

成体兔转基因成纤维细胞的克隆分离 及其核移植研究*

张传山^{1,2)**} 郭毅^{1)**} 谷瑞环¹⁾ 李善刚¹⁾ 李峰¹⁾
王伟²⁾ 丁雷³⁾ 邢凤英¹⁾ 姚刚^{2)***} 陈学进^{1)***}

(¹⁾上海交通大学医学院实验动物科学部, 上海 200025; ²⁾新疆农业大学动物医学学院, 乌鲁木齐 830052;

³⁾东北林业大学野生动物资源学院, 哈尔滨 150040)

摘要 哺乳动物体细胞核移植及其与转基因技术的结合为转基因动物的研究提供了新的思路和方法。然而, 单个转基因细胞克隆的分离培养一直比较困难, 很大程度上限制了转基因动物的研制。将 pRNAT-U6.1/Neo 质粒转染成体兔成纤维细胞, 通过 24 孔细胞培养板分离培养法获得来源于单个转基因成纤维细胞克隆。由于单个成纤维细胞克隆在新鲜 DMEM 培养液中生长比较困难或缓慢, 采用由 DMEM/F12 制备的条件性培养液进行筛选。以转基因成纤维细胞为供体细胞进行核移植, 囊胚率为 23.5%, 与来源于成体兔正常成纤维细胞相比较差异不显著。并且利用 PCR 或多重 PCR 方法鉴定筛选的转基因细胞克隆及其核移植胚胎中整合的 Neo^R 基因和常染色体 β -actin DNA。为转基因哺乳动物细胞的分离培养和核移植胚胎的鉴定提供可靠的方法, 缩短了转基因动物的研制周期, 降低生产成本, 同时为进一步通过核移植技术获得转基因克隆兔提供了条件。

关键词 成体兔, 细胞分离, 多重 PCR, 核移植, 转基因检测

学科分类号 Q7

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00065

转基因技术在牛、羊、猪等家畜上的成功应用, 为培育基因组修饰动物、改良家畜品种、研制人类疾病模型、研究动物机体代谢和基因表达机制、制备生物反应器等提供了一种革命性的手段。显微注射是发展最早、应用比较广泛的生产转基因动物的技术, 但是该技术存在不足之处, 如外源基因整合效率低且具有随机性、成本高、生产周期长以及嵌合体的繁殖相对困难等^[1]。并且现在一般通过 PCR 方法来检测由显微注射制备的转基因胚胎^[2], 显微注射槽或游离质粒的影响也使该方法鉴定结果的假阳性率较高^[3,4]。

与显微注射技术相比, 哺乳动物体细胞核移植技术的出现, 不仅为研究胚胎早期发育提供模型, 同时为转基因动物的研制提供新的思路。核移植与转基因技术的结合进一步拓展了它的应用领域。以基因组被定点修饰的体细胞为供体细胞, 利用体细胞核移植技术可以获得基因敲除或敲入的动物, 获得动物的后代遗传背景一致, 保证转基因动物子代较高的阳性率, 提高了转基因动物生产的效率^[5,6]。然而, 转基因体细胞核移植技术也受到一些技术环

节的限制。如核移植之后胞质卵裂产生的一些非转基因胚胎可能被移植到受体动物, 转基因体细胞系的分离培养相对较难, 细胞的传代次数有限等。因此, 建立一种有效的转基因体细胞克隆分离的方法以及核移植转基因胚胎鉴定的方法成为提高转基因动物生产效率的关键。

本实验提供了一种快速分离培养来源于单个转基因成纤维细胞克隆的方法, 以及利用 PCR 方法鉴定核移植转基因胚胎的方法。以转基因成纤维细胞为供体细胞进行核移植, 获得发育到囊胚的转基因兔胚胎, 通过 PCR 方法鉴定单个转基因成体兔胚胎中整合的新霉素磷酸核糖转移酶基因(Neo^R)。

* 上海市科委基础研究重点项目(08JC1413900), 上海市科技兴农重点攻关项目(沪农科攻字(2006)第 5-3 号)和上海市重点学科建设项目(S30201)。

** 共同第一作者。

*** 通讯联系人。

陈学进. Tel: 021-63846590-776539, E-mail: chenxuej@yahoo.com.cn

姚刚. E-mail: yaogang516@163.com

收稿日期: 2009-02-03, 接受日期: 2009-04-07

转基因体细胞克隆分离培养方法和转基因核移植胚胎中外源基因检测技术的建立可有效地缩短转基因动物的研制周期,降低生产成本,减少了动物资源的浪费,同时为进一步通过核移植技术获得转基因克隆兔提供条件.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种、质粒. 大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 由新疆农业大学动物医学学院保存, pRNAT-U6.1/Neo 质粒购自 GenScript 公司.

