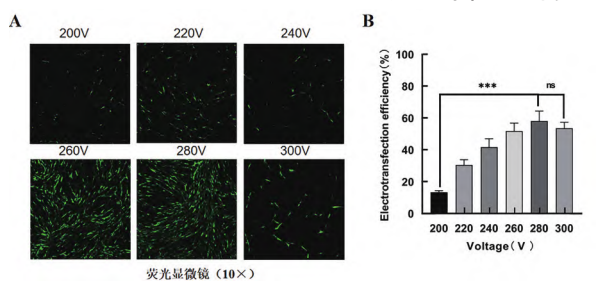


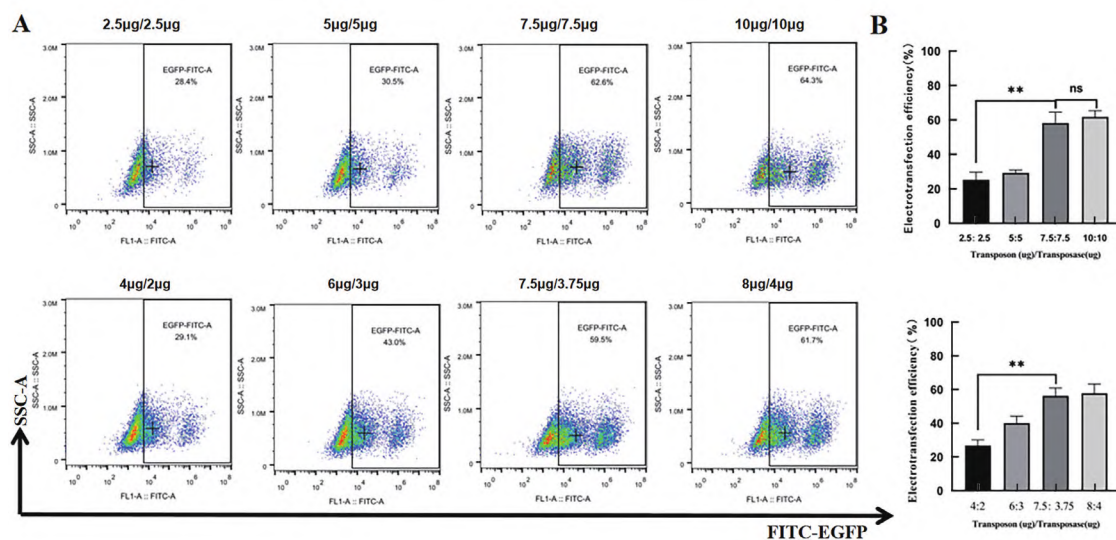
图1 流式细胞术检测不同电压下 MDA-MB-231 细胞系的电转染率



A. 荧光显微镜观察不同电压转导后细胞 EGFP 报告基因的发光情况; B. 不同电压的转导效率的统计差异 ($^{ns}P > 0.05$, $^{***}P < 0.001$)。

图2 荧光显微镜观察转导后 EGFP 报告基因的表达

2.2 优化电转染转座子质量、转座酶质量用量 当转座子质量高于 $7.5 \mu\text{g}$ 时, 提高转座子、转座酶质量比例对转染效率影响较小, 差异无统计学意义 ($F=38.88$, 21.32 , 均 $P > 0.05$) 见图 3; 转座子与转座酶比例对 MDA-MB-231 细胞对细胞转染效率的影响不显著 ($t=2.050$, $P=0.1768$), 见图 4。故电转染转座子质量、转座酶质量均为 $7.5 \mu\text{g}$ 为优化条件。



