



一种高效转染西藏小型猪胚胎成纤维细胞的方法

刘 薇, 陈 燕, 岳 敏, 袁 进, 邱添武, 肖 东, 顾为望

(南方医科大学比较医学研究所实验动物中心, 广州 510515)

【摘要】 目的 应用 Nucleofector II 核转染仪将外源基因 EGFP 导入西藏小型猪胚胎成纤维细胞 (PEFs), 并与脂质体转染的方法进行比较, 寻求一种高效转染猪胚胎成纤维细胞的方法。**方法** 使用 Lonza 公司的 Nucleofector II 核转染仪, 参考已报道的转染程序与相应的转染试剂, 将绿色荧光蛋白 (GFP) 基因导入西藏小型猪 PEFs, 并与脂质体转染的方法进行对比研究, 比较两种方法的转染效率。**结果** 转染 5 h 后, 核转染仪组镜下即可见绿色荧光, 转染效率高达 80%, 远远高于脂质体转染的方法。**结论** 用 Nucleofector II 核转染仪能实现西藏小型猪 PEFs 的高效转染, 为高效制备转基因克隆西藏小型猪提供了可靠的方法。

【关键词】 西藏小型猪; 胚胎成纤维细胞; 转染; 核转染; 脂质体转染

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 03-0064-03

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.003.12

An efficient method which can be used to transfect Tibetan minipig embryonic fibroblasts

LIU Wei, CHEN Yan, YUE Min, YUAN Jin, QIU Tian-wu, XIAO Dong, GU Wei-wang

(Institute of Comparative Medicine & Laboratory Animal Center, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

【Abstract】 Objective To transfect EGFP gene to porcine embryonic fibroblasts (PEFs) of Tibetan miniature pigs by Lonza Nucleofector II machine and compare the transfection efficiency between this method and the lipofection method. **Method** A plasmid carrying green fluorescent protein (GFP) was transfected into PEFs of Tibetan miniature pigs via the Lonza Nucleofector II machine (program U020) and by Lipofectamine 2000. **Results** 5 hours after nucleofection, green fluorescence was observed, indicating 80% transfecting efficiency in the nucleofection group, which is significantly higher than the lipofection group. **Conclusion** Nucleofector II machine can efficiently transfect PEFs, provides a reliable method for efficiently generate transgenic Tibetan minipigs.

【Key words】 Tibetan miniature pigs; Embryonic fibroblasts; Transfection; Nucleofection; Lipofection

小型猪因其体型大小、解剖结构、代谢特点、生理生化等方面与人有较大的相似性, 近年来越来越广泛地被用于生物医学研究, 而各种转基因猪更大扩展了小型猪在生物医学研究中的应用范围。

西藏小型猪是本单位 2004 年由西藏自治区引种至广州培育而成的实验小型猪品种, 近年来, 应用其建立了数种转基因动物模型^[1-2]。

制备转基因克隆猪常用的猪胚胎成纤维细胞

【基金项目】 国家“973”项目(2011CBA01006); 国家自然科学基金项目(31271042); 国家科技部国际合作项目(2011DFA33290); 广东省科技计划项目(2013B060300013); 广东省科技基础条件建设项目(2012B061700099); 广东省科技计划项目(2012B011000004)。

【作者简介】 刘薇, 女, 博士生, 研究方向: 基于小型猪研发人类疾病动物模型。

【通讯作者】 肖东, 男, 博士, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 干细胞与发育生物学及人类疾病动物模型研发, E-mail: Xiao_d@hotmail.com; 顾为望, 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 实验动物学与比较医学, E-mail: Guwwl00@163.com。

(porcine embryonic fibroblasts, PEFs) 是取自猪 35 日龄胚胎的原代成纤维细胞, 将外源基因导入 PEFs 是制备转基因克隆猪的第一步^[3]。目前常用的将外源基因导入 PEFs 的方法有脂质体转染法与慢病毒介导的方法。但是脂质体法转染 PEFs 的转染效率很低, 通过较长时间的药物筛选才能获得少量的稳定表达转基因的细胞用于后期的核移植; 而慢病毒法能解决转染效率低的问题, 但是慢病毒生产存在一定的技术难度且操作较直接的质粒转染要复杂, 而且对于片段较大的质粒, 慢病毒感染的效率会下降。

