

网络出版时间:2013-12-25 13:21 DOI:10.13207/j.cnki.jnwfufu.2014.01.032
网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13207/j.cnki.jnwfufu.2014.01.032.html>

滩羊胎儿成纤维细胞系的建立及其生物学特性研究

王娟^{a,b}, 孙毅^{a,b}, 程龙^{a,b}, 宋孚阳^a, 李敏^{a,b}, 刘晓明^{a,b}, 李勇^{a,b}

(宁夏大学 a 西部特色生物资源保护与利用教育部重点实验室, b 生命科学学院, 宁夏 银川 750021)

【摘要】 【目的】以滩羊胎儿皮肤组织为材料, 获得符合体细胞克隆转基因基本要求的供体细胞系。【方法】取滩羊胎儿皮肤组织, 采用组织块法分离培养获得滩羊胎儿成纤维细胞, 观测其形态和生长情况, 鉴定其性别, 并对其染色体核型和红色荧光报告基因质粒(pmCherry-N1)转染等生物学特性进行研究。【结果】采用组织块法成功获得了滩羊胎儿成纤维细胞, 其细胞群体倍增时间(PDT)约为 48 h; 5 代、15 代、25 代滩羊胎儿成纤维细胞核型分析表明, 各代细胞染色体均为 $2n=54$, 未见异常; 滩羊胎儿成纤维细胞的转染效率较高, 约为 50%, 对最终获得的稳定表达红色荧光蛋白的胎儿成纤维细胞进行核型分析, 结果证明遗传物质没有发生变化。【结论】建立了滩羊胎儿成纤维细胞系, 为滩羊分子育种奠定了基础。

【关键词】 滩羊; 成纤维细胞; 生物学特性; 体外培养

【中图分类号】 S826.2; Q813.1⁺1 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1671-9387(2014)01-0018-06

Establishment of fetal fibroblast cell line and its biological characteristics in Tan sheep

WANG Juan^{a,b}, SUN Yi^{a,b}, CHENG Long^{a,b}, SONG Fu-yang^a,
LI Min^{a,b}, LIU Xiao-ming^{a,b}, LI Yong^{a,b}

(a Key Laboratory of the Ministry of Education for Conservation and Utilization of Special Biological Resources in Western China,
b School of Life Science, Ningxia University, Yinchuan, Ningxia 750021, China)

Abstract: 【Objective】 This study aimed to obtain donor cells for somatic cloning and gene transformation from fetal skin tissue of Ningxia Tan sheep. 【Method】 Fetal skin tissues of Ningxia Tan sheep were cultivated by explant culture technique to obtain fetal fibroblast cells. The red fluorescent protein report gene (pmCherry-N1) was transferred into fetal fibroblast cells with liposome. The morphology and dynamic growth of obtained cells were analyzed, the sex was determined, and the karyotype was studied. 【Result】 Fibroblast cell of Tan sheep fetal was acquired by explant culture technique with the population doubling time (PDT) of approximately 48 h. Karyotype analysis of 5, 15, and 25 generations showed that the chromosome diploid was $2n=54$, and no anomalies were observed. Transfer efficiency of the plasmid was 50%, and karyotype analysis of fetal fibroblast cells, which generated stably expressed red fluorescent protein report gene, showed that the hereditary character was stable. 【Conclusion】 Fetal fibroblast cell lines in Ningxia Tan sheep were successfully established, which would improve the breeding of Tan sheep.

Key words: Tan sheep; fibroblast cell; biological characteristics; *in vitro* culture

【收稿日期】 2013-02-01
【基金项目】 宁夏自然科学基金项目(NZ1161)
【作者简介】 王娟(1982—), 女, 甘肃兰州人, 讲师, 主要从事分子与细胞生物学研究。E-mail: ben8204@163.com
【通信作者】 李勇(1977—), 男, 陕西西安人, 副教授, 硕士生导师, 主要从事细胞与胚胎生物技术研究。
E-mail: liyong7732@126.com

自从1997年多莉羊^[1]诞生以来,体细胞核移植技术就以其在动物繁殖、品种改良及育种中的巨大潜力和广阔前景而倍受广大动物科技工作者的关注。目前,国内外有许多实验室都在进行体细胞克隆技术的研究,而建立动物体细胞体外培养模式是体细胞克隆生产的前提。

