

# 核转染技术转染大鼠胚胎干细胞的初步研究

吴兆强 赵丽华 张曼玲 金永 聂晓伟 侯道荣 杨宁 陈袁 李荣凤\*

(南京医科大学江苏省异种移植重点实验室, 南京 210029)

**摘要** 大鼠胚胎干细胞(rat embryonic stem cells, rESCs)的基因转染研究仍处于探索阶段。该文利用不同的核转染条件,将红色荧光蛋白(red fluorescent protein, RFP)表达载体 pEF1alpha-DsRed-Express2导入大鼠胚胎干细胞中,比较不同转染条件下大鼠胚胎干细胞的红荧光蛋白表达效率和死亡率,确定最佳核转染条件。在采用最佳核转染条件转染大鼠胚胎干细胞后,利用碱性磷酸酶染色、RT-PCR、免疫荧光染色等方法,比较核转染前后大鼠胚胎干细胞的干细胞特性,探讨核转染过程对大鼠胚胎干细胞的干细胞特性的影响。实验结果显示,转染条件为A-13时,可获得最好的大鼠胚胎干细胞转染效率(39.63±1.75)%。核转染后,表达红色荧光蛋白的大鼠胚胎干细胞的碱性磷酸酶染色结果仍为阳性。另外,RT-PCR和免疫荧光染色结果表明,核转染前后大鼠胚胎干细胞的干细胞多能性标志基因的表达情况未出现明显差异。研究表明,核转染条件A-13可以在不改变大鼠胚胎干细胞特性的条件下有效地对其进行基因转染,即核转染技术适用于大鼠胚胎干细胞的基因转染。

**关键词** 大鼠胚胎干细胞; 红色荧光蛋白; 核转染; 干细胞多能性标志基因

## Preliminary Study on Nucleofection of Rat Embryonic Stem Cells

Wu Zhaoqiang, Zhao Lihua, Zhang Manling, Jin Yong, Nie Xiaowei, Hou Daorong, Yang Ning, Chen Yuan, Li Rongfeng\*

(Key Laboratory of Xenotransplantation of Jiangsu Province, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China)

**Abstract** The study of gene transduction on rat embryonic stem cells (rESCs) has been explored continually. In our study, in order to detect the optimized program for gene transduction, the reporter red fluorescent protein (RFP) gene was transfected into rESCs with different nucleofection programs. The proportion of cells with red fluorescent and the dead cells after transfection were compared among different programs. Then, the best program was selected and used to transfect rESCs. Alkaline phosphatase (AP) staining, RT-PCR and immunostaining were performed to compare the characters of rESCs before and after nucleofection. The results showed that the A-13 was the best program for rESCs transfection and its efficiency reached (39.63±1.75)%. The AP staining of rESCs was still positive after nucleofection, and the expression and immunostaining of ESC marker genes (RT-PCR and immunostaining) were not changed by the nucleofection process. Therefore, the rESCs could be effectively transduced with the nucleofection program A-13 and their morphology and pluripotency characters were maintained. Nucleofection was an effective method for gene transduction of rESCs.

**Keywords** rESCs; RFP; nucleofection; SC marker genes

收稿日期: 2014-11-17 接受日期: 2015-01-04

国家自然科学基金面上项目(批准号: 31371487)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 025-86862059, E-mail: lirf01@126.com

Received: November 17, 2014 Accepted: January 4, 2015

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31371487)

