

## 整合高拷贝数猪源转录因子的猪胎儿成纤维细胞系的建立

张曼玲, 陈 袁, 赵丽华, 李艳如, 金 永, 王俊政, 姜海滨, 陈俏羽, 李荣凤\*

(南京医科大学江苏省异种移植重点实验室, 江苏 南京 211166)

**[摘要]** 目的:对猪primed胚胎干细胞、囊胚内细胞团(inner cell mass, ICM)和胎儿成纤维细胞(porcine embryonic fibroblasts, PEF)转录组比较分析,在筛选出ICM中表达水平上调的5个转录因子(OCT4、TBX3、REX1、LIN28及DPPA5)的前期研究基础上,尝试构建具有2A肽(2A peptide)基因序列的转录因子重组表达载体,并与pEF1a-Tet3G质粒共转染PEF细胞,以期获得同时转入5个转录因子的单克隆细胞系,为讨论利用Tet-On 3G诱导表达系统并通过添加盐酸多西环素(doxycycline hyclate, DOX)激活转录因子表达,高效诱导形成猪诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPS)的相关研究奠定基础。方法:以PEF细胞cDNA为模板,利用PCR方法扩增获得猪源REX1、LIN28、DPPA5 3个转录因子,并将3个转录因子以E2A和T2A序列连接成三因子片段(RLD),最终将三因子片段及商业合成的OCT4和TBX3连接到改造后的诱导表达载体pTRE3G-Zs中,获得3个重组表达载体;利用核转染的方法,将3个重组诱导表达载体与表达反式激活蛋白的pEF1a-Tet3G质粒共转染PEF细胞,并通过药物筛选和鉴定获得单克隆转基因细胞系。结果:扩增获得带有2A肽序列的猪源转录本片段REX1 (975bp)、LIN28 (727bp) 和DPPA5 (408bp), 并获得2A肽序列连接成的三因子片段RLD, 最终构建了3个表达载体(pTRE3G-Zs-OCT4、pTRE3G-Zs-TBX3、pTRE3G-Zs-RLD),且经酶切鉴定证明载体连接正确;3个表达载体与pEF1a-Tet3G质粒核共转染PEF细胞后,经过药物筛选和外源基因鉴定,共获得同时转入五因子的单克隆细胞系70个,其中29个细胞系外源基因拷贝数较高。结论:成功建立了具有高拷贝数猪源OCT4、TBX3、REX1、LIN28、DPPA5 5个转录因子的单克隆转基因细胞系。

**[关键词]** 猪转录因子;2A肽基因序列;诱导表达载体;转基因细胞系;iPS细胞

**[中图分类号]** Q785

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2017)11-1377-08

**doi:**10.7655/NYDXBNS20171101

## Establishment of transgenic porcine fetal fibroblast cell lines with multi-copy of porcine transcriptional factors

Zhang Manling, Chen Yuan, Zhao Lihua, Li Yanru, Jin Yong, Wang Junzheng, Jiang Haibin, Chen Qiaoyu, Li Rongfeng\*

(Jiangsu Key Laboratory of Xenotransplantation, NJMU, Nanjing 211166, China)

**[Abstract]** **Objective:** Based on the comparison of transcriptional profiles between porcine primed embryonic stem cells(pESC), porcine inner cell mass(ICM) and porcine embryonic fibroblasts(PEF) in our previous study, five transcriptional factors(OCT4, TBX3, REX1, LIN28 and DPPA5) were selected due to their expressions were significantly higher in ICM than pESC and PEF. To establish porcine induced pluripotent stem (iPS) cell line, three expression vectors with five porcine transcriptional factors connected via 2A peptide gene sequence were constructed. The induced expression vectors and pEF1a-Tet3G were cotransfected into PEF followed by supplement with doxycycline hyclate to obtain more efficient pluripotent stem cell induction strategy. **Methods:** Firstly, the cDNA sequences of transcription factors REX1, LIN28, DPPA5 were cloned from PEF through PCR and linked together with E2A and T2A sequence (RLD). The cDNA sequences of transcription factors OCT4 and TBX3 were synthesized. Secondly, OCT4, TBX3 and RLD were transfected respectively into the TET-ON induced expression plasmid(pTRE3G-Zs), followed by plasmid extraction and restriction endonuclease digestion to verify the correct construction of three recombinant vectors. Finally, the transgenic cell lines were obtained via nucleofection of these three vectors and pEF1a-Tet3G, and were screened with G418. **Results:** 975bp REX1 sequence, 727bp LIN28 sequence and 408bp DPPA5 sequence were obtained by PCR. The correct construction of three recombinant vectors(pTRE3G-Zs-OCT4, pTRE3G-Zs-TBX3, and pTRE3G-Zs-RLD) was verified by restriction endonuclease. A total of 70 cell lines including 29 cell lines with multicopy of foreign genes were established by drug screening and PCR. **Conclusion:** We have established transgenic cell lines with

**[基金项目]**国家自然科学基金(31371487)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: lirongfeng@njmu.edu.cn

five porcine transcription factors (OCT4, TBX3, REX1, LIN28, and DPPA5) and pEF1a-Tet3G plasmid successfully.

