

# pEGFP-hTERT 载体的构建及其在牛 A 型精原细胞中的表达

毕聪明<sup>1,2</sup>, 张仕强<sup>1</sup>, 彭树英<sup>1</sup>, 吕宁<sup>1</sup>, 张涌<sup>1</sup>

(1 西北农林科技大学 生物工程研究所, 陕西 杨凌 712100; 2 锦州医学院 畜牧兽医学院, 辽宁 锦州 121000)

**[摘要]** 为了构建端粒酶逆转录酶表达载体, 用带有绿色荧光蛋白报告基因的载体 pEGFP-C1 和带有 hTERT cDNA 的载体 pCL-Neo-hTERT, 通过基因重组构建新的载体 pEGFP-hTERT, 转化后筛选阳性克隆进行酶切鉴定; pEGFP-hTERT 载体通过脂质体介导法转染纯化后的牛 A 型精原细胞, 观察绿色荧光表达, G418 筛选阳性克隆。结果表明, pEGFP-hTERT 载体与预设计的一致; pEGFP-hTERT 载体转染牛 A 型精原细胞后, 经筛选获得了 1 个表达绿色荧光蛋白的阳性细胞克隆。由此可见, hTERT 表达载体得到了成功构建, 并在牛 A 型精原细胞中实现了表达。

**[关键词]** A 型精原细胞; 基因重组; hTERT; 牛

**[中图分类号]** Q813.1<sup>+</sup>1

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-9387(2007)08-0006-05

## Establishment of pEGFP-hTERT vector and expression in type A spermatogonia of bovine

BI Cong-ming<sup>1,2</sup>, ZHANG Shi-qiang<sup>1</sup>, PENG Shu-ying<sup>1</sup>, L Ü Ning<sup>1</sup>, ZHANG Yong<sup>1</sup>

(1 Institute of Bioengineering, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Department of Veterinary Science, Jinzhou Medical University, Jinzhou, Liaoning 121001, China)

**Abstract:** To construct a telomerase reverse transcriptase expression vector, a new vector pEGFP-hTERT was established by genetic recombination of vector pEGFP-C1 with green fluorescence protein reporter gene and vector pCL-Neo-hTERT containing hTERT cDNA. Positive clones containing recombinant plasmids were identified by restriction endonuclease digesting. Type A spermatogonia of bovine after purification were transfected with pEGFP-hTERT vector mediated by lipofectamine and the expression of green fluorescence protein was observed, and then the positive clone was screened with G418. The results showed that the pEGFP-hTERT vector was identical to the size devised in advance. After transfecting with pEGFP-hTERT vector, a positive clone of type A spermatogonia expressing green fluorescence protein of bovine was obtained by screening. Thus it could be concluded that pEGFP-hTERT vector was established and expressed in type A spermatogonia of bovine successfully.

**Key words:** type A spermatogonia; gene recombination; hTERT; bovine

通过将目的基因导入体外培养的精原干细胞, 再将携带有目的基因的精原干细胞移植到受体睾丸

**[收稿日期]** 2006-06-23

**[基金项目]** 国家“863”计划项目(2004AA213072)

**[作者简介]** 毕聪明(1973-), 男, 黑龙江海伦人, 在读博士, 主要从事哺乳动物胚胎工程研究。

**[通讯作者]** 张涌(1956-), 男, 内蒙古和林格尔人, 教授, 博士生导师, 主要从事哺乳动物胚胎工程和发育生物学研究。

E-mail: zhy1956@263.net

中,从而获得源源不断的转基因精子来生产转基因动物,已成为当前转基因动物生产的一条新途径。Brinster 等<sup>[1]</sup>率先进行了用精原干细胞转染外源基因生产转基因动物的研究。但该项技术仍然存在生产效率低的问题,主要原因之一是精原干细胞很难在体外长期存活。体外培养的精原干细胞由于缺乏机体内环境因素的调控,很快发生分化和凋亡。所以,建立永生化精原干细胞系对解决细胞来源问题具有重要意义。

