

山羊胎儿成纤维细胞转染人 t-PA 指形区 缺失基因及其核移植研究*

赵晓娥, 安志兴, 马保华, 武 浩, 高立功, 刘新颖, 张 涌

(西北农林科技大学 生物工程研究所, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 采用阳离子脂质体法将人 t-PA 指形区缺失基因乳腺特异性表达载体(pEBT)导入山羊胎儿成纤维细胞,以山羊胎儿成纤维细胞和转染的山羊胎儿成纤维细胞作供体,构建核移植胚,对其体外发育情况进行了研究,比较了2种供体细胞(山羊胎儿成纤维细胞和转染人 t-PA 指形区缺失基因的山羊胎儿成纤维细胞)及转染人 t-PA 指形区缺失基因的山羊胎儿成纤维细胞饥饿处理与否对核移植胚胎体外发育的影响。结果表明,早期核移植胚有荧光蛋白(GFP)的表达;以山羊胎儿成纤维细胞作供体细胞时,核移植胚的桑葚胚率(50.3%)及囊胚率(16.0%)均高于以转染人 t-PA 指形区缺失基因胎儿成纤维细胞为供体时的桑葚胚率(48.4%)和囊胚率(10.9%),但差异不显著($P > 0.05$);转染人 t-PA 指形区缺失基因的山羊胎儿成纤维细胞经饥饿处理后,其核移植胚胎的卵裂率(73.6%)与不饥饿时的卵裂率(73.9%)差异不显著;饥饿处理后核移植胚胎的桑葚胚率(48.5%)和囊胚率(11.2%)均高于不饥饿处理的桑葚胚率(39.2%)和囊胚率(9.2%),但差异不显著($P > 0.05$)。本研究成功地构建了转染人 t-PA 指形区缺失基因的体细胞核移植胚胎,体外囊胚率为 11.2%。

[关键词] 山羊;血清饥饿; t-PA 基因;转基因核移植胚;囊胚率

[中图分类号] Q 813.7

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)01-0001-05

Study of transfer t-PA gene to the goat fetal fibroblasts and nuclear transfer

ZHAO Xiao-e, AN Zhi-xing, MA Bao-hua, WU Hao, GAO Li-gong, LIU Xing-ying, ZHANG Yong

(Bio-Engineering Institute, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Goat fetal fibroblasts were transferred into mammary gland expressed vector pEBT t-PA gene by using lipofectam in. The development of nuclear transfer embryos derived from fetal fibroblasts including t-PA gene were studied. And transgenic fetal fibroblasts were used to make nuclear transfer embryos; The development of nuclear transfer embryos derived from fetal fibroblasts including t-PA gene, fetal fibroblasts were compared. The development of nuclear transfer embryos derived from fetal fibroblasts including t-PA gene in medium DMEM including 0.5% FBS for starvation and including 10% FBS were compared. The result showed: nuclear transfer embryos were saw fluorescent protein (GFP); The morulae rate (50.3%) and blastocyst rate (16.0%) of fetal fibroblasts cells were higher than that of fetal fibroblasts including t-PA gene (48.4%, 10.9%) ($P > 0.05$); Morular rate (48.5%) and blastocyst rate (11.2%) nuclear transfer embryos derived from fetal fibroblasts including t-PA gene cultured in medium DMEM including 0.5% FBS were higher than that (39.2%, 9.2%) in media DMEM including 10% FBS ($P > 0.05$). The transgenic nuclear transfer embryos were reconstructed, and blastocyst rate of transgenic nucle-

* [收稿日期] 2005-12-23

[基金项目] 国家“863”计划项目(2004AA213072);西北农林科技大学博士研究启动经费项目(01140506)

[作者简介] 赵晓娥(1968-),女,陕西洋县人,讲师,博士,主要从事哺乳动物细胞与胚胎工程研究。E-mail: zhxiaoe126@126.com

[通讯作者] 张 涌(1956-),男,内蒙古和林格尔人,教授,博士生导师,主要从事家畜胚胎工程及发育生物学研究。

ar transfer embryos was 11.2%.