1.1.2 主要试剂. PCR 试剂盒、DNA Marker 购自 TaKaRa 公司; Lipofectamine TM 2000、G418 购自 Invitrogen 公司; NP-40、蛋白酶 K 购自上海生工生物工程有限公司; DMEM-F12、胰蛋白酶购自 GIBCOL 公司; 胎牛血清购自 Hyclone 公司.

1.2 方法

1.2.1 细胞的培养和转染.

用无菌的眼科剪刀剪下一块(1 cm $\times$ 0.5 cm $\times$ 0.5 cm)新西兰公兔耳缘皮肤组织,迅速在超净台内依次用 75%乙醇,DMEM 冲洗组织块,然后加约 100 μ l DMEM,用眼科弯剪刀将组织块反复剪切,涂于 3.5 cm 培养皿底部,37 $^{\circ}$ C 放置 2 h 后加入含 20% FBS 的 DMEM,置培养箱内 37 $^{\circ}$ C, 5% CO $_2$, 100%湿度培养. 2 周后细胞长满培养皿,经过 4 次传代,生长的细胞形态基本是成体兔成纤维细胞状.

将成体兔成纤维细胞接种至 6 cm 培养皿中,当达到 70%汇合度时,按 Lipofectamine TM 2000 试剂说明书,将 8 μ g 环状质粒 pRNAT-U6.1/Neo 及其 *Sca* I 酶切线性化质粒 pRNAT-U6.1/Neo 分别与 Lipofectamine TM 2000 试剂混合,转染成体兔成纤维细胞. 转染 12 h 后,0.05% 胰酶消化接种至 24 孔板,在含有 20% 胎牛血清的 DMEM-F12 培养液中培养,当达到 90%汇合度时,用含有 800 mg/L G418 的 DMEM-F12 培养液持续筛选 1 周. 待长出细胞克隆后,消化细胞克隆,用新鲜 DMEM-F12 培养液或条件性培养液稀释至 1 000 个 /ml,接种至 24 孔板中继续扩大培养,并维持 300 mg/L 的 G418 条件.

条件性培养液的制备方法:当成体兔成纤维细胞接种在 75 cm 2 培养瓶中达到 80% 汇合度时,换成新鲜培养液(DMEM-F12+15%FBS)继续培养 35 h 后收集,4 000 r/min 离心 5 min,完全上清与新鲜

培养液按不同比例混合即为条件性培养液. 由于质粒 pRNAT-U6.1/Neo 带有绿色荧光蛋白基因(cGFP),可以通过倒置显微镜和荧光显微镜跟踪观察细胞的生长状态、转染效率及外源基因的整合情况.

1.2.2 细胞克隆的分离培养. 采用两种方法进行转基因成纤维细胞系的分离培养. 第一种方法是当长出细胞克隆后,消化细胞克隆,与非转基因成体兔成纤维细胞按 1:1 比例混合传代至 24 孔板中,目的是增加细胞的密度,待细胞长满,消化传代至 6 孔板中,培养至 80% 汇合度,继续用含有 800 mg/L G418 的 DMEM-F12 培养液持续筛选 2 周,目的是清除非转基因成纤维细胞. 第二种方法是长出细胞克隆后,消化细胞克隆传代至 24 孔板中,待细胞长满,传代至 6 孔板中继续扩大培养,并维持 300 mg/L 的 G418 条件.

1.2.3 基因组 DNA 抽提和外源基因 PCR 鉴定.

收集 6 cm 培养皿中扩大培养的细胞, PBS 洗涤 1 次,加抽提缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, 0.1 mol/L EDTA, 0.5% SDS, 20 mg/L 胰 RNA 酶),进行基因组提取. 100 ng 基因组 DNA 作为模板,进行 β -actin DNA 和外源基因 Neo R 的 PCR 扩增鉴定. PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 4 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 56 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 50 s, 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 7 min 延伸. 外源基因 Neo R 扩增的上游引物 5' GAGGCTATT-CGGCTATGACTG 3', 下游引物 5' TCGACAA-GACCGGCTTCCATC 3', 扩增片段大小 411 bp; β -actin DNA 扩增的上游引物 5' CACACGGTGC-CCATCTACG 3', 下游引物 5' GCCATCTCCTG-CTCGAAGTC 3', 扩增片段大小 204 bp.

