转染技术在海洋无脊椎动物中应用现状

吉中钰, 康云思, 狄国涛

(中国海洋大学 海洋生命学院方宗熙海洋生物进化与发育研究中心, 山东 青岛 266003)

摘要: 海洋无脊椎动物在生物医学和农学等领域蕴藏巨大的应用潜力, 从基因层面解析和开发海洋无脊椎动物的生物学价值是未来研究的重要方向。目前模式生物中常见的遗传学操作手段还未广泛应用于海洋无脊椎动物, 因而限制了对海洋无脊椎动物在基因功能、基因表达调控等方面的研究。转染作为一种可高效将外源核酸导入细胞的技术, 是海洋无脊椎动物基因操作的理想工具。首先概述了不同类型的转染方法, 并对其转染的优缺点进行了总结; 随后重点介绍了转染技术在海洋无脊椎动物中的应用进展; 最后总结了在海洋无脊椎动物中建立转染技术的难点。以期为海洋无脊椎动物在转染策略的选择中提供参考, 为海洋无脊椎动物的分子生物学研究提供帮助。

关键词: 转染; 海洋无脊椎动物; 物理转染; 化学转染

中图分类号: P735; Q78　**文献标识码**: A　**文章编号**: 1000-3096(2025)1-0054-14

DOI: 10.11759/hykx20240417003

海洋是生命的摇篮, 是地球生物资源的宝库[1-3], 其中, 海洋无脊椎动物是一类背侧没有脊椎的海洋动物, 包括海洋中除脊椎动物亚门外的所有门类, 种类繁多, 占海洋物种的 92%以上, 是动物的原始形式[4]。

近年来, 随着对海洋无脊椎动物的深入研究和开发, 人们愈发认识到其在海洋和人类生活中发挥的重要作用。当前, 许多海洋无脊椎动物在环境保护、药物开发、水产养殖等领域受到广泛关注[5-8]。例如, 造礁珊瑚(刺胞动物门)在海洋生态系统中发挥着重要作用, 热带和温带珊瑚礁创造了复杂的三维栖息地, 并保护了海岸线[9-10]; 从海洋无脊椎动物中提取的一些天然产物具有伤口愈合、抗菌和抗凝血特性, 可以进一步合成来治疗人类疾病[11-12]; 在海产品消费需求增加和野生种群过度捕捞的背景下, 甲壳类动物和软体动物的水产养殖已成为满足这些需求的可持续方式[13]。

随着组学的发展, 人们已经对多种海洋无脊椎动物进行了全基因组测序, 不仅丰富了海洋生物的基因组数据, 同时为从基因组学以及分子生物学等层面对海洋无脊椎动物进行深入研究提供了可能[14-15]。因此, 通过基因敲除、基因敲降、转基因品系的构建等手段对海洋无脊椎动物开展的研究逐渐增多[16-17], 这些研究有助于进一步阐明基因功能、揭示遗传生长规律、培养优质的水产新品种、推演进化历程以及为海洋药物开发提供资源等[18-21]。

然而, 由于缺乏细胞生物化学和生理学的相关信息, 对海洋无脊椎动物的细胞研究仍停留在原代培养水平, 目前还没有成功建立胚胎细胞系或克隆化的永生细胞系[6, 22]。此外, 海洋无脊椎动物的有性繁殖策略、生命周期和胚胎发育方式非常多样化[23-24], 这些都增加了对海洋无脊椎动物进行基因层面遗传学操作的难度。在长期的科学探索中, 近年来转染技术在海洋无脊椎动物中的应用取得突破[25-29]。本文主要总结了当下转染技术在海洋无脊椎动物中的研究现状, 包括技术进展、应用成果和面临挑战。

1 转染技术

因为细胞膜具有选择透过性并起到保护细胞的作用, 所以一般裸露的核酸分子很难进入细胞内。为解决这一问题, 转染(transfection)作为一种将外源核酸导入细胞中的技术, 成为分子生物学研究的重要手段[30-31]。用于创造转基因动物的 DNA 操作始于 20 世纪 70 年代[32-33], 最初将病毒粒子微量注入不同着床阶段的小鼠胚胎中[34-35]。随后, 利用简单的 DNA 质粒对小鼠受

收稿日期: 2024-04-17; 修回日期: 2024-05-05

基金项目: 国家自然科学基金(32200415)

[Foundation: the National Natural Science Foundation of China, No. 32200415]

作者简介: 吉中钰(1998—), 女, 山东临沂人, 硕士, 主要研究方向为海洋生物学, E-mail: jizhongyu@stu.ouc.edu.cn; 康云思 (1991—), 通信作者, 女, 湖北襄阳人, 博士, 副教授, 主要研究方向为纤毛与器官发育的生物学研究, E-mail: kangyunsi@ouc.edu.cn

精卵细胞核进行显微注射[36]，直到 80 年代形成将 DNA 构建体引入个体的稳健程序[32]。目前，不同类型的核酸(DNA、RNA 等)均能够导入动物的细胞中[37]。

根据转染的时效性，转染一般分为稳定转染和瞬时转染[37]。稳定转染是指将外源 DNA 整合到宿主基因组中，使外源基因成为细胞基因组的一部分，从而能够维持基因的稳定表达；瞬时转染中，外源基因并不能整合到宿主基因组中，也不会被复制，通常仅可维持几天[30, 38-40]。

根据转染的载体介质，通常可以分为病毒性转染和非病毒性转染[37]，其中根据转染的递送途径又可将非病毒性转染分为物理介导和化学介导两类[30, 41]。病毒性转染，也叫转导(transduction)，是利用改造后的病毒载体感染细胞，将特定核酸序列携带到宿主细胞内，并且病毒感染可以很容易地将核酸序列整合到宿主基因组中，从而实现稳定的基因表达[42]；目前腺病毒以及逆转录病毒载体已经应用于多种哺乳动物的细胞体外转染[43-44]。病毒性转染的优点主要是转染效率高，并可在难以转染的细胞类型中实现转染[45]，但会具有较高的细胞毒性和免疫反应，并且可能会引起插入诱变[46]。然而，由于海洋生物特殊的生存环境，缺乏合适的海洋工程病毒，在海洋生物转染方案中该转染方式很难应用。因此，物理转染和化学转染这两大类非病毒转染方法成为海洋生物转染方案的首选。

1.1 物理转染

物理转染是通过施加外部的物理能量在细胞膜上形成微小孔洞来促进核酸分子穿过细胞屏障进入细胞质以及细胞核内从而实现基因转移和表达[30, 47-48]，但这种转染方式容易对细胞造成物理损伤[48]。根据施加外力的不同可分为显微注射、电穿孔、基因枪、激光照射等转染方法。

显微注射法是利用尖端极细(0.1~0.5 μm)的玻璃微量注射针将外源核酸直接注射到宿主细胞质或细胞核中的技术[49]。为了确保注射的外源核酸分子进入到细胞中以实现较高的转染效率，通常会将外源核酸与无毒染料混合后注射，从而对外源物质的递送效果进行指示[50]。显微注射法的优点是能够准确地将核酸递送到目标位置，且细胞毒性较低。理论上单细胞显微注射的转染效率能够接近 100%；其缺点是显微注射比较耗时，且效率低下，特别是对于较小的细胞。目前，已经有报道通过开发显微注射机器人系统来提高效率并减少细胞损伤[30-31]。

电穿孔技术指利用短的电脉冲扰乱细胞膜，形成核酸可以通过的孔，从而允许外来核酸进入细胞[51]。电穿孔技术首次由 Neumann 在 1982 年提出，并用于转染小鼠淋巴瘤细胞[48]。根据细胞膜的不同反应，电穿孔过程可分为无可检测孔洞、可逆孔洞、非热不可逆孔洞和热不可逆孔洞 4 个阶段[52]。外源核酸主要在形成可逆孔洞的阶段进入细胞[53]，当外加电场消失后，细胞膜重新愈合[48]。电穿孔效率受多种因素影响，包括电极类型、电场强度、脉冲数量和时间、电穿孔缓冲液组成、电导率及细胞类型等[53-56]，另外质粒浓度和温度也对转染效率有影响。因此，为了达到较高的转染效率和细胞存活率，需要针对不同的细胞类型和核酸分子优化电穿孔参数。此外，电穿孔虽然是一种简单快速的转染方法，能在短时间内处理大量细胞，但它可能会对细胞造成不可逆的损伤。