A. 流式检测不同转座子/转座酶质量时 MDA-MB-231 细胞系的电转染率; B. 不同转座子、转座酶质量时转导效率的统计差异 ($^{ns}P > 0.05$, $^{**}P < 0.01$)。

图3 不同转座子、转座酶质量对 MDA-MB-231 电转染效率的影响

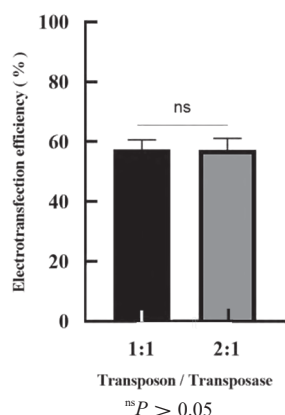
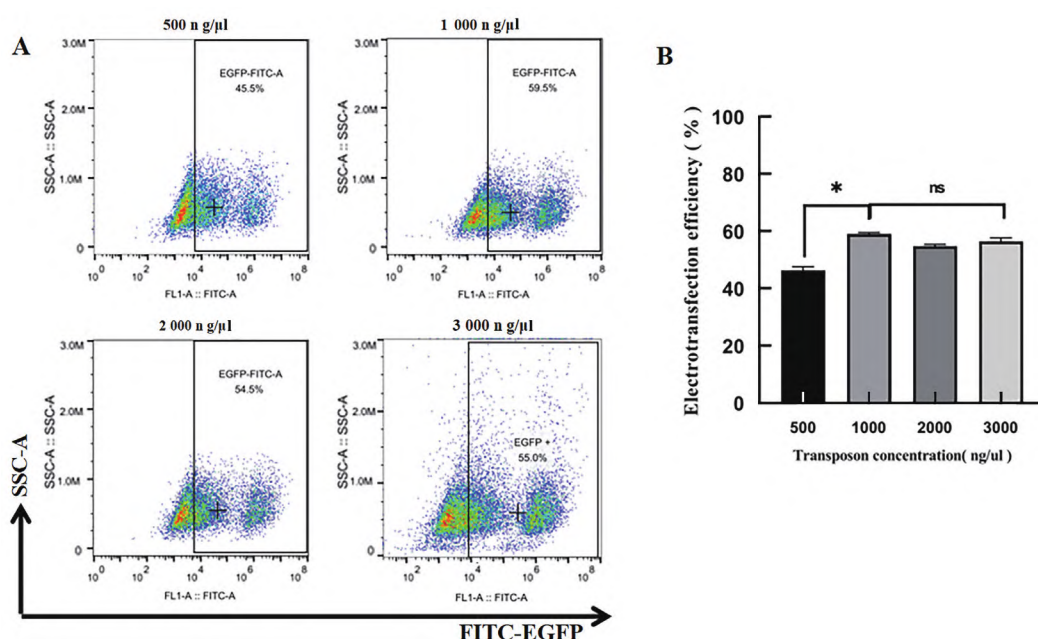