端粒酶逆转录酶(Telomerase reverse transcriptase, TERT)是端粒酶的催化亚基,可与端粒酶 RNA-端粒酶相关蛋白 1(Telomerase-associated protein 1, TEP1)复合物结合形成全酶以激活端粒酶活性。异位表达人端粒酶逆转录酶(hTERT)可使干细胞端粒酶活性提高,导致干细胞发生与端粒酶相关的功能和特性的变化,从而达到建立永生化细胞系等目的。有研究表明,导入外源 hTERT 基因可延长细胞体外培养寿命,而对生长、分化等多种生物学特性并无影响<sup>[2]</sup>。为此,本研究试图通过构建 hTERT 真核表达载体,对牛 A 型精原细胞进行转染,从而为建立永生化牛精原干细胞系奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

新生荷斯坦小公牛由杨凌区屠宰场提供;pEGFP-C1 质粒(全长 4.7 kb)和 DH5 菌株均为西北农林科技大学生物工程研究所保存;pCL-Neo-hTERT 质粒(全长 8.9 kb)由第四军医大学口腔医院王新文博士惠赠。限制性内切酶购自 MBI 公司;T4 连接酶和卡那霉素购自 Promega 公司;凝胶回收试剂盒为 U-gene 公司产品;质粒提取试剂盒购自安徽优晶生物工程有限公司;琼脂糖购自 sigma 公司。型胶原酶(Col)、胰蛋白酶、EDTA 为 Sigma 公司产品;DMEM 为 Gibco BRL 公司产品;胎牛血清(FBS)为杭州四季清生物工程材料有限公司产品;Percoll 为 Pharmacia 公司产品;其余试剂均为国产分析纯。

### 1.2 pEGFP-C1 和 pCL-Neo-hTERT 质粒的提取

pEGFP-C1 质粒和 pCL-Neo-hTERT 质粒的提取,均参照质粒提取试剂盒说明书进行。提取后用分光光度法测定 DNA 含量。

### 1.3 pEGFP-hTERT 真核表达质粒的构建

pEGFP-C1 质粒和 pCL-Neo-hTERT 质粒均用 EcoR / Sal 内切酶进行双酶切,37 温育 6~12

h。将上述酶切后的产物在 10 g/L 的琼脂糖凝胶上电泳,使载体与外源基因片段充分分离。分别切下含有 hTERT(3.4 kb)的目的基因片段和酶切后的 pEGFP-C1(4.7 kb)载体片段胶条,用 DNA 回收试剂盒进行回收,分光光度计测定 DNA 含量。将回收纯化的目的基因片段 hTERT 和酶切后的 pEGFP-C1 载体进行定向连接,连接体系按照 T4 DNA Ligase 说明书操作,4 连接 12 h。

### 1.4 pEGFP-hTERT 原核表达质粒的转染与鉴定

用 CaCl<sub>2</sub> 制备感受态宿主菌,具体步骤见参考文献[3]。将上述连接产物转化感受态宿主菌 DH5 后,涂布于含卡那霉素的培养板上,37 培养 8~12 h。挑取单克隆,37 振荡培养过夜。提取质粒进行 EcoR 和 Sal 双酶切,0.8 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测。

### 1.5 牛 A 型精原细胞的纯化及饲养层制作

按 Izadyar 等<sup>[4]</sup>的方法,并略作修改。无菌条件下采集新生公牛睾丸,去除睾丸组织块周围结缔组织后清洗离散曲细精管,剪碎,加入 10 倍体积 0.1 g/L 胶原酶(Col),37 消化 20 min 至曲细精管成小段,中间轻晃数次。PBS 洗 3 次,然后用 2.5 g/L 胰蛋白酶消化 5~10 min 成单细胞悬液,孔径 0.076 mm 纱网过滤,采用 Percoll 密度梯度离心和反复差速贴壁法纯化精原细胞。