[Key words] porcine transcriptional factor; 2A peptide gene sequence; induced expression vector; transgenic cell line; iPS cell

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(11):1377-1384]

诱导性多能干细胞 (induced pluripotent stem cells, iPS)是指通过将外源转录因子转入体细胞中,使外源基因表达量提高,进而诱导内源性基因表达上调,诱导重编程<sup>[1]</sup>,将成体细胞诱导形成类似 naive 胚胎干细胞的一种多能性细胞。所产生的细胞系无论在形态、传代方式、多能性因子的表达以及畸胎瘤实验分化成三胚层方面都与 naive 胚胎干细胞十分类似。iPS 细胞的出现为研究胚胎干细胞建系及信号通路等问题提供了良好的实验材料。

iPS 细胞最早由 Takahashi 和 Yamanaka<sup>[2-5]</sup>建立,通过从 24 个与多能性相关的转录因子中筛选,进而确定了 OCT4<sup>[6-7]</sup>、SOX2、KLF4、c-MYC 4 个转录因子(OSKM)。通过逆转录病毒等方法<sup>[2, 8-11]</sup>转入小鼠胚胎成纤维细胞(mouse embryonic fibroblast, MEF)中,使其重编程形成 iPS 细胞。该细胞无论是在形态或是生长特异性方面都与 naive 小鼠胚胎干细胞(mouse embryonic stem cell, mESC)十分类似,在进一步鉴定过程中发现,其在甲基化水平、X 染色体激活等方面都与胚胎干细胞完全一致。而后又培育出了大鼠 iPS 细胞<sup>[12-13]</sup>,同时猪 iPS 细胞也有了一定进展<sup>[14-16]</sup>,目前这项技术已十分成熟,iPS 细胞也已广泛应用于胚胎干细胞的研究及嵌合体的形成,为下一步进行异种移植打下基础<sup>[17]</sup>。

在 iPS 细胞研究中,OCT4 因其能够维持胚胎干细胞的自我更新能力和全能性,同时在细胞分化调控过程中起一定作用,一直作为 iPS 的首选且不可缺少的转录因子。利用 OSK+TBX3<sup>[18]</sup>四因子诱导所形成的 iPS 细胞具有与 OSKM 诱导形成的 iPS 细胞相同的基因表达谱,且 OSK+TBX3 较传统 OSKM 更易形成生殖系嵌合。LIN28 是一种小 RNA,在人和小鼠的胚胎干细胞中都有高表达。有研究表明,在小鼠胚胎干细胞中,LIN28 基因表达量上调能够有效加速增殖,而特异性敲除或下调则会引起细胞增殖能力下降<sup>[5]</sup>。此外,LIN28 对于细胞重编程具有一定调节作用,能提高重编程效率。REX1 和 DPPA5 也对细胞增殖起到一定作用。

目前大部分 iPS 细胞研究都是基于小鼠、大鼠和人,所利用的转录因子来源及组合也均局限于鼠和人,而代谢生理、基因组大小和个体大小等方面

与人类更为接近的猪 iPS 细胞研究却不多,对于真正适合猪 iPS 细胞研究的猪源转录因子筛选与组合的探索就更少了。本研究是在对猪 primed 胚胎干细胞、囊胚内细胞团(inner cell mass, ICM)和胎儿成纤维细胞(porcine embryonic fibroblasts,PEF)转录组分析前期研究的基础上<sup>[19]</sup>,测定不同转录因子 mRNA 水平的相对表达量,筛选出一组目的基因,其表达水平在 ICM 中均上调,并结合其生物学功能确定 5 个转录因子 (OCT4、TBX3、REX1、LIN28 和 DPPA5)。由于所选用的转录因子是猪源的,有效避免了种间转录因子表达沉默及蛋白构象差异导致的功能下降或丧失,同时猪源转录因子更适合猪 iPS 细胞的研究,使得猪 iPS 细胞的诱导更加高效。

2A 肽(2A peptide)是一种可自我剪切的短小肽链,最初在手足口病毒(foot-and-mouth disease virus, FMDV)中发现,平均长度为 18~22 个氨基酸,2A 肽可在蛋白翻译时通过核糖体跳跃从自身最后 2 个氨基酸 C 末端断裂<sup>[20]</sup>。这种 2A 肽介导的剪切广泛存在于所有真核动物细胞当中。2A 肽序列短小且前后基因表达具有均一的优点。利用 2A 肽较高的剪切效率及促使上下游基因平衡表达的能力,可以改进异源多聚蛋白(如细胞表面受体、细胞因子、免疫球蛋白等)的表达效率。由于 2A 肽独特的切割效率,使之成为本研究中构建含有多个目的基因表达载体的有效工具。

本研究通过商业购买 TET-ON 诱导表达载体质粒 pTRE3G-ZsGreen I 和 pEF1a-Tet3G,并对所购买 pTRE3G-ZsGreenI 质粒进行修饰;以 PEF 细胞 cDNA 为模板,合成或扩增猪源 OCT4、TBX3、REX1、LIN28、DPPA5 5 个转录因子,利用 PCR 方法,将 REX1、LIN28、DPPA5 以 E2A 和 T2A 序列连接成三因子片段,将商业构建的 OCT4 和 TBX3 以及自行构建的三因子片段分别连接到修饰后的诱导表达载体 pTRE3G-Zs 中,从而获得 3 个重组表达载体;通过核转染的方法,将 3 个重组表达载体与 pEF1a-Tet3G 质粒共转染 PEF 细胞,并在药物筛选条件下获得单克隆转基因细胞系,为下一步转基因细胞系在细胞培养时添加盐酸多西环素(doxycycline hyclate, DOX)诱导,使其形成 iPS 细胞的研究奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

PEF 细胞由本实验室制备;猪源 OCT4 和 TBX3 的 cDNA 序列由上海金斯瑞生物技术有限公司合成,并克隆于商业载体中,分别命名为 pUC57-pOCT4 和 pUC57-pTBX3; pTRE3G-ZsGreen I 和 pEF1a-Tet3G 质粒购自日本 TaKaRa 公司。

DMEM、FBS、DPBS、胰酶、青链霉素(Gibco 公司, 美国);RNAsio RNA 抽提试剂盒、DNA marker、HS 快速反应酶试剂盒、限制性内切酶、PMD18/19T 载体、T4 DNA 连接酶试剂盒(大连宝生物公司);Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega 公司, 美国)。CO<sub>2</sub> 培养箱(Thermo 公司, 美国),凝胶成像仪(BIO-RAD 公司, 美国),核转仪(Lonza 公司, 美国),荧光倒置显微镜(Nikon 公司, 日本),荧光定量 PCR 仪(罗氏公司, 美国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 表达载体的酶切鉴定和诱导表达功能鉴定

