

LipofectamineTM 和 Fugene-6 介导 GFP 基因转染 绵羊胎儿成纤维细胞的比较研究

马玉珍^{1,2}, 王瑞², 闫真², 王利民², 刘东军², 夏国良¹

(1. 中国农业大学生物学院, 北京 100094;

2. 内蒙古大学哺乳动物繁殖生物学与生物技术教育部重点实验室, 呼和浩特 010021)

摘要: 分别用 LipofectamineTM 和 Fugene-6 介导质粒 pEGFP-C1 转染体外培养的绵羊胎儿成纤维细胞 (sheep fetal fibroblast cells, sFFCs), 比较了 DNA 浓度、转染试剂用量以及细胞暴露于 DNA、转染试剂中作用时间对转染效率的影响, 通过含 G418 的 DMEM/F12 培养液筛选得到转基因单克隆细胞。结果表明脂质体转染试剂 LipofectamineTM 转染效率优于 Fugene-6。另外, 对转基因细胞进行了染色体核型分析。结果表明, 转基因细胞中二倍体核型占 74.5%, 与对照组比较没有显著性差异。以上研究为其他基因转染 sFFCs 以及利用体细胞克隆法生产转基因绵羊提供了参考依据。

关键词: 绵羊胎儿成纤维细胞; 脂质体; 转基因; 染色体

中图分类号: Q813; Q959.842

文献标识码: A

文章编号: 1008-0864(2008)01-0108-05

Comparison Between Sheep Fetal Fibroblast Cells transfected with GFP by LipofectamineTM and by Fugene-6

MA Yu-zhen^{1,2}, WANG Rui², YAN Zhen², WANG Li-min²,
LIU Dong-jun², XIA Guo-liang¹

(1. College of Biological Science, China Agricultural University, Beijing 100094; 2. Key Laboratory of Mammal Reproductive Biology and Biotechnology, Ministry of Education, Inner Mongolia University, Huhhot 010021, China)

Abstract: Sheep fetal fibroblast cell were transfected with pEGFP-C1 by using LipofectamineTM or Fugene-6 substance respectively. The impacts of DNA concentration, concentration of transfection agents, exposure time and incubation time on transfection efficiency were carefully compared. The transfected cells were incubated in DMEM/F12 media containing G418. The results showed that the efficiency of transgenic with LipofectamineTM were excelled Fugene-6. Chromosome analysis shows no remarkable difference between transgenic and normal cells. LipofectamineTM transfection method developed in this paper can be easily adopted by most research labs and will provide a basic reference for transfection of sheep fetal fibroblast cells with other gene and transgenic nuclear transfer.

Key words: sheep fetal fibroblast cell; liposome; gene transfer; chromosome

自从 1997 年第一头转基因体细胞克隆绵羊诞生以来, 在转基因动物研究中, 将基因转染和筛选的步骤从个体水平提前到了细胞水平, 大大提高了转基因动物的生产效率。DNA 导入哺乳动物细胞的方法有病毒介导和非病毒介导两大类, 前者多采用逆转录病毒、腺病毒或腺相关病毒介导转染, 但是由于这些活病毒本身的危险性限制了该方法在基因转染中的广泛应用; 在非病毒介

导的基因转染系统中, 常用的转基因方法有磷酸钙沉淀法、电穿孔法和脂质体法^[1-4]。脂质体介导的细胞转染是通过脂质体 DNA 复合物与细胞融合而将 DNA 导入细胞的, 该方法具有高效、简便、对细胞损伤小和容易重复等优点, 因而在体内外细胞转染中成为首选工具, 但是其转染效率很大程度上取决于细胞类型及转基因参数的选择。近年来在转基因体细胞克隆动物研究中, 由胎儿

收稿日期: 2007-12-29; 修回日期: 2008-01-11

基金项目: 国家自然科学基金项目(30060059)和新疆建设兵团博士基金项目(05JC03)资助。

作者简介: 马玉珍, 副研究员, 博士, 主要从事动物生殖生物学和生物技术研究。Tel: 0471-4992443; E-mail: mayz@imnu.edu.cn