基因枪粒子递送转染，又称微粒轰击术，其原理是将外源核酸包裹在金颗粒(或其他金属颗粒)中，通过“基因枪”以高压气体为动力，将核酸-颗粒偶联物高速射入靶细胞中[30]，进而外源核酸与金属颗粒分开整合到基因组中，或进行瞬时表达。基因枪的优点是操作简单、快速并且允许一次性输送较大量的核酸，其缺点是使用成本较高，且对样本造成物理伤害较大[57]。基因枪粒子递送转染技术最初被应用于植物的转基因[58]，最近的研究已将其扩展到多种动物组织，包括皮肤、肝脏、骨骼肌和胰腺[57, 59]。

激光介导转染是通过脉冲激光在细胞膜上形成瞬时孔，通过激光诱导的孔隙使核酸进入细胞[30]，通过调节激光的功率，可以确保孔洞在核酸转移完成后迅速闭合[60]。激光介导转染的优点是可以进行精准操作；缺点是激光显微镜系统十分昂贵，且对操作人的要求极高。

1.2 化学转染

化学试剂转染的基本原理是带正电荷的化学物质与带负电荷的核酸形成复合物，将复合物与宿主细胞进行共同孵育，在电荷作用下将复合物吸引到细胞膜上，复合物通过细胞的胞饮作用或受体介导的内吞作用进入细胞内[61]，随后复合物实现内体逃逸，最终释放核酸分子至细胞核，实现外源核酸的转录表达[62]。与病毒转染相比，化学转染细胞毒性较低，不会引起诱变，是一种相对安全的转染方法。但是，化学试剂转染效率相对较低，并可能激活先天免疫系统引发细胞炎症反应[63]。基于转染试剂的不

同，化学转染法大体上可以分为脂质体和非脂质体转染试剂两大类[30]，常见的脂质体有 Lipofectamine 2000 和 Lipofectamine 3000 等，非脂质体包括阳离子聚合物和无机纳米颗粒载体等[37]。

脂质体是一种囊泡状结构，由具有两亲性质的脂质分子构成[64]，通过与核酸形成复合物的方式，在通过细胞内吞作用进入细胞时保护核酸免受降解[65]。复合物如何从内体逃逸的机制目前尚不明确，普遍认为可能通过电荷中性化或膜融合后释放复合物或裸露的核酸到细胞质中，进而实现 DNA 的核内输送、转录和表达[66-67]。脂质体转染效率与病毒载体转染相比较低，主要是因为 DNA 进入细胞核需要从复合物中解离并穿过核孔这一过程[66]。此外，脂质体的转染效率还受 DNA 与脂质体的配比影响[68]，并且不同脂质体试剂在不同细胞系中的转染效率和细胞毒性也存在差异[69]。

阳离子聚合物作为一种常用的基因递送载体，包括聚乙烯亚胺(PEI)、聚酰胺-胺(PAMAM)、壳聚糖和阳离子蛋白等[41]，这些聚合物易于制造，能与 DNA 形成复合物，通过内吞作用进入细胞。不同聚合物的结构差异导致内体逃逸效率和转染效率有所不同。PEI 因其高密度的胺基团提供强大的质子缓冲能力，作为“质子海绵”促进内体逃逸[70-71]，进而具有较高的转染效率，目前已成为最有效和广泛使用的阳离子聚合物之一[70, 72]。但 PEI 的生物不可降解性具有一定毒性，目前已开发出可在进入细胞后降解为小分子碎片的 PEI 转染试剂，该类型转染试剂可以促进 PEI 从细胞质内清除，降低其细胞毒性[73]。jetPEI 是一种线性聚乙烯亚胺衍生物，通过与多种商业转染试剂进行比较，发现 jetPEI 具有较高的转染效率，同时细胞毒性较低[74]。

纳米颗粒因其出色的物理特性和易修改性，成为基因递送领域的热门研究载体[75]。无机纳米颗粒的类型包括磁性纳米颗粒、金纳米颗粒和二氧化硅纳米颗粒等[76-77]。阳离子聚合物如 PEI 等可应用于对纳米颗粒进行修饰[78]使其成为理想的纳米载体，修饰后的纳米颗粒不仅可以降低 PEI 对受体细胞的毒性[79]，还可以提高转染效率[78-80]。此外，在介孔二氧化硅纳米颗粒(MSN)的基础上研发出表面具有刺突结构的二氧化硅纳米颗粒(SSNs)[81-82]，具有较强的 DNA 负载和保护能力，以及通过表面刺突穿透细胞膜的高效细胞摄取能力[83-84]。Fu 等[85]通过竞争性外延生长的方法，制备了氨基修饰并具有刺突的二氧化硅纳米颗粒(NH2-SSNs)，并对刺突长度进行了优化，在多种细胞中表现出优异的递送性能和较低的细胞毒性。这些发现展示了纳米颗粒在基因递送领域的强大潜力。

上文所述转染方式总结见图 1。

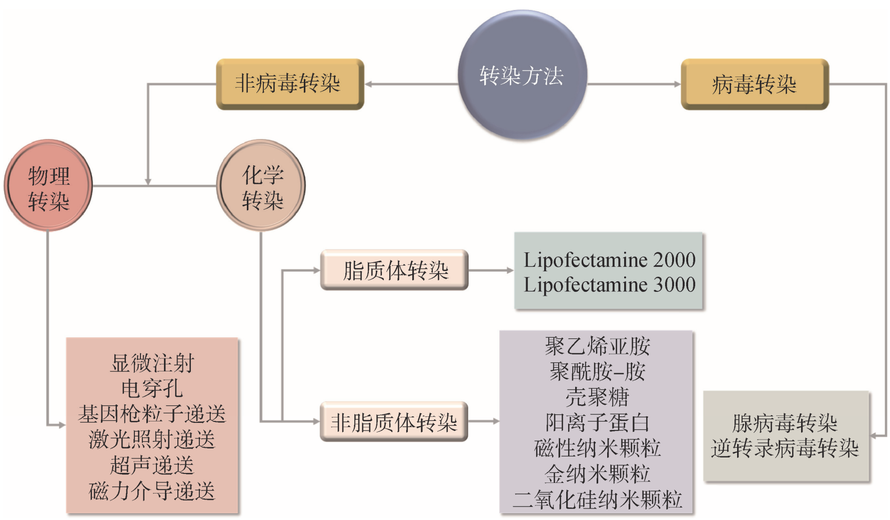

图 1 转染技术分类总结

Fig. 1 Classification of the transfection techniques

2 海洋无脊椎动物转染技术应用现状

海洋无脊椎动物包括了多种类群，如棘皮动物(海星、海胆等)、甲壳动物(虾、蟹等)、软体动物(贝类、乌贼等)、扁形动物(涡虫等)、刺胞动物(水螅、水母等)以及多孔动物(海绵)等。海洋无脊椎动物凭

借其独特的进化地位、生物学特征以及经济价值而具有重要的研究意义。本节将对海洋无脊椎动物转染技术的应用现状展开描述。

2.1 转染技术在海洋棘皮动物中的应用

棘皮动物门(Echinodermata)在生物进化中占有特殊地位，包括了海星纲、海胆纲、海参纲、蛇尾纲和海百合纲等多个纲[86]。目前转染技术主要应用于海胆纲和海星纲。

海胆被广泛认为是进行实验胚胎学、细胞结构和受精机制等基础理论研究的理想实验对象之一。除了在科学研究领域的应用，海胆还具有显著的经济价值。虽然海胆作为模式生物在生物学研究中极受欢迎，但由于基因操作技术的局限性，对海胆的研究仍面临着一定的挑战[86]。近期，科研人员通过显微注射法，将外源 DNA 引入绿海胆(*Lytechinus variegatus*)卵细胞中，研究发现，若注射线性化质粒，它们将发生随机整合并在早期发育中反复复制；若注射超螺旋 DNA 则既不会连接也不会复制。两种形式的外源 DNA 都能在胚胎中持续存在，直至胚胎发育阶段[87]。Franks 等[88]通过将外源 DNA 注射到海胆受精卵的细胞核中，发现注射到细胞核的动物有 36%的幼体表达外源基因，而注射到细胞质的动物，其幼体仅有 12%的表达率。此外，外源 DNA 也可以通过基因枪粒子递送转染法成功地被输送到马粪海胆(*Hemicentrotus pulcherrimus*)的受精卵中[89]，但这种方法尚未得到广泛使用[90]。Core 等[26]还以逆转录病毒为载体实现了对绿海胆卵细胞的转染。