Key words: goat; serum starvation; t-PA gene; transgenic nuclear transfer embryo; blastocyst rate

以动物体细胞(成体细胞、胎儿成纤维细胞以及多潜能干细胞)为受体,将融合目的基因和标记基因的基因以 DNA 转染的方式导入能够进行传代培养的动物体细胞中,通过标记基因来筛选转基因阳性细胞及克隆,再以这些转基因阳性细胞为核供体进行动物克隆,可以提高转基因动物的生产效率。目前,利用体细胞核移植的方法已获得了转基因绵羊^[1-2]、牛^[3]、山羊^[4]等动物。t-PA 为组织型纤溶酶原激活剂,能有效激活纤溶酶原成为纤溶酶,纤溶酶能使血栓中的纤维蛋白溶解,血栓消散,是治疗心血管疾病的一种新型特效药物。本研究采用阳离子脂质体法将人 t-PA 指形区缺失基因乳腺特异性表达载体(pEBT)导入山羊胎儿成纤维细胞,用 G418 对转染细胞进行筛选,以转染的山羊胎儿成纤维细胞作供体细胞构建核移植胚,对早期胚胎进行荧光检测,以实现在胚胎植入前对其进行基因整合检测,达到移植后生产的动物 100% 为转入 t-PA 指形区缺失基因动物。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 表达载体 pEBT 人 t-PA 指形区缺失基因乳腺特异性表达载体 pEBT,由西北农科技大学生物工程研究所提供,此载体含有报告基因 EGFP、抗性基因 neo、调控成分牛 β 酪蛋白基因调控序列以及 t-PA 指形区缺失基因(目的基因)。

1.1.2 山羊胎儿成纤维细胞 山羊胎儿成纤维细胞来源于杨凌科元公司妊娠 40 d 奶山羊的流产胎儿。用常规组织块法进行山羊胎儿成纤维细胞的原代培养,待细胞相互汇合形成单层后用 2.5 g/L 胰蛋白酶消化传代。原代培养用液为 DM EM + 体积分数 10% FBS。

1.1.3 山羊卵巢 山羊卵巢采集于陕西省西安市某屠宰场。将卵巢置于 20~30℃,含 0.32 mg/mL 硫酸庆大霉素的生理盐水的保温瓶内,6~8 h 运回实验室。

1.1.4 引物设计与合成 依据 Genbank 上登陆的 t-PA cDNA 序列(登陆号 X7393),利用生物软件 Vectors NTI Suite 9.0 和 Primer Premier 5.0 设计 1 对引物,其序列为:

tPA 1: 5'-CCG TGA ATT TAA GGG ACG

CTG TG-3';

tPA 2: 5'-GAA GAG GCG GGA TCT CAT TTG CT-3'。

1.1.5 试剂及仪器 试剂:细胞松弛素 B (CB), 离子霉素 (Ionomycin), 6-二甲氨基嘌呤 (6-DMA P), 聚乙烯醇 (PVA) 和胰蛋白酶等均为 Sigma 公司产品; G418 为 Amresco 公司产品; 胎牛血清 FBS 为 Hyclone 公司产品; DM EM 和 DM EM /F12 脂质体 Lipofectamine™ 2000 为 Invitrogen 公司产品。

试验仪器有显微操作仪 (Nikon), 倒置相差显微镜 (Olympus), PCR 仪 (美国 MJ 公司), 荧光显微镜 (日本 Nikon), CO₂ 培养箱 (Forma)。

卵母细胞成熟液 OM 及胚胎培养液 SO Faa 的配制参照文献[5]方法。

1.2 山羊胎儿成纤维细胞的转染与鉴定

1.2.1 外源基因的转染及阳性细胞克隆的筛选 将山羊胎儿成纤维细胞在 37℃、体积分数 5% CO₂ 饱和湿度条件下培养,待其生长至 80% 左右贴壁时利用脂质体 Lipofectamine™ 2000 转染人 t-PA 指形区缺失基因。转染细胞培养 24 h 后用 G418 (600 μ g/mL) 进行抗性细胞克隆筛选 8 d, 然后用 G418 (250 μ g/mL) 继续扩增克隆筛选 17 d。在荧光显微镜下观察,当扩增克隆细胞的 GFP 表达情况趋于稳定时,收集细胞克隆,一部分冻存,另一部分继续扩增克隆,用于构建转基因核移植胚。