分别将含有 pTRE3G-ZsGreen I 质粒和 pEF1a-Tet3G 质粒的 DH5 $\alpha$  单菌落进行扩增培养,并使用质粒小提试剂盒,按照说明书分别提取 pTRE3G-ZsGreen I 质粒和 pEF1a-Tet3G 质粒;使用 BamH I、EcoR I、EcoR V、Hind III 限制性内切酶,按照说明书对提取的 pTRE3G-ZsGreen I 质粒进行酶切鉴定;使用 BamH I、EcoR V、Hind III 限制性内切酶对 pEF1a-Tet3G 质粒进行酶切鉴定。

将含有 pTRE3G-ZsGreen I 质粒和 pEF1a-Tet3G 质粒的 DH5 $\alpha$  菌株进行过夜培养,分别使用无内毒素质粒大提试剂盒提取两种质粒并测定质粒浓度。质粒经酶切线性化后,采用乙醇沉淀法回收质粒,存于-20℃备用。解冻第 1 代猪 PEF 于 1 个 10 cm 培养皿中进行培养(84%高糖 DMEM、15%FBS 及 1% Pen Strep),当细胞汇合度达到约 90%时,用 0.05%胰酶将细胞消化成单细胞,1 500 r/min 离心 5 min,弃上清后重悬,利用血球计数板进行计数,取 1 $\times$ 10<sup>6</sup> 个细胞离心,弃上清进行转染。按照试剂盒 Amaxa™ Basic Nucleofector™ Kit Primary Fibroblasts(Lonza 公司, 美国)中操作说明配制核转液,使用核转仪将线性化的 pTRE3G-ZsGreen I (2  $\mu$ g)和 pEF1a-Tet3G (3  $\mu$ g) 共同转入 PEF 中。转染后的细胞转移至 6 孔板的 2 个孔中,培养 24 h 后,将 1 孔细胞更换为含有 1  $\mu$ g/mL DOX 的完全培养基,另 1 孔仍为普通完全培养基,继续培养 2 d 后,于荧光倒置显微镜下观察细胞是

否有绿色荧光,并拍照记录。

#### 1.2.2 pTRE3G-ZsGreen I 表达载体的修饰改造

利用 EcoR V 限制性内切酶,按照说明书对提取的 pTRE3G-ZsGreen I 质粒进行酶切,琼脂糖凝胶电泳检测反应产物,确认酶切成功后,使用 Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System 试剂盒进行目的产物胶回收,具体步骤按说明书进行。胶回收产物用 T4 连接酶进行连接,16℃水浴过夜连接,连接产物转化 DH5 $\alpha$  感受态细菌后涂板,挑取单菌落于 LB 培养基中摇菌培养过夜后,进行菌落电泳,电泳结果正确的细菌进行保菌,命名为 pTRE3G-Zs 质粒。随后对获得的 pTRE3G-Zs 质粒进行限制性酶切鉴定。

#### 1.2.3 猪源目的基因片段的扩增和商业合成

猪 PEF 总 RNA 提取及 cDNA 的制备:解冻第 4 代大白猪 PEF,以 DMEM(含 15%FBS+1% 双抗)为培养基,于 10 cm 培养皿中培养;待 PEF 汇合度达到 90%后,用 0.05%胰酶消化,1 500 r/min 离心 5 min, PBS 洗涤 1 遍,转移到无酶处理的 1.5 mL EP 管中;使用 RNA 提取试剂盒 RNAsio Plus,按照说明书进行细胞总 RNA 提取;使用 Recombinant DNase I (RNasefree)试剂盒去除 DNA 干扰,按说明书进行操作;使用紫外分光光度计检测总 RNA 浓度及测定吸光度值,样品保存于-80℃备用。取准备好的猪 PEF 细胞总 RNA 做模板,使用 PrimeScript™ RT Reagent Kit,根据说明书进行反转录获得猪 cDNA。使用紫外分光光度计检测 cDNA 浓度及测定吸光度值,样品保存于-20℃备用。

REX1、LIN28 和 DPPA5 转录因子片段扩增:根据 GenBank 中猪转录组 REX1 (GenBank 登录号: XM\_001352187)、LIN28 (GenBank 登录号: NM\_001123133)、DPPA5 (GenBank 登录号: XM\_013992632)设计 3 对用于扩增猪 REX1、LIN28 和 DPPA5 基因 cDNA 序列的引物(具体引物序列见表 1)。为实现后续 2A 载体质粒的构建,在引物序列中加入了限制性内切酶识别位点(由斜体下划线部分表示)、2A 序列(由黑体下划线部分表示)以及 2A 重复序列(由黑体部分表示,引物序列由上海金斯瑞公司合成)。按照 TaKaRa HS 快速反应酶试剂盒说明书,以 PEF 细胞 cDNA 为模板分别进行 3 个基因的 PCR 扩增,PCR 反应总体积为 20  $\mu$ L,包括 HS 快速反应酶 0.2  $\mu$ L, Buffer I 2.0  $\mu$ L, dNTP mix 2.0  $\mu$ L, 上、下游引物各 1.0  $\mu$ L, 模板 cDNA 1.0  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 12.8  $\mu$ L。反应条件如下:95℃预变性 1 min; 95℃变性 5 s, 60℃退火 10 s, 72℃延伸 30 s, 共 35 个循

表 1 引物序列,退火温度及产物大小  
Table 1 Primer sequences, annealing temperature and product size