\*Corresponding author. Tel: +86-25-86862059, E-mail: lirf01@126.com

网络出版时间: 2015-03-03 10:42

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20150303.1042.001.html>

胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)是一类来源于囊胚期内细胞团<sup>[1]</sup>(inner cell mass, ICM)的具有自我更新和多向分化潜能的细胞。由于这类细胞能够无限增殖并能在体外诱导分化成几乎所有类型的细胞,所以它能被广泛应用于早期胚胎发育、基因功能、药物研发和再生医学等研究领域<sup>[2]</sup>。作为哺乳类研究的模型动物,大鼠被应用于生理学、毒理学、行为学等研究领域,最早可追溯至150年前<sup>[3]</sup>。相比于小鼠,大鼠在生理活动、药理反应和疾病发生机制等方面都更接近于人类,而且在心血管和神经系统疾病等特殊疾病的研究中起着不可替代的作用<sup>[4]</sup>。然而,大鼠胚胎干细胞系一直未能被成功建立,这阻碍了大鼠动物模型在科学研究中的应用与发展<sup>[5-6]</sup>。直至2008年, Buehr等<sup>[7]</sup>和Li等<sup>[8]</sup>才建立起真正意义上的大鼠胚胎干细胞系,为胚胎干细胞的研究提供了另一种十分重要的实验模型。现今,随着人们对大鼠胚胎干细胞研究的深入,其已被逐步应用于基因修饰、疾病模型建立<sup>[9-10]</sup>和体外诱导分化<sup>[11]</sup>等研究领域。

红色荧光蛋白(red fluorescent protein, RFP)是一种具有荧光标记作用的报告蛋白,将其导入大鼠胚胎干细胞内,有利于在研究中示踪大鼠干细胞的增殖和分化过程,并且为大鼠干细胞的基因修饰提供有效的技术支持。到目前为止,国内还未见到大鼠胚胎干细胞株高效转染红色荧光蛋白基因的相关报道,大鼠胚胎干细胞的基因修饰成功与否严重影响着其在干细胞领域的应用前景。目前,最常用于胚胎干细胞基因转染的几种方法有:脂质体转染法<sup>[12]</sup>、电穿孔转染法和慢病毒转染法<sup>[13]</sup>。然而,由于脂质体转染法的基因转染效率较低<sup>[14]</sup>、电穿孔转染法细胞死亡率高<sup>[15]</sup>等因素限制了这两种方法的广泛运用。虽然慢病毒转染法转染胚胎干细胞能取得较好的基因转染效率<sup>[16-17]</sup>,但是其应用仍然存在很多不安全因素,而且慢病毒的应用对实验环境和操作等都有相当严格的要求,从而也限制了该方法的应用。另外,由于部分大鼠胚胎干细胞处于悬浮生长状态,而对悬浮生长的细胞进行基因转染一直是干细胞转染的难题之一<sup>[18-19]</sup>,这进一步增加了大鼠胚胎干细胞基因修饰的难度。

基于以上转染方法在胚胎干细胞基因修饰方面存在的问题,本实验采用较新的核转染技术对大鼠胚胎干细胞进行基因转染方面的初步研究。核转染技术是德国 Amaxa公司依据电穿孔转染技术原理

开发的一种转染技术。该技术通过优化电穿孔转染法的各项参数(包括电压、电流和电穿孔时间等),使用适用于不同类型细胞的转染试剂盒和具有专利权的仪器,直接将外源基因导入细胞核中,同时尽可能地降低电穿孔造成的细胞死亡率,是一种高效的非病毒性转染技术<sup>[20]</sup>。本研究利用核转染技术对大鼠胚胎干细胞进行红色荧光蛋白表达载体的转染,比较不同核转染条件的转染效率,以期寻找大鼠胚胎干细胞的最优核转染条件。另外,在采用最佳核转染条件转染大鼠胚胎干细胞后,利用碱性磷酸酶染色、RT-PCR、免疫荧光染色等方法,比较分析核转染技术对大鼠胚胎干细胞的干细胞特性的影响。本文初步探讨了应用核转染技术进行大鼠胚胎干细胞基因转染的可行性,以期为大鼠胚胎干细胞在干细胞研究和异种移植等领域的应用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料及主要仪器

实验用 DA品系大鼠胚胎干细胞由赵小阳研究员(中国科学院动物研究所)惠赠。pEF1alpha-DsRed-Express2 Vector购自大连宝生物公司; EndoFree Maxi Plasmid Kit购自天根生化科技有限公司; DMEM、DMEM/F12、Neurobasal medium、N2 medium、B27 medium、Phosphate-buffered saline(PBS)、胰蛋白酶、青链霉素均购自美国 GIBCO公司; Insulin购自 Roche公司; L-谷氨酰胺、2-巯基乙醇、Albumin from bovine serum(BSA)、Gelatin、DMSO、PD0325901、CHIR99021均购自Sigma公司; 重组鼠白血病抑制因子购自 Millipore公司; 胎牛血清购自 Hyclone公司; 丝裂霉素C购自 Wako公司; Taq Master Mix购自 Vazyme公司。

