

利用体细胞核移植技术生产表达增强绿色荧光蛋白(EGFP)的转人溶菌酶基因(HLY)的猪克隆胚胎^{*}

李秋艳^{1,2} 卫恒习¹ 郭英¹ 李燕² 赵蕊² 于政权¹ 汤波²
张磊² 戴蕴平^{1,2} 李宁^{1**}

1 中国农业大学农业生物技术国家重点实验室, 生物学院, 北京 100094; 2 北京济普森生物技术有限公司, 北京 100094

摘要 由于生理特性和器官大小的原因, 猪在人类疾病模型和器官移植方面具有很大的应用潜力. 正因如此, 猪基因结构的修饰对农业生产和人类医学两方面都意义重大. 研究用脂质体介导的方法转染了猪胎儿成纤维细胞, 所用结构为双标的人溶菌酶质粒(pBC1-HLY-GFP-NEO). 分别对包含两个品种(五指山猪、长白猪)的5个细胞系(sw7, sw8, slw3, slw6和slw9)进行了转染. 经过14d, 1000 μg/mL浓度G418药物的筛选处理, sw7, sw8, slw3和slw6等4个细胞系的95%以上细胞都表达绿色荧光蛋白, 而细胞系slw9的转染效率只有49.3%. 用转染效率高的3个细胞系作为核供体构建猪克隆胚胎, 通过电刺激方法进行融合和激活, 然后在PZM3中体外培养. 48h后, 重构胚的平均卵裂率为76.7%; 经过7d培养后观察, 有18.5%的胚胎发育到囊胚阶段, 其中93.3%的囊胚在荧光显微镜下能够发出绿色荧光, 但囊胚之间的荧光强度存在差异. 研究结果表明, 通过脂质体介导的方法可以获得高转染效率的转基因猪胎儿成纤维细胞系, 但细胞系之间的转染效率不同; 用转基因猪胎儿成纤维细胞构建的重构胚, 能够成功发育到囊胚阶段, 而且大多数为表达绿色荧光蛋白的阳性胚胎.

关键词 EGFP 猪 核移植 胎儿成纤维细胞 人溶菌酶(HLY)

猪病防治一直是养猪业的工作重点. 注射疫苗是预防烈性病毒感染的主要方法, 而细菌感染的防治主要依靠抗生素. 由于每种抗生素的抗菌谱有限, 以及细菌对药物耐药性的产生, 这不仅造成饲养经济成本增加, 而且病猪往往不能及时得到有效的治疗, 给养猪业造成很大的经济损失. 尤其是仔猪, 由于日龄低、抗病性差, 发病和死亡率都比较高. 所以, 有必要寻求一种经济、安全、高效的防治措施.

溶菌酶是一种天然非特异性免疫物质, 能够溶

解微生物的细胞壁而起到杀菌作用, 还能调节消化道有益菌群的建立, 以及提高机体的免疫力^[1]. 有资料表明, 在仔猪日粮中添加溶菌酶, 可以使日增重增加、降低腹泻率、提高饲料报酬^[2-4]. 溶菌酶广泛分布于人和动物的多种组织、分泌物以及某些植物和微生物中^[5]. 人乳中溶菌酶含量约0.5 mg·mL⁻¹, 比牛、绵羊和山羊乳含量高1500—4000倍, 并且其破坏和溶解细菌的能力约为牛乳的300倍. 如果培育出一种转基因猪, 其乳腺能够表达人重组溶菌酶, 使母猪的奶中含有高抑菌

2008-03-20 收稿, 2008-04-16 收修修改稿

^{*} 国家自然科学基金(批准号: 5030001)和国家“引进国际先进农业技术计划”(批准号: 2006-G59)资助项目

^{**} 通信作者: E-mail: ninglbau@public3b.tanet.cn

©1994-2018 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

活性的溶菌酶,既有营养功能,又有药用功能,这将是一种理想的仔猪疾病防治手段。我国已经成功克隆出小型猪^[6]、东北民猪^[7]等品种,生产转标记基因的克隆胚胎也有报道^[8];但目前还没有关于转目的基因的克隆猪胚胎或个体方面的文献。转人溶菌酶基因的克隆动物也只有小鼠^[9-13]、山羊^[14-17]和牛^[18,19],国内外尚无转人溶菌酶基因猪或胚胎的报道。