1.2.2 PCR 鉴定 提取筛选的山羊胎儿成纤维细胞基因组 DNA 作为模板,PCR 扩增 t-PA,扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。PCR 反应体系按 Pyrobest DNA 聚合酶说明书配制,在 0.2 mL 的 PCR 反应管中依次加入: 10×PCR Buffer 5 μ L, dNTP Mixture (10 μ mol/L) 1 μ L, PS (10 μ mol/L) 1 μ L, PA (10 μ mol/L) 1 μ L, Pyrobest DNA 聚合酶 0.3 μ L (10 U/ μ L), dDNA 产物 2 μ L, 超纯水 39.7 μ L。瞬间离心混匀, 94℃ 变性 4 min; 94℃ 变性 30 s, 59℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 100 s, 30 个循环; 最后 72℃ 延伸 10 min。

1.3 山羊卵母细胞的回收及体外成熟培养

用剖宫法采集山羊卵母细胞。将卵巢用生理盐水洗净后,用外科手术剪剔除卵巢表面的结缔组织及附着的输卵管,清洗干净后,置于盛有杜氏磷酸盐缓冲液 (D-PBS) 的培养皿中。在培养皿中用剃须刀

片或手术刀片切开卵巢表面 1~5 mm 的卵泡。切割完成后, 将切割液置于体视显微镜下采集培养皿中的卵丘-卵母细胞复合体(cumulus-oocyte complexes, COCs)。将COCs在38.5℃、体积分数5% CO₂饱和湿度条件下培养20~22 h, 用透明质酸酶处理除去COCs的卵丘细胞, 在体视显微镜下检出具有第一极体的卵母细胞, 备用。

1.4 山羊卵母细胞的去核

将体外培养20~22 h成熟的并去掉卵丘细胞的山羊卵母细胞置于含7.5 μg/mL细胞松弛素B(CB)的显微操作液微滴中(每个液滴移入约30枚山羊成熟卵母细胞), 置于Nikon显微操作仪上进行去核。固定卵母细胞时, 把极体摆放在相当于时钟4~5点左右的位置进行去核, 去核针从3点钟位置进入, 注射针下压接近极体时, 吸取极体及周围的部分胞质, 吸取的胞质最好不要超过1/3。

1.5 核移植胚胎的构建与激活

1.5.1 核移植胚胎的构建 将去核的卵母细胞按15~20枚/批置于含7.5 μg/mL CB的显微操作液微滴中, 用石蜡油覆盖, 然后吸取10~20 μL供体细胞(转入t-PA指形区缺失基因的山羊胎儿成纤维细胞)悬液加入100 g/L PVA的操作液滴, 置显微操作仪下注核。移动固定管和注射管到含供体细胞液滴中, 吸取细胞并反复吹吸细胞直到破膜, 然后吸取核胞体并使之位于注射针尖端, 再移动固定管和注射管到含卵母细胞的液滴中, 用固定管固定卵母细胞, 将注射管与卵母细胞调到同一高度, 插入卵母细胞, 轻轻将供体细胞核胞体注入卵母细胞质中, 退出注射管。

1.5.2 核移植胚胎的激活 将核移植胚胎放在含7.5 μg/mL CB的PBS液中平衡1 h, 用PBS洗3遍后, 移入含5 μmol/L离子霉素(bonomycin)的SOFaa中激活4 min, 再用SOFaa培养液洗3遍后, 移入含2 mmol/L 6-DMAP的SOFaa中培养3~4 h。

1.6 核移植胚胎的体外培养

核移植胚胎激活处理后, 先用胚胎培养液清洗3次, 然后移入含SOFaa液的颗粒细胞单层上于体积分数5% CO₂ 38.5℃饱和湿度下培养, 培养皿上覆盖矿物油。在培养的第3天加入体积分数10%的BFF, 继续培养2 d后观测卵裂率, 培养5~9 d时, 观测记录发育到桑囊胚阶段的胚胎数, 评定早期胚胎发育能力。所有试验均重复3~5次, 试验数据进行 χ^2 统计分析。

1.7 核移植胚胎中外源基因的荧光检测

转入t-PA指形区缺失基因的山羊胎儿成纤维细胞核移植胚胎培养后, 应用Nikon显微镜(TE-300)紫外光系统(UV的发射波长为490 nm)对早期胚胎进行观察, 检测GFP的表达情况。