CO<sub>2</sub>培养箱购自 Thermo公司; 生物光学显微镜显微镜购自 Olympus公司; PCR仪购自 ABI公司; 荧光显微镜购自日本 Nikon公司; 核转染仪购自 Amaxa公司。

### 1.2 方法

1.2.1 pEF1alpha-DsRed-Express2 Vector质粒的提取  
取适量感受态细胞,将 pEF1alpha-DsRed-Express2 Vector质粒与感受态细胞按 1:100的比例轻轻混匀后冰浴30 min, 42 °C热激90 s, 迅速冰浴2 min。然后,加入适量不含抗生素的液态细菌培养基,混匀后置于 37 °C恒温摇床上, 150 r/min震荡 45~60 min; 室温下 5 000 r/min离心 5 min, 然后将适量细菌沉淀转移至固体细菌培养基,于 37 °C培养箱中倒置培

养12~16 h; 挑取状态良好的细菌克隆, 加入液体细菌培养基, 于37 °C恒温摇床上220 r/min震荡培养12~14 h。最后, 取适量菌液与50%的甘油以1:1的比例混合均匀, 置于-80 °C保存备用。

采用EndoFree Maxi Plasmid Kit试剂盒提取pEF1-alpha-DsRed-Express2 Vector质粒, 具体实验步骤按照产品说明书进行, 提取后的质粒置于-20 °C保存备用。

**1.2.2 大鼠胚胎干细胞饲养层细胞的准备** 取怀孕13.5 d的小鼠, 断颈法处死后, 取出子宫内的胎鼠; 用眼科剪小心地除去胎鼠的头、尾、四肢、内脏和生殖脊, 仅保留其肌肉部位; 随后将组织块尽可能地剪碎, 用0.05%胰蛋白酶消化15~20 min; 显微镜下观察, 消化至组织团块变得松散后, 按1只胎鼠/100 mm培养皿的密度接种小鼠胎儿成纤维细胞(mouse embryonic fibroblast cells, MEFs), 使用小鼠胎儿成纤维细胞培养液(DMEM+15% FBS+1% PS)进行培养; 培养至细胞汇合度约为90%时, 消化传代或冻存备用。使用小鼠成纤维细胞培养液继续培养传代或解冻的原代MEFs于100 mm培养皿中, 2~3 d更换一次培养基, 待细胞汇合度约为90%时进行传代。待传代至第二代或第三代的MEFs汇合度达到90%时, 向培养基中添加10 µg/mL丝裂霉素-C(Mitomycin-C), 继续培养2~2.5 h; 待细胞汇合度达到90%时, 用胰蛋白酶消化MEFs为单细胞并计数, 按 $4 \times 10^4/\text{cm}^2$ 的密度均匀接种于6孔板中, 置于37 °C、5% CO<sub>2</sub>的培养箱中过夜培养, 备用。

**1.2.3 大鼠胚胎干细胞的培养** 复苏大鼠胚胎干细胞, 接种于制备好的铺有饲养层细胞的六孔板, 置于37 °C、5% CO<sub>2</sub>培养箱中, 使用大鼠胚胎干细胞培养液(48.13% DMEM/F12+48.13% Neurobasal+0.5% N2+1% B27+1% L-Glutamine+1% Penicillin/Streptomycin+0.1% Insulin+0.1% β-mercaptoethanol+0.002 5% BSA+0.02% PD0325901+0.01% CHIR99021+0.01% mLif)进行培养, 每天更换新的大鼠胚胎干细胞培养液并观察细胞状态, 每3~4 d传代一次。由于大鼠胚胎干细胞既有贴壁生长又有悬浮生长, 在换液时, 需要收集含悬浮细胞的培养基, 1 000 r/min离心5 min后将沉淀细胞重新接种于培养板中。