由于动物胎儿成纤维细胞具有易分离、体外培养生长速度快、倍增代数多、染色体倍性稳定等特点,故大多数克隆以胎儿成纤维细胞为供体,并已在牛^[2]、山羊^[3]和猪^[4]上取得了成功。

滩羊属于短脂尾羊,是中国唯一生产二毛裘皮用绵羊品种,与浙江湖羊、山东鲁西小尾寒羊一样,是国家二级保护品种,2001年被农业部列入第一批畜禽品种保护名录。滩羊体质坚实,适应荒漠、半荒漠地区^[5],所产二毛裘皮独具一格,羊毛富有光泽和弹性,为纺织提花毛毯的原料。而且,滩羊肉具有细嫩鲜美,脂肪分布均匀,无膻腥味等优点。因此,对滩羊种质资源特色的保护及繁育性能的改良成为滩羊产业发展的共性需求。陈亮等^[6]曾以滩羊耳缘组织为材料,构建了滩羊成纤维细胞系。本试验以滩羊胎儿皮肤组织为材料,采用组织块培养分离获得滩羊胎儿成纤维细胞,观测其形态和生长情况,鉴定其性别,并对其染色体核型和红色荧光报告基因(pmCherry-N1)转染等生物学特性进行研究,旨在将这一特有品种的遗传资源从细胞水平保存下来,为滩羊分子育种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

滩羊胎儿取自宁夏银川市红寺堡天源良种肉羊繁育场。

培养基及主要试剂:DMEM/F12为Gibco公司产品,胎牛血清(FBS)为HyClone公司产品,胰蛋白酶(1:250)、EDTA、DMSO、秋水仙素、Giemsa、Trypan blue均为Sigma公司产品,脂质体转染试剂盒、Taq酶均为全式金公司产品。

1.2 滩羊胎儿成纤维细胞的获取

取妊娠滩羊的体尺为5~8 cm胎儿(约45~60 d胎龄),置37℃生理盐水中带回实验室,用含有青霉素(100 IU/mL)、链霉素(100 IU/mL)的PBS洗涤3~5次,用眼科剪将滩羊胎儿皮肤剪切成1 mm³大小的组织块,用移液器将碎组织块移入培养瓶,并均匀地平铺于培养瓶底部。将培养瓶倾斜(以防添加培养液时将组织块冲下),加入5 mL含体积分数

10% FBS的DMEM/F12完全培养液。将有皮肤小块的一面向上放入培养箱,于体积分数5% CO₂、38.5℃和饱和湿度下静置4 h后,将培养瓶翻转过来^[7],使培养液浸没组织块,尽量避免组织块浮起,然后继续培养,每2 d换1次培养液。

1.3 滩羊胎儿成纤维细胞的纯化与培养

根据上皮细胞与成纤维细胞对胰蛋白酶消化敏感性的不同及二者贴壁速度的差异,可以将二者分离。在混合生长的原代细胞中,弃除培养瓶中的培养液,加入无血清PBS漂洗1次,然后加入2 mL孵育好的2.5 g/L胰蛋白酶,在38.5℃的培养箱中作用2 min,待70%的细胞脱壁、变圆、分离成单个细胞时轻轻拍打,使细胞脱离瓶壁,立即加入4 mL含体积分数10% FBS的DMEM/F12培养液终止消化,将消化后的细胞混合液加入10 mL的离心管中,1 000 r/min离心5 min,弃上清液,加入细胞培养液重悬,根据需要接种到新的培养瓶中培养,通过2~3次选择传代,可完全纯化成纤维细胞,形成成纤维细胞系。以后视细胞生长和代谢物情况换液,待细胞生长至70%~90%汇合时进行传代。

1.4 滩羊胎儿成纤维细胞的冻存及复苏

1.4.1 细胞冻存 处在对数生长期的成纤维细胞在冻存前24 h更换新的完全培养液。按常规传代方法消化细胞,制备成单细胞悬液,将单细胞悬液收集于10 mL离心管中,1 000 r/min离心5 min,去上清液,收集细胞;加入4℃预冷的冻存液(DMEM+体积分数30% FBS+体积分数10% DMSO),将悬液分装于无菌塑料冻存管中,严密封口,并注明细胞名称、培养代数、冻存编号、冻存日期等。将冻存管放在4℃冰箱中40~60 min,然后悬挂在液氮液面以上过夜,次日放入液氮罐中分类保存^[8]。

