

文章编号:1003-8701(2014)04-0050-04

# 猪胎儿成纤维细胞的分离与基因转染

于永生,曹 阳,罗晓彤,张立春,金海国,王晓阳\*

(吉林省农业科学院畜牧分院,吉林 公主岭 136100)

**摘 要:**为利用核移植法获取转基因克隆猪提供供体细胞,体外分离培养猪胎儿成纤维细胞并进行了绿色荧光蛋白基因转染。首先采用组织块贴壁法分离培养猪胎儿成纤维细胞,绿色荧光蛋白表达载体以脂质法介导转染猪胎儿成纤维细胞,通过 G418 筛选获得稳定转染的细胞克隆,PCR 鉴定外源基因在细胞基因组中的整合,利用荧光显微镜检测荧光蛋白的表达。结果表明,组织块贴壁后 9 d 可获取原代成纤维细胞,基因转染后利用 G418 筛选 9 d 即可获得转基因细胞,对转基因细胞进行传代,PCR 检测显示荧光蛋白基因整合到细胞基因组中,荧光显微镜下观察到绿色荧光蛋白表达,为下一步通过核移植方法获得转基因猪提供了基础。

**关键词:**猪胎儿成纤维细胞;绿色荧光蛋白;基因转染;脂质体

中图分类号:S828

文献标识码:A

## In vitro Culture of Porcine Fetal Fibroblast Cells and Gene Transfection

YU Yong-sheng, CAO Yang, Luo Xiao-tong,

ZHANG Li-chun, JIN Hai-guo, WANG Xiao-yang\*

(Branch of Animal Husbandry, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Gongzhuling 136100, China)

**Abstract:** In order to offer donor cells for porcine transgenic cloning by nuclear transferring, fibroblast cells were isolated by attaching tissue explants from porcine fetal. The plasmid containing green-fluorescent protein cDNA was transfected into porcine fetal fibroblast by Lipofectmine. Cell clones were obtained after screening by G418. The recombinant of extrogenous DNA was identified by polymerase chain reaction, the extrogenous DNA expression was identified by fluorescence microscope. Results showed that primary porcine fibroblast cells were isolated from the tissue cultured for 9 days, and the transgenic cells were obtained after G418 selection for 9 days. Identification of the transgene in the cell clones was examined by PCR and the exogenous DNA had been integrated into genome. The transgenic cell line could express green-fluorescent protein. These results have paved the way to obtain the new transgenic porcine by nuclear transfer in the future.

**Keywords:** Porcine fetal fibroblast; Green-fluorescent protein; Gene transfection; Lipofectmine

中国是世界上养猪规模最大的国家,但猪生产水平远低于欧美养猪发达国家<sup>[1]</sup>。短期内传统的育种手段很难在猪生产性能方面取得大的进展,转基因动物为猪遗传育种提供了新的技术手段,可大大加速遗传改良的速度,尤其是转基因体细胞核移植技术的出现,为转基因技术在猪改良育种

中的应用提供了技术支撑。绿色荧光蛋白(Green-fluorescent protein, GFP)cDNA 由 Prasher 等在维多利亚水母(Aequorea Victoria)中克隆获得<sup>[2]</sup>,该蛋白在一定波长的紫外光下呈现绿色荧光,可作为标记蛋白用于生物学研究,尤其是由于可直观表现表达效果,而在转基因动物研究领域广泛应用<sup>[3-6]</sup>。

表达 GFP 的转基因猪由 Park 等采用核移植方法在 2001 年获取<sup>[7]</sup>,随后韩国的 2 个实验室也分别获取了 GFP 转基因猪<sup>[8-9]</sup>。国内东北农业大学刘忠华研究团队于 2007 年也获得了国内首批 GFP 转基因猪<sup>[10]</sup>。

收稿日期:2014-06-14

基金项目:吉林省科技发展计划项目(20080566)

作者简介:于永生(1976-),男,博士,副研究员,从事动物生物技术研究。

通讯作者:王晓阳,男,副研究员,

E-mail: wangxiaoyang3005@163.com

本文利用组织块贴壁法获取猪胎儿成纤维细胞,通过脂质体介导的转基因技术获得了表达绿色荧光蛋白的转基因细胞,为建立利用核移植技术获取转基因猪的技术平台奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

