

文章编号: 1000-0615(2001)05-0402-06

脂质体介导的鲫 CAB 细胞转化 及转化细胞的核移植

赵浩斌, 朱作言

(中国科学院水生生物研究所淡水生态与生物技术国家重点实验室, 湖北 武汉 430072)

摘要:采用脂质体法成功地使 *gfp* 基因转入鲫囊胚细胞株 CAB 细胞基因组, 获得了具有 G418 抗性的细胞。以转化细胞为供体, 银鲫卵为受体, 核移植得到了转基因的囊胚和原肠胚; 并发现 4℃ 处理细胞 24h 能显著改善核移植胚胎的发育。

关键词: 鲫; 转化; 核移植; 转基因鱼; 脂质体介导

中图分类号: Q813; S917 文献标识码: A

Lipofection of cells of CAB strain of *Carassius auratus* and nuclear transplantation of transformed cells

ZHAO Hao-bin, ZHU Zuo-yan

(State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, CAS, Wuhan 430072, China)

Abstract: The *gfp* gene constructs were successfully introduced into cells of CAB strain of crucian carp (*Carassius auratus*) by lipofection, and the cells with antagonism to G418 were obtained. Transgenic fish embryos at blastula and gastrula stage were acquired from *gfp* or *hGH* transformed cells by nuclear transfer using eggs of silver crucian carp (*Carassius auratus gibelio* Bloch) as recipients, and the development of nuclear transfer embryos was better from cells incubated at 4℃ for 24h than that from freshly prepared cells. The results indicated that transgenic fish with stable integrated foreign gene might be got via nuclear transfer of transformed cells, and the efficiency of nuclear transfer could be affected by status of donor cells.

Key words: *Carassius auratus*; transformation; nuclear transplantation; transgenic fish; lipofection

细胞的基因转移是研究基因功能、基因表达和基因调控的主要手段,也是转基因动物研究的主要途径,培养细胞的基因转化、筛选及克隆是核移植方法纯合转基因鱼的前提。细胞基因转移的方法有脂质体介导、重组缺陷性病毒感染、显微注射、电脉冲介导、磷酸钙共沉淀法和 Polybrene 介导等多种途径。培养细胞基因转移的研究在哺乳动物进行得比较广泛,而鱼类细胞基因转移的研究较少,有一些学者进行了探索,沈孝宙等^[1]和李金花等^[2]用 DNA-磷酸钙共沉淀法分别使 pSV2-CAT 质粒和 pSV2-neo 质粒导入草鱼肾细胞株 CIK,李辉等^[3]和张义兵^[4]分别用 Polybrene 介导进行了鱼类细胞的人生长激素 (*hGH*) 基因转移,Zhang 等采用脂质体介导对鲢细胞进行了基因转移^[5]。

收稿日期: 2001-01-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39730290); 中国科学院院长基金资助

第一作者: 赵浩斌(1965-), 男, 陕西人, 副研究员, 博士, 主要从事生物技术研究。现工作单位: 湖北省农业科学院生物技术研究, 430064, E-mail: miniz@sohu.com。

脂质体介导具有操作简便、细胞毒性小等优点,绿色荧光蛋白(GFP)具有可直接观察、检测方便等优点,本研究以鲫囊胚细胞株 CAB 为对象、*gfp* 基因为报告基因,用脂质体介导法进行细胞基因转移;并以转化细胞为核供体,以银鲫 *Carassius auratus gibelio* Bloch 卵为受体,研究核移植获得转基因鱼的可能性。

1 材料和方法

1.1 细胞

细胞为鲫囊胚细胞株 CAB^[6],培养温度 28℃;普通培养基为 M199 + 15% 胎牛血清(FCS) + 25 mmol·L⁻¹ N-2-羟乙基哌嗪-N'-2-乙磺酸(HEPES),pH 7.0;普通培养基中添加 300μg·mL⁻¹ G418 即为选择培养基。

1.2 质粒

所用质粒有 XIG(含 *gfp* 基因)、ccMTeGFP(香港中文大学 K.M.Chan 教授惠赠)和 pCMVeGFP(本实验室构建)。线性质粒脱氧核糖核酸(DNA)溶于 TE 中,过滤除菌, -20℃ 保存。