将 Percoll 分离后的细胞悬液接种于直径为 60 mm 塑料培养皿 1 中,在接种后 6 h 收集游离的细胞接种于 60 mm 塑料培养皿 2 中,6 h 后再次收集培养皿 2 中游离的细胞,即为高度纯化的 A 型精原细胞,对其进行台盼蓝染色计数,按  $5 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$  接种于 24 孔板。

贴壁生长的睾丸支持细胞待 80% 汇合时传代,用于制作支持细胞饲养层。A 型精原细胞和支持细胞的培养液均为添加体积分数 2.5% FBS 的 DMEM,于 37、体积分数 5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度培养。

### 1.6 pEGFP-hTERT 转染牛 A 型精原细胞

参考文献[5]中介绍的方法,并略有修改。取 16  $\mu\text{L}$  含 pEGFP-hTERT 真核表达载体的质粒 DNA,用无血清 DMEM 稀释至 50  $\mu\text{L}$ ,温和混匀。取 2  $\mu\text{L}$  Lipofectamine 2000 用无血清 DMEM 稀释至 50  $\mu\text{L}$ ,温和混匀。5 min 后,将稀释的 DNA 和 Lipofectamine 2000 温和混匀,室温下静置 20 min。

分孔收集培养 24 h 后的 A 型精原细胞悬液,1 000 r/min 离心浓缩细胞,用无血清的 DMEM 漂

洗 2 次,每孔加入 100  $\mu\text{L}$  转染液,轻轻混匀。37  $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数 5%  $\text{CO}_2$  饱和湿度培养 6 h。吸除转染液,换为不含抗生素添加 2.5% FBS 的 DMEM 培养基继续培养 24 h。按照 1:5 的比例传代,接种于支持细胞饲养层上,24 h 后添加 G418 (600  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 进行筛选。

## 2 结果与分析

### 2.1 pEGFP-hTERT 真核表达载体的构建

重组 pEGFP-hTERT 真核表达载体,转化 DH5 感受态宿主菌后得到了阳性克隆。提取阳性重组质粒,进行 *EcoR* / *Sal* 内切酶酶切鉴定,结果(图 1)显示,试验结果符合预设计要求,得到了 3.4 kb 的目的条带。

### 2.2 牛 A 型精原细胞的纯化及饲养层制作

通过 Percoll 密度梯度离心及反复差速贴壁法纯化的精原细胞,纯度达 90%,A 型精原细胞在无饲养层条件下呈悬浮生长(图 2)。

支持细胞在接种 6 h 之内就可贴壁生长,接种 12 h 后开始伸出伪足。80% 汇合后传代,用于制作

饲养层,所得细胞形态均一,呈成纤维样(图 3)。

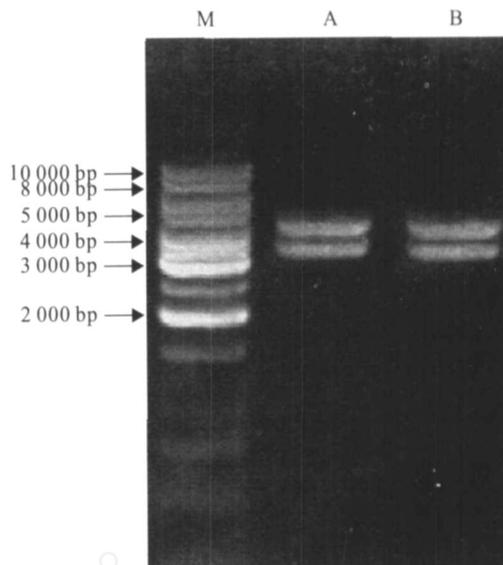


图 1 pEGFP-hTERT 载体酶切鉴定结果

M. DNA Marker; A, B. 2 个重复

Fig. 1 Result of pEGFP-hTERT vector identification by enzymes digesting  
M. DNA Marker; A, B. two repeats.