1.4.2 细胞复苏 将冻存的细胞快速从液氮中取出,快速投入39℃水浴中,并在水浴中不断快速摇动冻存管以迅速解冻,待冷冻液彻底解冻后,加孵育好的新鲜培养液稀释至4~5 mL,并将溶解液转移至离心管中,再以1 000 r/min离心5 min,以达到去除DMSO以缓解冷冻液毒性,用新鲜的培养液悬浮细胞沉淀,将细胞稀释至所需浓度,接种培养^[9]。

1.5 滩羊胎儿成纤维细胞的生物学特性检测

1.5.1 细胞生长曲线 消化对数生长期的成纤维细胞,制成细胞悬液,计数后用培养液稀释,将细胞密度调整至大约 4×10^4 个/mL,接种培养于24孔培养板,每孔加入1 mL培养液,每隔24 h收集4个孔的细胞并计数,取平均值,接种日期记为0 d,连续记

录 7 d。将计数结果输入计算机处理,绘制细胞生长曲线图,并求得细胞群体倍增时间参数^[10]。

1.5.2 成纤维细胞系的性别鉴定 参照天根全基因组提取试剂盒操作说明书,取部分滩羊胎儿成纤维细胞提取基因组 DNA。

根据 GenBank 已发表的绵羊 *Sry* 基因序列 (GenBank 号:JN992673.1)设计 1 对引物,上游引物:5'-AGC GGT GGT ACA GCAACA AA-3';下游引物:5'-TGT GCC TCC TCA AAAGAAT GG-3',引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。PCR 反应体系:待测 DNA 样品 2 μ L,上、下游引物各 1 μ L, *Taq* 酶 0.5 μ L, dNTP 2 μ L, 10 $\times$ Buffer 5 μ L, ddH₂O 38.5 μ L, 总体积 50 μ L。反应条件:94 $^{\circ}$ C 45 s; 59 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存备用^[11]。取 PCR 产物进行 8 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.5.3 细胞染色体制备与核型分析 取纯化后 5 代、15 代和 25 代的对数生长期成纤维细胞,加入含 0.1 μ g/mL 秋水仙素的 DMEM/F12 培养液 6~8 mL 培养 4~6 h,用 2.5 g/L 的胰蛋白酶消化收集细胞,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,逐滴加入 37 $^{\circ}$ C 预热的 0.075 mol/L KCl 10 mL, 37 $^{\circ}$ C 低渗处理 20~30 min, 1 000 r/min 离心 5 min。弃上清,向沉淀细胞加入现配制的固定液(V(甲醇):V(冰醋酸)=3:1) 1 mL,预固定 5 min, 1 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,加现配制固定液 10 mL 悬浮细胞,室温静置 30 min, 1 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,再固定 1 次。向 2 次固定后的细胞沉淀中加固定液,根据细胞数量的多少制成细胞悬液,用微细管吸取细胞悬液,在距载玻片上方大于 1 m 处滴于-20 $^{\circ}$ C 冰冻载玻片上。过酒精灯火焰,使其快速

干燥或自然干燥,然后用姬姆萨磷酸缓冲液(V(姬姆萨原液):V(磷酸缓冲液)=1:9)染色 15 min,流水冲洗 40 s,自然干燥或酒精灯加热干燥,树胶封片,姬姆萨染色后,油镜下观察并拍照,对铺展完好的中期相统计染色体数目^[12]。

1.5.4 脂质体转染 转染前 24 h,将成纤维细胞以 2×10^5 个/孔的量接种到六孔细胞培养板,每孔加 2 mL 培养基。在 38.5 $^{\circ}$ C、体积分数 5% CO₂、饱和湿度培养箱中培养,待细胞达到 70%~80% 汇合时,备用。将 4 μ g 携带有红色荧光报告基因质粒(pm-Cherry-N1)的 DNA 在 400 μ L opti-mem 培养液中稀释,再加 5 μ L puls 混匀静置 5 min 后,加入 8 μ L Lipofectamine LTX 小心混匀,室温下静置 30 min,形成 DNA-脂质体混合物。将混合物加入六孔板中,12 h 后换含体积分数 10% FBS 的 DMEM/F12 培养液继续培养,24 h 后传代加入 G-418,对转染细胞进行筛选。对筛选出的细胞进行生长动力学和核型分析,以检测转染后滩羊胎儿成纤维细胞生长能力和遗传物质的变化情况。