收集单个处于囊胚期成体兔核移植胚胎, PBS 洗涤 2 次,转移至 PCR 管中,用 NP-40 或蛋白酶 K 进行裂解处理. NP-40 裂解方法是在上述 PCR 管中加入 9 μ l 1 $\times$ PCR 缓冲液, 1 μ l 10% NP-40, 放置 PCR 仪中进行 95 $^{\circ}$ C 1 min、4 $^{\circ}$ C 1 min, 5 次冻融处理. 蛋白酶 K 裂解方法是在上述 PCR 管中加入 9 μ l 1 $\times$ PCR 缓冲液, 1 μ l 20 g/L 蛋白酶 K, 放入 PCR 仪中 55 $^{\circ}$ C 30 min, 95 $^{\circ}$ C 5 min. 然后分别向以上含胚胎裂解液的 PCR 管中加入 10 μ l PCR 缓冲液(2 μ l 10 $\times$ PCR 缓冲液, 2 μ l dNTP, 引物各 1 μ l, 0.15 μ l r-Taq),按上述反应条件进行扩增. 多重 PCR 扩增按两步进行,第一步是利用 Neo R 上下游引物扩增 30 循环,第二步是取 2 μ l 上述扩增产物,加入包括 Neo R 和 β -actin DNA 两对上下游引物的 PCR 反应液中,再进行 30 循环扩增.

1.2.4 转基因兔成纤维细胞核移植.

实验操作参考文献[7], 选择不发情新西兰成年母兔颈部皮下注射 PMSG 100 U/只, 96 h 后耳缘静脉注射 HCG 100 U/只, 14 h 后耳缘静脉注射空气致死. 无菌取出输卵管, 用预热的 HRD 冲洗输卵管, 将卵丘-卵母细胞复合体移入含 100 U/ml 透明质酸酶的 HRD 中, 消化, 吹打复合体至颗粒细胞完全脱落.

以去除第一极体和细胞核的 M II 期卵母细胞做受体细胞, 经含 0.5% FBS 培养液饥饿 2~5 天的转基因体细胞和正常的体细胞做供体细胞分别进行核移植. 将核移植胚胎在融合液(0.3 mol/L 甘露醇溶液中添加 0.5 mmol/L 醋酸镁, 0.1 mmol/L 醋酸钙, 10 mmol/L Hepes, 1 g/L BSA) 3 000 V/cm 电击融合, 80 min 后对融合的重构胚进行激活处理(方法同融合), 然后移入 mRD(其中含有 5 mg/L CHX, 2 mmol/L 6-DMAP)中培养 1 h, 再移入 mRD 培养液继续培养 2 h, 最后移入含 2.5% FBS 的 B2

培养液培养. 同时观察重构胚中荧光表达情况.

2 结 果

2.1 条件性培养液对转基因细胞株生长的影响

转染成体兔成纤维细胞在含有 800 mg/L G418 的 DMEM-F12 培养液持续筛选 1 周, 待长出细胞克隆后, 共接种 4 个 24 孔板(共 96 孔), 其中 24 孔没接种细胞, 36 孔接种约 1000 个/ml, 36 孔接种约 2 000 个/ml(表 1). 包含细胞的 72 孔被分为 3 组, 每组 24 孔, 分别在新鲜培养液、50%条件培养液、100%条件培养液中培养. 经 2 周培养后, 在新鲜培养液中长出的细胞株为 1(0+1)个, 在 50%条件培养液中长出的细胞株为 3(1+2)个, 在 100%条件培养液中长出的细胞株为 6(2+4)个. 在 6 孔板扩大培养的过程中, 有 6 个细胞株生长状态良好. 结果显示, 条件性培养液对转基因细胞系生长的影响差异显著, 完全条件性培养液更适合转基因细胞株生长.