怀孕 35 d 的大白猪来源于吉林省农业科学院畜牧分院种猪场,手术法采集子宫,置于 37℃ PBS 中,1 h 内运送至实验室;荧光蛋白真核表达质粒 pEGFP-C1 为本实验室保存。

### 1.2 猪胎儿成纤维细胞的分离培养

用灭菌剪刀剖开子宫,取出胎儿,利用添加抗生素的 37℃ PBS 洗涤至少 3 遍,置于无菌平皿中,去除头、四肢、内脏,将剩余的躯干转移到另外的灭菌安瓿瓶中,利用灭菌眼科剪将组织剪碎至糊状,将其涂布到细胞培养皿底部,置于 38℃、饱和湿度的 CO<sub>2</sub> 培养箱中放置 4 h 后,小心加入细胞培养液(DMEM+10%胎牛血清+1%双抗+1%非必需氨基酸),尽量避免组织块漂浮,继续以上述条件进行培养,每 72 h 换液一次,在第 9 d 左右成纤维样细胞开始从组织块孵出,利用 0.25% 的胰蛋白酶消化细胞,进行传代。

### 1.3 猪胎儿成纤维细胞生长曲线测定

用 0.25% 胰蛋白酶消化传至第三代的猪胎儿成纤维细胞,将细胞悬液与等量 0.5% 台盼蓝混合染色,利用细胞计数板进行活细胞计数,利用细胞培养液将活细胞浓度调整为  $2 \times 10^4$  个/mL,接种至 24 孔细胞培养板,每孔接种量为 0.5 mL,将细胞培养板置于 38℃、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度的 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。每 24 h 利用细胞计数板计数 3 个孔中的活细胞数目,计算平均活细胞数,利用 Excel 绘制生长曲线。

### 1.4 猪胎儿成纤维细胞最小致死浓度测定

将传至第三代的猪胎儿成纤维细胞按每孔接种  $2 \times 10^5$  细胞的量接种到 24 孔板的 6 个孔,24 h 后换液,分别用终浓度为 0、200、400、600、800、1000  $\mu$ g/mL 的 G418 进行处理,每 72 h 换液 1 次,培养 9 d 后所有细胞均凋亡的 G418 浓度,就是 G418 对猪胎儿成纤维细胞的最小致死浓度。

### 1.5 猪胎儿成纤维细胞的转染

将传至第三代的猪胎儿成纤维细胞接种至 6 孔板中,利用不添加双抗的细胞培养液进行培养,待生长至 80% 汇合时,按照脂质体 2000 说明书的方法进行基因转染,每孔用脂质体 10  $\mu$ L,质粒 4  $\mu$ g。转染 18 h 后利用含最小致死浓度的 G418

的细胞培养液进行筛选,每 72 h 换液一次。

### 1.6 转基因细胞的鉴定

筛选 9 d 后,利用荧光显微镜观察细胞是否具有荧光,同时利用 0.25% 胰蛋白酶消化部分细胞,蛋白酶 K(150  $\mu$ g/mL)消化后用两倍体积的无水乙醇(含 0.075M 的氯化钠)沉降 DNA,利用引物 P1 和 P2,PCR 检测外源基因的整合。引物序列如表 1 所示。

表 1 PCR 引物序列

引物	序列
P1	5'-ACCTTATGGGACTTTCTACTTGGC-3'
P2	5'-CTTGATGCCGTTCTTCTGCTTGT-3'

## 2 结果与分析

### 2.1 组织块法分离培养猪胎儿成纤维细胞

贴壁的组织块培养 3 d 后仅有少量成纤维细胞从组织块边缘游离出,接种 9 d 后,组织块周围即可长出大量成纤维细胞(图 1A)。利用胰蛋白酶传代,传代后的细胞呈梭形,生长旺盛(图 1B)。