成纤维细胞提供核供体相继产生了转基因克隆山羊、绵羊、奶牛^[5-7], 以及基因定点修饰的绵羊^[8]和猪^[9-10], 因此, 胎儿成纤维细胞成为用于生产转基因克隆动物的首选体细胞系。由于基因转染及体外筛选对细胞在体外的传代次数和基因组的稳定性也有较高的要求, 在体外培养的过程中应尽快得到转基因细胞。为了获得成纤维细胞的最佳转染效率, 在将目的基因转入 sFFCs 之前, 我们以 EGFP 为报告基因进行细胞转染, 优化转染试剂 Lipofectamine™ 和 Fugene-6 转染 sFFCs 的多种参数, 旨在建立一种简便快速、高效低毒、重复性好的基因转移体系, 为其他基因转染绵羊胎儿成纤维细胞以及生产转基因绵羊提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 实验动物 30 d 左右绵羊胎儿来自内蒙古自治区呼和浩特市屠宰场。

1.1.2 酶和试剂 pEGFP-C1 质粒购自 Clontech 公司, DMEM 培养液、Lipofectamine™ 和 Fugene-6 购自 Gibco 公司, 胰蛋白酶、胎牛血清购自 Sigma 公司, 质粒提取和纯化试剂盒购自 Promega 公司, 小牛血清为本实验室自制。

1.2 实验方法

1.2.1 质粒 DNA 的提取与纯化 pEGFP-C1 质粒转化大肠杆菌 DH-5 α , 将转化菌扩大培养; 用试剂盒提取、纯化质粒, 方法参见 Promega 公司试剂盒说明书, 经电泳、紫外分光光度计确定质粒浓度、纯度后用于细胞转染。

1.2.2 绵羊胎儿成纤维细胞的培养 妊娠 30 d 左右绵羊胎儿, 除去头、四肢和内脏, 在含 10% FCS 的 DMEM 培养液中以小组织块法培养, 培养条件为 38.5℃、5% CO₂、饱和湿度。0.25% 的胰蛋白酶消化传代培养 2~3 代, 待细胞纯化为成纤维细胞后用于转基因研究。

1.2.3 Lipofectamine™ 和 Fugene-6 介导 pEGFP-C1 转染 sFFCs 条件的优化 在六孔板中培养 sFFCs 细胞, 细胞密度达 70%~80% 时进行基因转染。共分为三组, 一组为 pEGFP-C1 质粒 2 μ g, 分别与 2 μ L、4 μ L、6 μ L、8 μ L、10 μ L 和 12 μ L 的 Lipofectamine™ 或 Fugene-6 混合转染 sFFCs; 另一

组为 10 μ L Lipofectamine™ 或 6 μ L Fugene-6 与 0.5 μ g、1 μ g、2 μ g、3 μ g、5 μ g 和 7 μ g 的 pEGFP-C1 质粒转染 sFFCs, 培养 8 h 后, 换入含 10% FCS 的 DMEM 培养液, 同样条件下继续培养 48 h; 第三组为 10 μ L Lipofectamine™ 或 6 μ L Fugene-6 介导 2 μ g pEGFP-C1 质粒转染 sFFCs, 分别培养 4 h、8 h、12 h 和 16 h 后, 换入含 10% FCS 的 DMEM 培养液, 继续培养 48 h。

1.2.4 G418 抗性克隆的筛选及转染效率计算 0.25% 的胰蛋白酶消化转基因 sFFCs, 六孔板中每孔接种 2×10^3 细胞, 加入含 800 μ g \cdot mL⁻¹ G418 的 DMEM/F12 培养液, 常规培养, 每 3 d 更换培养液一次, 共筛选 14 d, 激光共聚焦显微镜下计数荧光单克隆个数, 计算转染效率。每组设 3 个复孔, 结果取其平均数, 各组间的差异显著性经 sscp 软件分析。

1.2.5 转基因细胞的染色体核型分析 通过秋水仙素培养使转基因单克隆细胞和对照组细胞终止于对数期, 经低渗、固定、滴片、Giemsa 染色、自然干燥后用树胶封片, 在光学显微镜下检片。选取染色体分散良好、长度适中、着丝粒和染色单体清晰的片子拍照, 随机抽取 100 个分散较好的中期相进行染色体计数, 并进行染色体核型分析。通过 sscp 软件分析二者的差异显著性。