本研究使用含报告基因绿色荧光蛋白(GFP)的乳腺表达重组人溶菌酶(HLY)质粒,对两个品种5个个体的猪胎儿成纤维细胞进行转染,筛选出转基因阳性细胞系,并以此为核供体构建克隆胚胎,旨在探索用核移植方法生产转HLY基因的胚胎,为生产乳腺表达HLY的转基因克隆猪奠定基础。

1 材料和方法

除非特别说明,本研究所用化学试剂均购自Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA)公司。

1.1 猪卵母细胞的体外成熟

从屠宰场采集初情期前母猪卵巢,置于含青、链霉素的30℃生理盐水中,并在2h内运回实验室。用注射器抽出卵巢上3—6mm卵泡内的卵丘细胞卵母细胞复合体(COCs),在体视镜下挑选卵丘包裹3层以上,致密、胞质均匀的COCs,用含20mmol/L HEPES, 10%胎牛血清(FBS)的TCM199(H199)溶液洗涤3遍,然后放到四孔板(Nunc, Denmark)内进行体外成熟。成熟液以TCM199为基础培养基,添加10%的发情牛血清(ECS,自制),10%卵泡液(PFF,自制),10 IU/mL hCG和PMSG以及10 ng/mL的表皮生长因子(EGF)。每孔400 μL的成熟液中放入约100枚COCs,上覆石蜡油,置于39℃,含5% CO₂气体、饱和湿度的培养箱中培养40h。

PFF的制备:抽取初情期前青年母猪卵巢上5—8mm直径的卵泡,将抽取液放入50 mL离心管中,1600 g离心30 min后取上清液,用0.45 μm孔径的一次性针头式过滤器过滤后再分装到15 mL离心管中,放入-20℃保存备用。

1.2 供体细胞的培养、转染和筛选

胎儿成纤维细胞系sw7, sw8, slw3, slw6和slw9(前2个细胞系是五指山小型猪,后3个是长白

猪品种)的建立和培养同文献[8]。在六孔板中培养待转染的细胞,培养液为含10%FBS的DMEM,待其生长至50%—60%汇合时,利用脂质体lipofectamineTM 2000 (Invitrogen)介导的方法将本实验室构建的线性化双标记载体pBC1-hLY-GFP-NEO^[17]转染至各细胞系,经过1000 μg/mL G418筛选14—20 d后,荧光显微镜下检测阳性细胞的比例。发光比例>90%的细胞传代培养2次后冻存。

核移植前5 d左右解冻转染的细胞sw8, slw3和slw6,培养至细胞密度达到100%汇合,再继续培养1—2 d后便可用于核移植。注核前用0.1%胰蛋白酶消化细胞2 min,然后用离心收集细胞,室温放置备用。

1.3 去核和注核

成熟培养后的COCs用含1 mg/mL透明质酸酶的改良磷酸盐缓冲液脱卵丘,挑选排出第一极体,胞质均匀的卵母细胞用于核移植。显微操作液为添加7.5 μg/mL细胞松弛素B(CB)的H199,将成熟卵母细胞转入操作液液滴中,然后在显微操作仪上用固定吸管(外径100—120 μm)吸持卵母细胞,用挤压法去除卵母细胞的纺锤体。注核时选择直径20 μm左右、质膜光滑、折光性强的细胞,放在去核卵母细胞的卵周隙中。每次放到操作液中的卵子数应控制在30 min内完成,依次对所有成熟卵母细胞进行去核和注核操作。