海星具有很强的再生能力和繁殖能力，并且其在生态学研究、极端环境下的生物多样性研究以及进化发育生物学的研究中具有重要意义[86]。目前关于海星的转染方法研究较少，有报道称在蝙蝠海星(*Patiria miniata*)中，已经成功使用显微注射法将外源 DNA 引入到海星的受精卵中[91]。上文所述海洋棘皮动转染方法应用如表 1 所示。

表 1 海洋棘皮动物转染技术研究
Tab. 1 Research on the transfection techniques used in marine Echinodermatans

物种	转染方法	样品	参考文献
绿海胆(*Lytechinus variegatus*)	显微注射法	卵细胞或受精卵	[87-88]
	逆转录病毒转染	卵细胞	[26]
马粪海胆(*Hemicentrotus pulcherrimus*)	基因枪粒子递送转染	受精卵	[89]
蝙蝠海星(*Patiria miniata*)	显微注射法	受精卵	[91]

2.2 转染技术在海洋甲壳动物中的应用

甲壳动物(Crustacean)是一类重要的水产经济群体，转染技术在海洋甲壳动物的应用主要集中于海洋虾类。

1995 年已有报道证明，显微注射法可以将 *lacZ* 基因转入至南方白虾(*Penaeus schmitti*)中形成瞬时表达[92]，但相较于需要复杂操作的显微注射法，电穿孔法在这类虾的转染操作中具有更大的潜力[93]。之后 Arenal 等[94]确定，在脉冲电压 12 kV，工作时间 6 s 的非电容式电脉冲条件下，以 4×PBS 为电穿孔缓冲液进行转染后，虾胚胎的转染效率为 19.4%。2004 年，Arenal 等[25]又发现使用 SV40 T 抗原的核定位信号肽与超螺旋 DNA 结合使用对南方白虾受精卵进行电穿孔后，基因转移频率比裸 DNA 高 2 倍，且核摄取速度更快。

有报道比较了显微注射、电穿孔以及基因枪粒子递送转染三种转染方法在日本对虾(*Penaeus japonicus*)中的效率，最终确定显微注射法是最适用于日本对虾转染的方法，而基因枪粒子递送转染法无法获得转基因日本对虾[95]。

使用电穿孔法将 *pFLAG-CMV-1-BAP* 质粒引入虎虾(*Penaeus monodon*)受精卵中，可获得转基因虎虾[96]；Yazawa 等[97]则使用了显微注射法和基因枪粒子递送转染法将 *pJEF-GFP* 基因引入虎虾受精卵中，获得转基因虎虾。

Sun 等[98]使用 *pβactP2-TSV-CP* 质粒检测了显微注射、电穿孔、化学试剂转染三种方法在南美白对虾(*Penaeus vannamei*)中的转染效率，发现使用转染试剂 jetPEI 得到的最高表达率为 40%~60%，其余二者均有一定效果。随后，使用 jetPEI 试剂向受精卵中转染反义 Taura 综合症病毒(TSV)外壳蛋白基因构建体，与对照动物相比，转基因虾对 TSV 感染具有部分抗性[99]，这些数据对于商业对虾养殖具有重要意义。

在中国对虾(*Penaeus chinensis*)中，通过使用基因枪粒子递送法，将携带切割对虾白斑病病毒基因的核酶基因质粒 *pGDNA-RZ1* 导入中国对虾受精卵

中，转染效率达到 60.7%[100]。综上，适用于甲壳动物的转染方法主要是电穿孔法和显微注射法，而基因枪粒子递送法和化学试剂转染法具有一定作用但应用较少(表 2)。

表 2　海洋甲壳动物转染技术研究
Tab. 2　Research on the transfection techniques employed in marine Crustaceans

物种	转染方法	样品	参考文献
南方白虾(*Penaeus schmitti*)	显微注射法	受精卵	[92]
	电穿孔法	胚胎、受精卵	[25, 93-94]
日本对虾(*Penaeus japonicus*)	显微注射法	胚胎	[95]
	电穿孔法	胚胎	[95]
虎虾(*Penaeus monodon*)	电穿孔法	受精卵	[96]
	显微注射法	受精卵	[97]
	基因枪粒子递送转染	受精卵	[97]
南美白对虾(*Penaeus vannamei*)	显微注射法	受精卵	[98]
	电穿孔法	受精卵	[98]
	化学试剂转染法(jetPEI)	受精卵	[98-99]
中国对虾(*Penaeus chinensis*)	基因枪粒子递送转染	受精卵	[100]

2.3　转染技术在海洋软体动物中的应用

软体动物门(Mollusca)是种类最多的海洋无脊椎动物类群[101]。目前在海洋软体动物中主要使用电穿孔法和显微注射法进行转染操作，其中电穿孔法应用较为广泛(表 3)。

Lu 等[102]最初使用泛嗜性逆转录病毒作为载体，通过电穿孔法破坏卵黄膜，使病毒颗粒与胚胎表面直接接触，实现了侏儒蛤(*Mulinia lateralis*)的转染。

2018 年，有报道表明在电阻 100 Ω、电压 300 V、电容 100 μF、脉冲持续时间 20 ms、脉冲间隔 100 ms 条件下，进行五次电穿孔脉冲，使用 *piggyBac* 转座子系统即可在太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)中实现高效的转染[103]。此外，有研究发现通过显微注射法可实现对太平洋牡蛎的转染，并发现其内源性 *EF-1α* 启动子具有较高的转染驱动效率[27]。在福建牡蛎(*Crassostrea angulate*)中，使用脉冲电压 100 V、脉冲持续时间 15 ms、脉冲间隔 100 ms 的条件进行方波脉冲电穿孔可以实现转染，并成功引入 CRISPR/Cas9 系统[104]。

在马氏珠母贝(*Pinctada martensii*)中，对卵细胞在电压 300 V、频率 50 kHz、脉冲时间 1.5 ms 的最佳条件下进行电穿孔，可以获得转基因品系[105]。在大珠母贝(*Pinctada maxima*)中，精子在 6 kV 电压和 28 次脉冲条件下进行 6 次重复的电穿孔处理后与卵细胞结合便可以获得转基因品种[106]。Yoon 等[107]在虾夷扇贝(*Mizuhopecten yessoensis*)中实现了原代细胞的电穿孔转染，还发现了具有较高转染驱动效率的 *OsHV-1* 启动子。在九孔鲍(*Haliotis diversicolor suportexta*)中使用 10 kV 电压和 27 次脉冲条件进行 6 次重复电穿孔处理后的精子与卵细胞结合，便可以获得转基因品种[108]。

此外，使用显微注射法向马氏珠母贝卵细胞中注射质粒也可以获得转基因品系[109]。Crawford 等[110]通过对头足类乌贼(*Doryteuthis pealeii*)受精卵进行显微注射的方法成功引入 CRISPR/Cas9 系统。上文所述海洋软体动物中转染方法应用总结如表 3 所示。

2.4　转染技术在海洋扁形动物中的应用

扁形动物门(Platyhelminthes)包括约 15 000 种动物，从扁形动物开始出现了两侧对称的体型，并具有真正的三胚层结构且体壁出现了肌肉层，这是动物进化过程中一个重要的标志性阶段[111]。作为两侧对称动物的简化模型，扁形动物对于神经中枢的起源、干细胞的增殖分化以及再生等问题的研究具有重要意义[111-114]。*Macrostomum lignano* 是一种海洋生活的涡虫，最开始通过将其浸泡在双链 RNA 溶液中进行 RNA 干扰(RNAi)[115]，目前常用的转染技术主要为显微注射法[116]。Wudarski 等[117]在 *Macrostomum lignano* 中将 DNA 构建体显微注射到受精的单细胞阶段胚胎中，在低剂量照射后外源基因发生随机整合，建立了具有普遍表达的 HUB1 转基因系。因此，目前在海洋扁形动物中应用的转染技术主要是显微注射法(表 4)。