2 结果与分析

2.1 滩羊胎儿成纤维细胞的分离培养

滩羊胎儿组织块贴壁后第 2 天即可见到细胞从组织块边缘向外生长,成纤维细胞和上皮细胞均有,随后迅速向外扩散,培养 3 d 左右 80%~90% 细胞可汇合(图 1A),此时进行细胞传代,之后成纤维细胞生长逐渐占优势,再传代 2~3 次便可得到纯化的滩羊胎儿成纤维细胞。滩羊胎儿成纤维细胞呈梭形、长条形、多角形或不规则形。多数情况下,细胞之间排列疏松,有较大细胞间隙,有时也有平行排列,成群细胞呈放射状或漩涡状分布(图 1B)。

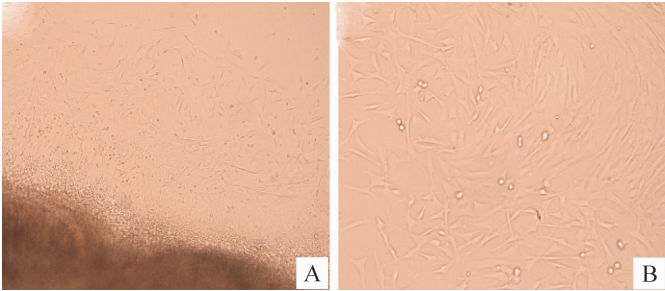


图 1 滩羊胎儿成纤维细胞

A. 组织块分离的原代胎儿成纤维细胞($\times 100$); B. 纯化后的滩羊胎儿成纤维细胞($\times 200$)

Fig.1 Fibroblast cells of Tan sheep

A. Tissue cultured primary fetal fibroblasts ($\times 100$); B. Fetal fibroblasts after purification ($\times 200$)

2.2 滩羊胎儿成纤维细胞的生长曲线

连续 7 d 定时计数接种于 24 孔培养板的细胞,

记录各次细胞密度,绘制成细胞生长曲线,结果见图 2。由图 2 可知,滩羊胎儿成纤维细胞生长总体趋势

均呈“S”型,并没有因为传代次数的增加而发生改变。细胞生长共经历了潜伏生长期、对数生长期和平台生长期3个时期。刚刚接种细胞均有24 h的潜伏期,此期为细胞的适应阶段,是细胞由于接种时胰蛋白酶消化而致的损伤后的修复时期;接种第2天起细胞进入对数生长期,其倍增时间约为48 h,这是细胞生长最快的时期;从第5天起细胞生长缓慢,进入平台生长期,随后可见有细胞死亡,这是由于细胞缺乏生长可利用的空间,出现接触抑制和密度抑制所致。