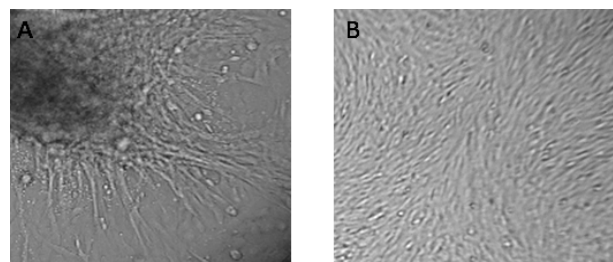


图 1 猪胚胎成纤维细胞分离培养  
(A)组织块贴壁培养 9 d;(B)传代后的成纤维细胞

### 2.2 细胞生长曲线的测定

每天对 24 孔板中的 3 个孔进行活细胞计数,绘制细胞生长曲线(图 2),可以发现细胞生长趋势为:细胞生长滞留期为 0~1 d,对数生长期为 2~4 d,5 d 后进入平台期。

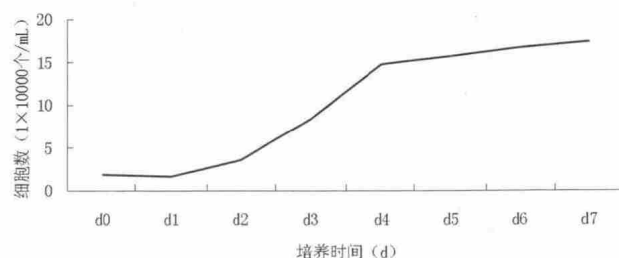


图 2 猪胎儿成纤维细胞生长曲线图

### 2.3 G418 对猪胎儿成纤维细胞最小致死浓度的确定

以 6 个不同浓度的 G418 处理猪胎儿成纤维细胞,观测细胞形态,发现 600  $\mu\text{g/mL}$  的 G418 处理 9 d 后可使猪胎儿成纤维细胞全部死亡,因此在筛选转基因细胞时采用的 G418 浓度为 600  $\mu\text{g/mL}$ 。

#### 2.4 转基因细胞的鉴定

对筛选得到的转基因细胞提取 DNA,利用 PCR 对外源基因的整合进行鉴定,结果显示,可检测到预期片段(图 3),说明外源基因有效整合到细胞基因组。

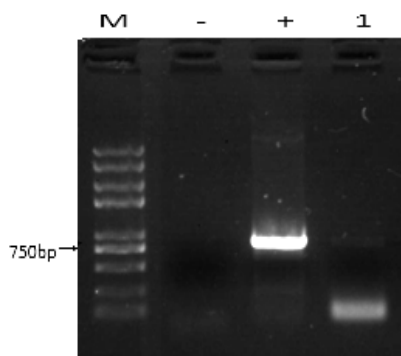


图 3 GFP 转基因细胞和克隆胚胎 DNA 检测结果

M:Marker 8000;-:阴性对照;+:质粒阳性对照;1:转基因细胞

在荧光显微镜下,可以看到筛选得到的细胞大多可表达绿色荧光蛋白(图 4),说明外源基因得到有效表达。

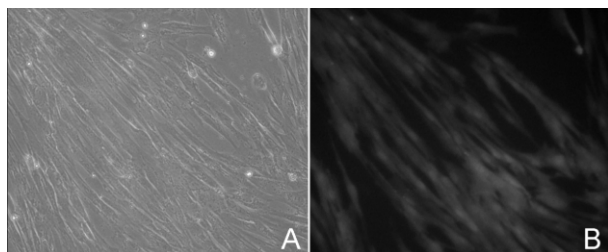


图 4 GFP 转基因猪成纤维细胞(200x)

A:光镜下照片;B:荧光镜下照片

### 3 讨论

目前猪胎儿成纤维细胞的分离主要采用两种方法:蛋白酶消化法和组织块法。前者是先用蛋白酶对组织块进行消化,经过筛网过滤后,细胞悬液接种到细胞培养皿(瓶),经过 3~5 d 培养获得原代细胞,该方法需要时间短,但蛋白酶消化程度不好把握,容易对分离的细胞增殖造成一定影响;后者是把组织剪碎后接种到培养皿(瓶)壁,当组织周围孵出的细胞形成单层时,消化这些单层细胞即可获得原代细胞,该方法获得的细胞增殖能力比较稳定,但需要的时间长。综合考虑利弊,本文