**1.2.4 大鼠胚胎干细胞的基因转染和效率鉴定** 按照Human Stem Cell Nucleofector® kit1 and kit2(Lonza)试剂盒操作说明, 将Human Stem Cell Nucleofector® kit1 and kit2试剂盒中的Human Stem Cell Nucleofector®

Solution 1和Supplement 1按9:2的比例混合成核转液备用。用0.05%胰蛋白酶溶液将大鼠胚胎干细胞消化成单细胞后加入等体积大鼠胚胎干细胞培养液终止消化; 1 000 r/min离心5 min后, 用大鼠胚胎干细胞培养液重悬细胞, 接种于新的100 mm培养皿, 置于37 °C、5% CO<sub>2</sub>的培养箱中培养1 h; 取上清, 经细胞计数后取 $2 \times 10^6$ 个细胞于1 000 r/min离心5 min; 去上清后, 加入4 mL PBS重悬干细胞, 再次1 000 r/min离心5 min; 去上清后, 取100 µL混合的核转液重悬细胞后加入5 µg pEF1alpha-DsRed-Express2 Vector质粒, 混匀后转至核转杯中; 将含有细胞悬液的核转杯置于Amaxa核转染仪中, 运行核转仪程序。本实验按照Human Stem Cell Nucleofector® kit1 and kit2试剂盒操作说明中推荐的五种转染条件(A-12、A-13、A-23、A-27、B-16)将实验分为五组。

核转染后, 首先取少部分细胞立即进行台盼蓝拒染实验检测各组细胞存活率, 镜下显示被台盼蓝染色的细胞为死亡的细胞。剩余细胞立刻接种至预先铺有饲养层细胞的六孔板中, 置于37 °C、5% CO<sub>2</sub>的培养箱中用大鼠胚胎干细胞培养液培养, 24 h后换液一次, 48 h后在荧光显微镜下检测转染效率。荧光显微镜下随机观测4个视野, 每个视野下计数细胞中红色荧光阳性的克隆数及总克隆数, 计算细胞转染率, 然后取平均值统计转染效率。核转染效率(%)=(发出红色荧光的克隆数/可见光下总克隆数)×100%, 细胞死亡率(%)=死亡的细胞总数/总细胞数×100%。

**1.2.5 碱性磷酸酶染色(alkaline phosphatase staining)** 本实验采用碱性磷酸酶染色试剂盒 Alkaline Phosphatase Detection Kit(Millipore公司)分别对转染前后的大鼠胚胎干细胞进行染色鉴定, 具体实验步骤按照产品说明书操作。去除六孔板中原有的培养基, 用PBS清洗一次后, 用4%多聚甲醛固定液固定1~2 min; 吸除固定液后, 用1×Rinse Buffer清洗一次; 吸除1×Rinse Buffer后, 加入0.5 mL的染色工作液, 盖住培养板底部, 避光室温孵育15 min。去除染色液, 用1×Rinse Buffer清洗一次, 再用PBS覆盖皿底, 在显微镜下观察干细胞染色情况。

**1.2.6 RT-PCR检测** 取核转染前后正常生长的大鼠胚胎干细胞, 用0.05%胰酶将干细胞消化为单细胞后, 用大鼠胚胎干细胞培养液重悬细胞, 1 000 r/min离心5 min后, 接种于新的100 mm培养皿, 置于37 °C、5% CO<sub>2</sub>的培养箱中培养1 h。然后, 取含干细胞的上清



液于室温1 000 r/min离心5 min, 弃上清, 用1 mL PBS重悬细胞并转移至1.5 mL离心管, 经8 000 r/min离心2 min后收集干细胞。以每 $1 \times 10^7$ 个细胞加入1~2 mL RNAiso Plus的量进行大鼠胚胎干细胞的裂解, 用移液枪反复吹吸含干细胞的RNAiso Plus至无明显沉淀后, 室温静置5 min; 按RNAiso Plus的1/5体积量加入氯仿, 盖紧离心管盖, 剧烈震荡15 s; 待溶液充分乳化后室温静置5 min, 于4 °C离心机中12 000 r/min离心15 min; 回收上清液至新的离心管内, 加入等体积异丙醇, 充分混匀后, 室温静置10 min; 于4 °C离心机中12 000 r/min离心10 min并弃上清, 沿离心管壁缓慢加入1 mL 75%乙醇, 并于4 °C离心机中12 000 r/min离心5 min并弃上清; 室温干燥2~5 min, 加入适量RNase-free dH<sub>2</sub>O回溶RNA, 于-80 °C保存备用。