1.3 脂质体转化的方法

选用宝灵曼公司的 DOTAP 转化试剂,在转化试验的前一天以 $(1 \sim 3) \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$ 的密度进行细胞接种。DNA 储存液用 HEPES 溶液(20mmol·L⁻¹, pH 7.4)稀释为 0.1μg·μL⁻¹, DOTAP 试剂根据 DNA 的量(4.5 ~ 5μg)按比例(1:3 或 1:6)用 HEPES 溶液稀释,分别混匀。把 DNA 溶液转入含 DOTAP 试剂的 HEPES 溶液,用吸管吹打、混匀,室温放置 15min。然后,把 DNA/DOTAP 混合液与培养基混匀(DNA/DOTAP 混合液量在培养基中应使 DOTAP 不超过 30μg·mL⁻¹)。更换细胞培养基为含 DNA/DOTAP 混合物的培养基,培养 6h,再更换为新鲜培养基。为获得稳定的转化细胞,在 24h 后再换以含 G418 的选择培养基,以后每隔 3 ~ 4d 更换一次选择培养基。

1.4 荧光的观察

细胞接种于含盖玻片的培养皿中,48h 后用磷酸缓冲液(PBS, pH7.0)清洗,用含 4% 多聚甲醛的 PBS 固定 4h,然后把盖玻片置于载玻片上,荧光显微镜下用兰色紫外光(480nm)激发,观察绿色荧光蛋白(GFP)的绿色荧光(510nm)。

1.5 核移植

采用脂质体转化的方法,把质粒 pCMVeGFP(*Xho*I 线性化)转入 CAB 细胞,短期培养,用于核移植。含有人生长激素基因(*hGH*)的质粒 pSMGH 转化的 CAB 细胞由水生生物研究所张义兵提供。供体细胞一部分直接使用,一部分在含 10% FCS 的 1640 培养基中 4℃ 保存 24h 后使用。

用银鲫成熟卵作为核移植的受体,经 0.25% 胰酶消化脱膜后,把分离的转化细胞核注入卵子动物极进行核移植,核移植胚胎在 Holtfreter 液中培育。

1.6 基因检测

制备培养细胞和核移植胚胎的 DNA,聚合酶链式反应(PCR)法检测 *hGH* 基因^[7]和 *gfp* 基因。

hGH 的 PCR 引物为 5'-AAGCGTCACCACGACT-3' 和 5'-AAAAGCCAGGAGCAG-3',分别位于 *MT* 启动子和 *hGH* 结构基因上,PCR 产物 450bp。

gfp 的 PCR 引物位于 *gfp* 结构基因上,正向引物为 5'-AGCAAGGGCGAGGAGCTGTT-3',反向引物为 5'-TCCATGCCGAGAGTGATCCC-3',产物长度 698bp。25μL 反应体积中模板 DNA 0.1μg,4 种 dNTP 各 50μmol·L⁻¹,引物各 20pmol, Taq 酶 1 单位。94℃ 预变性 2min;30 个循环扩增 DNA,每个循环 94℃ 30s,58℃ 30s,72℃ 1min;72℃ 保温 5min。0.8% 琼脂糖凝胶电泳,UVP GDS8000 凝胶成像系统检测。

1.7 统计分析

百分数的 t 检验^[8]。

2 结果与分析

2.1 稳定转化细胞的获取

用 XIG 质粒,以 DNA 和 DOTAP 试剂分别为 1:3 和 1:6 的比例,进行转化。转化后 24h,荧光显微镜观察,随机计数 1 000 个细胞中的发荧光细胞数,结果如图 1。1:6 的转化效率显著高于 1:3,分别为 5.0% 和 0.7%。*gfp* 在 CAB 细胞中的表达分布于整个细胞,而在核附近的表达较浓(图 1),与 Zhang 等观察的结果^[5]相似。