Table 1 Effect of conditioned culture medium on cell colony growth

Conditioned medium(%)	Empty	One thousand cells	Two thousand cells	Total No. of viable colonies/ No. of cell-containing wells
0	8	12(0)	12(1)	0/24 ^{a)}
50	8	12(1)	12(2)	2/24 ^{a, b)}
100	8	12(2)	12(4)	4/24 ^{b)}

The values in parentheses indicate the number of colonies selected for multiplication after 2 weeks in culture. Fresh medium: DMEM-F12+15% FBS; conditioned medium: fresh medium was conditioned by growing non-transfected fibroblasts in 75 cm² bottles at 37°C in 5% CO₂ until they reached 80% confluency, at which point the medium was replaced and conditioned for 35 h. The different letters on top of data show significantly different($P < 0.05$, χ^2 test).

2.2 起始细胞密度对转基因成纤维细胞分离培养的影响

持续筛选 1 周的转基因成纤维细胞长出克隆后, 共接种 2 个 24 孔板(共 48 孔), 其中第一组 24 孔接种约 1 000 个/ml, 第二组 24 孔接种约

2 000 个/ml(表 2), 第三组设置 10 孔非转基因成纤维细胞对照, 接种约 4 000 个/ml, 第四组设置 10 孔转基因和非转基因混合成纤维细胞, 接种约 4 000 个/ml(各占 50%), 目的是增加起始细胞的密度. 经 2 周完全条件性培养液培养后, 第一组共长

Table 2 Effect of initial cell density on transgenic fibroblast growth

Days in culture	No. of cells loaded into the well			
	One thousand cells	Two thousand cells	Control	Four thousand cells (50% transgenic+50% normal)
0	24	24	10	10
5	11	13	9	7
10	8	10	8	7
15	5	9	8	6
No. of colonies selected for multiplication/ initial No. of colonies seeded	5/24 ^{a)}	9/24 ^{a)}	8/10 ^{b)}	6/10 ^{b)}
No. of viable colonies after multiplication/ initial No. of colonies seeded	1/24 ^{a)}	6/24 ^{b)}	5/10 ^{b)}	4/10 ^{b)}

The final number of expanded colonies was recorded only after confluency in the 6-well culture plate (last row). The different letters on top of data show significantly different($P < 0.05$, χ^2 test).

出的细胞株为 5 个, 第二组共长出的细胞株为 9 个, 第三组共长出的细胞株为 8 个, 第四组共长出的细胞株为 6 个. 在 6 孔板扩大培养的过程中, 有 16 个细胞株生长状态良好. 结果显示起始细胞密度对转基因成纤维细胞分离培养的影响差异显著. 增大起始细胞筛选的密度, 有利于转基因成纤维细胞克隆的生长.

2.3 质粒线性化对转基因成纤维细胞株的影响

环状和线性化质粒 pRNAT-U6.1/Neo 转染成纤维细胞持续筛选 1 周, 待长出细胞克隆后, 共接种 3 个 24 孔板(共 72 孔), 其中第一组环状质粒接种 30 孔, 约 2 000 个 /ml, 第二组线性化质粒接种 30 孔, 约 2 000 个 /ml, 第三组设置 12 孔非转基因成纤维细胞对照, 接种约 4 000 个 /ml(表 3). 经 2 周完全条件性培养液培养后, 第一组共长出的细胞株为 3 个, 第二组共长出的细胞株为 6 个, 第三组共长出的细胞株为 5 个. 结果显示, 线性化质粒的整合效率相对较大, 但质粒是否线性化对转基因成纤维细胞株的影响差别不显著.

筛选的转基因成体兔成纤维细胞系在荧光显微镜下 GFP 的表达情况见图 1.

Table 3 Effect of linear-plasmid on cell colony growth

No. of cells loaded into the well	Circo-plasmid	Linear-plasmid	Control
Two thousand cells	30(4)	30(11)	
Four thousand cells			12(9)
Total No. of viable colonies/	3/30 ^{a)}	6/30 ^{a, b)}	5/12 ^{b)}
No. of cell-containing wells			

The values in parentheses indicate the number of colonies selected for multiplication after 2 weeks in culture. The different letters on top of data show significantly different($P < 0.05$, χ^2 test).