采用组织块贴壁法进行猪胎儿成纤维细胞的分离,通过 9 d 组织块贴壁培养,最终获得了形态正常的猪原代胎儿成纤维细胞。传至第三代,绘制的细胞生长曲线显示,接种第一天细胞处于恢复期,细胞数量有所下降,因为部分细胞死亡。从第二天开始细胞恢复旺盛的增殖分裂,进入对数生长期,5 d 后进入平台期,细胞铺满培养皿,随后由于细胞相互接触,生长受到抑制。该结果与李仕新等采用酶联检测仪测定 OD 值法绘制的蛋白酶消化法分离的猪胎儿成纤维细胞的生长曲线的实验结果不一致,该研究小组结果显示猪胎儿成纤维细胞于生长初期 1~6 d 呈对数增长,此后进入平台期,差异可能是由于细胞分离方法以及生长曲线绘制方法不同而造成<sup>[7]</sup>。猪胎儿成纤维细胞的分离为进一步的基因转染奠定了基础。

转基因细胞一般采用脂质体介导转染法、电击法、钙沉淀法、病毒介导法进行获取。电击法往往适用于所转移的片段比较大、细胞转染率低等情况;钙离子沉淀法需要对钙离子浓度进行精密控制,不易操作且实验重复性差;病毒介导法具有转基因效率高的特点,但考虑到安全性,往往在以获取转基因动物为目的的研究中应用不多;脂质体法主要利用带正电荷的阳离子脂质体与带负电荷的 DNA 片段结合,进而将 DNA 导入细胞膜脂质双分子层内,从而完成转基因,目前脂质体法已经在猪、牛、羊等动物细胞转基因方面得到应用。综合考虑上述的转基因方法,本项目采用脂质体介导的转基因技术进行基因导入,按脂质体 10  $\mu\text{L}$ : 荧光蛋白质粒 4  $\mu\text{g}$  的比例对六孔板中的细胞进行转染,由于荧光蛋白质粒上带有 neo 基因,一旦整合到细胞中,可表达 neo 蛋白,有效抵抗 G418 对细胞的危害,因此可用 G418 对转染后的细胞进行筛选,经过 600  $\mu\text{g/mL}$  的 G418 的筛选,最终得到转基因细胞,PCR 检测荧光蛋白基因得到有效整合,荧光检测显示,所获取的细胞大多可表达绿色荧光蛋白,说明外源基因得到有效表达,所得转基因细胞可以作为生产转绿色荧光蛋白猪的核移植供体细胞,为下一步通过核移植方法获得转基因“荧光猪”奠定了基础。

#### 参考文献:

- [1] 熊远著. 中国养猪业发展道路[J]. 中国猪业, 2006(4): 1-4.
- [2] Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, et al. Primary structure of the Aequorea victoria green-fluorescent protein [J]. Gene, 1992, 111(2): 229-233.
- [3] Takada T, Iida K, Awaji T. Selective production of transgenic

- mice using green fluorescent protein as a marker [J]. *Nat Biotechnol*, 1997, 15(5): 458-461.
- [4] Koo BC, Kwon MS, Roh JY, et al. Quantitative analysis of tetracycline-inducible expression of the green fluorescent protein gene in transgenic chickens [J]. *J Reprod Dev*, 2012, 58(6): 672-677.
- [5] Lin F, Liu Q, Li M, et al. Transient and stable GFP expression in germ cells by the vasa regulatory sequences from the red seabream (*Pagrus major*) [J]. *Int J Biol Sci*, 2012, 8(6): 882-890.
- [6] Murakami T, Kobayashi E. GFP-transgenic animals for in vivo imaging: rats, rabbits, and pigs [J]. *Methods Mol Biol*, 2012(872): 177-189.
- [7] Park K W, Cheong H T, Lai L, et al. Production of nuclear transfer-derived swine that express the enhanced green fluorescent protein [J]. *Anim Biotechnol*, 2001(12): 173-181.
- [8] Hyun S, Lee G, Kim D, et al. Production of nuclear transfer-derived piglets using porcine fetal fibroblasts transfected with the enhanced green fluorescent protein [J]. *Biol Reprod*, 2003(69): 1060-1068.
- [9] Lee G S, Kim H S, Hyun S H, et al. Production of transgenic cloned piglets from genetically transformed fetal fibroblasts selected by green fluorescent protein [J]. *Theriogenology*, 2005(63): 973-991.
- [10] 刘忠华, 宋军, 王振坤, 等. 体细胞核移植生产绿色荧光蛋白转基因猪 [J]. *科学通报*, 2008, 53(5): 556-560.
- [11] 李仕新, 陈松玲, 李加琪, 等. 长大二元杂交猪胎儿成纤维细胞的生物学特性 [J]. *四川农业大学学报*, 2012, 30(2): 220-225.
- [12] 李景芬, 于浩, 袁野, 等. 同源重组敲除 MSTN 基因的猪胎儿成纤维细胞的构建 [J]. *中国农业科学*, 2009, 42(8): 2972-2977.
- [13] 于永生, 罗晓彤, 张立春, 等. 牛胎儿成纤维细胞的分离培养及转染线虫  $\omega$ -3 脂肪酸去饱和酶基因 [J]. *中国农学通报*, 2011, 27(23): 12-16.
- [14] 王彦凤, 梁燕, 金永, 等. 克隆内蒙古白绒山羊胸腺素  $\beta$  4 基因并稳定转染胎儿成纤维细胞 [J]. *中国农业科学*, 2010, 43(21): 4497-4504.