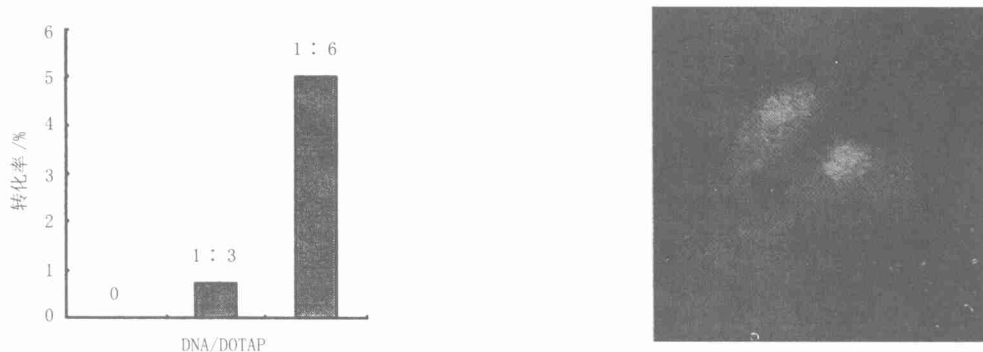


图 1 DNA/DOTAP 比例对转化效率的影响

Fig.1 The effects of DNA/DOTAP on transformation efficiency

注:右图示发出绿色荧光的细胞。

以 DNA:DOTAP 为 1:6,ccMTeGFP 转化 CAB 细胞。转化 24h 后进行选择培养,每隔 3~4d 更换 1 次选择培养基。1 周以后,在 G418 作用下,部分细胞开始死亡(图 2-a)。4 周后,对照组全部死亡,而转化细胞瓶中还有部分细胞存活(图 2-b)。8 周后细胞克隆长出,经原瓶消化传代,使其继续在选择培养基中生长,获取稳定转化的细胞。转化细胞基本保持上皮样(图 2-c),细胞核绝大多数为 1 个,呈圆形或椭圆形,说明基因转移后细胞形态没有发生变化。

转化细胞在选择培养基中传递 3 代后,提取 DNA 进行 PCR 检测,其结果如图 2-d。说明外源基因已成功地转入受体细胞,所获细胞为转化细胞。

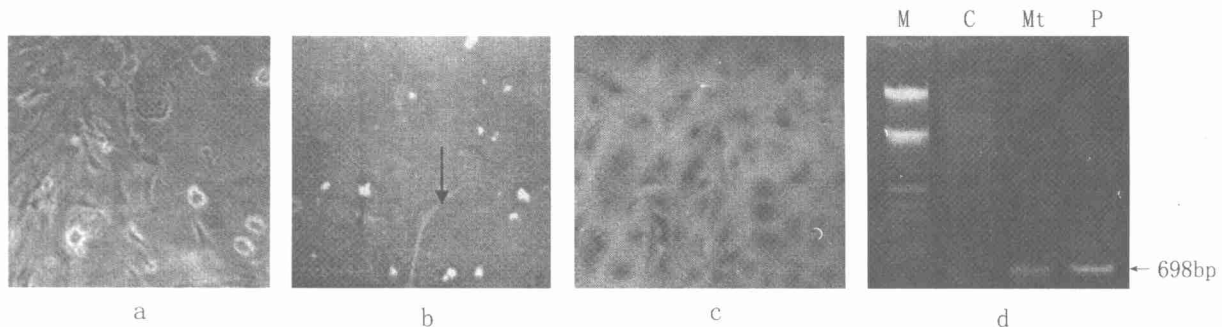


图 2 稳定转化细胞的获取

Fig.2 Acquisition of transformed cells in selection medium

注:a:1 周后;b:4 周后,箭头示存活细胞;c:转化细胞的形态;d:转化细胞的 PCR 检测结果。

M: λ DNA(EcoR I/Hind III), C:对照, Mt:转化细胞 DNA PCR 结果,P:质粒 ccMTeGFP 的 PCR 结果。

2.3 核移植及核移植胚胎中外源基因的存在

因为巨细胞病毒(CMV)启动子驱动的 *gfp* 基因表达较早,为了能够观察到通过核移植获得的绿色转基因胚胎,所以采用 pCMVeGFP 转化细胞。以 pCMVeGFP 转化后的短期培养细胞和 *hGH* 基因转移的 CAB 细胞为供体,核移植胚胎发育结果见表 1。

