

绿色荧光蛋白基因在山羊胎儿成纤维细胞中的表达

楚秋霞¹, 王二耀^{1*}, 吴 姣², 陈付英¹, 王治方¹, 辛晓玲¹,
施巧婷¹, 冯亚杰¹, 李文军¹, 魏成斌¹, 徐照学¹

(1. 河南省农业科学院 畜牧兽医研究所, 河南 郑州 450002;

2. 河南农业大学 牧医工程学院, 河南 郑州 450002)

摘要: 为建立稳定表达增强型绿色荧光蛋白(*EGFP*)基因的山羊胎儿成纤维细胞(gFFC)株, 采用组织块贴壁法培养 gFFC, QIAGEN 转染试剂介导转染 gFFC, 用 G418 梯度法筛选阳性细胞株。结果显示: 培养的 gFFC 生长形态正常; 24 孔培养板中细胞汇合度达 70%~80% 时, 每 60 μ L 转染液内含 DNA 量 0.4 μ g 和 QIAGEN 转染试剂 3 μ L, 每孔内加入 40 μ L 转染液时能获得最佳转染效果, 在 G418 筛选 1 个月后获得抗性阳性细胞株。表明 *EGFP* 基因在 gFFC 中成功表达。

关键词: 山羊胎儿成纤维细胞; 转染; *EGFP* 基因; 表达

中图分类号: Q813.1⁺1 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2013)10-0142-04

Expression of *EGFP* Gene in Goat Fetal Fibroblast Cells

CHU Qiu-xia¹, WANG Er-yao^{1*}, WU Jiao², CHEN Fu-ying¹, WANG Zhi-fang¹,
XIN Xiao-ling¹, SHI Qiao-ting¹, FENG Ya-jie¹, LI Wen-jun¹, WEI Cheng-bin¹, XU Zhao-xue¹

(1. Institute for Animal Husbandry and Veterinary Research, Henan Academy of Agricultural Sciences,

Zhengzhou 450008, China; 2. College of Animal Husbandry and Veterinary Science, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: In order to establish the goat fetal fibroblasts cell (gFFC) clones stably expressing the enhanced green fluorescent protein (*EGFP*) gene, the goat fetal fibroblast cells (gFFC) were harvested by tissue explants culture method and then transfected with the *EGFP* gene using the QIAGEN transfection reagent. The positive cells with transgenes were screened using different concentrations of G418. The results showed that the propagation of gFFC was normal and the highest transfection efficiency was achieved when using the 70%—80% confluent cells in the 24-well plate cultured with supplement of 40 μ L transfection medium, which contains 0.27 μ g DNA and 2 μ L QIAGEN transfection reagent. One month later, the drug-resistant cell clones gradually formed under the selection of G418. The results indicated that the *EGFP* was expressed efficiently in gFFC.

Key words: goat fetal fibroblasts cell (gFFC); transfection; *EGFP* gene; expression

近年来, 转基因动物及植物一直成为人们关注的焦点。目前, 体细胞核移植法是生产转基因动物的主要方法, 在动物中应用供体体细胞进行细胞核移植优于传统的显微注射法。而供核细胞的选择,

是转基因动物生产能否成功的关键, 为保证核移植效率, 一般取少于 30 代的细胞作为核移植的供体细胞^[1]。动物转基因研究中, 为了标记目的基因在生物体基因组中的整合情况, 人们常使用在活体中表

收稿日期: 2013-06-08

基金项目: 河南省农业科学院基础研究专项资金项目; 国家转基因肉羊新品种培育专项(2013ZX08008003-002)

作者简介: 楚秋霞(1984-), 女, 河南许昌人, 助理研究员, 硕士, 主要从事家畜胚胎工程研究。E-mail: chuqiuxia@163.com

* 通讯作者: 王二耀(1971-), 男, 内蒙古呼和浩特人, 副研究员, 博士, 主要从事家畜胚胎工程研究。

E-mail: erylaoawang@yahoo.com

达且易于检测的报告基因^[2-3]。1962 年,Dijon 等^[4]首先从多管水母(Aequoria victoria)中分离出了绿色荧光蛋白(GFP);1994 年,Chalfie 等^[5]首次将 GFP 基因在大肠杆菌细胞和线虫中表达,并发现 GFP 能在多种异源细胞中表达。增强型绿色荧光蛋白基因(EGFP)由野生型 GFP 改进获得,其具有结构稳定、高效表达、无种系依赖性等特点,更适用于细胞基因表达和蛋白定位检测及细胞示踪标记^[6]。研究表明,EGFP 基因在酵母、果蝇以及多种哺乳动物细胞(中国仓鼠卵巢细胞系、人体胚性肾细胞系、猿猴 Cos-1 细胞系以及鼠 NIH3T3 细胞系等)中表达,也能获得含有该基因的活体动物^[7]。而 EGFP 基因在山羊胎儿成纤维细胞(gFFC)中的表达尚未见报道。本研究旨在建立 gFFC 培养体系,获得转 EGFP 基因的 gFFC 细胞系,以期大量获得以 EGFP 作为示踪标记的山羊胎儿成纤维细胞,为转基因研究提供具有标记基因的供体细胞材料。