Nucleofection 核转染技术是一种可以针对不同细胞类型, 选择最佳的转染程序与转染试剂的电转染技术, 利用这种方法可以高效转染难转染的细胞系和原代细胞(如神经元、免疫细胞、干细胞等)^[4], 且转染效率较高, 因其操作便利性与较高的转染效率, 目前已经有一些实验室将此技术应用到转基因克隆猪制备的上游工作(将目的基因转入 PEFs)。本实验室参照已报道的实验条件, 将此技术用于转染西藏小型猪 PEFs, 并比较其与传统脂质体转染方法在转染效率上的差别。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 核转染用试剂与仪器

核转染试剂: Human Dermal Fibroblasts Nucleofector Kit (VPD-1001) (包含 pmaxGFP 质粒) (德国 Lonza 公司); Nucleofector II 核转染仪(德国 Lonza 公司)。

1.1.2 主要试剂

胎牛血清、高糖 DMEM、非必需氨基酸、L-谷氨酰胺购自 Hyclone 公司、Lipofectamine™ 2000、Opti-MEM、青霉素-链霉素溶液、胰蛋白酶和 DMSO 等购自 Invitrogen 公司, 培养瓶及培养板等购自 Corning 公司。其余试剂为国产或进口化学纯或分析纯。

1.2 方法

1.2.1 借助 Nucleofector 核转染仪将 pmaxGFP 质粒转染入 PEFs

实验采用本实验室冻存的西藏小型猪 PEFs, 将冷冻保存的细胞复苏后传代 2 次, 胰酶消化收集细胞, 并计数, 用 VPI-1001 试剂盒中的核转染液重悬细胞 (Basic Nucleofector Solution + Supplement 4.5: 1), 按 10^6 细胞加 5 μg 的量加入 pmaxGFP 质粒, 将

混合液加入电转杯, 使用 U020 程序进行电转染, 完成电转染后, 尽快用吸管向电转杯中加入 500 μL 预热的培养基, 用吸管将细胞混合液转移到含足量预热培养液的培养瓶中, 放入 CO_2 培养箱培养一段时间后, 观察细胞的绿色荧光蛋白 (GFP) 表达情况。

1.2.2 借助脂质体将 pmaxGFP 质粒转染入 PEFs

同期培养的 PEFs, 按照 Invitrogen 推荐的实验方法, 按每六孔板一个孔加 2.1 μg 质粒, 5.4 μL 脂质体的量进行转染。

2 结果

核转染 5 h 后, 倒置荧光显微镜下可见 GFP 表达, 转染效率在 80% 以上, 转染 3 d 后可见绿色荧光强度明显升高, 转染效率也保持在 80% 以上 (彩插 11 图 1), 细胞生长迅速, 活力良好。经过传代培养, 发现转染 6 d 后, GFP 阳性的细胞明显减少 (50% 以下), 伴随荧光亮度减弱。转染 11 d 与 21 d 后, GFP 阳性的细胞进一步减少, 但直到第 21 天, 可以看到 P5 代细胞仍有少量细胞表达绿色荧光 (彩插 11 图 1)。说明通过核转染可以获得少量稳定整合外源基因的细胞; 而用脂质体转染的 PEFs, 在 12 h 才可看到 GFP 表达, 且转染效率很低 (彩插 11 图 2), 在传代培养至第 7 天时, 已经不可见绿色荧光。使用本实验中的核转染方法转染 PEFs, 所获得的转染效率明显高于脂质体法。

3 讨论

脂质体法只能介导外源基因的瞬时表达, 仅有非常少量的细胞稳定整合了外源基因, 需要通过新霉素 (NEO)、潮霉素 (HYG) 等抗性基因来筛选稳定整合的细胞, 而对于 PEFs 这种原代细胞来说, 本身脂质体转染的效率就很低 (10% 以下), 再加上长达一周的抗生素筛选, 使细胞活力大大下降, 用这种方法筛选稳定整合目的基因的细胞株耗时很长, 且获得转基因细胞的成功率低。

Lonza 公司研发的核转染技术是一种非病毒介导的新型转染技术, 该技术在传统电穿孔技术的基础上进行改良, 设计出包含针对不同类型细胞的优化转染程序和细胞特异性核转染试剂。核转染法就是采用对特定类型细胞配套的核转染试剂和转染程序, 直接把外源基因导入细胞核中, 以达到最佳转染效率。与脂质体法相比, Nucleofection 核转染的方法可以将质粒 DNA 直接转入细胞核内, 从而