2 结 果

2.1 G418 筛选荧光单克隆细胞

激光共聚焦显微镜观察转基因细胞, 转染 8 h 后, 可见细胞中出现弥散的微弱荧光, 发绿色荧光的细胞较少。转染 48 h 时荧光细胞数最多。激光共聚焦显微镜下观察到绿色荧光分布于细胞胞核和胞质, 且胞核含量多于胞质(图 1); 转基因 sFFCs 经含有 800 μ g \cdot mL⁻¹ G418 的 DMEM/F12 培养液筛选 6 d 时, 60%~70% 的细胞死亡, 继续培养 8 d, 形成单克隆细胞(图 2)。

2.2 DNA 量对转染效率的影响

如图 3 所示, 六孔板中, 不同浓度的 pEGFP 质粒 DNA 与 Lipofectamine™ 或 Fugene-6 转染 sFFCs, 筛选培养 12 d 后计算荧光单克隆细胞数。Lipofectamine™ 介导的转染效率明显优于 Fugene-6,

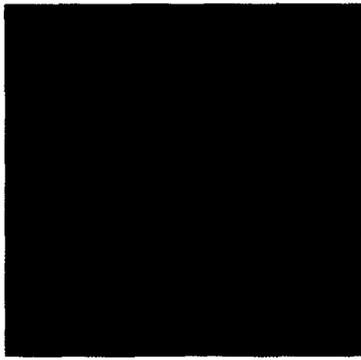


图1 激光共聚焦显微镜下观察转基因细胞(200 x)

Fig.1 Transgenic sFFCs were observed under the laser confocal microscope(200 x).

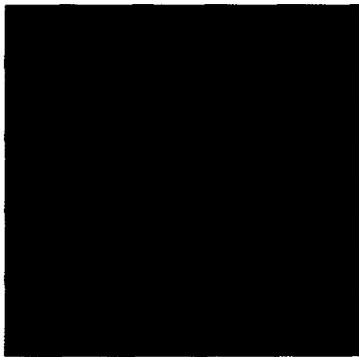


图2 激光共聚焦显微镜下观察转基因单克隆细胞(100 x)

Fig.2 Single cell clone of transgenic sFFCs were observed under the laser confocal microscope(100 x).

大约为 Fugene-6 转染效率的 2 倍。二者的转染效率均随着 DNA 量的增加而先增加后降低。DNA 量为 2 μg 时,转染效率最高,同一种转染试剂中,前四组间统计学分析没有显著性差异(P < 0.05),与后两组比较均有显著性差异(P > 0.05)。

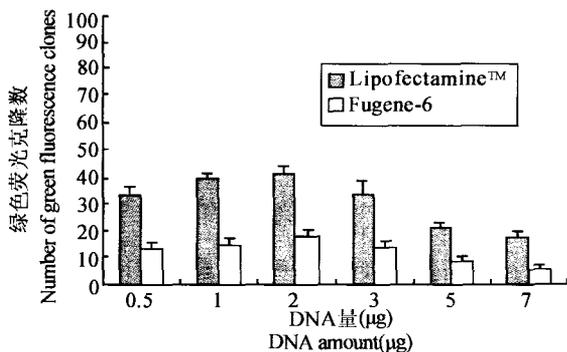


图3 不同剂量 DNA 转染 sFFCs 效率比较

Fig.3 Transfection efficiency of sFFCs with different DNA amount.

2.3 脂质体量对转染效率的影响

转染试剂的剂量影响转染效率,如图 4 所示, Lipofectamine™ 转染效率明显优于 Fugene-6, 10 μL Lipofectamine™ 及 6 μL Fugene-6 下转染效率最高。经统计学分析, Lipofectamine™ ≥ 6 μL 时各组间没有显著性差异(P < 0.05),与 2 μL, 4 μL 组比较均有显著性差异(P > 0.05)。Fugene-6 前四组间没有显著性差异(P < 0.05),与后两组比较均有显著性差异(P > 0.05)。

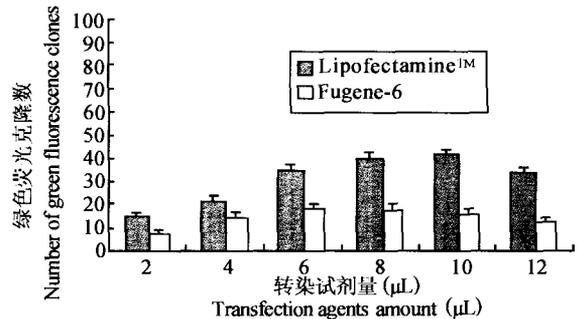


图4 不同剂量 Lipofectamine™ 和 Fugene-6 转染 sFFCs 效率比较

Fig.4 Transfection efficiency of sFFCs mediated by Lipofectamine™ and Fugene-6.