表 3　海洋软体动物转染技术研究
Tab. 3　Research on the transfection techniques applied in marine Molluscans

物种	转染方	样品	参考文献
侏儒蛤(*Mulinia lateralis*)	逆转录病毒转染	受精卵	[102]
太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)	显微注射法	受精卵	[27]
	电穿孔法	精子	[103]
福建牡蛎(*Crassostrea angulate*)	电穿孔法	卵细胞、囊胚	[104]
马氏珠母贝(*Pinctada martensii*)	电穿孔法	卵细胞	[105]
	显微注射法	精子, 卵细胞	[109]
虾夷扇贝(*Mizuhopecten yessoensis*)	电穿孔法	原代细胞	[107]
九孔鲍(*Haliotis diversicolor suportexta*)	电穿孔法	精子	[108]
大珠母贝(*Pinctada maxima*)	电穿孔法	精子	[106]
乌贼(*Doryteuthis pealeii*)	显微注射法	受精卵	[110]

表 4　海洋扁形动物转染技术研究
Tab. 4　Research on the transfection techniques utilized in marine Platyhelminthes

物种	转染方法	样品	参考文献
Macrostomum lignano	显微注射法	受精卵	[116-117]

2.5　转染技术在海洋刺胞动物中的应用

刺胞动物门(Cnidaria)包括约 11 000 种动物[118], 它们共同含有一种独特的细胞类型——刺细胞[119]。刺胞动物作为进化上最原始的多细胞动物之一，对研究高等动物类群起源和演化具有重要的参考意义。在刺胞动物转染技术的探索中，目前已在 *Hydractinia*, *Nematostella*, *Clytia* 等刺胞动物中建立了转染技术[28]。

在贝螅(*Hydractinia*)的转染操作中，最常用的方法是显微注射法[28, 120]，在 50 mmol/L 氯化钾溶液中向受精卵中注入 100 pL DNA(0.5~1.5 μg/μL)，通过报告基因对特定细胞进行标记，并且转入的外源基因可以传递到下一代[120]。同时也可以通过向胚胎注射 mRNA、shRNA, 实现基因瞬时性过表达或敲降[121]。此外，电穿孔法也可用于贝螅的转染，使用 15%Ficoll-400 为电穿孔缓冲液，与过滤海水和待传递核酸混合为 100 μL 电穿孔混合液体系后，在 2 mm 的电击杯中进行电穿孔，可实现靶基因的有效敲低[122] 。

小星海葵(*Nematostella vectensis*)的转染主要使用显微注射法，通过使用 I-SceI 巨核酸酶系统建立稳定转基因品系，具体操作体系为 50 ng/μL DNA 与 1× I-SceI 缓冲液、40 μg/mL Alexa Dextran 和 0.2 U/μL I-SceI 混合，注射前将混合物在 37 ℃下孵育 30 min 后，向每个受精卵中注射平均 45 pL DNA 混合液[123]。此外，也可以使用与贝螅相同的电穿孔法进行转染[124]。

在半球美螅水母(*Clytia hemisphaerica*)中也是使用电穿孔和显微注射法进行转染操作[125-126]，其中电穿孔法是通过使用 90 μL 15%Ficoll-400 与过滤海水和 10 μL 待传递核酸混合为 100 μL 电穿孔混合液，在 4 mm 的电击杯中进行电穿孔[125]。显微注射法与在贝螅中的应用类似[126]。综上，目前海洋刺胞动物常用的转染方法主要是显微注射法和电穿孔法(表 5)。

表 5　海洋刺胞动物转染技术研究
Tab. 5　Research on transfection techniques applied in marine Cnidarians

物种	转染方法	样品	参考文献
贝螅(*Hydractinia*)	显微注射法	胚胎或受精卵	[28, 120]
	电穿孔法	受精卵	[122]
小星海葵(*Nematostella vectensis*)	显微注射法	受精卵	[123]
	电穿孔法	卵细胞	[124]
半球美螅水母(*Clytia hemisphaerica*)	电穿孔法	受精卵	[125]
	显微注射法	卵细胞	[126]

2.6 转染技术在海洋多孔动物中的应用

多孔动物(Porifera)通常被称为海绵，是已知最简单的多细胞动物之一。多孔动物凭借其位于后生动物基部的进化地位以及卓越的再生能力在进化生物学及发育生物学等领域的研究中占有重要地位，是研究早期发育调控以及再生机制的理想模型[127-129]。长期以来，转染技术尚未在任何多孔动物门物种中建立，直到 2018 年，Revilla-I-Domingo 等[29]在寄居蟹皮海绵(*Suberites domuncula*)的切片外植体中，通过 jetPEI 转染由 *β-actin* 启动子驱动的 *egfp* 基因表达载体，在转染后 48 h，根据荧光信号可以将转染的细胞从组织中特异性分离，并通过实时荧光定量 PCR 检测发现转染后培养长达 28 d 的动物中仍可检测到 *egfp* mRNA。这是首次在海绵中成功实现转染，该团队还尝试使用电穿孔法进行转染，但是效果比 jetPEI 转染法低 100 倍[29]。因此，目前在多孔动物中有效的转染方法仅有化学试剂转染法一种(表 6)，虽然转染效率很低，但它已经适用于一些应用，如谱系追踪，同时为建立进一步的分子功能技术奠定了基础，未来，还需要对海绵动物的转染条件进行进一步的优化，从而为海绵研究增加一种多功能工具。

表 6 海洋多孔动物转染技术研究
Tab. 6 Research on the transfection techniques applied in marine Poriferans

物种	转染方法	样品	参考文献
寄居蟹皮海绵(*Suberites domuncula*)	化学试剂转染法(jetPEI)	切片外植体	[29]

3 海洋无脊椎动物转染技术发展与应用的局限性

转染技术在模式生物中的成功应用为研究基因功能和基因表达调控，以及进行基因治疗等提供了可能。然而，相对于常见模式生物，海洋无脊椎动物种类繁多、基因组信息缺乏、生存环境特殊、生命周期和繁殖策略多样，使得转染技术应用于这些生物时面临着额外的复杂性和不确定性。

3.1 生物多样性的挑战

海洋无脊椎动物种类丰富，不同物种间的基因表达和发育过程等的较高差异，导致很难找到一种适用于所有物种的高效转染方法。因此，需要针对不同的物种定制不同的转染策略。

在探究不同的转染策略时，需要考虑物种间的差异，比如胚胎发育时期的差异、精卵细胞大小的差异、精子和卵细胞发育过程的差异、细胞生存条件的差异以及待处理样品不同的发育阶段等。

同时，转染方法本身也存在诸多的差异，在转染的过程中，需要平衡转染效率与不同样品的存活率之间的关系。比如在海洋生物中常用的电穿孔法，需要针对不同的物种或细胞优化特定的电穿孔参数(电压、脉冲数、脉冲长度等)。另外，不同物种对转染载体的接受度、基因整合机制以及表达系统也大相径庭，这就要求必须为每一种研究对象定制适宜的转染策略。

3.2 基因组信息的不足

与模式生物如小鼠和果蝇相比，海洋无脊椎动物的基因组资源普遍比较落后，许多物种缺乏高质量的参考基因组，从而限制了转染研究中目标基因选择的准确性，也使得基因编辑的精确性大打折扣[15]。海洋无脊椎动物基因组的复杂性和某些物种的多倍体性质进一步增加了转染操作的难度。此外，转染效率与启动子的表达效率具有直接相关性。然而，目前对于海洋无脊椎动物中高效启动子的应用研究相对缺乏[130]，常用的启动子仅为 *EF-1α* 启动子和 *β-actin* 启动子[27, 29, 98]。

