

双标记选择载体转染牛胎儿成纤维细胞方法的建立*

龚国春 戴蕴平 樊宝良 赵春江 王莉莉 王海平 郑敏 李宁**

中国农业大学农业生物技术国家重点实验室, 北京 100094

摘要 以经 *Ssp*I 和 *Bam*HI 对所构建的双标记选择载体质粒 pCE-EGFP-IRES-Neo-dNdB 双酶切后的线性目的 DNA 为外源基因, 对电击介导的牛胎儿成纤维细胞基因转染方法的效率进行了优化. 实验结果表明, 当电场强度为 1.2 kV/cm、脉冲时间为 1 ms 时可获得约 50 个阳性细胞克隆/10⁵ 个细胞的最佳转染效率. 通过牛胎儿成纤维细胞对不同浓度 G418 抗性的敏感性实验确定 800 μg/mL G418 为快速筛选浓度, 以 300 μg/mL G418 为维持筛选浓度. 从两个牛胎儿成纤维细胞系中共分离了 56 个绿色荧光蛋白(GFP)阳性细胞克隆, 从中选取 2 个冷冻保存. 经 PCR 检测, 证实 2 个冷冻克隆株均含有所转染的外源基因.

关键词 双标记选择载体 牛 胎儿成纤维细胞 电击 基因转染

1997 年, 英国的 PPL Therapeutics 公司和罗斯林研究所的 Wilmut 博士合作, 通过体细胞核移植率先在世界上培育出表达人凝血因子 IX 的转基因克隆绵羊^[1], 从而开辟了转基因克隆的新领域. 转基因克隆是运用体细胞克隆技术和细胞基因转染技术, 首先将外源目的基因导入体外培养的动物细胞, 然后经过各种筛选方法获得阳性细胞及其克隆, 再利用这些阳性细胞进行体细胞克隆生产转基因动物^[2~4]. 但外源目的基因在细胞内的有效整合率仍然是限制转基因克隆效率的一个瓶颈. 本实验通过对荧光蛋白、新霉素基因双标记选择载体质粒 pCE-EGFP-IRES-Neo-dNdB 电击转染牛胎儿成纤维细胞最佳条件的优化, 获得了有效整合率较高的转基因阳性细胞系.

1 材料与方法

构建同时表达绿色荧光蛋白(GFP)和新霉素抗性(Neo^r)的哺乳动物双标记选择载体: 以 *Eco*RI, *Xba*I 双酶切质粒 pCE321-FL 和质粒 pCMV-EGFP-IRES-Neo, 将质粒 pCMV-EGFP-IRES-Neo 中细胞巨化病毒(CMV)启动子后的增强绿色荧光蛋白基因

(EGFP)和内部核糖体进入位点(IRES)及其携带的新霉素抗性基因(Neo^r)插入到质粒 pCE321-FL 中由细胞巨化病毒增强子(CMV-IE Enhancer)和人延伸因子 1α 启动子(pEF321)组成的 5' 调控区 pCE321 后, 以 pCE321 替代 CMV 启动子. 去除位于 DNA 片段 EGFP-IRES-Neo 间的 *Not*I 位点和 *Bam*HI 位点形成含双标记选择载体的质粒 pCE-EGFP-IRES-Neo-dNdB. 去除 *Not*I 位点是为在双标记选择载体旁端插入多克隆位点做准备, 去除 *Bam*HI 位点是为将双标记选择载体从质粒上完整切下. 以 *Ssp*I, *Bam*HI 双酶切质粒 pCE-EGFP-IRES-Neo-dNdB 获得线性双标记选择载体(其结构见图 1), 经 QIA-GEN 公司的 QIAEX II 试剂盒纯化回收, 溶于灭菌超纯水中.

牛胎儿成纤维细胞系的建立: 从冀南牛 68 日龄的胎儿分离部分皮肤组织, 通过胰酶消化法建立牛胎儿成纤维细胞系^[5]. 当细胞传至 4~5 代时, 取其中一部分冻存, 另一部分用于基因转染.

细胞计数、活细胞检测、牛胎儿成纤维细胞对 G418 毒性敏感性检测及电击转染的方法和步骤参见参考文献[6].