2.4 不同转染时间对转染效率的影响

为了优化细胞与 DNA、转染试剂共作用时间, 2 μg DNA 与 10 μL Lipofectamine™ 或 6 μL Fugene-6 共培养 4 h、8 h、12 h 和 16 h 后比较转染效率。结果如图 5 所示, Lipofectamine™ 与 DNA、细胞共培养 8 h 时转染效率最高, 延长转染时间, 转化率反而下降; Fugene-6 与 DNA、细胞共培养 12 h 时转染效率最高。Lipofectamine™ 对细胞的损伤较大。

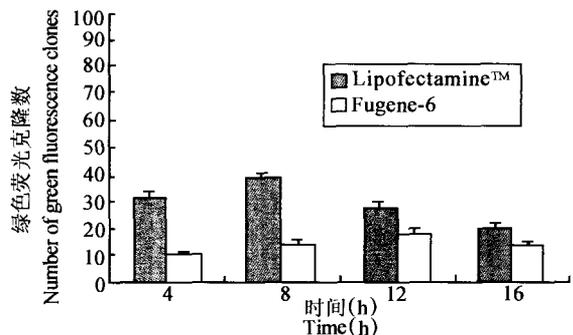


图5 DNA、转染试剂与细胞共培养时间对转染效率的影响

Fig.5 Transfection efficiency of sFFCs co-culture with DNA and transfection agents in different time.

2.5 转基因细胞染色体核型分析

对绵羊胎儿成纤维细胞染色体进行核型分析,结果见图 6。400x 倒置显微镜下观察,有 26 对常染色体,其中一对为性染色体,以短臂长度与体长之比计算着丝粒指数,总体可将其分为两组:1~3 号常染色体为大的中部着丝粒,4~26 号常染色体为端部着丝粒。在性染色体中,X 染色体为端着丝粒染色体,Y 染色体为最小的中部着丝

粒染色体。分别分析 200 个转基因荧光细胞和对照组细胞,转基因组正常核型为 149 个,占 74.5%;对照组正常核型为 162 个,占 81%;经 sscp 软件分析二者没有显著性差异($P > 0.05$)。荧光单克隆细胞染色体核型和着丝粒指数分析结果与对照组及相关资料相比无明显差别,表明其遗传学特性稳定,体外培养并没有造成染色体核型的不稳定,可为体细胞克隆提供供体核物质。



图 6 转染 EGFP 基因的绵羊胎儿成纤维细胞染色体核型(400x)

Fig. 6 Chromosome analysis of sFFCs transfected by EGFP gene (400x).

3 讨论

研究发现多种脂类可以在合适的条件下形成小的单层阳离子脂质体,这些脂质体的表面带有正电荷,能被 DNA 的磷酸根所吸附,同时也能被表面带负电荷的细胞膜吸附,通过细胞融合或胞吞作用使脂质体-DNA 复合物进入细胞质,最终进入细胞核并使外源基因整合到染色体中进行基因的表达。由于不同类型的细胞其吸收大小各异颗粒的能力不尽相同,针对不同类型的细胞株以及所介导的核酸(DNA、RNA 或核苷酸),选择合适的脂质体是十分重要的, Lipofectamine™ 是一种新型脂质体,其独特的精胺基团强正电子头部可以同时与带负电的 DNA 和细胞形成复合物,大大提高了转染效率基因; Lipofectamine™ 作为载体在体内外基因转染的研究中已有很多文献报道,但是对不同类型细胞转染效率基因差别较大。Fugene-6 是一种以脂质体为基础的多成分转染试剂,其介导的基因转染具有效率高、重复性好的特