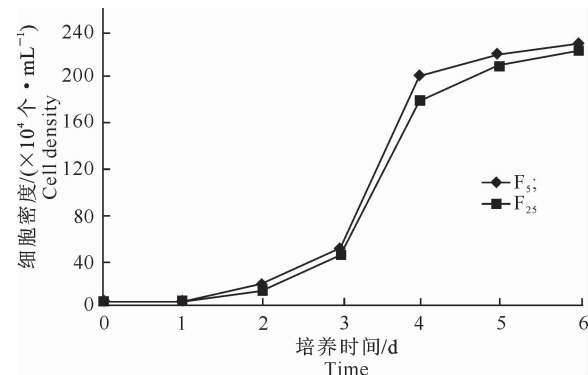


图2 滩羊胎儿成纤维细胞生长曲线

Fig. 2 The growth curve of Tan sheep embryo fibroblast cell line

2.3 滩羊胎儿成纤维细胞系的性别鉴定

共检测了5个滩羊胎儿成纤维细胞系样品,结果

(图3)显示,1、2号样品无特异性扩增带,可以判断这2个细胞系为雌性;3、4、5号样品均扩增出约130 bp的特异性条带,说明这3个细胞系为雄性。

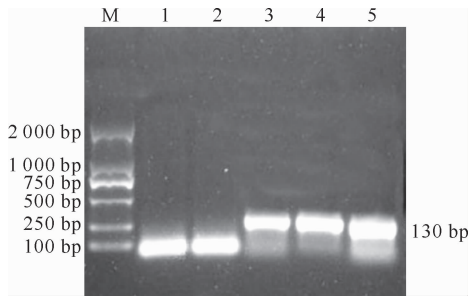


图3 滩羊胎儿成纤维细胞系的性别鉴定

M, DNA Marker DL2000;1,2. 雌性细胞;3~5. 雄性细胞

Fig. 3 Sex identification of Tan sheep fetal fibroblast lines by Sry-PCR

M, DNA Marker DL2000;1,2. Female cells;
3—5. Male cells

2.4 滩羊胎儿成纤维细胞的染色体分析

在油镜下观察滩羊胎儿成纤维细胞的染色体标本的形态并计数,每代细胞随机选取10个中期分裂细胞染色体进行统计分析,结果(图4)表明,5代、15代和25代滩羊染色体全部为 $2n=54$ 。说明所研究的滩羊胎儿成纤维细胞染色体数目为 $2n=54$,为稳定的二倍体细胞系,且未随着传代次数的增加造成染色体的缺失,可以作为体细胞核移植的供体细胞。

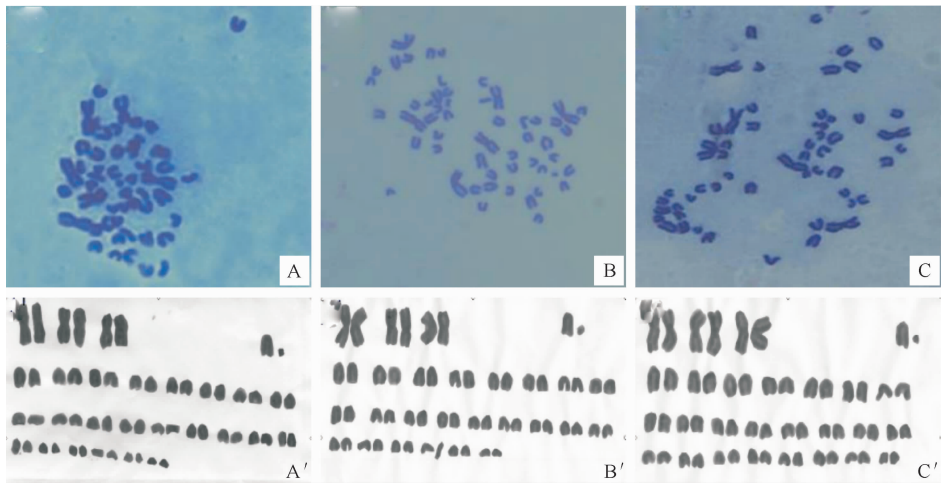


图4 不同代数滩羊胎儿成纤维细胞的染色体及核型分析($\times 1\,000$)

A和A'. 5代细胞染色体及核型;B和B'. 15代细胞染色体及核型;C和C'. 25代细胞染色体及核型

Fig. 4 Chromosomes and chromosomal karyotypes of fibroblast cells from different generations($\times 1\,000$)

A and A'. Chromosomes and chromosomal karyotype from a 5th generation cell;B and B'. Chromosomes and chromosomal karyotype from a 15th generation cell;C and C'. Chromosomes and chromosomal karyotype from a 25th generation cell

2.5 滩羊胎儿成纤维细胞脂质体转染标记基因

滩羊胎儿成纤维细胞转染 pmCherry-N1 重组

质粒后12 h,可见部分细胞发红色荧光,分布较松散,亮度较弱(图5A);24 h 阳性细胞明显增多,低

倍镜视野内可见 50%左右,未转染细胞则无荧光显示(图 5B);转染 24 h 后,传代加入药物,经过 1 周的

筛选,可观察到无荧光细胞均已死亡,阳性细胞亮度增强(图 5C)。

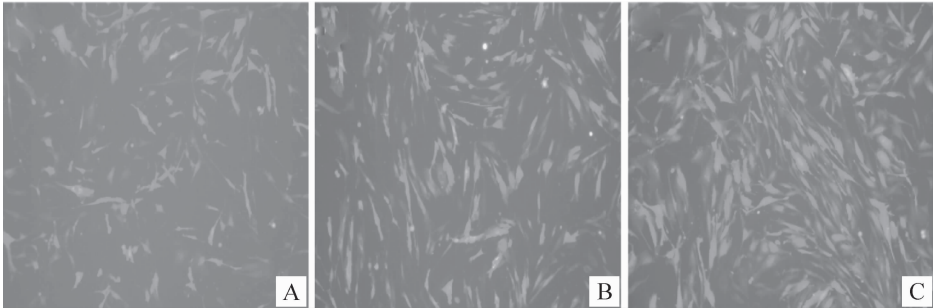


图 5 pmCherry-N1 转染滩羊胎儿成纤维细胞(×100)