引物名称	引物序列	退火温度(°C)	产物大小(bp)
<i>Mlu</i> I -REX1-E2A	PMR5-CTTAA <u>CGCGT</u> ATGGACCAACAGCTGAAGAAAAGGGAAAAG PREA3- <b>TTTCAACATCGCCAGCGAGTTTCAACAAAGCGTAGTT</b> <b>AGTACATTGTCCGGATCCCTGATTTGTATTGGCCTTTGTATGAGT</b>	60	975
E2A-LIN28-T2A	PEAL5- <u>CTTTGTTGAAACTCGCTGGCGATGTTGAAAGTAACCCC</u> <b>GGTCCTATGGGCTCTGTGTCAAACCAGCAGT</b> PLTA3- <u>CTCCACGTCAACGCATGTTAGAAGACTTCCCTCTCGCCC</u> <b>TCATTCTGAGCCTCTGGGAGCATG</b>	60	727
T2A-DPPA5- <i>Nhe</i> I	PTAD5- <b>GGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAATC</b> <b>CCGGCCCTATGGGGAAGCTGCCACCGAAGCCGAATG</b> PDN3- <u>TTTGCTAGCTCACTTCATCGGAGGACATAGCTCAAGTG</u>	54	408

斜体下划线部分为插入限制性内切酶识别位点;黑体下划线部分为 2A 序列;黑体部分为 2A 重复序列。

环;72 °C延伸 2 min。琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,凝胶成像仪照相。并使用 Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System 试剂盒进行胶回收,具体步骤按说明书进行。按说明书操作分别将猪 REX1、LIN28 和 DPPA5 的 cDNA 片段胶回收产物与克隆载体 PMD18T-vector 混合 16 °C水浴过夜连接,连接产物转化 DH5α 感受态细菌后涂板,挑取单菌落于 LB 培养基中摇菌培养过夜后,进行菌落电泳后送测序。测序结果与 GenBank 中猪 3 个基因序列进行比对,比对结果正确的细菌进行保菌备用。

OCT4 和 TBX3 转录因子的商用合成:根据实验设计,猪源 OCT4 和 TBX3 片段(上下游序列加入限制性内切酶识别位点)由人工合成,合成后的 2 个质粒分别转化感受态细菌后挑单菌落后送测序,鉴定结果正确的菌株被命名为 pUC57-pOCT4 和 pUC57-pTBX3,分别进行保菌备用(合成片段均由上海金斯瑞公司提供)。

#### 1.2.4 猪源转录因子重组表达载体的构建

REX1、LIN28 和 DPPA5 三因子片段的连接:利用 overlap PCR,按照 TaKaRa HS快速反应酶试剂盒说明书,对带有 2A 肽序列的 REX1、LIN28、DPPA5 进行跨片段扩增:以 PEAL5 和 PDN3 为引物,E2A-LIN28-T2A和 T2A-DPPA5-*Nhe* I 为模板,实现 E2A 连接 LIN28 和 DPPA5,形成 E2A-LIN28-T2A-DPPA5-*Nhe* I 片段,以 PMR5 和 PDN3 为引物,*Mlu* I-REX1-E2A 和 E2A-LIN28-T2A-DPPA5-*Nhe* I 片段为模板,T2A 连接形成 *Mlu* I-REX1-E2A-LIN28-T2A-DPPA5-*Nhe* I,简称为 RLD 片段,所得 RLD 片段经琼脂糖凝胶电泳后,利用 Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System 试剂盒进行胶回收,具体步骤按说明书进行。分别将 RLD 片段胶回收产物按摩尔

比 4:1 的比例与克隆载体 PMD18T-vector 混合 16 °C水浴过夜连接,连接产物转化 DH5α 感受态细菌后涂板,挑取单菌落于 LB 培养基中摇菌培养过夜后,进行菌落电泳后送测序。测序结果正确的细菌被命名为 PMD18T-RLD,后进行保菌备用。

3 个重组表达载体的构建:利用质粒抽提试剂盒,分别提取质粒 pTRE3G-Zs、商业合成质粒 pUC57-pOCT4 和 pUC57-pTBX3、以及实验室构建的 3 个转录因子质粒 PMD18T-RLD;使用 *Mlu* I 限制性内切酶对上述 4 种质粒进行酶切,37 °C水浴过夜,0.7%琼脂糖凝胶电泳鉴定酶切结果后,对酶切产物进行乙醇沉淀和纯化;随后利用 *Nhe* I 限制性内切酶分别再次酶切 4 种线性化质粒,0.7%琼脂糖凝胶电泳进行目标片段的切胶回收,按胶回收试剂盒说明书对其进行纯化;纯化产物经紫外分光光度计测定浓度和吸光度值。按照 T4 连接酶说明书,连接构建重组基因表达载体,将酶切获得的猪 OCT4 序列、TBX3 序列、RLD 三因子序列分别连接到 pTRE3G-Zs 载体中;连接产物转入 DH5α 感受态细胞,并进行涂板培养;次日观察固体培养基上菌落生长情况,挑取形状规则饱满的单菌落,于 LB 液体培养基中摇菌扩培 12~16 h;菌落电泳,挑选目的菌落按照质粒小提试剂盒提取质粒;对所提取的质粒进行酶切鉴定,对鉴定正确的菌落进行保菌,分别命名为 pTRE3G-Zs-OCT4、pTRE3G-Zs-TBX3、pTRE3G-Zs-RLD,保存于 -80 °C 备用。

#### 1.2.5 猪源转录因子的转基因 PEF 系的建立

PEF 中转入质粒 pTRE3G-Zs-OCT4、pTRE3G-Zs-TBX3、pTRE3G-Zs-RLD 与表达反式激活蛋白的质粒 pEF1a-Tet3G:分别过夜培养含有 pTRE3G-Zs-OCT4、pTRE3G-Zs-TBX3、pTRE3G-Zs-RLD 与 pEF1a-Tet3G 质粒的大肠杆菌 100 mL,使用无内毒素质粒