1.4 重构胚的融合激活

重构胚的融合及激活采用电流刺激法一步完成。融合液成分:0.3 mol/L的甘露醇,0.05 mmol/L CaCl₂, 0.1 mmol/L MgSO₄和0.01%的聚乙烯醇(PVA)。重构胚先在融合液中平衡3—5 min,然后每5个一组放入添加了融合液的融合槽中(BTX, San Diego, CA),拨动卵子,使供体细胞—受体卵细胞膜接触面与电极平行,用CUY-21融合仪(Japan)施加两个100 μs、间隔1 s、电压16 kV/cm的直流电脉冲诱导融合同时激活。取出重构胚,并用PZM-3洗涤3次,然后在含10 μg/mL CB和10 μg/mL的放线菌酮(CHX)的PZM-3^[19]溶液中进行化学辅助激活处理4 h。辅助激活完成后,在体视镜下判定融合结果。

1.5 胚胎培养和荧光检测

从辅助激活液中取出卵子, PZM-3 洗涤 3 次, 每次在洗涤液中放置 5 min, 然后转入预先平衡好的培养液 PZM-3 中, 气相条件为含 7% O₂, 88% N₂ 和 5% CO₂ 的混合气体, 培养箱的温度为 39°C, 湿度为 100%. 在激活培养的第 48 小时和 168 小时分别观察卵裂率和囊胚形成率. GFP 阳性胚胎通过在蓝色激发光照射下观察是否发出绿色荧光来判断.

1.6 细胞转基因的分子检测

对于转入溶菌酶基因克隆猪胚胎的分子生物学鉴定参照文献[9]. PCR 检测的引物序列为: 5' TTA TAC ACA CGG CTT TAC 3'; 5' CAG CAT CAG CGA TGT TAT CT 3'. PCR 条件: 94°C 5 min, 94°C 40 s, 53°C 40 s, 72°C 40 s, 72°C 7 min, 4°C 1 h, 30 个循环, 扩增产物长度应为 750 bp.

1.7 统计分析

实验结果中的 GFP⁺ 细胞比例、重构胚的发育率以及转基因胚胎的百分比等数据均用卡方统计方法检验, $P < 0.05$ 为差异显著.

2 结果

2.1 质粒 pBC1-hLY-GFP-NEO 转染细胞结果

sw7, sw8, slw3, slw6 等 4 个细胞系在转染后第 2 天开始用 G418 进行筛选, 3 d 后(筛选开始

当天为第 0 天)细胞发生明显死亡, 第 4 天有大量的死亡细胞漂浮, 第 6 天只有极少量单个分布的贴壁细胞. 经过继续筛选培养, 逐渐形成单个散在的 GFP⁺ 克隆点(图 1), 每孔有 7-10 个活力好的克隆点. 在转染的第 11-13 天进行传代, 并检测荧光细胞的百分比. 5 种细胞的转染结果见表 1. 实验观察到虽然转染和筛选方法对 5 个细胞系均相同, 但是 slw9 的结果与其他 4 个细胞系不同, 一些没有荧光的细胞成片或夹杂在阳性克隆点内生长, 消化传代后 GFP 阴性细胞继续增殖, 表现出对 G418 的抗性. 将转染效率较高的细胞系进行了扩大培养和冻存, 并用 PCR 方法检测 HLY 基因是否已经整合进细胞的基因组内. 图 2 显示了细胞系的转染结果: 4 个细胞系都扩增出与阳性对照(质粒)片段大小相等的条带, 而阴性对照孔(非转基因细胞基因组)没有相应的条带.

表 1 质粒 pBC1-HLY-GFP-NEO 转染细胞结果

细胞系	细胞开始死亡时间	细胞大量死亡时间	筛选 10 d 后细胞状态	GFP ⁺ 细胞比例 / % ^{a)}
sw7	第 3 天	第 4 天	只有 GFP ⁺ 细胞克隆	96.3 (289/300)
sw8	第 3 天	第 4 天	只有 GFP ⁺ 细胞克隆	95.3 (286/300)
slw3	第 3 天	第 4 天	只有 GFP ⁺ 细胞克隆	98.0 (294/300)
slw6	第 3 天	第 4 天	只有 GFP ⁺ 细胞克隆	95.7 (287/300)
slw9	第 3 天	第 4 天	有部分 GFP ⁺ 细胞	49.3 (148/300)