A. 转染 12 h 后的成纤维细胞;B. 转染 24 h 后的成纤维细胞;C. 转染后筛选 1 周的成纤维细胞

Fig. 5 Fibroblasts of Tan sheep transfected with pmCherry-N1(×100)

A. Fibroblasts of Tan sheep 12 h after transfection with pmCherry-N1(12 h);B. Fibroblasts of Tan sheep 24 h after transfection with pmCherry-N1(24 h);C. Fibroblasts screened one week after transfection

对筛选后的第 5 代、10 代滩羊胎儿成纤维细胞进行染色体核型分析,并绘制生长曲线,结果见图 6 和图 7。染色体核型分析结果(图 6)表明,第 5 代、10 代单克隆转染细胞染色体全部为 $2n = 54$,说明转染后的滩羊胎儿成纤维细胞染色体没有发生缺失情况,且药物的筛选也没有对滩羊胎儿成纤维细胞

的遗传物质造成改变。由图 7 可知,获得的单克隆转染细胞生长总体趋势呈“S”型,与正常成纤维细胞的生长曲线相同,都包括潜伏生长期、对数生长期和平台生长期 3 个时期,且单克隆转染细胞的生长趋势并未因为传代次数的增加而有所改变。

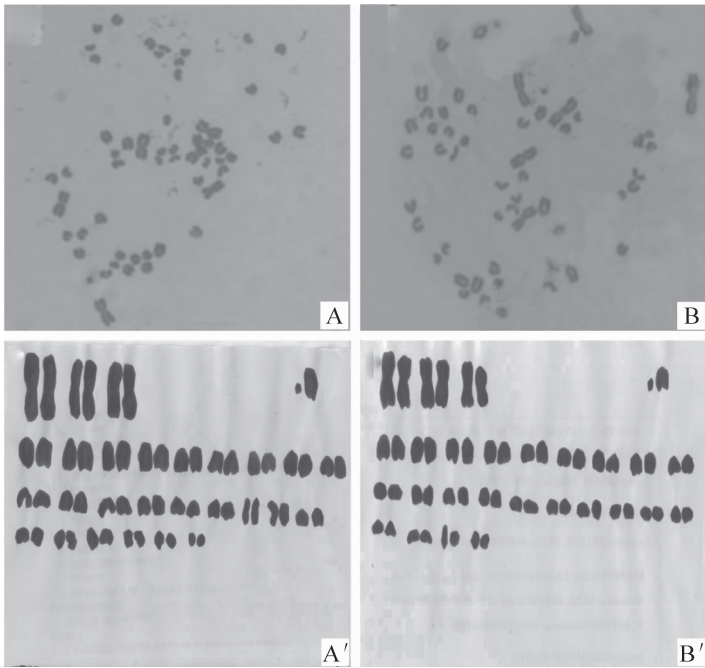


图 6 不同代数转染 pmCherry-N1 滩羊胎儿成纤维细胞的染色体及核型分析(×1 000)

A 和 A'. 5 代细胞染色体及核型;B 和 B'. 10 代细胞染色体及核型

Fig. 6 Chromosomes and chromosomal karyotype of fibroblast cells from different generation after transfection with pmCherry-N1(×1 000)

A and A'. Chromosomes and chromosomal karyotype from a 5th generation cell with pmCherry-N1 transfection; B and B'. Chromosomes and chromosomal karyotype from a 10th generation cell with pmCherry-N1 transfection

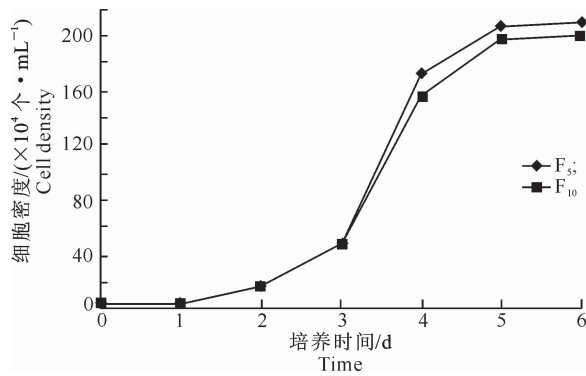


图 7 转染 pmCherry-N1 质粒后滩羊胎儿成纤维细胞生长曲线

Fig. 7 The growth curve of Tan sheep embryo fibroblast cell line transfected with pmCherry-N1