3.3 技术和方法的局限

目前在海洋无脊椎动物广泛使用的转染方法为电穿孔和显微注射法，其中显微注射法几乎适用于绝大部分海洋生物，但仍然存在不能大批量获取转基因动物、操作复杂耗时较长且细胞易损伤等问题；电穿孔法虽然可以规避显微注射法的部分缺陷，但目前仍然无法解决电穿孔会对细胞造成损伤，导致细胞活性降低这一问题[48, 98]。基因枪法也被报道用于一些海洋无脊椎动物中，如日本对虾，但其操作较为复杂且需要昂贵的设备，并且获得的转基因动物具有较多的嵌合体。jetPEI 转染试剂已成功应用于海洋动物并且在许多系统中被证明比其他常用转染试剂更有效[74]，但也仅针对于部分海洋无脊椎动物，如南美白对虾[98-99]，而在海绵中的表达效率仍旧较为低下[29]。目前广泛使用的基因编辑技术，如 CRISPR/Cas9，虽然在福建牡蛎、头足类等海洋无脊椎动物中取得了初步成功[104, 110, 131]，但在效率、稳定性和安全性方面仍然存在局限[132]。此外，合适的转染载体对于基因的整合和表达具有重要作用，在海洋无脊椎动物中的转染载体研究相对较少，缺少参考性。

3.4 生态和伦理的问题

海洋无脊椎动物在海洋生态系统中扮演着关键角色，转染技术可能会带来生态平衡改变，并产生不可预见的后果。海洋是一个开放且不可控的环境，一旦将转基因生物放入海洋中，产生的效应可能是不可逆的。因此，转染技术在海洋无脊椎动物的研究和应用必须考虑其对自然环境和生物多样性的潜在影响。同时，伦理问题也是不可忽视的，特别是涉及具有商业价值或受保护的物种时。

4 总结及展望

本文综述了海洋无脊椎动物中转染技术应用进展，其中物理方法尤其是显微注射法和电穿孔法最为常用，几乎在所有门类中均有应用并取得良好效果，是适合于大多数海洋生物的转染方法。但对细胞或胚胎造成一定损伤的缺陷是不可避免的，且需要显微操作系统或电穿孔系统等特殊设备。此外，化学试剂转染的方法相对温和，同时价格低廉且易于操作，虽然目前在海洋无脊椎动物中的应用较少，但已经在甲壳动物中表现出较高的转染效率和极大的应用潜力，未来可能会更多地被应用到海洋无脊椎动物的转染操作中。

尽管海洋无脊椎动物转染技术在操作方法、效率以及稳定性等方面还存在着许多问题，但是目前已有的研究成果展示了其发展潜力。转基因海绵、涡虫在推进对进化、发育和干细胞生物学的研究中具有强大的潜力；转基因水螅在推进对海洋生态系统中生物互作和环境适应机制方面的研究发挥了重要作用；转基因软体动物和甲壳动物的研究则对水产养殖业的遗传改良和疾病防控提供了新思路。海洋无脊椎动物转染技术已从理论探索逐步迈向实际应用。这一领域的进展不仅为我们理解这些生物的生物学基础提供了新的视角，而且对于生物医药、环境保护以及可持续海洋资源利用等多个领域具有重要的实际意义。

随着未来海洋无脊椎动物转染技术的不断成熟以及对海洋无脊椎动物生物学特性更深入的探究，现阶段转染技术的局限将会逐渐被克服。此外，在未来的研究中，伴随着跨学科领域的合作，分子生物学、海洋生物学、生态学以及遗传学等领域的知识和技术将共同促进海洋无脊椎动物转染技术的发展。海洋无脊椎动物转染技术有望为人类揭开更多海洋生物生活特性的神秘面纱，同时为海洋的可持续发展贡献力量。

参考文献：

[1] BOEUF P G. Ocean and bio-medical research[J]. Journal de la Societe de Biologie, 2007, 201(1): 5-12.

[2] SNELGROVE P V R. An ocean of discovery: biodiversity beyond the census of marine life[J]. Planta Medica, 2016, 82(9/10): 790-799.

[3] GOULITQUER S, POTIN P, TONON T. Mass spectrometry-based metabolomics to elucidate functions in marine organisms and ecosystems[J]. Marine Drugs, 2012, 10(4): 849-880.

[4] CHEN E Y-S. Often overlooked: understanding and meeting the current challenges of marine invertebrate conservation[J]. Frontiers in Marine Science, 2021, 8: 690704.

[5] LI Y, ZHANG H. Progress in antioxidant enzymes study of marine invertebrates[J]. Marine Science Bulletin, 2018, 37(3): 241-253.

[6] CEN W, HU M, RINKEVICH B, et al. Establishment of cell lines from marine invertebrates by inducing cellular stemness[J]. Marine Sciences, 2021, 45(1): 146-154.

[7] LIU C, CAO J, WANG F, et al. Research progress of chemical and pharmacological studies on sea urchin polysaccharides[J]. Chinese Journal of Marine Drugs, 2014, 33(3): 85-90.

[8] GONG X, WU Y. Review on research progresses and application in the food preservation of antimicrobial peptides from marine invertebrates[J]. Biotechnology Bulletin, 2011(3): 27-32.

[9] GRAHAM N A J, NASH K L. The importance of structural complexity in coral reef ecosystems[J]. Coral Reefs, 2013, 32(2): 315-326.

[10] HOEGH-GULDBERG O, POLOCZANSKA E S, SKIRVING W, et al. Coral reef ecosystems under climate change and ocean acidification[J]. Frontiers in Marine Science, 2017, 4: 158.

[11] DE ZOYSA M. Medicinal benefits of marine invertebrates: sources for discovering natural drug candidates[J]. Advances in Food and Nutrition Research, 2012, 65: 153-169.

[12] SENTHILKUMAR K, KIM S-K. Marine invertebrate natural products for anti-inflammatory and chronic diseases[J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2013: 572859.

[13] TEZZO X, BUSH S R, OOSTERVEER P, et al. Food system perspective on fisheries and aquaculture development in Asia[J]. Agriculture and Human Values, 2021, 38(1): 73-90.

[14] VAN Oppen M J H, COLEMAN M A. Advancing the protection of marine life through genomics[J]. PLoS Biology, 2022, 20(10): e3001801.

[15] HOUSTON R D, BEAN T P, MACQUEEN D J, et al.

Harnessing genomics to fast-track genetic improvement in aquaculture[J]. Nature Reviews Genetics, 2020, 21(7): 389-409.

[16] LEDFORD H. CRISPR: gene editing is just the beginning[J]. Nature, 2016, 531: 156-159.

[17] DOUDNA J A, GERSBACH C A. Genome editing: the end of the beginning[J]. Genome Biology, 2015, 16: 292.

[18] WANG H, DING J. Mechanism of polyunsaturated fatty acids biosynthesis and metabolism in marine invertebrates: a review[J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2021, 23(10): 181-191.

[19] XU J, ZHANG L, WANG Y, et al. Thyroid hormone signaling pathway and its research advance in marine invertebrate[J]. Biotechnology Bulletin, 2014(10): 23-32.

[20] ZHANG L, FAN X, NIU R. Immunomodulatory activity determination of ethanol extracts from some marine invertebrates[J]. Chinese Journal of Immunology, 2003, 19(11): 739-743.

[21] CHEN N, WANG X, LIU B, et al. Research progress on the chemical constituents of starfish[J]. Chinese Journal of Marine Drugs, 2019, 38(2): 39-53.

[22] 张晓娟, 郭华荣. 海洋无脊椎动物胚胎细胞培养研究进展[J]. 海洋科学前沿, 2016, 3(2): 38-42.
ZHANG Xiaojuan, GUO Huarong. Advances in the embryonic cell culture of marine invertebrates[J]. Advances in Marine Sciences, 2016, 3(2): 38-42.

[23] ROSSI S, BRAMANTI L, GORI A, et al. Marine animal forests: The ecology of benthic biodiversity hotspots[M]. Cham: Springer International Publishing, 2017: 571-594.

[24] OSTROVSKY A N. Reproductive strategies and patterns in marine invertebrates: diversity and evolution[J]. Paleontological Journal, 2021, 55(7): 803-810.

[25] ARENAL A, PIMENTEL R, GARCÍA C, et al. The SV40 T antigen nuclear localization sequence enhances nuclear import of vector DNA in embryos of a crustacean (*Litopenaeus schmitti*)[J]. Gene, 2004, 337: 71-77.