1.8 不同类型供体细胞对核移植胚胎体外发育的影响

对山羊胎儿成纤维细胞和转基因山羊胎儿成纤维细胞进行传代培养, 待其壁铺满皿底后消化, 作为供核细胞进行胞质内注射, 构建核移植胚胎, 并检测其体外发育情况。

1.9 供体细胞饥饿对核移植胚胎体外发育的影响

分别以正常培养和DMEM/F12(含0.5% FBS)饥饿处理1~3 d的转入t-PA指形区缺失基因山羊胎儿成纤维细胞作为供核细胞, 进行胞质内注射, 构建核移植胚胎, 检测其体外发育情况。

2 结果与分析

2.1 转染后山羊胎儿成纤维细胞的荧光鉴定

转染后, 筛选阳性细胞传代培养25 d(5代), 在荧光显微镜下观察GFP表达情况。结果表明, 转染的山羊胎儿成纤维细胞中有GFP表达(图1)。

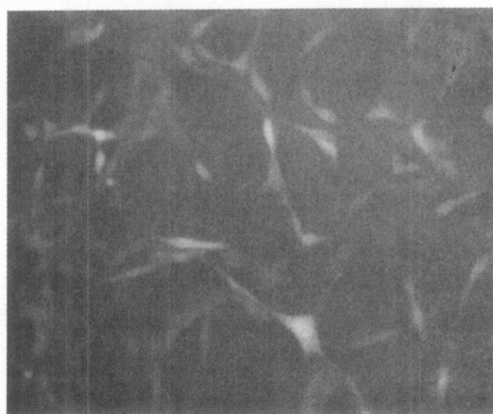


图1 转入t-PA指形区缺失基因山羊胎儿成纤维细胞的观察(荧光显微镜)

Fig 1 Observation of transfer human t-PA gene to the goat fetal fibroblasts (fluorescent microscope)

2.2 转染后山羊胎儿成纤维细胞的PCR鉴定

对G418筛选的阳性细胞进行PCR鉴定, 结果见图2。由图2可知, PCR电泳得到1条1640 bp的条带, 与预期结果一致, 可见目的基因已经整合到了细胞基因组上。

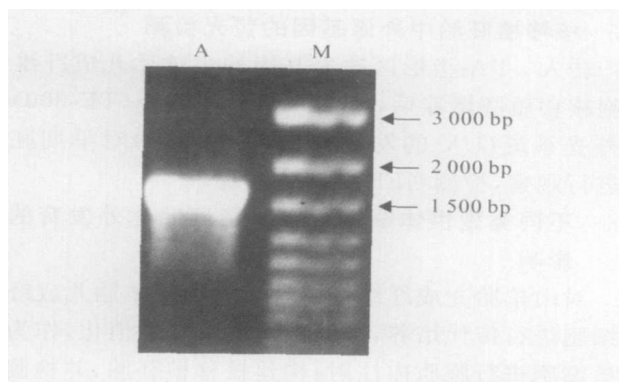


图 2 转入 t-PA 指形区缺失基因山羊胎儿成纤维细胞的 PCR 鉴定

M. DNA Marker; A. 阳性细胞的 PCR 结果

Fig 2 Detemination of transfer human t-PA gene to the goat fetal fibroblasts

M. DNA M arker; A. PCR result of positive cells

2 3 外源基因在早期胚胎中的表达

由图 3 可以看出, 核移植胚胎发育良好, 由图 4 可知, 早期核移植胚中有不同程度的 EGFP 表达。

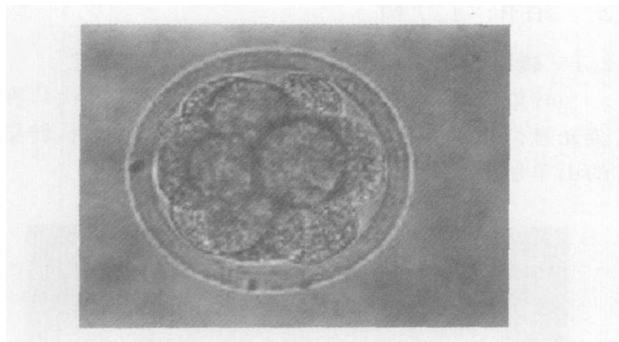


图 3 转入 t-PA 指形区缺失基因山羊胎儿成纤维细胞核移植胚胎 (16 细胞, 200 ×)

Fig 3 Nuclear transfer embryo of transfer human t-PA gene to the goat fetal fibroblasts (16 cells, 200 ×)