大大增加了质粒 DNA 整合到宿主基因组的几率,因此能大大提高稳定整合的效率。

Nucleofector 核转染仪需要针对不同细胞制定最佳的转染试剂和转染程序,从生产厂家 Lonza 的网站上可以查到不断更新的用户更新的数据,包含近 1000 种细胞的转染试剂、转染程序、优化实验方法、转染效率、细胞活性等信息。但是对于 PEFs 我们在其网站没有查到相关信息。而国内崔茂盛^[5]、李松^[6]等分别对羊和牛的胚胎成纤维细胞进行了核转染,他们通过筛选多种转染程序发现针对羊胚胎成纤维细胞的最佳转染程序是 T016,获得的转染效率为 86%;针对牛胚胎成纤维细胞的最佳转染程序是 V013,获得的转染效率为 96%。国外 Maurisse 等^[7]发现,针对 PEFs 的最优转染程序为 U020(猪种未提及),获得的转染效率是 90%,他们使用的转染试剂是 Human Dermal Fibroblasts Nucleofector Kit (VPD-1001)。Nakayama 等^[8]转染 Claw 小型猪 PEFs 时对推荐的 10 个转染程序进行筛选得出最优程序 U023,获得了 79% 的转染效率,使用的转染试剂是 Basic Primary Fibroblasts Nucleofector Kit (VPI-1002)。本实验我们采用 Maurisse 的经验,使用 VPD-1001 转染试剂和 U020 程序,参考成纤维细胞的推荐实验方法对西藏小型猪 PEFs 进行核转染。

利用 Nucleofection 核转染技术转染西藏小型猪 PEFs 后,目的基因 GFP 能在 PEFs 中表达,获得了较高的转染效率,转染效率明显高于脂质体法转染 PEFs,且传代 21 d 后,仍有部分细胞表达 GFP,说明通过 Nucleofection 核转染能获得一定比例的稳定整合外源基因的细胞,预示可以通过此方法,再进行抗性筛选,获得稳定整合目的基因的细胞株,进而为制备转基因克隆猪提供核供体。

Nucleofection 核转染技术操作简单,转染时无需更换无血清培养基,细胞在进行转染 5 h 后即可看到荧光表达;而脂质体转染法,转染时需要更换无

血清培养基,转染后 4 ~ 8 h 需要换液,以去除其对细胞的毒性,且一般于 12 h 后才能看到荧光表达,可见,用核转染的方法,能大大减少实验操作,缩短实验周期,适合高通量的细胞转染实验。

综上所述,Nucleofection 核转染的方法具有很多脂质体法不可比拟的优点,是一种高效转染猪 PEFs 的方法,值得推广应用。

参考文献:

- [1] Deng W, Yang D, Zhao B, *et al.* Use of the 2A peptide for generation of multi-transgenic pigs through a single round of nuclear transfer[J]. *PLoS One*, 2011, 6(5): e19986.
- [2] Yang D, Wang CE, Zhao B, *et al.* Expression of Huntington's disease protein results in apoptotic neurons in the brains of cloned transgenic pigs[J]. *Hum Mol Genet*, 2010, 19(20): 3983 - 3994.
- [3] 刘薇,贾俊双,唐华,等. 慢病毒载体法制备遗传工程猴和小型猪的现状及应用前景展望[J]. *中国实验动物学报*, 2012, 05: 84 - 89.
- [4] Martinet W, Schrijvers D, Kockx M. Nucleofection as an efficient nonviral transfection method for human monocyte cells[J]. *Biochemical Lett*, 2003, 25(13): 1025 - 1029.
- [5] 崔茂盛,冯冲,张金龙,等. 不同体细胞类型和基因转染方式对绵羊克隆胚胎体外发育的影响[J]. *畜牧与兽医*, 2012, 44(1): 57 - 60.
- [6] 李松,丁方荣,戴蕴平,等. 不同转染方法转染牛体细胞效率的比较[J]. *农业生物技术学报*, 2011, 19(6): 1027 - 1033.
- [7] Maurisse R, De Semir D, Enamekhoo H, *et al.* Comparative transfection of DNA into primary and transformed mammalian cells from different lineages[J]. *BMC Biotechnology*, 2010, 10(1): 9.
- [8] Nakayama A, Sato M, Shinohara M, Matsubara S, *et al.* Efficient transfection of primarily cultured porcine embryonic fibroblasts using the amaxa nucleofection system TM[J]. *Cloning and Stem Cells*, 2007, 9(4): 523 - 534.

[修回日期] 2015-02-06