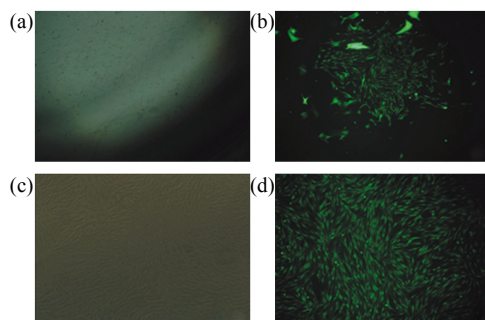


Fig. 1 Drug-resistant clones stably transfected with pRNAT-U6.1/Neo plasmids

(a) The transgenic fibroblast clones after G418 2w. (c) The transgenic fibroblast clones after serial subcultivation 3w. (b, d) The transgenic fibroblast clones showing cGFP expression. (a, c) Bright field microscopic image corresponding to (b, d). Original magnification 40x.

2.4 转基因成纤维细胞和核移植胚胎的转基因检测

收集 6 cm 培养皿中扩大培养的转基因成纤维细胞, 提取基因组 DNA, 取 100 ng 作为模板用于外源基因 Neo^R 的 PCR 鉴定(图 2). 结果显示, 单个转基因成纤维细胞株整合有外源基因 Neo^R, 而转基因和非转基因混合培养成纤维细胞株也有外源基因 Neo^R 的整合, 但有部分非转基因成纤维细胞的存在, 与荧光显微镜观察结果一致. 因此增加起始细胞密度有利于转基因成纤维细胞的分离培养, 但后期非转基因成纤维细胞的去除比较困难.

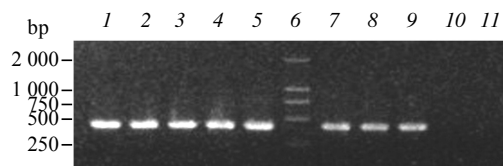


Fig. 2 Identification of transgenic rabbit fibroblast clones by PCR

1: pRNAT-U6.1/Neo plasmid; 2~5: Transgenic fibroblast clones; 6: DL2 000 bp marker; 7~9: Transgenic and normal fibroblast clones; 10: Normal fibroblast; 11: Negative.

我们也检测了两种不同胚胎裂解方法对 PCR 实验结果的影响(图 3). 结果显示两种方法获得的胚胎基因组 DNA 都适合于 PCR 扩增.

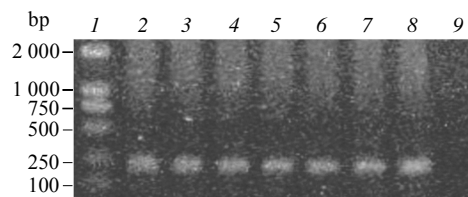


Fig. 3 Identification of a single transgenic embryo β -actin gene by PCR

1: DL2 000 bp marker; 2~4: Embryos disrupted with proteinase K(2 g/L); 5~7: Embryos disrupted with 1% NP-40; 8: DNA purified from cultured rabbit fibroblasts; 9: Negative.

选取 4 个非转基因核移植胚胎和 4 个转基因核移植胚胎, 裂解产物分别作为模板用于多重 PCR 扩增. 将第一步扩增产物进行电泳, 结果显示只有 2 个样品扩增出微弱转基因 Neo^R 条带(图略). 第二步取 2 μ l 上述扩增产物作为模板, 与 β -actin DNA 共同进行 PCR 扩增, 电泳结果显示, 所有核移植胚胎都扩增出目的 β -actin DNA 片段, 同时 4 个转基因核移植胚胎扩增出转基因 Neo^R 条带(图 4).

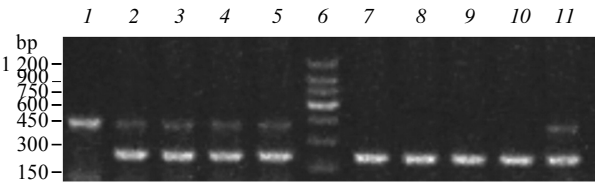


Fig. 4 Identification of a single transgenic embryo
 β -actin and Neo^R gene by multiplex-PCR

1: pRNAT-U6.1/Neo plasmid; 2~5: Embryos produced by NT of transgenic fibroblasts; 6: 150 bp marker; 7~10: Embryos produced by NT of non-transgenic fibroblasts; 11: DNA purified from cultured transgenic rabbit fibroblasts.