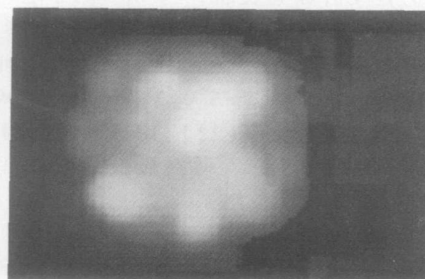


图 4 转入 t-PA 指形区缺失基因山羊胎儿成纤维细胞核移植胚胎的荧光照片 (16 细胞, 200 ×)

Fig 4 Fluorescen photograph of nuclear transfer embryo of transfer human t-PA gene to the goat fetal fibroblasts (16 cells, 200 ×)

2 4 不同类型供体细胞对山羊胎儿成纤维细胞核移植胚胎体外发育的影响

由表 1 可知, 以胎儿成纤维细胞作供体时, 核移植胚的桑葚胚率为 50.3%, 囊胚率为 16.0%, 高于以转基因胎儿成纤维细胞为供体时的桑葚胚率 (48.4%) 和囊胚率 (10.9%), 但差异不显著 ($P > 0.05$)。

2 5 供体细胞饥饿与否对转入 t-PA 指形区缺失基因核移植胚胎体外发育的影响

由表 2 可知, 转入 t-PA 指形区缺失基因山羊胎儿成纤维细胞饥饿处理组核移植胚胎的卵裂率 (73.6%) 与不饥饿处理 (73.9%) 差异不显著。饥饿处理组核移植胚胎的桑葚胚率 (48.5%) 和囊胚率 (11.2%) 均高于不饥饿处理组的桑葚胚率 (39.2%) 和囊胚率 (9.2%), 但差异不显著 ($P > 0.05$)。

表 1 不同类型供体细胞对山羊胎儿成纤维细胞核移植胚胎体外发育的影响

Table 1 Effect of donor cells on nuclear transfer embryos *in vitro* development

供体细胞 Donor cells	卵母细胞数 No. of oocytes	卵裂率/% Cleavage rate	桑葚胚率/% Morulae rate	囊胚率/% Blastocyst rate
胎儿成纤维细胞 Fetal frbroblasts	225	75.1(169/225)	50.3(85/169)	16.0(27/169)
转基因胎儿成纤维细胞 T transfer t-PA gene fetal frbroblasts	336	73.8(248/336)	48.4(120/248)	10.9(27/248)

表 2 供体细胞饥饿与否对核移植胚胎发育的影响

Table 2 Effect of starvating donor cells on Nuclear transfer embryos *in vitro* development

组别 Group	卵母细胞数 No. of oocytes	卵裂率/% Cleavage rate	桑葚胚率/% Morulae rate	囊胚率/% Blastocyst rate
饥饿组 Strvation group	182	73.6(134/182)	48.5(65/134)	11.2(15/134)
不饥饿组 No strvation group	176	73.9(130/176)	39.2(51/130)	9.2(12/130)

3 讨论

3.1 供体细胞类型对核移植胚胎体外发育的影响

目前使用比较多的供体细胞有胎儿成纤维细胞^[6-7]、颗粒细胞^[8-9]、输卵管和子宫上皮细胞^[9]、成年动物成纤维细胞^[10]等, 供体细胞类型对核移植胚胎体外发育有很大的影响。利用小鼠睾丸支持细胞和脑神经细胞不能克隆出个成活个体, 而利用卵丘细胞可以获得克隆小鼠^[11]。龚国春等^[12]在牛体细胞核移植研究中, 综合比较了Holstein 奶牛的4种体细胞重构造胚的发育情况, 结果显示, 输卵管上皮细胞系重构造胚的囊胚发育率最高, 胎儿成纤维细胞系和奶牛颗粒细胞系次之, 成年成纤维细胞系最低。本试验以山羊胎儿成纤维细胞和转人 t-PA 指形区缺失基因山羊胎儿成纤维细胞为供体, 对构建的核移植胚胎体外发育能力的比较表明, 用山羊胎儿成纤维细胞构建的核移植胚胎, 其体外囊胚率(16.0%)高于用转人 t-PA 指形区缺失基因山羊胎儿成纤维细胞构建的核移植胚胎(囊胚率为10.9%)。其原因可能是细胞在转染过程中受到一定程度的损害, 也有可能是转基因细胞的染色体核型因为外源基因的插入而发生了异常。