表 1 核移植胚胎的发育

Tab.1 Development of nuclear transferred embryos from transformed cells

供体细胞		移核总数	囊胚(%)	早期原肠胚(%)	晚期原肠胚(%)
质粒	处理				
pCMVeGFP	新鲜	321	132(41.12)	1(0.31)	0
pSMGH	新鲜	373	148(39.58) ^a	1(0.27) ^a	0 ^a
	4℃, 24h	305	168(55.08) ^b	15(4.92) ^b	4(1.31) ^b

注:a, b: $P < 0.01$ 。

分离的新鲜细胞做供体,移核胚胎仅有 0.27% ~ 0.31% 发育到原肠早期;而在 4℃ 培养 24h 的细胞为供体时,移核胚胎有 4.92% 发育到原肠早期,还有 1.31% 发育到原肠晚期;经 t 检验,不同温度处理的同种细胞核移植胚胎发育率差异极显著 ($P < 0.01$)。说明异倍化细胞核移植后可以再程序化而重新发育,但发育能力有限;冷处理可以改善细胞核移植后的胚胎发育。

核移植胚胎发育到囊胚期后,取部分胚胎,进行外源基因的 PCR 检测,其结果如表 2 和图 3。pCMVeGFP 转化细胞的核移植胚胎只有 7.5% 具有外源基因,与基因转化的比例 5% (图 1) 相当。长期选择培养的 pSMGH 转化细胞核移植后,发育的胚胎 100% 具有外源基因。

表 2 核移植胚胎外源基因检测结果

Tab.2 Foreign genes in nuclear transferred embryos from transformed cells

质粒	囊胚		原肠胚	
	检测数	阳性数(%)	检测数	阳性数(%)
pCMVeGFP	40	3(7.5)	1	0
pSMGH	40	40(100)	10	10(100)

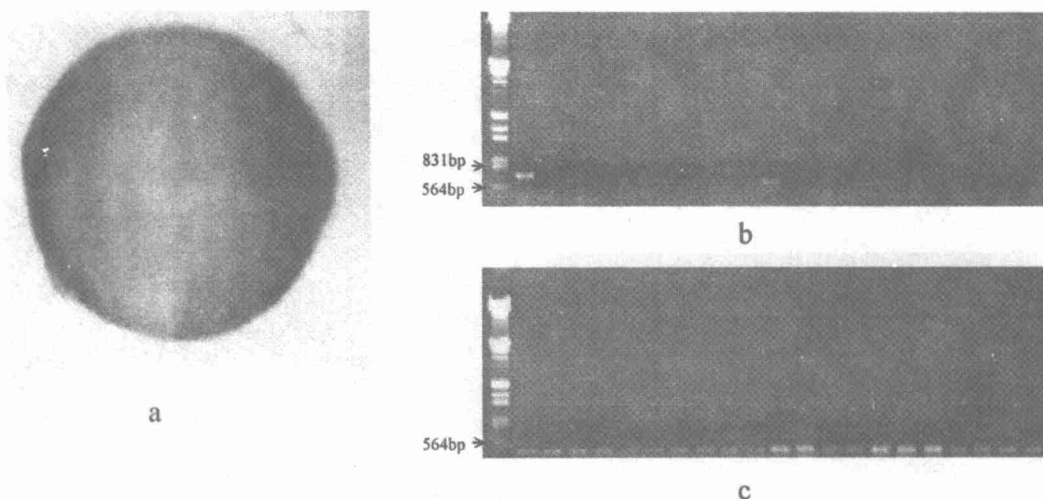


图 3 核移植胚胎中外源基因的 PCR 检测结果

Fig.3 PCR results of novel gene in nuclear transferred embryos from transformed cells