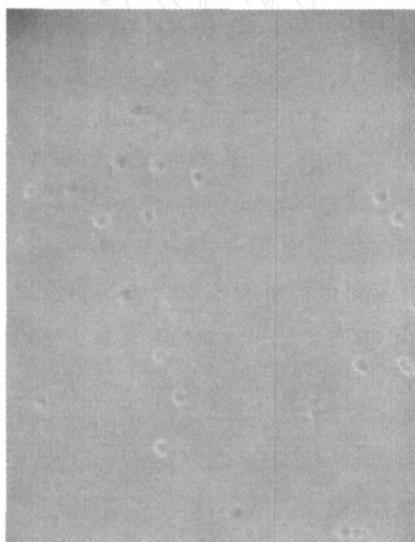


图 2 分离纯化的牛 A 型精原细胞(100  $\times$ )

Fig. 2 Type A spermatogonia of bovine after isolation and purification (100  $\times$ )

### 2.3 牛 A 型精原细胞的转染

牛 A 型精原细胞转染 24 h 后,在倒置荧光相差显微镜下观察转染孔中的细胞,发现孔中有点状绿色荧光(图 4)。转染 A 型精原细胞按照 1:5(体积比)的比例传代,接种于支持细胞饲养层上,24 h 后 A 型精原细胞在支持细胞饲养层上贴附生长,此时添加 G418 (600  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 进行筛选。每 3 d 换液 1

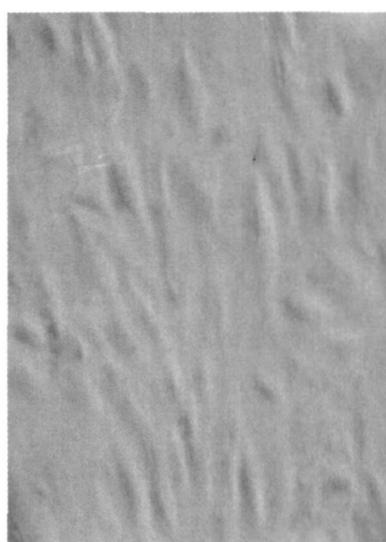


图 3 用作饲养层的牛睾丸支持细胞(100  $\times$ )

Fig. 3 Sertoli cells of bovine as feeder layer (100  $\times$ )

次。筛选 7 d 后,只剩下约 15% 的支持细胞。剩余的支持细胞和精原细胞混合物一起,传代接种于新的支持细胞饲养层上,继续筛选。1 周以后, G418 浓度减半。经过 2 周筛选,获得了 1 株阳性克隆(图 5),该阳性克隆在体外存活了近 2 个月。试验重复 3 次,但未获得更多的阳性克隆。

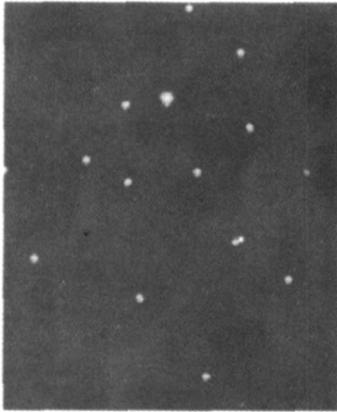


图 4 转染 24 h 后的牛 A 型精原细胞(100 ×)

Fig. 4 Type A spermatogonia of bovine transiently expressed green fluorescence protein after transfection for 24 h (100 ×)

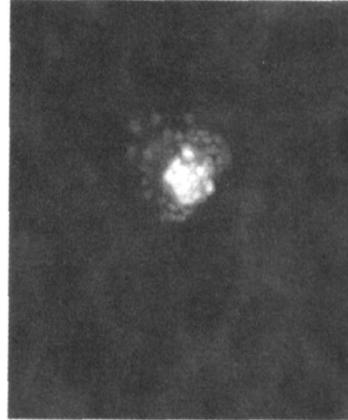


图 5 表达绿色荧光蛋白的牛 A 型精原细胞克隆(100 ×)