slw9 与其他 4 个细胞系相比差异显著 ($P < 0.05$)

a) 括号内数字表示不同视野的 300 个细胞中所含阳性细胞的数量

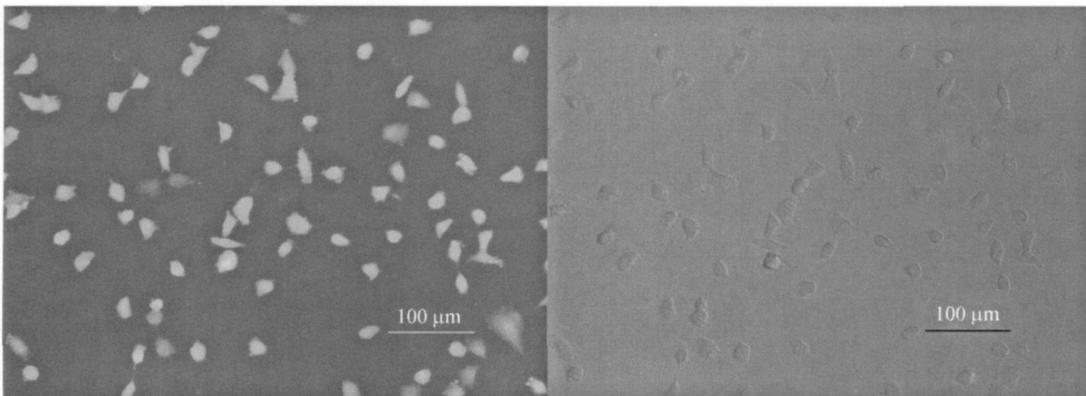


图 1 G418 筛选 10 d 后形成的阳性细胞克隆
(左图为暗视野, 右图为对映的明视野照片)

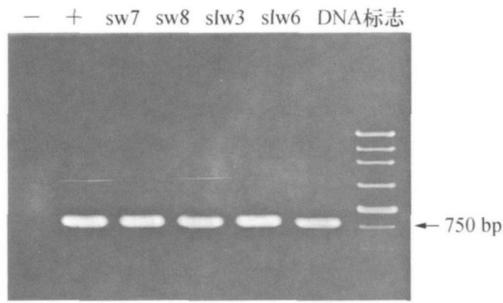


图 2 转 pBC1-HLY-GFP-NEO 基因细胞系的 HLY 的 PCR 检测结果

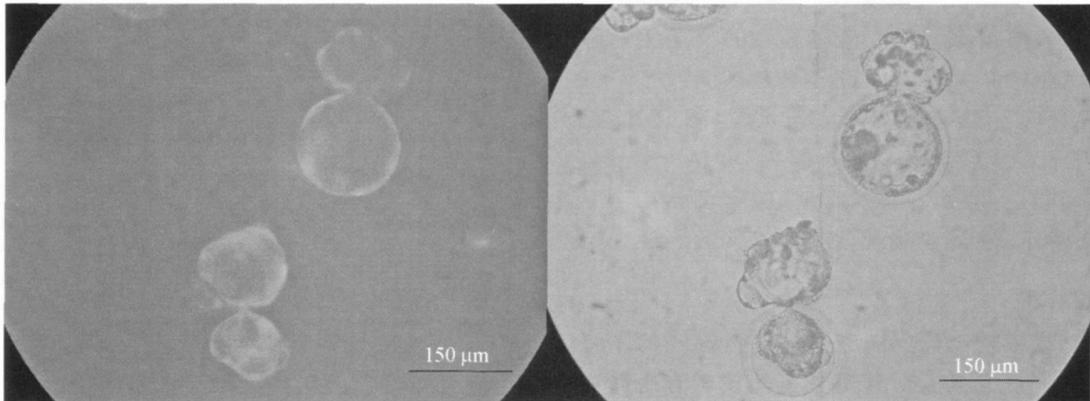


图 3 转 pBC1-HLY-GFP-NEO 的 GFP 阳性克隆囊胚
(左图为暗视野, 右图为对映的明视野照片)