(上接第 34 页)变化趋势,滴灌克瑞森葡萄花前氮、钾及有机质含量明显高于果实采收后,磷含量明显低于果实采收后;果实采收后各个施肥处理土壤肥力大部分高于花前。由此可见,土壤肥力是土壤特性的综合反映,不同的生长期对各种养分的需求程度也有很大差异<sup>[9-10]</sup>。由于土肥管理不一致,不同土层的土壤养分和理化性状有着很大的差异,应在了解土壤特性的基础上,科学合理补充养分、改良土壤<sup>[11]</sup>。随着采样土层深度的增加,氮、磷、钾及有机质含量整体呈减少的趋势,这与田间管理和营养成分的特性有关,如肥料补充多集中在 0~20 cm,磷和有机质的游离能力较差,相对集中在表层土壤,而氮和钾随着滴水会从表层土壤流失。因此,在补充养分时,应结合各养分的特点进行,如在施有机肥时,最好能深施基肥。

参考文献:

- [1] 苏学德, 李铭, 郭绍杰, 等. 干旱区戈壁地克瑞森无核“3414”肥料效应及推荐施肥量研究[J]. *中外葡萄与葡萄酒*, 2012(1): 32-35.
- [2] 张志勇. 规模化和农户葡萄园施肥与养分循环平衡的研究 [D]. 河北农业大学, 2004.
- [3] 朱小平, 刘微, 张京政, 等. 河北省昌黎县赤霞珠葡萄产区土壤养分及施肥状况分析[J]. *北方园艺*, 2007(1): 19-21.
- [4] 苏学德, 李铭, 郭绍杰, 等. 施肥处理对戈壁地滴灌克瑞森无核葡萄叶营养元素及产量的分析 [J]. *北方园艺*, 2011(18): 12-14.
- [5] 孙权, 陈茹, 王振平, 等. 宁夏贺兰山东麓酿酒葡萄高产栽培的土壤肥力问题与调控途径 [J]. *中外葡萄与葡萄酒*, 2009(9): 69-72.
- [6] 钱亚明, 吴伟民, 赵密珍, 等. 江苏 5 个葡萄试验示范基地土壤肥力状况调查分析[J]. *江苏农业科学*, 2013, 41(9): 145-146.
- [7] 王圣瑞, 马文奇, 徐文华, 等. 陕西省小麦施肥现状与评价研究[J]. *干旱地区农业研究*, 2003, 21(1): 31-37.
- [8] 张鹏, 刘瑞, 崔亚胜, 等. 施肥对陕西关中西部灌区小麦养分吸收及肥料利用率的影响 [J]. *西北农林科技大学学报 (自然科学版)*, 2011, 39(1): 166-170.
- [9] 张志勇, 马文奇. 酿酒葡萄“赤霞珠”养分累积动态及养分需求量的研究[J]. *园艺学报*, 2006, 33(3): 466-470.
- [10] 王泽, 盛建东, 陈波浪, 等. 氮磷钾配施对枣园肥力及红枣生长、产量的影响[J]. *土壤通报*, 2013, 44(3): 660-666.
- [11] 钱亚明, 吴伟民, 赵密珍, 等. 江苏 5 个葡萄试验示范基地土壤肥力状况调查分析[J]. *江苏农业科学*, 2013, 41(9): 145-146.