点,国内胡义德等^[11]利用 Fugene-6 转染 4 个癌细胞系,取得 32.4%~56.6% 的转染效率。Uytter-spore 等^[12]研究发现, Fugene-6 对增殖缓慢、较难培养的原代细胞同样具有良好的转染效果,但是对于介导外源基因转染绵羊胎儿成纤维细胞的研究少见报道。本研究比较了以上二者的转染效率及优化条件,发现对于绵羊胎儿成纤维细胞, 10 μ L Lipofectamine™ 和 6 μ L Fugene-6 分别与 2 μ g 质粒与细胞共培养 8 h 时转染效率最高,而且 Lipofectamine™ 的转染效率优于 Fugene-6,这可能是 Lipofectamine™ 能结合较多的 DNA 而且形成的颗粒有利于绵羊胎儿成纤维细胞的吸收,然而过量的 DNA 或脂质体沉积于细胞表面,会对细胞造成毒性作用,从而影响转染效率,因此选择合适浓度的脂质体和适量的 DNA 十分必要。

体细胞介导转基因技术是克隆技术的成熟和完善,它为实验动物和家畜的遗传修饰和改造提供了一条新的途径。已有研究认为体外的长期培养及不同的培养方法,可能会导致培养细胞发生突变,克隆时会增加克隆胚胎发生异常的机

率^[13,14]。对于转基因体细胞克隆来说,从细胞的转染到阳性克隆的获得到提供核供体至少需要30~40 d(相当于10~15代),再加上原代细胞培养以及细胞的纯化,到转基因细胞核移植时,细胞在体外培养至少已经是18~20代,远比大多数体细胞核移植所用的供体细胞在体外的传代次数多。因此核移植前分析细胞核型十分必要。本研究对筛选出的绵羊转基因单克隆细胞核型分析表明,二倍体核型正常率在74.5%,正常对照组二倍体核型正常率为81%,二者没有显著性差异。说明筛选出的转基因绵羊胎儿成纤维细胞单克隆扩大培养后,能够满足转基因克隆操作对供体细胞的要求。

参 考 文 献

- [1] Kitamura T. New experimental approaches in retrovirus-mediated expression screening[J]. *Int. J. Hematol.*, 1998, 67(4): 351 - 359.
- [2] Canatella P J, Karr J F, Petros J A, *et al.*. Quantitative study of electroporation-mediated molecular uptake and cell viability[J]. *Biophys.*, 2001, 80(2): 755 - 764.
- [3] Madry H, Reszka R, Bohlender J, *et al.*. Efficacy of cationic liposome-mediated gene transfer to mesangial cells *in vitro* and *in vivo*[J]. *J. Mol. Med.*, 2001, 79(4): 184 - 189.
- [4] Pari G S, Keown W A. Experimental strategies in efficient transformation of mammalian cells: calcium phosphate and DE-AE dextran [J]. *Methods Mol. Biol.*, 1997, 62(1): 301 - 306.
- [5] 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.
- [6] Lan G C, Chang Z L, Luo M J, *et al.*. Production of cloned goats by nuclear transfer of cumulus cells and long-term cultured fetal fibroblast cells into abattoir-derived oocytes [J]. *Mol. Reprod. Dev.*, 2006, 73(7): 834 - 840.
- [7] 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.
- [8] McCreath K J, Howcroft J, Campbell K H, *et al.*. Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from culture somatic cells [J]. *Nature*, 2000, 405(6790): 1066 - 1069.
- [9] Lai L, Kolber S D, Park K W, *et al.*. Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning [J]. *Science*, 2002, 295(5557): 1089 - 1092.
- [10] Takahagi Y, Fujimura T, Miyagawa S, *et al.*. Production of alpha 1,3-galactosyltransferase gene knockout pigs expressing both human decay-accelerating factor and N-acetylglucosaminyltransferase III [J]. *Mol. Reprod. Dev.*, 2005, 71(3): 331 - 338.
- [11] Felgner P L, Gadek T R, Holm M, Roman R, *et al.*. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, 84(21): 7413 - 7417.
- [12] 胡义德, 高楠, 曹晓运, 等. Fugene-6, 一种介导体外真核细胞高效率基因转染的新方法 [J]. *免疫学杂志*, 2001, 17(2): 138 - 140.
- [13] Uyttersport N, Costagliola S, Miot F. A new tool for efficient transfection of dog and human thyrocytes in primary culture [J]. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 1998, 142(1,2): 35 - 39.
- [14] Polejaeva I A, Campbell K H S. New advances in somatic cell nuclear transfer: application in transgenesis [J]. *Theriogenology*, 2000, 53(1): 117 - 126.
- [15] Cibelli J B, Stice S L, Golueke P J, *et al.*. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts [J]. *Science*, 1998, 280(5367): 1256 - 1258.