注:a:核移植获得的后期原肠胚;b:转 CMVeGFP 细胞核移植胚胎 *gfp* 基因的 PCR 结果,左面第一泳道为 λ DNA(EcoRI/HindIII),其余为样品;c:转 pSMGH 基因细胞核移植胚胎 *hGH* 基因 PCR 结果,左面第一泳道为 λ DNA(EcoRI/HindIII),其余为样品。

3 讨论

3.1 稳定整合的转基因鱼有望通过转化细胞的核移植获得

DOTAP 转化试剂是一种可以被机体降解的脂质体,培养基中血清的存在不影响其转化效率,而且操作简单,只需将其与 DNA 混匀放置一会即可形成 DNA 的包裹物。DNA 与 DOTAP 的比值对转化效率有较大的影响,结果发现 1:6 的效果较好,使转化率达到 5%;与 Zhang 等^[5]基因转移后,绿色荧光细胞占总数 1%~2%的结果相近。

在两栖类,Kroll 和 Gerhart 用脂质体介导转化爪蟾细胞 X-C,获得稳定转化的含 β -半乳糖苷酶基因和氯霉素乙酰转移酶(CAT)基因的 X-C 细胞,核移植得到了转基因的神经胚期和尾芽期胚胎^[9]。

在哺乳动物,Schnieke 等用新霉素抗性基因 *neo* 和人凝血因子 IX 构建体共转化绵羊胚胎成纤维细胞,核移植后,得到含有人凝血因子 IX 基因和 *neo* 基因的羊^[10]。

本研究首次进行了鱼类基因转化细胞的核移植,用 pSMGH 转化 CAB 细胞和脂质体转化法得到的 pCMVeGFP 转化 CAB 细胞进行核移植,得到了具有外源基因的转基因胚胎,说明在鱼类可以通过培养细胞转化、核移植的方法培育转基因鱼。由于得到的胚胎仅发育到原肠早期,无法观察 *gfp* 基因表达的绿色荧光。但经 PCR 检测,pCMVeGFP 转化细胞核移植胚胎中约 7.5% 含有外源基因,与细胞转化效率 5% 基本相当。说明 CMVeGFP 基因已成功地转移到细胞中,并通过核移植传递到核移植胚胎中。

在长期选择的压力下,外源基因稳定地存在于细胞基因组中。以 G418 长期筛选培养的 pSMGH 转化细胞为供体,核移植得到的胚胎 100% 具有外源基因,说明培养细胞转化后核移植有可能得到非嵌合型的转基因鱼。

由于试验时,仅得到 CAB 细胞,所以只能采用异倍化的 CAB 细胞作为基因转移和核移植的材料,致使难以获得完成胚胎发育的核移植鱼,仅获得原肠胚期的核移植胚胎,使基因表达的一致性难以观察、研究。今后,应采用培养早期的、染色体组成正常的细胞进行基因转移和核移植。

3.2 供体细胞状态对核移植胚胎发育有重要影响

细胞核移植成功的重要因素是保持移核胚胎的染色体组成与结构的正常、供体细胞核与卵细胞质在细胞周期上的协调。哺乳动物体细胞核移植研究表明以 G_0 期或 G_1 期细胞为供体最好。Wilmut 等^[11]用静止的乳腺细胞获得正常发育的绵羊,Cibelli 等采用 G_1 期胚胎成纤维细胞核移植得到转基因克隆牛^[12]。

细胞周期的同步化有多种方法,包括血清饥饿法、细胞分裂收获法、代谢抑制法和低温培养法。有报道人二倍体的皮肤成纤维细胞在 0℃ 时,微管解聚;温度恢复后,微管重新形成^[13]。-10℃ 1h 麻蝇 (*Sarcophaga crassipalpis*) 细胞周期扩增蛋白 (ScPCNA) mRNA 降低,ScPCNA 的减少使细胞处于静止状态。冷刺激去除后 1h,ScPCNA 的转录水平恢复正常^[14]。一种冷敏感的小鼠细胞 21-F 在 30℃ 时就进入静止状态^[15]。说明冷处理能使细胞微管系统改变、与分裂有关的蛋白因子减少,而使细胞分裂停滞,处于静止期。