[26] CORE A B, REYNA A E, CONAWAY E A, et al. Pantropic retroviruses as a transduction tool for sea urchin embryos[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(14): 5334-5339.

[27] YUE C, YU H, LI H, et al. The endogenous EF-1α promoter is highly active in driving gene overexpression in developing embryos of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*[J]. Aquaculture, 2020, 522: 735134.

[28] FRANK U, NICOTRA M L, SCHNITZLER C E. The colonial cnidarian *Hydractinia*[J]. Evodevo, 2020, 11(1): 7.

[29] REVILLA-I-DOMINGO R, SCHMIDT C, ZIFKO C, et al. Establishment of transgenesis in the Demosponge *Suberites domuncula*[J]. Genetics, 2018, 210(2): 435-443.

[30] KIM T K, EBERWINE J H. Mammalian cell transfection: the present and the future[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2010, 397(8): 3173-3178.

[31] CHOW Y T, CHEN S, WANG R, et al. Single cell transfection through precise microinjection with quantitatively controlled injection volumes[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 24127.

[32] MONTOLIU L. Historical DNA manipulation overview[J]. Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.), 2022, 2495: 3-28.

[33] MONTOLIU L. Transgenesis and genome engineering: a historical review[J]. Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.), 2023, 2631: 1-32.

[34] JAENISCH R, MINTZ B. Simian virus 40 DNA sequences in DNA of healthy adult mice derived from preimplantation blastocysts injected with viral DNA[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1974, 71(4): 1250-1254.

[35] JAENISCH R. Infection of mouse blastocysts with SV40 DNA: normal development of the infected embryos and persistence of SV40-specific DNA sequences in the adult animals[J]. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 1975, 39 Pt 1: 375-380.

[36] GORDON J W, SCANGOS G A, PLOTKIN D J, et al. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1980, 77(12): 7380-7384.

[37] CHONG Z X, YEAP S K, HO W Y. Transfection types, methods and strategies: a technical review[J]. PeerJ, 2021, 9: e11165.

[38] STEPANENKO A A, HENG H H. Transient and stable vector transfection: Pitfalls, off-target effects, artifacts[J]. Mutation Research-Reviews in Mutation Research, 2017, 773: 91-103.

[39] LUFINO M M P, EDSER P a H, WADE-MARTINS R. Advances in high-capacity extrachromosomal vector technology: Episomal maintenance, vector delivery, and transgene expression[J]. Molecular Therapy, 2008, 16(9): 1525-1538.

[40] RIEDL S A B, KAISER P, RAUP A, et al. Non-viral transfection of human T lymphocytes[J]. Processes, 2018, 6(10): 188.

[41] KAMIMURA K, SUDA T, ZHANG G, et al. Advances in gene delivery systems[J]. Pharmaceutical Medicine, 2011, 25(5): 293-306.

[42] PFEIFER A, VERMA I M. Gene therapy: Promises and problems[J]. Annual Review of Genomics and Human

Genetics, 2001, 2: 177-211.

[43] FAKHIRI J, SCHNEIDER M A, PUSCHHOF J, et al. Novel chimeric gene therapy vectors based on adeno-associated virus and four different mammalian bocaviruses[J]. Molecular Therapy-Methods & Clinical Development, 2019, 12: 202-222.

[44] BARQUINERO J, EIXARCH H, PÉREZ-MELGOSA M. Retroviral vectors: new applications for an old tool[J]. Gene Therapy, 2004, 11: S3-S9.

[45] MALI S. Delivery systems for gene therapy[J]. Indian Journal of Human Genetics, 2013, 19(1): 3-8.

[46] WOODS N B, MUESSIG A, SCHMIDT M, et al. Lentiviral vector transduction of NOD/SCID repopulating cells results in multiple vector integrations per transduced cell: risk of insertional mutagenesis[J]. Blood, 2003, 101(4): 1284-1289.

[47] ALSAGGAR M, LIU D. Physical methods for gene transfer[J]. Advances in Genetics, 2015, 89: 1-24.

[48] DU X, WANG J, ZHOU Q, et al. Advanced physical techniques for gene delivery based on membrane perforation[J]. Drug Delivery, 2018, 25(1): 1516-1525.

[49] ZHANG Y, YU L-C. Microinjection as a tool of mechanical delivery[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2008, 19(5): 506-510.

[50] GRAESSMANN M, GRAESSMANN A. Microinjection of tissue culture cells[J]. Methods in Enzymology, 1983, 101: 482-492.

[51] PRASANNA G L, PANDA T. Electroporation: Basic principles, practical considerations and applications in molecular biology[J]. Bioprocess Engineering, 1997, 16(5): 261-264.

[52] YARMUSH M L, GOLBERG A, SERSA G, et al. Electroporation-based technologies for medicine: Principles, applications, and challenges[J]. Annual Review of Biomedical Engineering, 2014, 16(1): 295-320.

[53] MIKLAVCIC D, MALI B, KOS B, et al. Electrochemotherapy: from the drawing board into medical practice[J]. Biomedical Engineering Online, 2014, 13(1): 29.

[54] PUCIHAR G, KRMELJ J, REBERSEK M, et al. Equivalent pulse parameters for electroporation[J]. IEEE Transactions on Biomedical Engineering, 2011, 58(11): 3279-3288.

[55] SHERBA J J, HOGQUIST S, LIN H, et al. The effects of electroporation buffer composition on cell viability and electro-transfection efficiency[J]. Scientific Reports, 2020, 10(1): 3053.

[56] DJUZENOVA C S, ZIMMERMANN U, FRANK H, et al. Effect of medium conductivity and composition on the uptake of propidium iodide into electropermeabilized myeloma cells[J]. Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes, 1996, 1284(2): 143-152.

[57] MATSUNO Y, IWATA H, UMEDA Y, et al. Nonviral gene gun mediated transfer into the beating heart[J]. Asaio Journal, 2003, 49(6): 641-644.

[58] KLEIN R M, WOLF E D, WU R, et al. High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. 1987[J]. Biotechnology (Reading, Mass.), 1992, 24: 384-386.

[59] YANG N S, BURKHOLDER J, ROBERTS B, et al. In vivo and in vitro gene-transfer to mammalian somatic-cells by particle bombardment[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1990, 87(24): 9568-9572.

[60] SHIRAHATA Y, OHKOHCHI N, ITAGAK H, et al. New technique for gene transfection using laser irradiation[J]. Journal of Investigative Medicine, 2001, 49(2): 184-190.

[61] LABATMOLEUR F, STEFFAN A M, BRISSON C, et al. An electron microscopy study into the mechanism of gene transfer with lipopolyamines[J]. Gene Therapy, 1996, 3(11): 1010-1017.

[62] TSENG W C, HASELTON F R, GIORGIO T D. Transfection by cationic liposomes using simultaneous single cell measurements of plasmid delivery and transgene expression[J]. Journal of Biological Chemistry, 1997, 272(41): 25641-25647.

[63] TOUSIGNANT J D, GATES A L, INGRAM L A, et al. Comprehensive analysis of the acute toxicities induced by systemic administration of cationic lipid: Plasmid DNA complexes in mice[J]. Human Gene Therapy, 2000, 11(18): 2493-2513.

[64] BANGHAM A D, STANDISH M M, WATKINS J C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids[J]. Journal of Molecular Biology, 1965, 13(1): 238-252.

[65] KARMALI P P, CHAUDHURI A. Cationic liposomes as non-viral carriers of gene medicines: Resolved issues, open questions, and future promises[J]. Medicinal Research Reviews, 2007, 27(5): 696-722.

[66] LIU D X, REN T, GAO X. Cationic transfection lipids[J]. Current Medicinal Chemistry, 2003, 10(14): 1307-1315.

[67] PARKER A L, NEWMAN C, BRIGGS S, et al. Nonviral gene delivery: techniques and implications for molecular medicine[J]. Expert Reviews in Molecular Medicine, 2003, 5(22): 1-15.

[68] ZHOU X H, HUANG L. DNA transfection mediated by cationic liposomes containing lipopolylysine: characterization and mechanism of action[J]. Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes, 1994, 1189(2): 195-203.