2.5 转基因兔成纤维细胞核移植

本实验核移植的供体细胞为正常兔成纤维细胞和转基因兔成纤维细胞。如图 5 所示，不同时期转基因核移植胚胎中有不同程度 cGFP 的表达。通过比较发现，正常兔成纤维细胞比转基因兔成纤维细胞有更好的融合率，但差异不显著($P > 0.05$)，正常兔成纤维细胞比转基因兔成纤维细胞的卵裂率高，并且差异显著($P < 0.05$)。转基因成纤维细胞来源的核移植囊胚率为 23.5%，正常兔成纤维细胞来源的核移植囊胚率为 30.8%，没有显著差异($P > 0.05$, 表 4)。

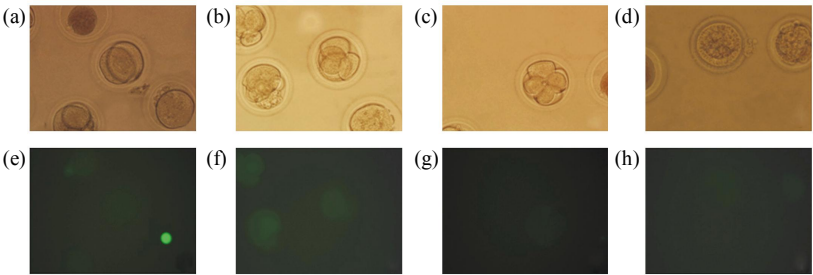


Fig. 5 The transgenic rabbit fibroblast cell cloned embryos by NT

(a, e) 2-cell NT embryos cultured *in vitro*. (b, f) 4-cell NT embryos cultured *in vitro*. (c, g) 8-cell NT embryos cultured *in vitro*. (d, h) Blastocysts of NT embryos cultured *in vitro*. (e~h) NT embryos green fluorescent image showing *cGFP* expression. (a~d) Bright field microscopic image corresponding to (e~h). Original magnification 400 $\times$.

Table 4 Pre-implantation stage development of nt-embryos resulting from donor cells from transgenic or non-transgenic fibroblasts

Donor cell type	NT oocytes	Fused oocytes(%)	Cleaved embryos(%)	Blastocysts(%)
cGFP	105	68(64.8)	35(51.5) ^{a)}	16(23.5)
Normal cell	96	65(67.7)	47(72.3) ^{b)}	20(30.8)

Normal cell-non-transgenic fibroblasts; cGFP-transgenic fibroblasts. The different letters on top of data show significantly different($P < 0.05$, χ^2 test).

3 讨 论

转基因动物的研究一直是国内外关注的热点，其在生物学、医学、畜牧业等领域具有广阔的应用前景。哺乳动物体细胞核移植同转基因技术的结合使转基因动物的研究进入了一个新的时代。此技术具有传统方法如原核注射法无法比拟的优势^[8~11]。然而，因转基因核移植胚胎移植率较低，孕期流产率及产期死亡率较高，导致核移植技术存在效率低，成本高等缺点^[6, 10]。

与非转基因胚胎相比，转基因胚胎流产率高可能因为转基因供体细胞在体外经历长时间的转染、筛选、分离培养以及多次的机械操作等过程对细胞产生不良影响。在胚胎发育期间，多次的机械操作

也可能阻止细胞内正确的基因表达模式^[12, 13]。因此，建立一种快速有效的转基因成纤维细胞克隆分离培养的方法将成为制备转基因核移植胚胎的基础。

本研究建立了一种转染、筛选、分离培养、鉴定转基因成体兔成纤维细胞及其转基因核移植胚胎外源基因的有效方法。虽然相关文献也介绍有关转基因体细胞分离培养技术，但缺少具体的技术细节。目前常用的转基因细胞克隆分离方法是利用细胞克隆环进行分离培养^[14]。但是，这种方法容易受到润滑油、陶瓷或不锈钢环操作的污染，不能同步进行多个克隆的操作，并且分离培养细胞克隆数目有限，导致核移植供体细胞数受到限制。我们利用的 24 孔细胞培养板分离培养法可以同步进行多个

转基因细胞克隆的分离培养. 经过 5~6 周筛选培养, 能够分离培养达到 10^7 个来源于单个转基因细胞克隆的成体兔成纤维细胞, 通过 PCR 鉴定, 这些转基因成纤维细胞都可以作为核移植供体细胞, 用于制备转基因核移植胚胎.