表 2 转基因阳性细胞为核供体构建重构胚的体外发育能力

供体细胞 ^{a)}	重构胚数量	卵裂数/%	囊胚数/%	GFP ⁺ 囊胚数/%
sw8-HLY	226	168(74.5) ^a	39(17.3) ^b	37(94.9) ^c
slw3-HLY	98	79(80.7) ^a	18(18.4) ^b	17(94.4) ^c
slw6-HLY	319	246(77.1) ^a	62(19.4) ^b	57(91.9) ^c
合计	643	493(76.7) ^a	119(18.5) ^b	111(93.3) ^c

同列中相同的字母标注表示差异不显著($P > 0.05$)

a) sw8-HLY 是转染 pBC1-HLY-GFP-NEO 质粒后的五指山小型猪胎儿成纤维细胞; slw3-HLY, slw6-HLY 是转染 pBC1HLY-GFP-NEO 质粒后的纯种长白猪胎儿成纤维细胞

3 讨论

本研究利用脂质体法转染猪胎儿的成纤维细胞系, 利用 G418 筛选后, 大部分细胞系(4/5)只有 GFP 阳性的细胞克隆存活下来, 这些细胞构建的重构胚能够在体外正常卵裂和发育, 并取得了较高的囊胚形成率(18.5%), 而且 PCR 也扩增出 HLY 的阳性条带, 这一结果为成功生产转人溶菌酶基因的

2.2 以转溶菌酶细胞为核供体所构建胚胎的体外发育能力

以 sw8-HLY, slw3-HLY 和 slw6-HLY 为供体细胞构建胚胎, 体外发育能力观察结果见表 2. 3 个转基因细胞系的重构胚在卵裂率和囊胚发育率方面都没有显著差异($P > 0.05$). 大多数囊胚在蓝光激发下都发出绿色荧光(图 3).

克隆猪奠定了坚实的基础.

胎儿成纤维细胞容易培养, 细胞寿命长, 核移植胚胎的发育能力强^[20-22], 所以是猪核移植工作中最常用的供体细胞类型. 尤其是在转基因克隆猪的生产中, 首先需要转染细胞, 将外源基因导入供体细胞的基因组内, 它必须经过长时间的药物筛选. 因此, 在猪的胚胎干细胞技术成熟之前, 胎儿成纤维细胞是首选的供体细胞类型^[23-29]. 在转基因克隆动物的生产中, 细胞的转染工作非常关键. 由于受细胞状态、细胞密度、药物敏感性等多种因素的影响, 实际工作中往往得不到理想的转染效果. 本研究同时对 5 个细胞系进行转染, 其中四个都只有阳性细胞克隆存活下来, 得到了很高纯度的转基因细胞系, 而且细胞的形态和增殖并未见异常, 说明本实验中细胞转染和筛选方法的可行性. 关于细胞系 slw9 转染效率低的原因可能是不同细胞系之间存在差异, 因为该细胞系的 G418 最低致死剂量、细胞密度、传代次数、实验时间等与其他 4 个细胞系都

一致, 而且传代后通过加大 G418 浓度仍不能进一步纯化, 但其确切机制有待进一步研究.

对 3 个转染细胞系进行的核移植实验, 与本实验室相同阶段未转染细胞构建胚胎的卵裂率和囊胚率(分别约 75%和 20%)相比, 没有显著的下降, 并与龚国春等的研究结果相似^[30]. 但也有文献表明, 长时间药物筛选所获得转基因细胞的体细胞克隆效率会明显降低^[31, 32], 可能与不同实验室选用的细胞系有关. GFP 是一种常用的报告基因, 它具有安全、直观的特点, 常和一些抗生素抗性基因一起被用来构建转基因载体. 本研究的载体也包含这两种基因, 筛选细胞构建的胚胎具有很高的 GFP 阳性率. 理论上目的基因 HLY 胚胎的阳性率应该与表达 GFP 胚胎的比例一致, 前人的研究结果也说明了标记基因 GFP 的准确性^[33]. 本文是首次将人溶菌酶基因导入猪细胞的基因组中, 并得到体外发育的转基因囊胚. 该结构已证明能够在小鼠的乳腺表达, 并且其表达产物具有与人溶菌酶相同的活性^[9]. 所以, 转基因重构胚移植后有望得到乳腺表达转人溶菌酶基因的克隆猪, 可以作为新品种进一步培育扩繁, 使种猪的生产效率得到提高.