[69] YAMANO S, DAI J, MOURSI A M. Comparison of transfection efficiency of nonviral gene transfer rea-

gents[J]. Molecular Biotechnology, 2010, 46(3): 287-300.

[70] BOUSSIF O, LEZOUALCH F, ZANTA M A, et al. A versatile vectorfor gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1995, 92(16): 7297-7301.

[71] PACK D W, HOFFMAN A S, PUN S, et al. Design and development of polymers for gene delivery[J]. Nature Reviews Drug Discovery, 2005, 4(7): 581-593.

[72] ABDALLAH B, SACHS L, DEMENEIX B A. Non-viral gene transfer: Applications in developmental biology and gene therapy[J]. Biology of the Cell, 1995, 85(1): 1-7.

[73] ARAVINDAN L, BICKNELL K A, BROOKS G, et al. Effect of acyl chain length on transfection efficiency and toxicity of polyethylenimine[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2009, 378(1/2): 201-210.

[74] HAN N R, LEE H, BAEK S, et al. Delivery of episomal vectors into primary cells by means of commercial transfection reagents[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2015, 461(2): 348-353.

[75] ZHANG L, FENG Q, WANG J, et al. Microfluidic synthesis of rigid nanovesicles for hydrophilic reagents delivery[J]. Angewandte Chemie-International Edition, 2015, 54(13): 3952-3956.

[76] LIONG M, LU J, KOVOCHICH M, et al. Multifunctional inorganic nanoparticles for imaging, targeting, and drug delivery[J]. Acs Nano, 2008, 2(5): 889-896.

[77] NAZ S, SHAMOON M, WANG R, et al. Advances in therapeutic implications of inorganic drug delivery nano-platforms for cancer[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(4): 965.

[78] PRIYAM A, NAGAR P, SHARMA A K, et al. Mussel-inspired polydopamine-polyethylenimine conjugated nanoparticles as efficient gene delivery vectors for mammalian cells[J]. Colloids and Surfaces B-Biointerfaces, 2018, 161: 403-412.

[79] KARIMOV M, APPELHANS D, EWE A, et al. The combined disulfide cross-linking and tyrosine-modification of very low molecular weight linear PEI synergistically enhances transfection efficacies and improves biocompatibility[J]. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2021, 161: 56-65.

[80] KANG Y K, KWON K, RYU J S, et al. Nonviral genome editing based on a polymer-derivatized CRISPR nanocomplex for targeting bacterial pathogens and antibiotic resistance[J]. Bioconjugate Chemistry, 2017, 28(4): 957-967.

[81] SINGH R K, KNOWLES J C, KIM H-W. Advances in nanoparticle development for improved therapeutics delivery: nanoscale topographical aspect[J]. Journal of Tissue Engineering, 2019, 10: 2041731419877528.

[82] NIU Y, YU M, HARTONO S B, et al. Nanoparticles mimicking viral surface topography for enhanced cellular delivery[J]. Advanced Materials, 2013, 25(43): 6233-6237.

[83] SONG H, YU M, LU Y, et al. Plasmid DNA delivery: nanotopography matters[J]. Journal of the American Chemical Society, 2017, 139(50): 18247-18254.

[84] SANG Z, XU L, DING R, et al. Nanoparticles exhibiting virus-mimic surface topology for enhanced oral delivery[J]. Nature Communications, 2023, 14(1): 7694.

[85] FU J Y, HAN W W, ZHANG X, et al. Silica nanoparticles with virus-mimetic spikes enable efficient siRNA delivery in vitro and in vivo[J]. Research, 2022, 2022(12): 0014.

[86] 杨红生，肖宁，张涛. 棘皮动物学研究现状与展望[J]. 海洋科学集刊, 2016, 51: 125-131.
YANG Hongsheng, XIAO Ning, ZHANG Tao. Present status and prospect of the study of echinoderms[J]. Studia Marina Sinica, 2016, 51: 125-131.

[87] MCMAHON A P, FLYTZANIS C N, HOUGH-EVANS B R, et al. Introduction of cloned DNA into sea urchin egg cytoplasm: replication and persistence during embryogenesis[J]. Developmental Biology, 1985, 108(2): 420-430.

[88] FRANKS R R, HOUGH-EVANS B R, BRITTEN R J, et al. Direct introduction of cloned DNA into the sea urchin zygote nucleus, and fate of injected DNA[J]. Development (Cambridge, England), 1988, 102(2): 287-299.

[89] KURITA M, KONDOH H, MITSUNAGA-NAKATSUBO K, et al. Utilization of a particle gun DNA introduction system for the analysis of *cis*-regulatory elements controlling the spatial expression pattern of the arylsulfatase gene (*HpArs*) in sea urchin embryos[J]. Development Genes and Evolution, 2003, 213(1): 44-49.

[90] CHEERS M S, ETTENSOHN C A. Rapid microinjection of fertilized eggs[J]. Development of Sea Urchins, Ascidians, and Other Invertebrate Deuterostomes: Experimental Approaches, 2004, 74: 287-310.

[91] JARVELA A M C, HINMAN V. A method for microinjection of *Patiria minata* zygotes[J]. Jove-Journal of Visualized Experiments, 2014(91): e51913.

[92] CABRERA E, PIMENTEL R, ABAD Z P J, et al. Transient transformation of shrimp (*Penaeus schmitti*) embryos by DNA microinjection[J]. Theriogenology, 1995, 43(1): 180.

[93] PIMENTEL R, CABRERA E, HERNÁNDEZ O, et al. Transient expression of a *lacZ* transgene in shrimp (*Penaeus schmitti*) using two different gene transfer