大提试剂盒提取质粒并测定质粒浓度。限制性内切酶 *Xho* I 线性化质粒 pTRE3G-Zs-OCT4, 限制性内切酶 *Pvu* I 线性化质粒 pTRE3G-Zs-TBX3, pTRE3G-Zs-RLD 与 pEF1a-Tet3G, 并采用乙醇沉淀法回收线性化质粒, 存于 -20 °C 备用。解冻原代中华小型猪 PEF 于 1 个 60 mm 皿中, 24 h 后观察, 当细胞达到 80%~90% 汇合度时, 用 0.05% 胰酶消化成单细胞, 加入成纤维细胞培养液 (84% 高糖 DMEM、15% FBS 及 1% Pen Strep) 终止消化后, 1 500 r/min 离心 5 min, 弃上清, 并用 DPBS 洗 1 遍。按照试剂盒 Amaxa™ Basic Nucleofector™ Kit Primary Fibroblasts 中操作说明配制核转液, 使用核转仪将线性化的 pTRE3G-Zs-OCT4, pTRE3G-Zs-TBX3, pTRE3G-Zs-RLD (各 1.8 μg) 和 pEF1a-Tet3G (5.5 μg) 共同转入 PEF 中, 将核转染后的 PEF 培养于 DMEM 培养基 (含 15% FBS+1% 双抗)。

转基因细胞系的筛选与单细胞克隆的鉴定: 经核转染的 PEF 细胞, 培养 24~48 h 后向培养基中加入 1 mg/mL G418, 利用 pEF1a-Tet3G 质粒中的新霉素抗性基因 (Neo<sup>r</sup>), 筛选出具有抗药性的单克隆细胞株。随后利用细胞裂解液 NP40 分别裂解各细胞株, 通过 PCR 鉴定 OCT4、TBX3、REX1、LIN28、DPPA5 与 Tet3 是否同时转入细胞中, 引物序列、退火温度及产物大小如表 2 所示。

表 2 引物序列, 退火温度及产物大小

Table 2 Primer sequences, annealing temperature and product size

引物名称	引物序列 (5'→3')	退火温度 (°C)	产物大小 (bp)
Tet3	F-TTTTCTTCCATTTTCAGGTGTCGT R-TCCAGGGTTTCGTAAGTTTCTCT	62	474
OCT4	F-CAGTCAAAGCACGGTCTAACAAAA R-ACCTTCCCAAAGAGAACCCCAAAA	62	648
TBX3	F-CAACTTTCCGTACCACTTCTACC R-CTTTTTTATCCAGCCCAGAACACC	60	592
RLD	F-TTTCCGTACCACTTCTACCCTCG R-TTCTTGTTTTGCCCCCTTTTTCAT	60	506

## 2 结果

### 2.1 诱导表达载体的酶切位点鉴定与诱导表达功能鉴定

按照小提试剂盒说明书对所提取的 pTRE3G-ZsGreen I 和 pEF1a-Tet3G 质粒 (TET-ON 诱导表达载体, 图 1) 进行提取, 利用限制性内切酶 *Bam*H I、*Eco*R I、*Eco*R V、*Hind* III 对 pTRE3G-Zs-

Green I 质粒进行酶切鉴定, *Bam*H I 和 *Eco*R I 为单酶切, 获得 4 700 bp 原质粒全长的酶切片段, *Eco*R V 为双酶切, 获得 1 194 bp 和 3 506 bp 的酶切片段, *Hind* III 为双酶切, 获得 1 064 bp 和 3 636 bp 的酶切片段。利用限制性内切酶 *Bam*H I、*Eco*R I、*Hind* III 对 pEF1a-Tet3G 质粒进行酶切鉴定, *Eco*R I、*Hind* III 为单酶切, 获得 7 892 bp 的原质粒全长的酶切片段, *Bam*H I 为双酶切, 获得 2 691 bp 和 5 201 bp 的酶切片段。酶切结果与预期片段大小相一致, 说明商业购买的质粒与其所提供的载体信息相符, 可以进行下一步实验。

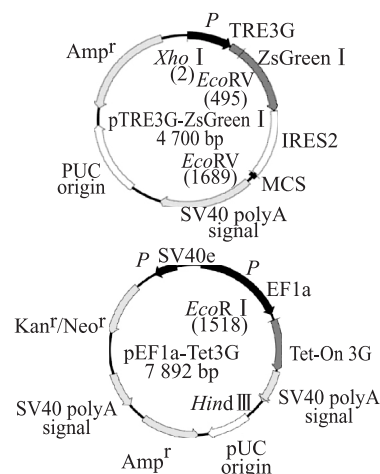


图 1 TET-ON 诱导表达载体

Figure 1 Expression plasmid induced by tet-on

利用核转染技术将 pTRE3G-ZsGreen I 和 pEF1a-Tet3G 诱导表达载体导入 PEF 细胞中, 同时以 LONZA 核转染试剂盒内附的绿色荧光蛋白质粒为阳性对照。核转染次日换液观察细胞情况, 阳性对照组转染 GFP 质粒的 PEF 细胞已有绿色荧光蛋白表达, 而实验组均未见荧光, 表明实验操作步骤正确无误。转染后第 2 天, 实验组中 1 孔以 1 mg/mL DOX 诱导 2 d, 另 1 组以常规培养基培养, 观察细胞情况并拍照记录 (图 2), 加入 DOX 诱导的实验组有部分细胞表达绿色荧光蛋白, 而未经 DOX 诱导的 PEF 细胞中未见荧光表达, 表明 pTRE3G-ZsGreen I 和 pEF1a-Tet3G 诱导表达系统有一定功能。

### 2.2 改造后表达载体 pTRE3G-Zs 的酶切鉴定

将经过酶切、连接和菌落电泳确定后的质粒命名为 pTRE3G-Zs 质粒, 按照小提试剂盒说明书对所提取的 pTRE3G-Zs 质粒进行提取, 利用限制性内切酶 *Eco*R I、*Eco*R V、*Hind* III 分别对其进行酶切鉴定, 获得 3 506 bp 的原质粒全长片段。酶切结果进一步确认 pTRE3G-Zs 质粒与预期改造形成的质粒完全相同 (图 3)。