1 材料和方法

1.1 供试材料

真核表达质粒 pEGFP-C1 为本研究所保存。

去内毒素质粒提取试剂盒购自 QIAGEN 公司,Attractene Transfection Reagent 转染试剂购自 QIAGEN 公司,G418 购自 MBI 公司,胎牛血清购自 HyClone 公司,其他试剂均购自美国 Sigma 公司。

1.2 gFFC 的分离培养

通过外科手术法取出 2 月龄的山羊胎儿,采用组织块贴壁培养法培养 gFFC^[8]。传代 2~3 次后,根据细胞生长状态转染或收集细胞冻存于液氮中,至少冻存 1 个月后复苏细胞,传代 1~2 次后作为试验材料。

1.3 G418 最小致死浓度的确定

将 gFFC 按 1 000 个/mL 接种到 24 孔板中,设定 G418 终质量浓度分别为 0、100、200、400、500、600、800、1 000 $\mu\text{g/mL}$,每个质量浓度重复 3 孔。每 2 d 换 1 次筛选液。在 14 d 内能使细胞全部死亡

的 G418 最小质量浓度作为最佳筛选浓度。

1.4 pEGFP-C1 转染 gFFC

将 gFFC 接种至 35 mm 培养皿中,加入不含双抗的细胞培养液。按照 QIAGEN 转染试剂说明书的方法用 pEGFP-C1 质粒转染 gFFC。分别在转染 24、48、72 h 消化细胞,传代培养。细胞贴壁后观察荧光情况。

将传至第 4 代的 gFFC 接种于 24 孔板中,接种密度为 0.4×10^5 个/孔,进行转染条件的优化。将 0.4 μg 质粒 DNA 分别与 QIAGEN 转染试剂 1、1.5、3、6 μL 混合,分别加入 opti-MEM 使得每个梯度转染液终体积均为 60 μL 。每孔中分别加入转染液 5、15、40 μL 进行转染。转染 7 d 后,在荧光倒置显微镜下观察转染阳性细胞数。

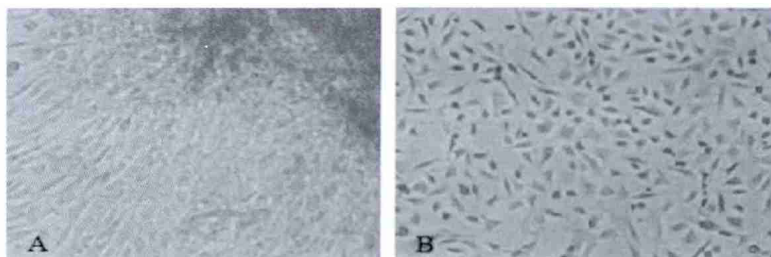
1.5 pEGFP-C1 阳性细胞株的筛选

按上述优化的转染条件 pEGFP-C1 质粒转染 gFFC,分别在转染 24、48、72 h 加入 G418 筛选液,筛选 2 周。筛选过程中观察细胞的生长状态,当未转染的细胞全部死亡时更换筛选液(G418 质量浓度减半),继续筛选。筛选 12 d 后,在荧光倒置显微镜下观察阳性细胞克隆,并用记号笔标记克隆位置。用细胞刮刮去克隆周围不发荧光的细胞,用胰蛋白酶消化发荧光的细胞,并将阳性克隆逐个传代至 6 孔板,进行扩大培养。

2 结果与分析

2.1 gFFC 的分离纯化

原代培养组织块在接种第 2 天有少量细胞从组织块边缘游出,4~5 d 可贴满瓶壁,形成细胞单层。随培养时间延长,细胞沿组织块周围呈旋涡状或火焰状生长,在荧光倒置显微镜下观察,细胞透明,细胞胞质突起,呈长梭形,立体感强(图 1A)。原代培养的 gFFC 中主要混合有上皮细胞,根据成纤维细胞和上皮细胞对胰蛋白酶的敏感性不同,通过消化培养进行分离纯化。在体外进行传代 2~3 次后,获得较纯的成纤维细胞(图 1B)。