体外哺乳动物成纤维细胞的生长一般需要固体支持物、细胞因子以及生长因子等^[15]. 而成纤维细胞体外培养分泌和需要的生长因子主要包括表皮生长因子、血小板源性生长因子、基本成纤维细胞生长因子、转化生长因子和结缔组织生长因子^[16]. 为了提供这些因子, 我们利用正常兔成纤维细胞的培养制备了条件性培养液, 用于转基因成纤维细胞克隆的分离培养. 通过与非条件性培养液对照实验结果表明, 利用条件性培养液对转基因成纤维细胞的筛选效率比较高, 可能是因为条件性培养液包括正常成纤维细胞分泌的细胞因子. 另外, 通过增加转基因成纤维细胞的密度和线性化转染质粒, 有利于提高转基因成纤维细胞分离培养的效率. 前者可能因为细胞生长的密度依赖性, 后者可能因为线性化的基因片段更利于整合入细胞基因组. 最后, 我们用 DMEM/F12 培养液代替了 DMEM 培养液, 更有利于转基因成纤维细胞克隆的形成(数据略).

选择作为供体细胞的转基因成纤维细胞株和 4 个转基因囊胚, 通过 PCR 方法鉴定了 β -actin DNA 和外源基因 Neo^R 的整合情况. 对于囊胚的检测, 单次 PCR 扩增不能完全检测到外源基因 Neo^R, 这可能因为单个兔囊胚的细胞数较少. 因此, 为了增加检测的准确性, 我们利用了多重 PCR 进行扩增, 鉴定结果与所选择的转基因和非转基因囊胚完全一致. 同时, 实验中利用了绿色荧光蛋白 cGFP 作为报告基因, 有利于跟踪观察细胞的转染效率、外源基因的整合情况.

以获得的转基因兔成纤维细胞为供体细胞进行核移植, 证明转基因细胞支持克隆胚发育到囊胚, 囊胚率 23.5%. 研究中还发现, 转基因兔成纤维细胞来源的囊胚发育率比正常兔成纤维细胞要低, 并且有一定数量的转染细胞在进行核移植前已经老化. 其原因可能是细胞在转染过程中受到一定程度的损害, 或者转基因细胞的染色体核型因为外源基因的插入而发生了异常. 因此, 延长培养时间与体细胞转染后的长期筛选对细胞核移植有一定负影响^[17, 18].

以上转基因体细胞株分离培养方法和转基因核

移植胚胎中外源基因检测技术的建立, 提高了转基因动物生产的效率, 为进一步利用核移植技术获得转基因克隆兔提供条件.

参 考 文 献

- 1 Pursel V G, Pinkert C A, Miller K F, *et al.* Genetic engineering of livestock. *Science*, 1989, **244**(4910): 1281~1288
- 2 Horvat S, Medrano J F, Behboodi E, *et al.* Sexing and detection of gene construct in microinjected bovine blastocysts using the polymerase chain reaction. *Transgenic Res*, 1993, **2**(3): 134~140
- 3 Krisner R L, Gibbons J R, Canseco R S, *et al.* Influence of time of gene microinjection on development and DNA detection frequency in bovine embryos. *Transgenic Res*, 1994, **3**(4): 226~231
- 4 Page R L, Canseco R S, Russell C G, *et al.* Transgene detection during early murine embryonic development after pronuclear microinjection. *Transgenic Res*, 1995, **4**(1): 12~17
- 5 Polejaeva I A, Campbell K H. New advances in somatic cell nuclear transfer: application in transgenesis. *Theriogenology*, 2000, **53**(1): 117~126
- 6 Schnieke A, Kind A J, Ritchie W A, *et al.* Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science*, 1997, **278**(5346): 2130~2133
- 7 Li S, Chen X, Sheng H Z, *et al.* Rabbits generated from fibroblasts through nuclear transfer. *Reproduction*, 2006, **131**(6): 1085~1090
- 8 Bueler H, Fischer M, Lang Y, *et al.* Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface Prp Protein. *Nature*, 1992, **356**(6370): 577~582
- 9 Brink M F, Bishop M D, Pieper F R. Developing efficient strategies for the generation of transgenic cattle which produce biopharmaceuticals in milk. *Theriogenology*, 2000, **53**(1): 139~148
- 10 Stice S L, Robl J M, Ponce de Leon F A, *et al.* Cloning: new breakthroughs leading to commercial opportunities. *Theriogenology*, 1998, **49**(1): 129~138
- 11 Montoliu L. Gene transfer strategies in animal transgenesis. *Cloning Stem Cells*, 2002, **4**(1): 39~46
- 12 Bertolini M, Beam S W, Shim H, *et al.* Growth, development, and gene expression by *in vivo*- and *in vitro*-produced day 7 and 16 bovine embryos. *Mol Reprod Dev*, 2002, **63**(3): 318~328
- 13 Young L E, Fernandes K, McEvoy T G, *et al.* Epigenetic change in IGF2R is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture. *Nat Genet*, 2001, **27**(2): 153~154
- 14 Freshney R I. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*. New York: Wiley-Liss, NY, USA, 1994
- 15 Takehara K. Growth regulation of skin fibroblasts. *J Dermatol Sci*, 2000, **24**(1): S70~S77
- 16 Rubin J S, Osada H, Finch P W, *et al.* Purification and characterization of a newly identified growth factor specific for epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, **86**(3): 802~806
- 17 Zou X G, Wang Y G, Cheng Y, *et al.* Generation of cloned goats (*Capra hircus*) from transfected fetal fibroblast cell, the effect of donor cell cycle. *Mol Reprod Dev*, 2002, **61**(2): 164~172
- 18 Keefer C L, Ba Idassarre H, Keyson R, *et al.* Generation of Dwarf Goat (*Capra hircus*) clones following nuclear transfer with transfected and non-transfected fetal fibroblasts and *in vitro*-matured oocytes. *Biol Reproduction*, 2001, **64**(3): 849~856