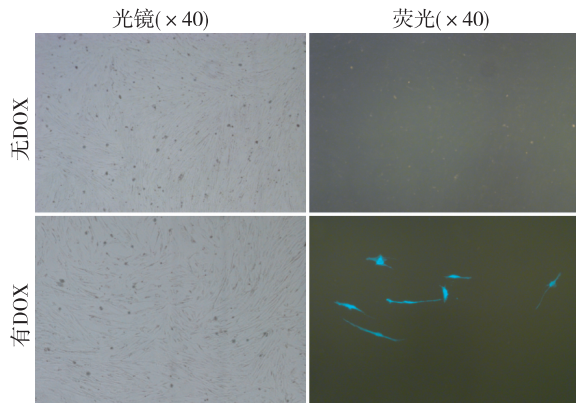
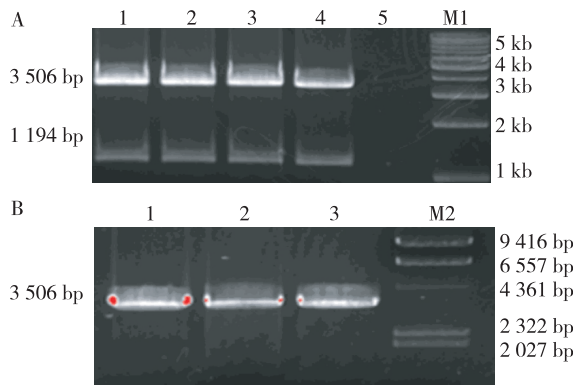


图 2 PEF 转染 pTRE3G-ZsGreen I 和 pEF1a-Tet3G 后绿色荧光蛋白表达情况

Figure 2 Expression of green fluorescent protein in PEF after nucleofection with pTRE3G-ZsGreen I and pEF1a-Tet3G



A: pTRE3G-ZsGreen I 质粒酶切改造结果。1~4: pTRE3G-ZsGreen I 质粒经 EcoRV 限制性内切酶改造; 5: 空白对照; M1: 1 Kb DNA ladder。B: pTRE3G-Zs 质粒酶切鉴定结果。1~3: pTRE3G-Zs 质粒经 EcoRI、EcoRV、HindIII 限制性内切酶酶切; M2:  $\lambda$ -HindIII digest DNA marker。

图 3 pTRE3G-Zs 质粒和酶切鉴定

Figure 3 pTRE3G-Zs plasmid detected by restriction endonuclease

### 2.3 猪源 REX1、LIN28 和 DPPA5 的成功扩增以及猪源 OCT4 和 TBX3 的商业合成

利用 PCR 法, 成功扩增 REX1 目的片段 975 bp、LIN28 目的片段 727 bp 和 DPPA5 目的片段 408 bp (图 4A), 3 个片段测序结果通过与 GenBank 中猪转录组 REX1、LIN28 和 DPPA5 序列比对, 结果显示 REX1 和 DPPA5 与目的序列同源性分别为 99% 和 90%, 而 LIN28 存在的差异较大, 是由不同品种猪基因片段存在一定差异导致的, LIN28 基因测序正确无误。

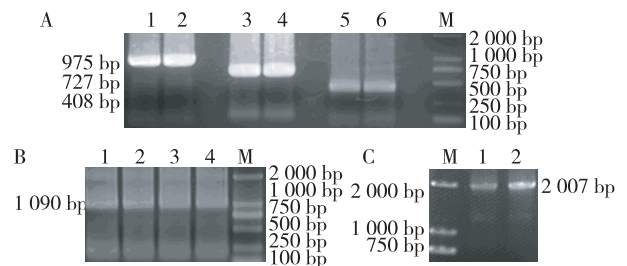
商业合成的 OCT4 和 TBX3 片段测序结果, 同样与 GenBank 中猪转录组 OCT4 和 TBX3 序列比

对, 结果显示 OCT4 和 TBX3 与目的序列同源性分别为 99% 和 97%。

### 2.4 成功构建 3 个猪源转录因子重组表达载体

通过 overlap PCR 方法, 以 PEAL5 和 PDN3 为引物, E2A-LIN28-T2A 和 T2A-DPPA5-Nhe I 为模板, E2A 连接形成 E2A-LIN28-T2A-DPPA5-Nhe I 片段 (图 4B), 进而以 PMR5 和 PND3 为引物, Mlu I-REX1-E2A 和 E2A-LIN28-T2A-DPPA5-Nhe I 片段为模板, 实现 T2A 连接形成 Mlu I-REX1-E2A-LIN28-T2A-DPPA5-Nhe I (图 4C), 连接 PMD-18T 载体, 送上海金斯瑞公司测序, 测序结果与目的片段吻合度为 99%, 所连片段正确, 保菌, 命名为 PMD18T-RLD。

分别用 Mlu I 和 Nhe I 限制性内切酶对 pTRE3G-Zs、pUC57-pOCT4、pUC57-pTBX3、PMD18T-RLD 质粒进行酶切修饰, 按照说明书, 利用 T4 连接酶分别连接获得 pTRE3G-Zs-OCT4、pTRE3G-Zs-TBX3 和 pTRE3G-Zs-RLD, 并进行酶切鉴定, pTRE3G-Zs-OCT4 经 Mlu I、Nhe I、Bgl II 限制性内切酶单酶切获得与原质粒等大的单一条带为 4 595 bp, EcoRI 限制性内切酶双酶切获得 3 000 bp 和 1 595 bp 两条片段 (图 5A); pTRE3G-Zs-TBX3 经 Mlu I、Nhe I 限制性内切酶单酶切获得与原质粒等大的单一条带为 5 678 bp, 经 Bgl II 限制性内切酶双酶切获得 5 600 bp 和 78 bp 两条片段, 经 EcoRI 限制性内切酶双酶切获得 4 400 bp 和 1 278 bp 两条片段 (图 5B); pTRE3G-Zs-RLD 经 Mlu I、Nhe I、Sma I 限制性内切酶单酶切获得与原质粒等大的单一条带为 5 492 bp, 经 XhoI 限制性内切酶双酶切获得 3 187 bp 和 2 305 bp 两条片段 (图 5C)。对酶切结果正确的质粒进行保菌, 分别命名为 pTRE3G-Zs-OCT4 1 号、pTRE3G-Zs-TBX39 号、pTRE3G-Zs-RLD 9 号。