A. 原代培养的 gFFC; B. 传代的 gFFC

图 1 gFFC 的培养形态(100 \times)

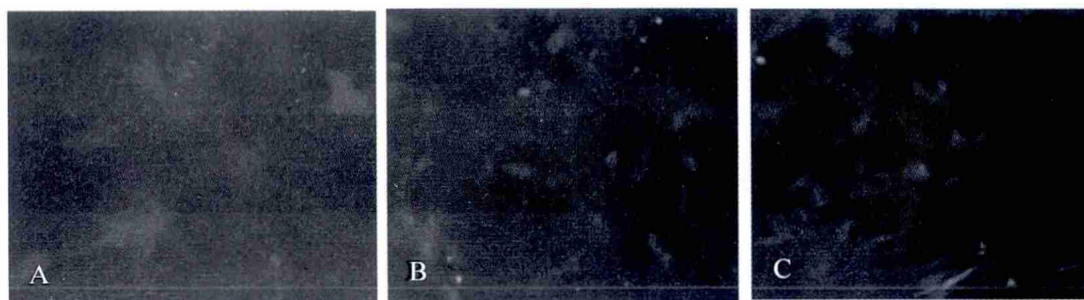
2.2 G418 最佳筛选质量浓度的确定

通过不同 G418 质量浓度梯度筛选,结果表明,筛选 14 d 后,接种 G418 质量浓度为 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时 gFFC 全部死亡。因此,选择 G418 质量浓度 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 作为 gFFC 细胞的最佳筛选质量

浓度。

2.3 阳性细胞的瞬时表达

分别在转染后 24、48、72 h 观察细胞转染情况。图 2 所示,在 24 h 时有少量荧光出现,随着转染时间延长,阳性细胞数增多,72 h 最多。



A. 转染 24 h; B. 转染 48 h; C. 转染 72 h

图 2 不同转染时间的 EGFP 表达情况 (200 \times)

2.4 转染条件的优化

通过转染不同质粒 DNA 量、不同转染试剂量比较分析可知(图 3),随着脂质体剂量增大,转染效率升高,3 μL 脂质体组浓度较高,转染率最高,但如果继续增加脂质体剂量,出现大部分细胞死亡现象。当每 60 μL 转染液内含质粒 0.4 μg DNA、QIAGEN 转染试剂 3 μL ,每孔内加入 40 μL 转染液时,能获最佳转染效果,48 h 观察细胞荧光率为 30%,经过 G418 筛选 3 周后转染效率达到 80% 以上。若质粒 DNA 量过高,也会出现大部分细胞死亡的现象。

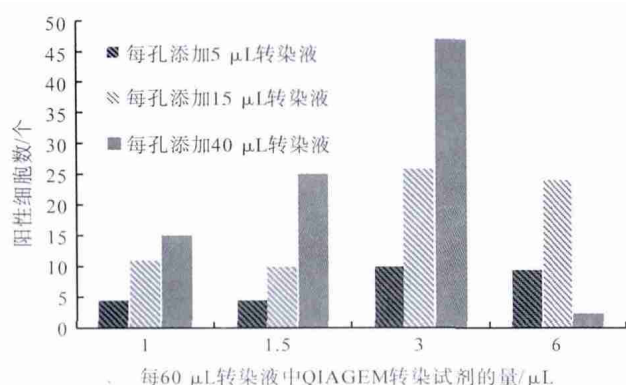


图 3 转染条件优化结果

2.5 阳性细胞的获得

细胞转染 48 h 传代,筛选 2 周,期间观察细胞的生长情况。G418 筛选第 9 天,在荧光显微镜下观察,几乎所有细胞都发荧光,荧光主要分布在细胞核中(图 4A)。第 3 周时有成片的荧光出现,随着培养时间的增加荧光量逐步增多,细胞增殖生长(图 4B)。筛选 1 个月后,用细胞克隆环固定要消化的阳性细胞,常规方法消化、传代培养,获得稳定表达 EGFP 的 gFFC 细胞系(图 4 C)。

3 结论与讨论

供体细胞的培养和外源基因阳性细胞的获得是体细胞核移植技术生产转基因动物的前提。本研究选用 gFFC 作为核供体细胞,体外培养的 gFFC 在传代 20 代后细胞生长缓慢。研究报道,所使用的细胞生长状态与来自个体的年龄有一定的关系,成纤维细胞增殖能力随年龄的增加和培养代数的延长而逐渐下降,其中以后者表现更为明显^[9]。因此,尽可能的选用年龄小且体外培养不超过 10 代的靶细胞作为核供体细胞。本研究体外培养的 gFFC 来自于孕期小于 2 月龄的胎儿,处于早期传代次数,这些