图4 不同转座子/转座酶质量条件下电转染效率的统计差异

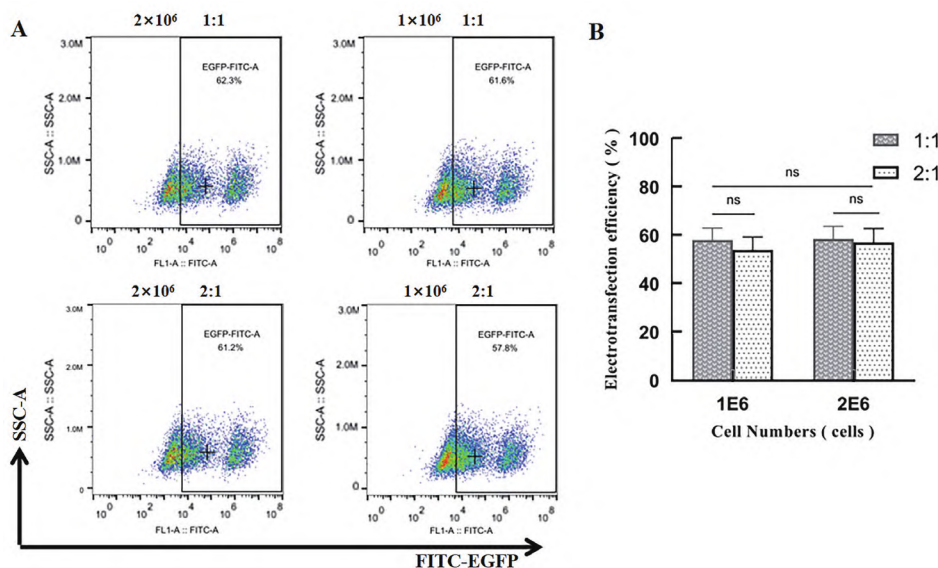
2.3 优化电转染质粒浓度 见图5。当质粒浓度高于 $1\ 000\text{ ng}/\mu\text{l}$ 时,提高质粒浓度,转染效率变化无显著性差异 ($F=69.29$, $P=0.458\ 7$);当质粒浓度低于 $1\ 000\text{ ng}/\mu\text{l}$,其电转染效率的差异具有统计学意义 ($F=69.29$, $P=0.000\ 7$,故电转染质粒浓度维持在 $1\ 000\text{ ng}/\mu\text{l}$ 以上为优化条件。

2.4 优化电转染细胞数量 见图6。细胞数量的变化对MDA-MB-231细胞电转染效率的影响不显著,且不同转座子与转座酶比例对转染效率影响较小,差异无统计学意义 ($t=2.192$, $P=0.272\ 4$)。在保证转染效率的情况下,为保证存活细胞数量及转染阳性细胞数量扩增,调整细胞数量至 2×10^6 个细胞。



A. 流式检测不同质粒浓度时 MDA-MB-231 细胞系的电转染率;B. 不同质粒浓度时转导效率的统计差异 ($^{**}P > 0.05$, $^{*}P < 0.05$)。

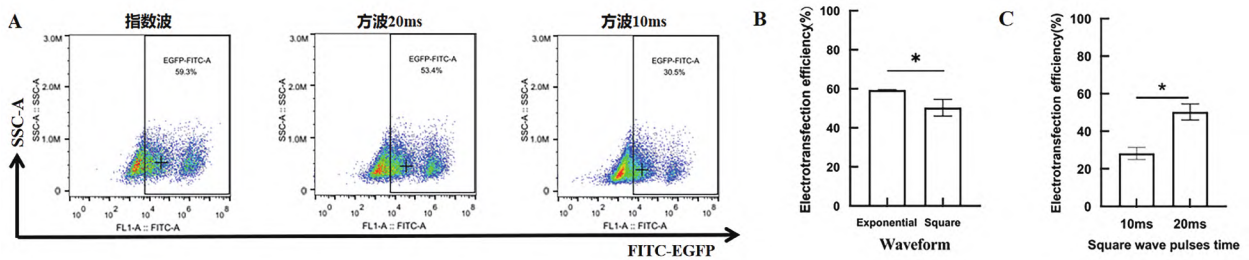
图5 质粒浓度对 MDA-MB-231 细胞电转染效率的影响



A. 流式检测不同细胞数量、转座子与转座酶比例时 MDA-MB-231 细胞系的电转染率;B. 不同细胞数量时转导效率的统计差异 ($^{**}P > 0.05$)。

图6 不同细胞数量对 MDA-MB-231 电转染效率的影响

2.5 优化电转染电击波形、脉冲时长 见图7。指数波相较于方波，方波脉冲时长20 ms较10 ms均可提高电转染效率，电转染效率差异具有统计学意义($t=2.966, 5.831, P=0.0274, 0.0282$)。