A: PCR 扩增结果。1, 2: REX1 片段胶回收; 3, 4: LIN28 片段胶回收; 5, 6: DPPA5 片段胶回收。B: E2A-LIN28-T2A-DPPA5-Nhe I 片段胶回收; C: Mlu I-REX1-E2A-LIN28-T2A-DPPA5-Nhe I 片段胶回收; M 为 DL 2000 DNA marker。

图 4 Mlu I-REX1-E2A-LIN28-T2A-DPPA5-Nhe I 片段胶回收  
Figure 4 Gel extraction of Mlu I-REX1-E2A-LIN28-T2A-DPPA5-Nhe I fragment

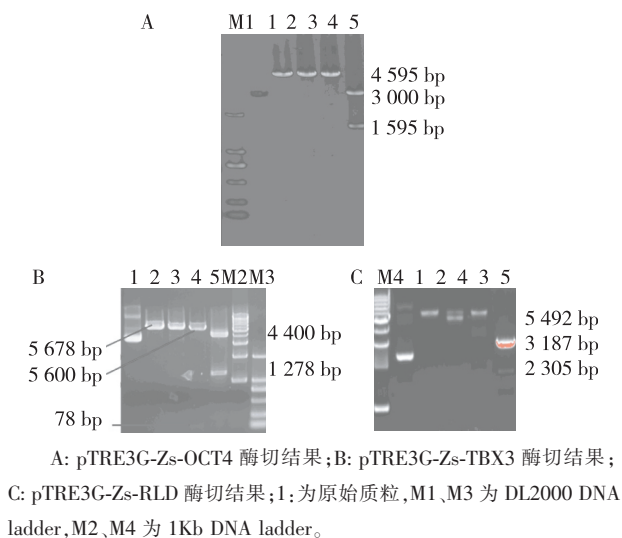


图 5 诱导表达载体酶切鉴定

Figure 5 Identification of induced expression vectors by restriction enzyme cleave

### 2.5 猪源 OCT4、TBX3、REX1、LIN28、DPPA5 5 个转录因子的单克隆转基因细胞系的建立

采用 Lonza 核转染试剂盒将线性化的 pTRE3G-Zs-OCT4、pTRE3G-Zs-TBX3、pTRE3G-Zs-RLD 质粒及 pEF1a-Tet3G 质粒(图 6A)共同转入  $1.0 \times 10^6$  个中华小型猪 PEF 细胞中,并利用 pEF1a-Tet3G 质粒上的新霉素抗性对细胞进行 G418 药物筛选,并以 PEF 为阴性对照。每天观察细胞状态,随着筛选天数的增加,转染阴性细胞不断死亡。药筛 8 d 后,耐药性克隆长出,克隆成规则的圆形,细胞排列紧密(图 6B)。之后将长出的克隆传代冻存,并留取部分细胞做转基因的 PCR 鉴定。本研究共挑取了 142 个克隆,经过 PCR 鉴定,有 70 个克隆 5 个因子和 TET3 均为阳性(图 6C),其中 29 个单克隆细胞株为外源 5 因子的拷贝数较高。

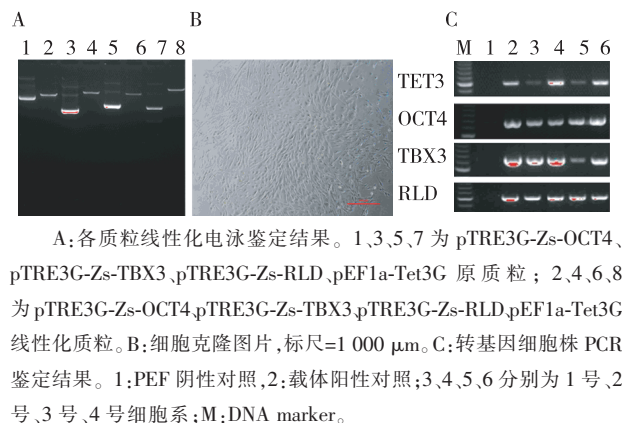


图 6 获得转染 5 个转录因子与 pEF1a-Tet3G 质粒的细胞系  
Figure 6 Obtainment of cell lines transfected with five factors and pEF1a-Tet3G plasmid

### 3 讨论

Takahashi 等<sup>[2-5]</sup>利用慢病毒载体将 OSKM 4 个转录因子转入 MEF 细胞,使其重编程并诱导形成 iPS。尽管 iPS 在形态、传代特性、甲基化方面都与胚胎干细胞十分相似,但是通过诱导表达所形成的 iPS 细胞往往会过量表达外源性多能因子,而撤去诱导物后内源性多能因子可能呈现两种状态,或持续高表达,形成稳定的 ESC,或表达量骤然下降,逐渐分化失去其多能性,不同克隆之间也存在差异。故不同的诱导方法、外源性因子的表达水平差异以及培养体系的不同均有可能产生不同结果。其次,慢病毒载体可能会导致逆转录的发生并使得外源性因子不可逆地整合进受体细胞基因组中,从而影响下一步治疗性应用,本研究通过核转染方法有效避免了慢病毒载体感染细胞所产生的一系列问题的发生。

2A 肽基因序列翻译产生一种自切蛋白,能够连接两个不同的外源基因,形成一个完整的开放阅读框。当外源基因转入细胞中进行转录翻译时,2A 肽序列所编码区域在 C 端被切开,将 2A 肽序列所连接的两个不同外源基因分离形成完整的单个独立蛋白。2A 肽基因序列的特点,使得 2A 肽策略成为多顺反子转基因中广泛应用的一个重要方法,不同基因通过 2A 肽编码序列连接并在真核环境中表达时,可以通过融合基因长 mRNA 表达出不同的单体蛋白。由于不同基因共用一个启动子与终止子,减少了插入序列的大小,同时避免了基因启动子间的同源沉默。