本研究中,细胞在 4℃ 培养 24h,可能改变了 CAB 细胞的微管系统、改变了细胞中与分裂有关的因子的量、改变了细胞的生理生化状态,而使细胞周期同步化、处于静止状态(这还有待进一步研究)。因而核移植胚胎的发育率显著高于未处理的细胞,说明细胞核的周期时相对鱼类核移植胚胎发育有重要影响。

参考文献:

- [1] 沈孝宙,李辉,邱黎明,等. 哺乳动物病毒 SV40 早期启动子在鱼类细胞中具转录调节功能[J]. 科学通报,1990,35:381-382.
- [2] 李金花,魏彦章,朱作言. 抗新霉素基因对草鱼肾细胞的磷酸钙共沉淀转移[J]. 水生生物学报,1991,15(2):191-192.
- [3] 李辉,刘冬梅,剧冬红,等. 鲤鱼金属硫蛋白基因启动区功能的研究[J]. 动物学报,1997,43(2):197-202.

- [4] 张义兵. Polybrene 介导鱼类培养细胞基因转移的研究及转基因细胞株的建立[R]. 中国科学院水生生物研究所硕士论文, 1996.
- [5] Zhang Q, Tiersch T R, Cooper R K. Inducible expression of green fluorescent protein within channel catfish cells by a cecropin gene promoter[J]. *Gene*, 1998, 216:207-213.
- [6] 陈敏容, 陈宏溪, 易咏兰. 鲫鱼异倍体细胞系的建立及生物学特性[J]. *水产学报*, 1985, 9(2): 121-129.
- [7] 李国华, 崔宗斌, 朱作言, 等. 鱼类精子携带的外源基因导入[J]. *水生生物学报*, 1996, 20(3): 242-247.
- [8] 贵州农学院. 生物统计附试验设计[M]. 北京: 农业出版社, 1979. 43-74.
- [9] Kroll K L, Gerhart J C. Transgenic *X. laevis* embryos from eggs transplanted with nuclei of transfected cultured cells[J]. *Science*, 1994, 266: 650-653.
- [10] 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.
- [11] Wilmot I, Schnieke A E, McWhir J, et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells[J]. *Nature*, 1997, 385:810-813.
- [12] Cibelli J B, Stice S L, Golueke P J, et al. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts[J]. *Science*, 1998, 280: 1256-1258.
- [13] Ostlund R E Jr, Leung J T, Hajek S V. Regulation of microtubule assembly in cultured fibroblasts[J]. *J Cell Biol*, 1980, 85(2): 386-391.
- [14] Tammariello S P, Denlinger D L. Cloning and sequencing of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) from the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*, and its expression in response to cold shock and heat shock[J]. *Gene*, 1998, 215(2):425-429.
- [15] Laeng H, Harris D T, Schindler R. Proliferative quiescence of normal mast cells resembles that of cold-sensitive mutant mastocytoma cells: Dominant expression of the quiescent state in heterokaryons[J]. *Exp Cell Res*, 1985, 158(1):170-176.

欢迎订阅 2002 年《水生生物学报》

本刊是我国唯一的淡水生物学综合性学术刊物, 主要刊登淡水生物学的生态、生理、生化、遗传、病理、毒理和分类区系; 淡水生物的育种、培养、开发利用和病害防治; 淡水生态及环境的评价和治理; 淡水渔业生物学及有关湖沼科学研究等方面新成果的论文报道, 研究简报和综述评。

本刊为双月刊, 逢单月中旬出版, 国内外公开发行人。每期定价 9.00 元, 全年 6 期共 54 元, 邮发代号: 82-329。请新老订户及时到当地邮电局办理订阅手续。也可直接向编辑部办理邮购。

编辑部地址: 武汉市武昌珞珈山

邮政编码: 430072 电话: (027)87647701

E-mail: acta@ihb.ac.cn

更 正

本刊 2001 年第 25 卷, 第 4 期, 第 348 页第 4 行中, 第三作者孙文钦系孙雯钦之误(含目次页)。前经作者校对无误, 现第三作者提出更正。