2002-06-07 收稿, 2002-07-05 收修改稿

* 北京市重大科技合同项目(990411-01)和国家重点基础研究发展规划项目(G20000161)资助

** 联系人, E-mail: ninglbau@public3.bat.net.cn

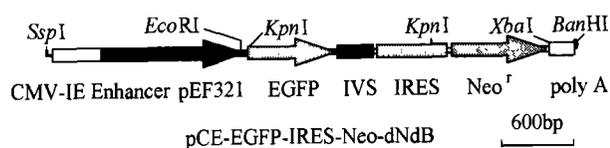


图1 pCE-EGFP-IRES-Neo-dNdB 双酶切后的线性图谱
 CMV-IE Enhancer, 细胞巨化病毒增强子; pEF321, 人延伸因子1 α 启动子; EGFP, 增强绿色荧光蛋白基因; IVS, 人工内含子; IRES, 内部核糖体进入位点; Neo^r, 新霉素抗性基因; polyA, SV40 的加尾信号

阳性细胞的单克隆培养: 在荧光显微镜下观察上述方法所得细胞克隆的发光情况, 用记号笔圈住分散良好(远离其他克隆)且细胞数量多的荧光克隆; 吸除培养液, 用无钙镁 PBS 漂洗细胞两次, 在高倍解剖镜下, 将 30~50 μ L 0.25% 胰蛋白酶消化液滴加在标记好的细胞克隆上, 待克隆的大多数细胞收缩脱壁后, 不等细胞悬浮, 快速吸取细胞克隆, 但注意不要吸入附近其他克隆的细胞; 转移细胞到加有 500 μ L 培养液的 4 孔板中, 吹打分散细胞团块; 挑出的克隆继续培养, 降低 G418 浓度至 300 μ g/mL 维持筛选; 待克隆细胞数量扩大后或汇合后, 将一部分细胞转移到 35 mm 培养皿中继续扩大培养, 另一部分用于转基因检测, 其他扩大后的细胞尽早冷冻。

转染细胞的 PCR 检测: 根据质粒 pCMV-EGFP-IRES-Neo 的 EGFP-IVS-IRES-Neo 段设计一对引物, 扩增范围包含 IVS 和 IRES 的全部及 EGFP 和 Neo 的部分序列, 预计扩增长度为 1.3 kb. 引物序列如下:

P₁: 5'CTG, CCC, GAC, AAC, CAC, TAC, CT3';

P₂: 5'CAG, TCA, TAG, CCG, AAT, AGC, CTC, TC3'

反应体系 (50 μ L) 含模板 DNA 3 μ L; 引物 1 μ L; 2.5 mmol/L dNTP 3 μ L; 10 \times Tag 酶缓冲液 5 μ L; Taq 酶 10 U. 反应参数为 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 40 s, 61 $^{\circ}$ C 40 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 共 25 个循环; 最后延伸 72 $^{\circ}$ C 10 min.

2 结果与讨论

结果表明, 200~800 μ g/mL G418 对牛胎儿成纤维细胞有明显毒害作用, 在培养后 5~21 d 内可杀死全部细胞. 细胞对 G418 的毒性敏感性随 G418 浓度升高而增加, 其中 800 μ g/mL G418 可在 8 d 内杀死全部细胞, 300 μ g/mL G418 在 15 d 内杀死全部细胞.

从图 2, 3 看出, 在细胞密度为 5×10^6 细胞/

mL, DNA 浓度为 20 μ g/mL 的条件下, 当电场强度为 1.2 kV/cm, 脉冲时间为 1 ms 时可获得最佳转染效率. 每 10^5 个细胞中可以获得约 50 个转基因细胞克隆, 优于其他处理组.