A. 流式检测不同波形、脉冲时间时MDA-MB-231细胞系的电转染率; B. 不同波形时转导效率的统计差异; C. 不同脉冲时间时转导效率的统计差异(* $P < 0.05$)。

图7 电击波形及方波脉冲时间对MDA-MB-231电转染效率的影响

2.6 MDA-MB-231细胞电转染优化参数 通过调整电转染MDA-MB-231细胞时的波形、电压、电击时间、电击次数、质粒浓度、细胞密度、转座

子与转座酶比例等转染条件，发现电转染MDA-MB-231细胞的优化参数见表2。

MDA-MB-231细胞电转染条件优化参数						
电击波形	电压(V)	电击次数	电容(UF)	转座子/转座酶质量(μg/μg)	质粒浓度(ng/μl)	细胞数量(个)
指数波	280	1	1000	7.5/7.5	1000	2 × 10 ⁶

3 讨论

乳腺癌是一种女性最常见的恶性肿瘤,且发病率、死亡率逐年上升^[13]。TNBC是乳腺癌亚型中恶性程度最高、患者生存率最低、免疫细胞浸润少、免疫应答弱的“冷肿瘤”,其起病隐匿,缺乏特异性表现^[14],具有复发风险高和患者预后差等特点^[15-16],已经严重威胁患者身体健康、心理健康、经济、家庭等^[17-18]。天然的肿瘤细胞系可以一定程度上作为疾病的体外模型,但是为了更贴合实验的需求,有时候需要通过基因工程的方法引入外源基因,对肿瘤细胞系进行改造。细胞内递送的方法通常分为三类①生物载体;②化学载体;③物理方法。其中生物载体通常为病毒载体,具有传播、复制能力的病毒的风险,化学载体的靶向性和转染效率有限,物理载体能够解决化学方法递送所面临的许多基本挑战,还能最大限度地减少与病毒载体相关的副作用^[19]。

PB转座子系统已被证明在哺乳动物细胞基因组工程的临床前应用中是有效的^[20],是目前用于遗传操作的最广泛使用的转座子系统^[21-22],可以在剪切和黏贴转位过程中绕过DNA合成^[23]。电转染是目前最常用的物理转染方式之一,操作简单,转染效率高,可重复性高,无细胞毒性,应用范围广,各种细胞类型均可转染^[24-25],已逐渐成为哺乳动物基因编辑的首选转染方法。电转染利用电场暂时破坏膜的稳定性,导致细胞膜瞬时透化,从而使通常不可渗透的大分子进入细胞质,在适当的场强下,几乎不会损害或创伤细胞,一旦确定了最佳电穿孔条件,就可以在短时间内转染大量细胞,每种细胞

类型所需的电转染条件略有不同,必须通过实验确定。优化的转染条件,可获取较高的转染效率,而不合适的电转参数会导致转染效率低、细胞死亡率高^[26-27],因此需针对实验条件优化电转染参数,以确保转染成功,保证转染后细胞的良好状态。

本研究优化了MDA-MB-231细胞的电转染条件,成功构建了MDA-MB-231-EGFP细胞系,且携带EGFP报告基因^[28]的MDA-MB-231细胞,EGFP基因的插入为TNBC的研究提供了更加有利的工具,可直接通过荧光显微镜观察细胞内荧光初步判断肿瘤细胞的数量及活力,可使用Incucyte实时活细胞成像分析系统对肿瘤细胞进行长期实时检测和记录,同时进行定量分析,并且在动物实验中(裸鼠)可以通过激发光检测小鼠体内肿瘤的生长状况,为后续对肿瘤进行实时观察、检测药物治疗TNBC的效果等提供了检验手段,为MDA-MB-231细胞株的相关基础研究和TNBC临床靶向治疗提供了合适的靶细胞,有助于TNBC的体外治疗方法与机制的研究,优化的电转染条件也为其他外源基因电转染MDA-MB-231细胞系提供基础实验数据参考,也可采用此方法过表达或者敲除MDA-MB-231细胞株的某些通路,在体内外研究中可初步探索TNBC的高致死率机制、TNBC的肿瘤微环境以及TNBC的细胞治疗、药物治疗机制等。