研究表明: 小型猪和长白猪两个品种的胎儿成纤维细胞都可以用脂质体方法进行转染, 并可以得到很高比例的表达绿色荧光蛋白基因的阳性细胞; 相同条件下, 细胞的转染效率在不同胎儿的成纤维细胞系之间存在差异; 用转染细胞构建的重构胚, 体外培养能够成功发育到囊胚阶段, 而且大多数胚胎都有绿色荧光蛋白表达.

致谢 感谢北京济普森生物技术有限公司王刚在实验取材等方面的帮助.

参 考 文 献

- Lonnerdal B. Biochemistry and physiological function of human milk proteins. *Am J Clin Nutr*, 1985, 42(6): 1299—1317
- 邵春荣, 包承玉, 孙有平, 等. 溶菌酶制剂对控制仔猪腹泻的效果. *江苏农业科学*, 1996, (3): 61—62
- 沈彦萍, 陈宇光, 潘宏涛, 等. 溶菌酶可溶性粉剂防治仔猪腹泻的效果观察. *饲料工业*, 2005, (6): 16—18
- 邱伟海, 潘宏涛, 蒋宏伟. 溶菌酶对断奶仔猪生产性能的影响. *饲料博览*, 2006, (2): 40—42
- Fleming A. On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions. *Proc Roy Soc London*, 1922, B93: 306—317
- Pan D, Zhang Y, Sun X, et al. Cloned pigs derived from somatic cell nuclear transfer embryos cultured *in vitro* at low oxygen tension. *Chin Sci Bull*, 2006, 51(7): 839—844
- 刘忠华, 田江天, 郑重, 等. 体细胞核移植克隆仔猪: 培养液对卵母细胞成熟及胚胎发育的影响. *中国科学 C 辑*, 2007, 37(6): 634—640
- 张运海, 潘登科, 孙秀柱, 等. 利用体细胞核移植技术生产表达绿色荧光蛋白的猪转基因克隆胚胎. *中国科学 C 辑*, 2005, 35(5): 439—445
- 于政权, 樊宝良, 戴蕴平, 等. 转基因小鼠乳腺表达重组人溶菌酶. *科学通报*, 2003, 48(20): 2149—2153
- Yu Z, Meng Q, Yu H, et al. Expression and bioactivity of recombinant human lysozyme in the milk of transgenic mice. *J Dairy Sci*, 2006, 89(8): 2911—2918
- Maga EA, Anderson GB, Murray JD. The effect of mammary gland expression of human lysozyme on the properties of milk from transgenic mice. *J Dairy Sci*, 1995, 78(12): 2645—2652
- K Hennegan K, D Yang D, Nguyen D, et al. Improvement of human lysozyme expression in transgenic rice grain by combining wheat (*Triticum aestivum*) puroindoline b and rice (*Oryza sativa*) Gt1 promoters and signal peptides. *Transgenic Res*, 2005, 14(5): 583—592
- Huang J, Wu L, Yalda D, et al. Expression of functional recombinant human lysozyme in transgenic mice cell culture. *Transgenic Res*, 2002, 11(6): 229—239
- Maga EA, Walker RL, Anderson GB, et al. Consumption of milk from transgenic goats expressing human lysozyme in the mammary gland results in the modulation of intestinal microflora. *Transgenic Res*, 2006, 15(4): 515—519
- Maga EA, Cullor JS, Smith W, et al. Human lysozyme expressed in the mammary gland of transgenic dairy goats can inhibit the growth of bacteria that cause mastitis and the cold-spoilage of milk. *Foodborne Pathog Dis*, 2006, 3: 384—392
- Scharfen EC, Mills DA, Maga EA. Use of human lysozyme transgenic goat milk in cheese making: Effects on lactic acid bacteria performance. *J Dairy Sci*, 2007, 90(9): 4084—4091
- 龚国春. 利用体细胞核移植技术生产转基因牛. 中国农业大学博士学位论文, 北京: 2005
- Sun HC, Xue FM, Qian K, et al. Intramammary expression and therapeutic effect of a human lysozyme-expressing vector for treating bovine mastitis. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2006, 7(4): 324—330
- Yoshioka K, Suzuki C, Tanaka A, et al. Birth of piglets derived from porcine zygotes cultured in a chemically defined medium. *Biol Reprod*, 2002, 66(1): 112—119
- Yin XJ, Tani T, Yonemura I, et al. Production of cloned pigs from adult somatic cells by chemically assisted removal of mater-