Fig. 5 Clone of type A spermatogonia expressing green fluorescence protein of bovine (100 ×)

### 3 讨 论

本研究中构建的 pEGFP-hTERT 真核表达载体,为 hTERT 的转染检测提供了简单快速的方法。绿色荧光蛋白基因是一种新的标记基因,对细胞无毒,不影响与其连接的目的基因的表达,也不影响目的蛋白的结构和功能。在组织和细胞中,能耐受各种处理而保持其发光特性,因而作为一个直观的报告基因得到了广泛的应用<sup>[6]</sup>。

新生牛睾丸曲细精管中,只存在 2 种类型的细胞,即 A 型精原细胞和支持细胞。A 型精原细胞又可进一步细分为 As、Apr 和 Aal 3 种亚型<sup>[7]</sup>。前两者具有精原干细胞特性,而 Aal 则是处于分化阶段的精原干细胞<sup>[8-10]</sup>。本试验分离纯化得到的牛 A 型精原细胞纯度可达 90%,因为新生牛尚未启动精子发生,所以本试验获得的主要是前两种亚型的精原细胞。

在本试验中,为支持细胞饲养层的制作而未采用传统的丝裂霉素 C 处理。因为在以前的试验中,作者发现丝裂霉素处理后的支持细胞活力较差。为了使支持细胞饲养层能适合精原细胞生长,又不至于生长过快,作者采用了添加体积分数 2.5% FBS 的低血清培养法。试验结果证明,在添加 G418 的条件下,支持细胞饲养层可维持精原细胞生长 1 周。

Feng 等<sup>[11]</sup>首次报道,利用逆转录病毒载体将 hTERT 基因导入小鼠 A 型精原细胞中,建立了永生精原细胞系,该细胞系具有 A 型精原细胞的形态特征,同时 RT-PCR 和 Western 杂交检测表明,该细胞系表达了 c-kit 受体,生殖细胞特异标记 DA-

ZL 和 Oct-4 呈阳性。用 SCF 诱导该永生细胞系,分化形成了初级精母细胞、次级精母细胞及精子细胞。精子细胞形成了顶体,表达 SP-10 和鱼精蛋白 2,染色体倍数正常,而且该永生细胞系在体外分化的时间进程与体内一致。因此,该永生精原细胞系具有精原干细胞增殖和分化的特征,这对于研究精子发生及对雄性配子体外遗传修饰具有重大意义。本研究获得的阳性细胞克隆,保持了旺盛的增殖能力。Nagano 等<sup>[12]</sup>报道,小鼠 A 型精原细胞克隆在体外维持 1 周后增殖能力就会降低。而本试验得到的牛 A 型精原细胞阳性克隆在体外维持了近 2 个月,这可能是转入的 hTERT 发挥了作用。对于本研究获得的阳性细胞克隆,是否具有分化为精子的能力,尚需进一步试验验证。

### [参考文献]

- [1] Brinster R L, Ararbock M R. Gernline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation [J]. Proc Natl Acad Sci, 1994, 91:11303-11307.
- [2] 杨 静,曹 亚.端粒酶激活与细胞永生[J].国外医学·生理·病理科学与临床分册,2001,21(6):462-464.
- [3] 萨姆布鲁克 J,拉塞尔 D W.分子克隆实验指南[M].北京:科技出版社,2002:96-99.
- [4] Izadyar F, Spierenberg G T, Creemers L B, et al. Isolation and purification of type A spermatogonia from the bovine testis [J]. Reproduction, 2002, 124:85-94.
- [5] 郑 维.汉英医学分子生物学实验方法[M].北京:中国协和医科大学出版社,2005:317-320.
- [6] Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, et al. Green fluorescent protein as a marker for gene expression[J]. Science, 1994, 263(5148):802-805.