3.2 供体细胞饥饿与否对转基因核移植胚胎发育的影响

目前在体细胞核移植研究中大多使用G₀/G₁期的细胞作为供体, 该时期的细胞活动减慢, DNA合成基本停止, G₀期细胞有利于核的重新编程, 能导致染色质结构改变, 使基因表达的初始化容易进行。在对绵羊的研究中, Wilmut等^[13]认为, G₀期的细胞作为供核细胞是核移植胚胎发育到个体的关键。因此, 选择处于细胞周期的G₀/G₁期细胞作供核细胞, 有利于核移植重建胚的发育^[13]。G₀/G₁期细胞可利用细胞贴壁生长接触抑制的特性或利用低浓度血清饥饿培养处理来获得。本试验结果显示, 血清饥饿法处理供体细胞构建的核移植胚胎的囊胚发育率(11.2%)稍高于不经血清饥饿法处理的供体细胞(9.2%), 但差异不显著。其原因可能是未经饥饿处理的细胞在培养过程中, 当细胞铺满皿底后, 由于细胞间的接触抑制使大部分细胞也处于G₀/G₁期。Kues等^[14]对猪成纤维细胞的研究结果表明, 猪的成纤维细胞用一般培养法培养贴壁铺满后, 有66.6%~73.7%的细胞停留在G₀/G₁期, 而用血清饥饿法培养24~72 h, 处于G₀/G₁期的细胞增加至77.9%~80.2%。郝茹等^[15]用血清饥饿法处理兔成

纤维细胞1~3 d, 结果发现处于G₀/G₁期的细胞比例由正常培养条件下的72.3%增加到86%。饥饿法处理供体细胞可使核移植胚胎较好地完成早期发育^[16], 但饥饿处理是否会对细胞核产生损伤而影响胚胎的后续发育, 还需进一步研究。

[参考文献]

- [1] Schnieke A E, Kind 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] McCreath K J, Howcroft J, Campbell K H S, et al Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells[J]. Nature, 2000, 405: 1066-1069
- [3] Prather R S, Barnes F L. Cloning embryos by nuclear transfer[J]. Reprod Fertil, 1990, 41: 414-418
- [4] Baguisi A, Behboodi E, Melian D T, et al Production of goats by somatic cell nuclear transfer[J]. Nat Biotechnol, 1999, 17(5): 456-461
- [5] 赵晓娥, 鲁进, 刘凤军, 等. 山羊卵母细胞显微受精及胚胎培养[J]. 农业生物技术学报, 2005, 13(4): 507-511
- [6] Cibelli J B, Stice S L, Golueke P J, et al Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblast[J]. Science, 1998, 280(5): 1256-1258
- [7] Onishi A, Iwanamoto M, Akita T, et al Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei[J]. Science, 2000, 289: 1188-1190
- [8] Chenog H T, Ikeda K, Martinez-Diaz M A, et al Development of reconstituted pig embryos by nuclear transfer of cultured cumulus cells[J]. Fertil Dev, 2000, 12: 15-20
- [9] Kato Y, Tani T, Sotomaru Y, et al Eight calves cloned from somatic cells of a single adult[J]. Science, 1998, 282: 2095-2098
- [10] Kubota M, Yamakuchi H, Todomichi J, et al Six cloned calves produced from adult fibroblast cells after long-term culture[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97: 990-995
- [11] Wakayama T, Perry A C, Zuccotti M, et al Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei[J]. Nature, 1998, 394: 369-374
- [12] 龚国春, 戴蕴平, 朱化彬, 等. 供体细胞类型对体细胞克隆牛生产效率的影响[J]. 中国科学 C 辑: 生命科学, 2004, 34(3): 257-262
- [13] Wilmut I, Schnieke A E, McWhir J, et al Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells[J]. Nature, 1997, 385: 810-813
- [14] Kues W A, Anger M, Arnswarth J W, et al Cell cycle synchronization of porcine fetal fibroblasts: effects of serum deprivation and reversible cell cycle inhibitors[J]. Biol Reprod, 2000, 62: 412-419
- [15] 郝茹, 王玉阁, 张正旺, 等. 家兔体细胞的发育周期与重构造胚发育的关系[J]. 细胞生物学杂志, 2004(26): 631-634
- [16] Campbell K H S, McWhir J, Ritchie W A, et al Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line[J]. Nature, 1996, 380: 64-66