参考文献:

[1] CHAUDHURI A, KUMAR D N, DEHARI D, et al. Endorsement of TNBC biomarkers in precision therapy by nanotechnology[J]. Cancers, 2023, 15(9): 2661.
[2] OBIDIRO O, BATTOGTOKH G, AKALA E O. Triple

- negative breast cancer treatment options and limitations:future outlook[J]. *Pharmaceutics*, 2023, 15(7): 1796.
- [3] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2019[J]. *CA-A Cancer Journal for Clinicians*, 2019, 69(1): 7-34.
- [4] 张凌捷, 葛睿, 程爱群, 等. 乳腺癌患者血清 NR3C2 和 DNMT3A 表达水平及其诊断价值研究 [J]. 现代检验医学杂志, 2023, 38(6): 120-124.
- ZHANG Lingjie, GE Rui, CHENG Aiqun, et al. Expression levels of serum NR3C2 and DNMT3A in breast cancer patients and their diagnostic value[J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2023, 38(6): 120-124.
- [5] 陈冉, 王维伊, 杨翊柠. 基于 TCGA 数据库分析乳腺癌组织 RBP7 mRNA 表达与肿瘤免疫细胞浸润及预后的相关性 [J]. 现代检验医学杂志, 2024, 39(2): 75-80, 180.
- CHEN Ran, WANG Weiye, YANG Yining. Correlation of RBP7 mRNA expression in breast cancer tissues with tumor immune cell infiltration and prognosis based on TCGA database[J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2024, 39(2): 75-80, 180.
- [6] SINGH D D, YADAV D K. TNBC: potential targeting of multiple receptors for a therapeutic breakthrough, nanomedicine, and immunotherapy[J]. *Biomedicine*, 2021, 9(8): 876.
- [7] WON K A, SPRUCK C. Triple-negative breast cancer therapy: current and future perspectives (Review)[J]. *International Journal of Oncology*, 2020, 57(6): 1245-1261.
- [8] SHI Junfeng, MA Yifan, ZHU Jing, et al. A review on electroporation-based intracellular delivery[J]. *Molecules*, 2018, 23(11): 3044.
- [9] KRANJC M, DERMOL-ČERNE J, POTOČNIK T, et al. High-intensity pulsed electromagnetic field-mediated gene electrotransfection in vitro [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(17): 9543.
- [10] 王贤慧, 慕鹏飞, 敖敬群. 大黄鱼头肾细胞系瞬时转染方法的选择及优化 [J]. 生物技术, 2023, 33(3): 287-292, 321.
- WANG Xianhui, MU Pengfei, AO Jingqun. Selection and optimization for transient transfection method of large yellow croaker head kidney cells(LYCK)[J]. *Biotechnology*, 2023, 33(3): 287-292, 321.
- [11] CERVIA L D, YUAN Fan. Current progress in electrotransfection as a nonviral method for gene delivery[J]. *Molecular Pharmaceutics*, 2018, 15(9): 3617-3624.
- [12] MARS T, STRAZISAR M, MIS K, et al. Electrotransfection and lipofection show comparable efficiency for in vitro gene delivery of primary human myoblasts[J]. *the Journal of Membrane Biology*, 2015, 248(2): 273-283.
- [13] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA-A Cancer Journal for Clinicians*, 2021, 71(3): 209-249.
- [14] WEN Qianer, LI Liang, FENG Ruiqi, et al. Recent advances in immunotherapy for breast cancer: a review [J]. *Breast Cancer: Targets and Therapy*, 2024, 16: 497-516.
- [15] SUBHAN M A, TORCHILIN V P. Advances in siRNA drug delivery strategies for targeted TNBC therapy[J]. *Bioengineering*, 2024, 11(8): 830.