本研究通过商业购买 TET-ON 诱导表达系统,并以 2A 肽剪切序列将各多能性因子连接,构建新的猪源转录因子重组诱导表达载体。随后利用表达载体与表达反式激活蛋白的 pEF1a-Tet3G 质粒共转染,并通过 G418 抗性筛选获得阳性细胞系,拟下一步添加 DOX 诱导,以期获得诱导多能性干细胞。

由于 OCT4 和 TBX3 基因序列在扩增过程中存在技术难度,故选择商业合成。本研究中 LIN28 片段测序结果与 GenBank 中猪转录组 LIN28 序列比对时,显示存在较大差异,为了研究是否为不同猪种之间存在差异,故取小黑猪的总 RNA 反转录获得 cDNA,利用 LIN28 引物扩增相应片段,连接 PMD-18T 载体后转化摇菌送测序,显示小黑猪 LIN28 片段吻合度为 88%,小黑猪和长白猪 LIN28 基因片段结果比对显示,不同品种猪基因片段存在一定差异,LIN28 基因测序正确无误。商业购买的

pTRE3G-ZsGreen I 质粒中含有 IRES2 控制作用元件,可能影响下游转录因子的表达,故原质粒需要进行改造,将 IRES2 控制作用元件切除,从而改造获得 pTRE3G-Zs 质粒。

本研究最终将 OCT4 和 TBX3 以及 RLD 序列分别连接改造后的诱导表达载体 pTRE3G-Zs,在核转染过程中通过控制质粒的比例实现共转。PEF 转染后,经过 G418 药物筛选获得抗药性单细胞克隆,并通过挑取单细胞克隆扩增培养来实现转基因细胞的富集,在细胞冻存的同时取不同单细胞系中定量细胞进行细胞裂解,随后以平行试验的方式对细胞裂解液进行转基因 PCR 鉴定,由于取样细胞的数量一定,故可通过 PCR 鉴定结果中外源基因目的条带的亮度,半定量确定转基因细胞系中外源基因整合拷贝数的高低,基于此理论我们挑选出了具有较高外源基因拷贝数的细胞系,从而为下一步诱导建立猪 iPS 细胞系提供理论依据。

我们准备在下一步研究中挑选出同时整合有 5 个猪源转录因子且具有较高拷贝数的细胞系,利用 DOX 诱导的方法,探索建立猪 iPS 细胞系,继而去掉 DOX,观察比较所建立猪 iPS 细胞系的多能性以及内外源转录因子的表达情况,并进一步探索真正的猪胚胎干细胞建系方法和相关信号通路。

#### [参考文献]

- [1] Hochedlinger K, Jaenisch R. Nuclear reprogramming and pluripotency[J]. *Nature*, 2006, 441(7097): 1061-1067
- [2] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors[J]. *Cell*, 2006, 126(4): 663-676
- [3] Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells[J]. *Nature*, 2007, 448(7151): 313-317
- [4] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors[J]. *Cell*, 2007, 131(5): 861-872
- [5] Yu JY, Vodyanik MA, Smuga-Otto KA, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells[J]. *Science*, 2007, 318(5858): 1917-1920
- [6] Chew JL, Loh YH, Zhang W, et al. Reciprocal transcriptional regulation of Pou5f1 and Sox2 via the Oct4/Sox2 complex in embryonic stem cells[J]. *Mol Cell Biol*, 2005, 25(14): 6031-6046
- [7] Shi Y, Do JT, Desponts C, et al. A combined chemical and genetic approach for the Generation of induced pluripotent stem cells[J]. *Cell Stem Cell*, 2008, 2(6): 525-528
- [8] Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, et al. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts[J]. *Nat Biotechnol*, 2008, 26(1): 101-106
- [9] Okita K, Hong H, Takahashi K, et al. Generation of mouse-induced pluripotent stem cells with plasmid vectors[J]. *Nat Protoc*, 2010, 5(3): 418-428
- [10] Okita K, Nakagawa M, Hong H, et al. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors[J]. *Science*, 2008, 322(593): 949-953
- [11] Woltjen K, Michael IP, Mohseni P, et al. Piggy Bac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells[J]. *Nature*, 2009, 458(7239): 766-770
- [12] Li W, Wei W, Zhu S, et al. Generation of rat and human induced pluripotent stem cells by combining genetic reprogramming and chemical inhibitors[J]. *Cell Stem Cell*, 2009, 4(1): 16-19
- [13] Liao J, Cui C, Chen S, et al. Generation of induced pluripotent stem cell lines from adult rat cells[J]. *Cell Stem Cell*, 2009, 4(1): 11-15
- [14] Gu Q, Hao J, Hai T, et al. Efficient generation of mouse ESCs-like pig induced pluripotent stem cells[J]. *Protein Cell*, 2014, 5(5): 338-342
- [15] Montserrat N, De Oñate L, Garreta E, et al. Generation of feeder-free pig induced pluripotent stem cells without Pou5f1[J]. *Cell Transplant*, 2012, 21(5): 815-825
- [16] Esteban MA, Xu J, Yang J, et al. Generation of induced pluripotent stem cell lines from Tibetan miniature pig[J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(26): 17634-17640
- [17] Zhu S, Li W, Zhou H, et al. Reprogramming of human primary somatic cells by OCT4 and chemical compounds[J]. *Cell Stem Cell*, 2010, 7(6): 651-655
- [18] Han J, Yuan P, Yang H, et al. Tbx3 improves the germline competency of induced pluripotent stem cells[J]. *Nature*, 2010, 463(7284): 1096-1100
- [19] Hou DR, Jin Y, Nie XW, et al. Derivation of porcine embryonic stem-like cells from *in vitro*-produced blastocyst-stage embryos[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 25838
- [20] De Felipe P, Hughes LE, Ryan MD, et al. Co-translational, intraribosomal cleavage of polypeptides by the foot-and-mouth disease virus 2A peptide[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(13): 11441-11448

[收稿日期] 2017-07-04