methods[J]. Biotecnologia Aplicada, 1996, 13(1): 26.
[94] ARENAL A, PIMENTEL R, GUIMARAIS M, et al. Gene transfer in shrimp (*Litopenaeus schmitti*) by electroporation of single-cell embryos and injection of naked DNA into adult muscle[J]. Biotecnologia Aplicada, 2000, 17(4): 247-250.
[95] PRESTON N P, BAULE V J, LEOPOLD R, et al. Delivery of DNA to early embryos of the Kuruma prawn, *Penaeus japonicus*[J]. Aquaculture, 2000, 181(3/4): 225-234.
[96] TSENG F S, TSAI H J, LIAO I C, et al. Introducing foreign DNA into tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by electroporation[J]. Heriogenology, 2000, 54(9): 1421-1432.
[97] YAZAWA R, WATANABE K, KOYAMA T, et al. Development of gene transfer technology for black tiger shrimp, *Penaeus monodon*[J]. Journal of Experimental Zoology Part A-Ecological and Integrative Physiology, 2005, 303A(12): 1104-1109.
[98] SUN P S, VENZON N C, CALDERON F R O, et al. Evaluation of methods for DNA delivery into shrimp zygotes of *Penaeus* (*Litopenaeus*) *vannamei*[J]. Aquaculture, 2005, 243(1/4): 19-26.
[99] LU Y N, SUN P S. Viral resistance in shrimp that express an antisense Taura syndrome virus coat protein gene[J]. Antiviral Research, 2005, 67(3): 141-146.
[100] 刘志毅, 相建海, 周国瑛, 等. 用基因枪将外源 DNA 导入中国对虾[J]. 科学通报, 2000, 45(23): 2539-2544.
LIU Zhiyi, XIANG Jianhai, ZHOU Guoying, et al. Introducing exogenous DNA into Chinese shrimp using a gene gun[J]. Chinese Science Bulletin, 2000, 45(23): 2539-2544.
[101] 李新正，寇琦，王金宝，等. 中国海洋无脊椎动物分类学与系统演化研究进展与展望[J]. 海洋科学，2020, 44(7): 26-70.
LI Xinzheng, KOU Qi, WANG Jinbao, et al. Advances and perspectives of researches on taxonomy and phylogeny of marine invertebrates in China[J]. Marine Sciences, 2020, 44(7): 26-70.
[102] LU J K, CHEN T T, ALLEN S K, et al. Production of transgenic dwarf surfclams, *Mulinia lateralis*, with pantropic retroviral vectors[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1996, 93(8): 3482-3486.
[103] CHEN J, WU C, ZHANG B, et al. *PiggyBac* transposon-mediated transgenesis in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) - first time in Mollusks[J]. Frontiers in Physiology, 2018, 9: 811.
[104] JIN K, ZHANG B, JIN Q, et al. CRISPR/Cas9 system-mediated gene editing in the Fujian oysters (*Crassostrea angulate*) by electroporation[J]. Frontiers in Marine Science, 2021, 8: 763470.
[105] 喻达辉, 贾晓平, 陈素文, 等. 合浦珠母贝卵子电击脉冲参数的初步研究[J]. 海洋科学, 2005, 29(8): 15-19.
YU Dahui, JIA Xiaoping, CHEN Suwen, et al. Optimization of pulse parameters in electroporation of *Pinctada fucata* eggs[J]. Marine Sciences, 2005, 29(8): 15-19.
[106] 喻达辉，汪亚平，吴开畅，等. 大珠母贝基因转移的电击参数[J]. 水产学报, 2001, 25(5): 408-412.
YU Dahui, WANG Yaping, WU Kaichang, et al. Parameters of electroporation in transgene of *Pinctada maxima*[J]. Journal of Fisheries of China, 2001, 25(5): 408-412.
[107] YOON J, GU W-B, KONUMA M, et al. Gene delivery available in molluscan cells by strong promoter discovered from bivalve-infectious virus[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2022, 119(45): e2209910119.
[108] TSAI H J, LAI C H, YANG H S. Sperm as a carrier to introduce an exogenous DNA fragment into the oocyte of Japanese abalone (*Haliotis diversicolor suportexta*)[J]. Transgenic Research, 1997, 6(1): 85-95.
[109] 石耀华，黄海燕，王爱民. 马氏珠母贝精子携带法转基因研究[C]//中国动物学会、中国海洋湖沼学会贝类学会分会第十四次学会研讨会论文摘要汇编, 2009: 132.
SHI Yaohua, HUANG Haiyan, WANG Aimin. Transgenic research using sperm-mediated gene transfer in *Pinctada martensii*[C]// The Abstract Compilation of the 14th Conference of the Molluscan Branch of the Chinese Zoological Society and the Chinese Society of Oceanology and Limnology, 2009: 132.
[110] CRAWFORD K, QUIROZ J F D, KOENIG K M, et al. Highly efficient knockout of a squid pigmentation gene[J]. Current Biology, 2020, 30(17): 3484-3490.
[111] HALTON D W, MAULE A G. Flatworm nerve-muscle: structural and functional analysis[J]. Canadian Journal of Zoology, 2004, 82(2): 316-333.
[112] EGGER B, GSCHWENTNER R, RIEGER R. Free-living flatworms under the knife: past and present[J]. Development Genes and Evolution, 2007, 217(2): 89-104.
[113] RINK J C. Stem cell systems and regeneration in planaria[J]. Development Genes and Evolution, 2013, 223(1/2): 67-84.
[114] HALTON D W, GUSTAFSSON M K S. Functional morphology of the platyhelminth nervous system[J]. Parasitology, 1996, 113: S47-S72.
[115] PFISTER D, DE MULDER K, HARTENSTEIN V, et al. Flatworm stem cells and the germ line: Developmental and evolutionary implications of *macvasa* expression in *Macrostomum lignano*[J]. Developmental Biology, 2008, 319(1): 146-159.
[116] MOTON S, WUDARSKI J, GRUDNIEWSKA M, et al. The regenerative flatworm *Macrostomum lignano*, a

model organism with high experimental potential[J]. International Journal of Developmental Biology, 2018, 62(6/8): 551-558.

[117] WUDARSKI J, SIMANOV D, USTYANTSEV K, et al. Efficient transgenesis and annotated genome sequence of the regenerative flatworm model *Macrostomum lignano*[J]. Nature Communications, 2017, 8(1): 2120.

[118] ZAPATA F, GOETZ F E, SMITH S A, et al. Phylogenomic analyses support traditional relationships within Cnidaria[J]. PLoS One, 2015, 10(10): e0139068.

[119] TECHNAU U, STEELE R E. Evolutionary crossroads in developmental biology: Cnidaria[J]. Development, 2011, 138(23): 1447-1458.

[120] KUENZEL T, HEIERMANN R, FRANK U, et al. Migration and differentiation potential of stem cells in the cnidarian *Hydractinia* analysed in eGFP-transgenic animals and chimeras[J]. Developmental Biology, 2010, 348(1): 120-129.

[121] CHRYHRYSOSTOMOU E, FEBRIMARSA, DUBUC T, et al. Gene manipulation in *Hydractinia*[J]. Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.), 2022, 2450: 419-436.

[122] QUIROGA-ARTIGAS G, DUSCHER A, LUNDQUIST K, et al. Gene knockdown via electroporation of short hairpin RNAs in embryos of the marine hydroid *Hydractinia symbiolongicarpus*[J]. Scientific Reports, 2020, 10(1): 17119.

[123] RENFER E, AMON-HASSENZAHL A, STEINMETZ P R H, et al. A muscle-specific transgenic reporter line of the sea anemone, *Nematostella vectensis*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010, 107(1): 104-108.

[124] KARABULUT A, HE S, CHEN C-Y, et al. Electroporation of short hairpin RNAs for rapid and efficient gene knockdown in the starlet sea anemone, *Nematostella vectensis*[J]. Developmental Biology, 2019, 448(1): 7-15.

[125] MASUDA-OZAWA T, FUJITA S, NAKAMURA R, et al. siRNA-mediated gene knockdown via electroporation in hydrozoan jellyfish embryos[J]. Scientific Reports, 2022, 12(1): 16049.

[126] ARTIGAS G Q, LAPEBIE P, LECLERE L, et al. A gonad-expressed opsin mediates light-induced spawning in the jellyfish *Clytia*[J]. eLife, 2018, 7: e29555.

[127] ERESKOVSKY A. Stem cells cell in sponges (Porifera): an update[J]. Isj-Invertebrate Survival Journal, 2019, 16: 62-63.

[128] ADAMSKA M, LARROUX C, ADAMSKI M, et al. Origin of the animal developmental toolkit: signaling pathways and transcription factors in a sponge[J]. Mechanisms of Development, 2005, 122: S161-S162.

[129] DEGNAN B M, LEYS S P, LARROUX C, et al. Developmental genes in sponges and the antiquity of animal development[J]. Integrative and Comparative Biology, 2003, 43(6): 989.

[130] 黄海燕，王爱民，宫知远，等. 水生动物转基因技术及其应用的研究进展[C]// 2008 年中国水产学会学术年会论文摘要集, 2008: 36.
HUANG Haiyan, WANG Aimin, GONG Zhiyuan, et al. Advances in studies on transgenic technique applying in aquaculture animals[C]// The Abstract Compilation of the 2008 Academic Conference of the Chinese Society of Fisheries, 2008: 36.

[131] JAENISCH R, ZHANG F, GAGE F. Genome editing in neurosciences[M]. Cham (CH): Springer, 2017: 21-29.

[132] KOSICHI M, TOMBERG K, BRADLEY A. Repair of double-strand breaks induced by CRISPR-Cas9 leads to large deletions and complex rearrangements[J]. Nature Biotechnology, 2018, 36(8): 765-771.

Current status of the transfection techniques applied in marine invertebrates

JI Zhongyu, KANG Yunsi, DI Guotao
(Fang Zongxi Center, College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Received: Apr. 17, 2024
Key words: transfection; marine invertebrates; physical transfection; chemical transfection

Abstract: Marine invertebrates harbor immense potential for applications in many fields, such as biomedicine and agriculture. Unraveling and developing their bio-economical value at the genetic level is a major topic for future research. However, genetic manipulation techniques commonly used in model organisms have not yet been widely applied to them; this limitation restricts research on aspects such as gene function and regulation of expression in them. Transfection, as a highly efficient technique for transfection of cells, has become an ideal tool for the genetic manipulation of marine invertebrates. Here, we provide an overview of the different types of transfection methods and compare their advantages and disadvantages. Then, we focus on the progress of transfection technology and summarize the challenges in establishing transfection techniques in marine invertebrates. This study aims to provide a reference for the selection of transfection strategies and to assist in molecular biology research in marine invertebrates.

(本文编辑：杨　悦)