3 讨论

3.1 成纤维细胞分离方法的选择

原代细胞分离方法主要有组织块法和酶消化法。对于胎儿成纤维细胞的原代培养,有的采用组织块法,有的采用酶消化法,有的进行原代培养时 2 种方法都采用^[13]。在酶消化法中酶作用时间长易对细胞产生损伤,损伤后的细胞不易贴壁,而滩羊的体细胞核移植对供体的选择要求严格,细胞必须具有高活力。组织块法具有操作简便,对组织、细胞损伤小,污染机率小,成功率高等优点,适用于各种细胞培养,因此本试验采用组织块法分离培养滩羊胎儿成纤维细胞,为核移植提供了量足质优的供体细胞。组织贴壁是组织块法的关键环节,只有贴壁后细胞才能很好地生长。本试验发现,在原代培养时,先将组织块贴在底壁上,组织块带有少量培养液为宜,然后倒置在培养箱中 4 h 后加入培养液,一般培养 1 d 后有细胞长出。本试验要构建细胞系,样本含量小,而且组织块小,因此选择组织块贴壁培养较为合适。

3.2 成纤维细胞的性别鉴定

Sry 基因的表达决定了胚胎沿雄性方向分化,特异性扩增 *Sry* 基因的核心序列就可以对动物胚胎或细胞进行性别鉴定。本试验根据绵羊 *Sry* 基因同源序列设计的这对引物,通过一次扩增反应,能有效地扩增出雄性滩羊 *Sry* 基因的一段近 130 bp 特异性片段,由此可判断有 130 bp 扩增带的细胞系为雄性,而无此带的为雌性。这为转基因克隆动物研究中及早地转染目的基因,以及保存和扩增性别已知的胎儿成纤维细胞系提供了可靠的依据。

3.3 成纤维细胞的染色体分析

染色体数目及核型能鉴定细胞是否趋于稳定,以及在离体培养条件下细胞是否发生转化。在细胞培养过程中,由于培养条件的变化和其他不利因素的影响,细胞生物学性状可能发生变化。随着细胞培养时间的延长和传代次数的增加,不仅会导致细胞停止生长,甚至失掉二倍体性状,因此以资源保存为目的的细胞培养要保证二倍体的稳定性就显得尤为重要。本试验结果表明,滩羊胎儿成纤维细胞染色体数目为 $2n=54$,为稳定的二倍体细胞系,且没有随着传代次数的增加造成染色体的缺失,可以作为体细胞核移植的供体细胞。

3.4 成纤维细胞的脂质体转染

细胞转染技术目前被广泛应用于各种基因结构与功能以及基因调控等研究领域。本研究使用的 Lipofectamine LTX 是人工合成的阳离子脂质体,它和带负电荷的樱桃红荧光蛋白报告基因质粒 (pmCherry-N1) 结合后形成复合物,当复合物接近细胞膜时被内吞进入细胞质,随后 DNA 复合物被释放进入细胞核内。本试验结果表明,所建的滩羊胎儿成纤维细胞系的细胞转染效率较高,约为 50%,说明外源基因能在滩羊胎儿成纤维细胞内进行有效的复制、转录、翻译及正确翻译后修饰,且外源基因表达所需的一些调控元件也能在这种成纤维细胞中有效工作^[14]。转染后滩羊胎儿成纤维细胞染色体没有发生缺失情况,说明转染没有造成滩羊胎儿成纤维细胞遗传物质的改变,细胞可以满足供体细胞的要求。

[参考文献]

- [1] Wilmot I, Schnieke A E, McWhir J, et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells [J]. Nature, 1997, 385(6619): 810-813.
- [2] 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(5346): 2130-2133.
- [3] Baquisi A, Behboodi E, Melican D T, et al. Production of goats by somatic cell nuclear transfer [J]. Nat Biotechnol, 1999, 17: 456-461.
- [4] Onishi A, Iwamoto M, Akita T, et al. Pig cloned by microinjection of fetal fibroblast nuclei [J]. Science, 2000, 289(5482): 1188-1190.
- [5] 赵晓勇, 牛文智. 宁夏滩羊发展现状的分析与思考 [J]. 中国草食动物, 2008, 28(1): 50-51.
Zhao X Y, Niu W Z. Analysis of the status and development of Ningxia Tan sheep [J]. China Herbivores, 2008, 28(1): 50-51. (in Chinese)