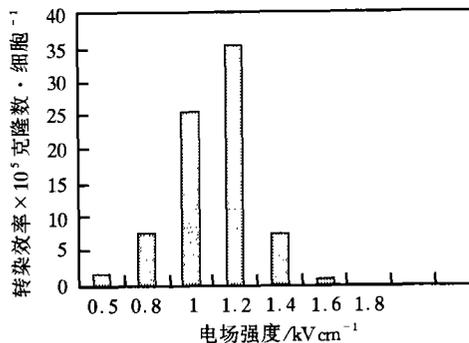


图2 不同电场强度的转染效率
 脉冲时间为 0.8 ms

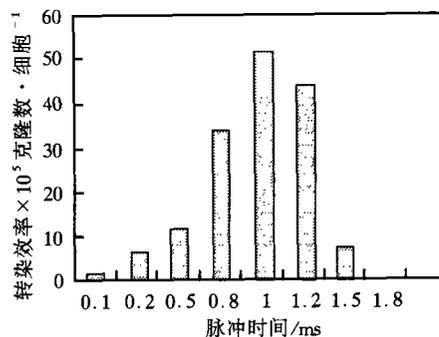


图3 不同脉冲时间的转染效率
 电场强度为 1.2 kV·cm⁻¹

不同的细胞对电场的强弱、电脉冲时间的长短要求不一样. 电场强度太小, 不能引起细胞膜的变化, DNA 就不能进入待转染细胞; 电场强度太大, 容易损伤细胞. 电击时所用的电场强度和脉冲时间应该通过预实验来决定. 预实验的电场强度和脉冲时间应以 50%~80% 细胞能存活下来为准. 本试验观察到, 电场强度为 0.8~1.5 kV/cm、脉冲时间为 0.8 ms 时, 细胞存活率为 50%~80%. 除场强外, 电击效率和细胞存活率也受脉冲时间 t 的影响. 已观察到, 当使用很窄的脉冲时间时, 要达到有效的电击效果场强通常很高. 反之, 当脉冲时间长时, 所需的场强非常低. 因此, 看来场强和脉冲时间在一定程度上可以互补. 在大多数实验中, 对于特殊细胞类型, 通常首先根据以前发表的文章, 为 t 选择一个试验值, 然后改变电场强度的设定, 以优化细胞存活率和转染率. 选择好最优电场强度后, 再进行脉冲时间 t 的优化. 电击效率还受到电击介质

浓度的影响。最优组分依使用的特定细胞种类而有明显的变化。因此,如果努力优化电场强度和脉冲时间,但结果依然不令人满意,就应尝试改变电击介质。此外,细胞的生长状态对电击转染的效率影响较大,一般以处于对数生长后期的细胞为佳。同时电击效率还受到细胞密度和DNA浓度等因素的影响,本实验未对这些因素进行进一步的优化。筛选初期出现的单个GFP细胞见图4。

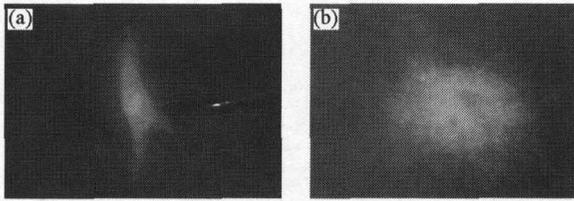


图4 GFP阳性细胞株

- (a) 筛选初期出现的单个GFP细胞;
(b) 筛选两周后出现GFP细胞克隆

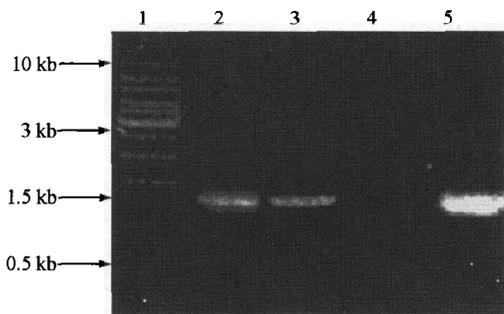


图5 转染细胞的PCR结果

- 1, DNA标准; 2, 经转染细胞样品1(第12代细胞); 3, 经转染细胞样品2(第12代细胞); 4, 未转染细胞(阴性对照); 5, 质粒pCE-EGFP-IRES-Neo-dNdB(阳性对照)

实验共分离出56个GFP阳性克隆(见图4(b)),转移到4孔板后,有27个克隆继续增殖存活,存活的克隆转移到直径35mm培养皿中后,仅9个克隆能生长至汇合,将其中2个克隆株冷冻保存。经PCR检测,证实2个冷冻克隆株均含有所转染的外源基因。转染细胞的PCR检测结果见图5。

对于贴壁细胞而言,很难从培养皿中的克隆群中分离出单个克隆,本试验虽然利用胰酶局部消化的方法,成功地分离了56个阳性克隆。但分离出的56个克隆最后仅有9个克隆能继续扩大。因此,为了提高单细胞克隆形成率和随后的存活率,尚有很多研究工作要做,比如,改进细胞培养条件,鉴定和分离培养代数更长的胎儿成纤维细胞,增加转染的初始细胞数量等等。

参 考 文 献

- 1 Schieke A S, et al. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science*, 1997, 278: 2130
- 2 Wakayama T, et al. Mice cloned from embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 14984
- 3 McCeath K J, et al. Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells. *Nature*, 2000, 405: 1066
- 4 Cibelli J B, et al. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science*, 1998, 289: 1256
- 5 Zakhartchenko V, et al. Effects of serum starvation and recloning on the efficiency of nuclear transfer using bovine fetal fibroblasts. *J Reprod Fertil, Suppl*, 1999, 115: 325
- 6 薛庆善 主编. 体外培养的原理与技术. 北京: 科学出版社, 2001