A. G418 筛选 9 d 的 gFFC; B. 阳性细胞的增殖; C. G418 筛选 1 个月的 gFFC

图 4 G418 筛选阳性 gFFC 生长情况 (400 \times)

细胞在 DMEM/F12 培养基中添加 10% 的 FBS 生长状态很好,符合试验要求。

目的基因在体细胞中的高效表达是获得阳性细胞的关键步骤^[10]。影响转染的因素很多,包括转染试剂的选择,细胞的生长状态、转染时 DNA 质量浓度、脂质体剂量、脂质体-DNA 复合物的孵育时间以及血清含量。本研究结果表明:当质粒 DNA 质量浓度过高和脂质体剂量过大时,均出现大量的死细胞,转染效率降低,可见质粒 DNA 和脂质体对细胞都有一定的毒性。因此,细胞的生长状态、质粒 DNA 和脂质体的质量浓度优化是获得高效表达的关键步骤。

pEGFP-C1 是可在哺乳动物细胞中高效表达的表达载体^[6,11]。EGFP 作为标记基因可表达荧光蛋白,在紫外光激发下可形成绿色荧光,标示目的基因的表达情况。本试验中,不同时间观察 EGFP 基因在 gFFC 细胞中的表达,随着时间的延长荧光量增加,该结果与刘建雄等^[12]报道的脂质体介导 EGFP 基因转染神经干细胞后,6 h 荧光蛋白偶见表达、24 h 表达量明显增加、48 h 达到最高峰、1 个月后有阳克隆形成结果一致。本研究在转染 48 h 时加入质量浓度为 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 G418 进行筛选,24 h 后观察发现大量细胞死亡,只有少量细胞存活,存活细胞产生强烈的绿色荧光,且随着时间的延长荧光细胞数量逐渐增多,2 周后观察到有成片细胞出现绿色荧光。表明 EGFP 基因成功整合到 gFFC 中,可作为良好的示踪标记。

本研究将 EGFP 基因成功转入 gFFC,为生产转基因动物提供有标记性的核供体细胞及进一步研究外源基因在动物体内的表达与调控、蛋白质定位奠定了基础。

参考文献:

[1] Schnieke A K, Kin A J, Ritchie W A, *et al.* Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei

from transfected fetal fibroblasts[J]. *Science*, 1997, 278:2130-2133.

- [2] 郝碧芳,王猛. 反向 PCR 鉴定 piggyBac 介导的哺乳动物细胞转基因研究[J]. *河南农业科学*, 2011, 40(10): 141-143, 152.
- [3] 钱方,高志芳,滕木子,等. 转基因作物的安全标记基因[J]. *河南农业科学*, 2007(7): 17-20.
- [4] Dijon M, Torne-Celer C, Moreau T, *et al.* Expression and recombination of the EGFP and EYFP genes in lentiviral vectors carrying two heterologous promoters[J]. *Cytotherapy*, 2005, 7(5): 417-426.
- [5] Chalfie M, Ta Y, Euskirchen G, *et al.* Greenfluorescent protein as a marker for gene expression[J]. *Science*, 1994, 263:802-805.
- [6] Zolotukhin S, Potter M, Hauswirth W W, *et al.* A Humanized green fluorescent protein cDNA adapted for high-level expression in mammalian cells[J]. *Journal of Virology*, 1996, 70(7): 4646-4654.
- [7] 薛启汉. 绿色荧光蛋白(GFP)的特性及其在分子生物学研究中的应用[J]. *江苏农业科学*, 1999, 15(1): 52-58.
- [8] 司徒振强,吴军正. 细胞培养[M]. 西安:世界图书出版公司, 2004:155-164.
- [9] 刘波,滕晓华,彭立辉,等. 不同年龄大鼠成纤维细胞增殖能力和端粒长度的变化[J]. *医学临床研究*, 2008, 25(8): 1396-1400.
- [10] 黄洋,靳辉,吕丽华,等. 不同转染试剂转染绵羊成纤维细胞效果比较[J]. *山西农业科学*, 2011, 39(11): 1202-1204.
- [11] 夏玉凤. 以 GFP 为报告基因研究蛋白亚细胞定位[J]. *生物技术通报*, 2006(2): 11-13.
- [12] 刘建雄,毛伯镛,李东燕,等. 脂质体介导 EGFP 基因转染神经干细胞实验研究[J]. *中华神经外科疾病研究杂志*, 2006, 5(1): 16-18.