Isolation of Transfected Adult Fibroblast Clones and SCNT Embryo Research*

ZHANG Chuan-Shan^{1,2)*}, GUO Yi^{1)*}, GU Rui-Huan¹⁾, LI Shan-Gang¹⁾, LI Feng¹⁾,
WANG Wei²⁾, DING Lei³⁾, XING Feng-Ying¹⁾, YAO Gang^{2)***}, CHEN Xue-Jin^{1)***}

¹⁾ Shanghai Jiao Tong University School of Medicine Department of Laboratory Animal Science, Shanghai 200025, China;

²⁾ College of Animal Medicine of Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China;

³⁾ College of Wildlife Resource of Northeast Forestry University, Harbin 120040, China)

Abstract Transgenesis in rabbit has provided numerous opportunities for livestock production. The development of nuclear transfer (NT) technology has improved the production of transgenic livestock by the combination of transgenic technology. However, the isolation of pure colonies from a single transfection event remains laborious and can be a constraint in the production of transgenic livestock. 24-well cell culture plates were used to isolate cell lineages obtained from a single fibroblast clone transfected with the pRNAT-U6.1/Neo plasmid. Since single fibroblast clone does not grow well in fresh medium, the use of conditioned medium was evaluated. Meanwhile, the effect of initial cell density and linear-plasmid on transgenic fibroblast colony growth were investigated. The increasing initial cell density and lining plasmid could improve colony growth and expansion. There was a significant difference in the conditioned medium or initial cell density compared to the control group. The neomycin phosphotransferase gene was detected in isolated colonies and NT embryos were produced from these cells. When the transgenic fibroblasts were used as donor cells of nuclear transfer, the blastocyst rate were 23.5%. There was not a significant difference in the transgenic fibroblasts compared to the normal group. PCR or Multiplex-PCR assays were performed to detect the transfected fragment as well as autosomal β -actin DNA in single NT embryos. This approach provided a reliable method for isolating transfected mammalian cells and for diagnosing the incorporation of desirable vectors in NT embryos. This method can reduce the time and cost of transgenic livestock production; further improvements in related technologies will facilitate the use of this method for the generation of the genetic engineering of rabbits.

Key words rabbit, cell isolation, multiplex-PCR, nuclear transfer, transgenic detection

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00065

*This work was supported by grants from Important Project of Basic Research for Science and Technology in Shanghai Government(08JC1413600), Agricultural Development by Science and Technology Program in Shanghai Government [(2006)5-3] and Shanghai Leading Academic Discipline Project(S30201).

**These authors contributed to this paper equally.

***Corresponding author.

CHEN Xue-Jin. Tel: 86-21-63846590-776539, E-mail: chenxuej@yachoo.com.cn

YAO Gang. E-mail: yaogang516@163.com

Received: February 3, 2009 Accepted: April 7, 2009