- [16] VAGIA E, MAHALINGAM D, CRISTOFANILLI M. The landscape of targeted therapies in TNBC[J]. *Cancers*, 2020, 12(4): 916.
- [17] 马青, 吴小玲, 方丹丹. 乳腺癌患者保乳手术术后无病生存期状况及其影响因素 [J]. 浙江创伤外科, 2024, 29(2): 315-317.
- MA Qing, WU Xiaoling, FANG Dandan. Disease free survival of breast cancer patients after breast conserving surgery and its influencing factors[J]. *Zhejiang Journal of Traumatic Surgery*, 2024, 29(2): 315-317.
- [18] 翟睿, 齐晶, 马晓霞. 三阴性乳腺癌患者采取保乳手术治疗的临床效果及 5 年随访观察分析 [J]. 河北医学, 2023, 29(10): 1677-1682.
- ZHAI Rui, QI Jing, MA Xiaoxia. Clinical efficacy and 5-year follow-up analysis of breast conserving surgery for TNBC patients[J]. *Hebei Medicine*, 2023, 29(10): 1677-1682.
- [19] MEACHAM J M, DURVASULA K, DEGERTEKIN F L, et al. Physical methods for intracellular delivery: practical aspects from laboratory use to industrial-scale processing[J]. *Journal of Laboratory Automation*, 2014, 19(1): 1-18.
- [20] YUSA K, ZHOU L Q, LI M A, et al. A hyperactive piggyBac transposase for mammalian applications[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U S A*, 2011, 108(4): 1531-1536.
- [21] YUSA K. PiggyBac transposon[J]. *Microbiology Spectrum*, 2015, 3(2): MDNA3-0028-2014.
- [22] SANDOVAL-VILLEGAS N, NURIEVA W, AMBERGER M, et al. Contemporary transposon tools: a review and guide through mechanisms and applications of sleeping beauty, piggyBac and Tol2 for genome engineering[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(10): 5084.
- [23] MITRA R, FAIN-THORNTON J, CRAIG N L. PiggyBac can bypass DNA synthesis during cut and paste transposition[J]. *EMBO Journal*, 2008, 27(7): 1097-1109.
- [24] CANOY R J, ANDRÉ F, SHMAKOVA A, et al. Easy and robust electrotransfection protocol for efficient ectopic gene expression and genome editing in human B cells[J]. *Gene Therapy*, 2023, 30(1/2): 167-171.
- [25] BISHOP D C, XU Ning, TSE B, et al. PiggyBac-engineered T cells expressing CD19-specific CARs that lack IgG1 Fc spacers have potent activity against B-ALL xenografts[J]. *Molecular Therapy*, 2018, 26(8): 1883-1895.
- [26] ZHAO Dipeng, QIN Jian, AN Jie, et al. Optimization of piggyBac transposon system electrotransfection in sheep fibroblasts[J]. *Molecular Biotechnology*, 2023, 65(10): 1585-1597.
- [27] 金庆梅, 索婧媛, 韩青, 等. 马鹿鹿茸原代前软骨与软骨细胞电穿孔法转染研究 [J]. 野生动物学报, 2025, 46(1): 72-80.
- JIN Qingmei, SUO Jingyuan, HAN Qing, et al. The study on electroporation transfecting primary cells from antler precartilages and cartilage tissues of red deer [J]. *Chinese Journal of Wildlife*, 2025, 46(1): 72-80.
- [28] 冯义超, 刘秀盈, 刘静静, 等. 基于逆转录病毒载体构建稳定表达人 CD19 和荧光蛋白的 SW620 细胞株 [J]. 现代生物医学进展, 2024, 24(4): 612-616.
- FENG Yichao, LIU Xiuying, LIU Jingjing, et al. Construction of a SW620 cell line stably expressing human CD 19 and fluorescent protein based on retroviral packaging technology[J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2024, 24(4): 612-616.

收稿日期: 2024-12-14

修回日期: 2025-02-13