- [7] de Rooij D G. Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells[J]. *Reproduction*, 2001, 121:347-354.
- [8] Huckins C. The spermatogonial stem cell population in adult rats: their morphology, proliferation and maturation[J]. *Anat Rec*, 1971, 169:533-557.
- [9] Oakberg E F. Spermatogonial stem-cell renewal in the mouse [J]. *Anat Rec*, 1971, 169:515-531.
- [10] de Rooij D G, Grootegoed J A. Spermatogonial stem cells[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 1998, 10:694-701.
- [11] Feng L X, Chen Y, Dettin L, et al. Generation and in vitro differentiation of a spermatogonial cell line [J]. *Science*, 2002, 297:392-395.
- [12] Nagano M, Ryu B Y, Brinster C J, et al. Maintenance of mouse male germ line stem cells in vitro [J]. *Biol Reprod*, 2003, 68:2207-2214.

(上接第 5 页)

### [参考文献]

- [1] Thomson J A, Itskovitz J, Shapiro S S, et al. Embryonic stem cell Lines derived from human blastocysts [J]. *Science*, 1998, 282:1145-1147.
- [2] Reubinoff B E, Pera M F, Fong C Y, et al. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro [J]. *Nat Biotechnol*, 2000, 18:399-404.
- [3] Mummery C, Ward D, Vanden B C E, et al. Cardiomyocyte differentiation of mouse and human embryonic stem cells [J]. *J Anat*, 2002, 200(3):233-242.
- [4] Oren, Ayelet L, Yaara B, et al. Tissue engineering of vascularized cardiac muscle from human embryonic stem cells [J]. *Circulation Research*, 2007, 100:263.
- [5] Metzger J M, Lin W, Samuelson L C. Vital staining of cardiac myocytes during embryonic stem cell cardiogenesis [J]. *Circ Res*, 1996, 78:547-552.
- [6] Kolossov E, Fleischmann B K, Liu Q, et al. Functional characteristics of ES cell-derived cardiac precursor cells identified by tissue specific expression of the green fluorescent protein [J]. *Cell Biol*, 1998, 143:2045-2056.
- [7] Liu Y P, Dovzhenko O V, Garthwaite M A, et al. Maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells stably over-expressing enhanced green fluorescent protein [J]. *Stem Cells Dev*, 2004, 13(6):636-645.
- [8] Min J Y, Yang Y K, Sullivan M F, et al. Long-term improvement of cardiac function in rats after infarction by transplantation of embryonic stem cells [J]. *Thorac Cardiovasc Surg*, 2003, 125:361-369.
- [9] Kim J H, Do H J, Choi S J, et al. Efficient gene delivery in differentiated human embryonic stem cells [J]. *Exp Mol Med*, 2005, 37(1):36-44.
- [10] Masi T, Drum M, Hall L, et al. Expression of the cardiac actin gene in axolotl embryos [J]. *Dev Biol*, 2000, 44(5):479-84.
- [11] Marini F C, Shayakhmetov D, Gharwan H, et al. Advances in gene transfer into haematopoietic stem cells by adenoviral vectors [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2002, 2(8):847-56.
- [12] 杨玉艾, 孙永科, 华进联, 等. 人类  $\alpha$ -actin 启动子真核表达载体的构建 [J]. *中国实验动物学报*, 2006, 14(4):241-245.
- [13] Klug M G, Soonpaa M H, Koh G Y, et al. Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts [J]. *Clin Invest*, 1996, 98:216-224.
- [14] Theise N D, Nimmakayalu M, Gardner R, et al. Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation [J]. *Hepatology*, 2000, 31:235-240.
- [15] 吴丹莉, 张友荣, 劳妙芬, 等. 腺病毒载体介导肝细胞生长因子基因对大鼠心肌缺血的基因治疗 [J]. *科学通报*, 2002, 47(22):1726-1729.