- nal chromosomes. *Biol Reprod*. 2002, 67(8): 442—446
- 21 De Sousa PA, Dobrinsky JR, Zhu J, et al. Somatic cell nuclear transfer in the pig: control of pronuclear formation and integration with improved methods for activation and maintenance of pregnancy. *Biol Reprod*. 2002, 66(3): 642—650
- 22 Lee GS, Hyun SH, Kim HS, et al. Improvement of a porcine somatic cell nuclear transfer technique by optimizing donor cell and recipient oocyte preparations. *Theriogenology*. 2003, 59(9): 1949—1957
- 23 Park KW, Cheong HT, Lai LX, et al. Production of nuclear transfer derived swine that express the enhanced green fluorescent protein. *Anim Biotechnol*. 2001, 12(2): 173—181
- 24 Lai LX, Park KW, Cheong HT, et al. Transgenic pig expressing the enhanced green fluorescent protein produced by nuclear transfer using colchicine treated fibroblasts as donor cells. *Mol Reprod Dev*. 2002, 62(3): 300—306
- 25 Lai L, Kolber-Simonds D, Park KW, et al. Production of α -1, 3-galactosyltransferase knock out pigs by nuclear transfer cloning. *Science*. 2002, 295(5557): 1089—1092
- 26 Phelps CJ, Koike C, Vaught TD, et al. Production of α -1, 3-galactosyltransferase deficient pigs. *Science*. 2003, 299(5605): 411—414
- 27 Ramsoondar J, Macháty Z, Costa C, et al. Production of α -1, 3-galactosyltransferase knockout cloned pigs expressing human α -1, 2-fucosyltransferase. *Biol Reprod*. 2003, 69(8): 437—445
- 28 Lee GS, Kim HS, Hyun SH, et al. Production of transgenic cloned piglets from genetically transformed fetal fibroblasts selected by green fluorescent protein. *Theriogenology*. 2005, 63(4): 973—991
- 29 Lai L, Kang JX, Li R, et al. Generation of cloned transgenic pigs rich in omega-3 fatty acids. *Nat Biotechnol*. 2006, 24(4): 435—436
- 30 龚国春, 戴蕴平, 樊宝良, 等. 以不同类型的转基因细胞为核供体生产牛的转基因克隆胚胎. *中国科学 C 辑*. 2003, 33(6): 532—538
- 31 Ogura A, Inoue K, Ogonuki N, et al. Production of male cloned mice from fresh, cultured, and cryopreserved immature Sertoli cells. *Biol Reprod*. 2000, 62(6): 1579—1584
- 32 Zakhartchenko V, Mueller S, Alberio R, et al. Nuclear transfer in cattle with nontransfected fetal or cloned transgenic fetal and postnatal fibroblasts. *Mol Reprod Dev*. 2001, 60(3): 362—363
- 33 Kato M, Yamanouchi K, Ikawa M, et al. Efficient selection of transgenic mouse embryos using EGFP as a marker gene. *Mol Reprod Dev*. 1999, 54(1): 43—48