实验采用反转录试剂盒PrimeScript™ RT reagent Kit(Perfect Real Time)(TaKaRa公司), 并按照产品说明书进行。反应体系共10 μL, 包括2 μL 5×PrimeScript Buffer(for Real Time)+0.5 μL PrimeScript RT Enzyme MixI+0.5 μL Random 6 mers(100 μmol/L)+500 ng RNA+RNase-Free dH<sub>2</sub>O(其中, 10 μL反应体系最多可使用500 ng RNA)。反转录条件为: 37 °C反应15 min, 85 °C反应5 s, 4 °C终止酶活性并停止反应。反应获得的cDNA产物可直接用于PCR扩增或-20 °C保存备用。

将2×Taq Master Mix(Vazyme)、引物、DNA模板、水按PCR反应体系混合均匀后, 进行PCR反应扩增转染前后的大鼠胚胎干细胞的多能性标志基因*Oct4*、*Sox2*、*Fgf4*、*Nanog*和内参基因*β-actin*。PCR反应体系共20 μL, 包括10 μL 2×Taq Master Mix+0.5 μL上游引物(10 pmol/L)+0.5 μL下游引物(10 pmol/L)+1 μL

cDNA+8 μL ddH<sub>2</sub>O, PCR引物序列见表1。PCR反应条件为: 94 °C预变性2 min; 94 °C变性30 s, 59 °C退火30 s, 72 °C延伸30 s, 30个循环; 72 °C终止延伸10 min, 4 °C保存。

分别以大鼠心肌成纤维细胞和ddH<sub>2</sub>O作为阴性对照, 其中大鼠心肌成纤维细胞的RNA提取、反转录和PCR方法同大鼠胚胎干细胞, ddH<sub>2</sub>O的PCR方法同大鼠胚胎干细胞。

**1.2.7 免疫荧光染色** 分别取核转染前后生长旺盛的大鼠胚胎干细胞, 去除培养基, 用PBS清洗一次后, 用4%多聚甲醛固定10 min; 然后, 用PBS洗三次, 每次5 min; 用1%的Triton-X-100室温通透1 h, 10%山羊血清封闭液封闭1 h, 再加入用封闭液1:200稀释的一抗后, 4 °C孵育过夜; 之后, PBS洗三次, 加入用封闭液1:400稀释的二抗, 室温避光孵育1 h(使用抗体见表2); 移除二抗后用PBS清洗两次, 加入用封闭液1:100稀释的DAPI, 室温孵育3 min; 移除DAPI后, 用PBS清洗一次, 加入DABCO Anti-fade后即可在荧光显微镜下观察结果。

### 1.3 数据统计分析

部分数据采用SPSS 20.0统计软件分析。实验数据以平均数±标准差表示,  $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 不同核转染条件下大鼠胚胎干细胞的基因转染效率

红色荧光蛋白(RFP)作为一种报告蛋白质, 在紫外光的激发下可呈现红色荧光, 因此在荧光显微镜下

表1 PCR引物序列

Table 1 The sequence of primer for PCR

基因 Genes	上游引物(5'→3') Forward primer (5'→3')	下游引物(5'→3') Reverse primer (5'→3')
<i>Oct4</i>	GGG ATG GCA TAC TGT GGA C	CTT CCT CCA CCC ACT TCT C
<i>Sox2</i>	GGC GGC AAC CAG AAG AAC AG	GTT GCT CCA GCC GTT CAT GTG
<i>Fgf4</i>	CGG GGT GTG GTG AGC ATC TTC	CCT TCT TGG TCC GCC CGT TC
<i>Nanog</i>	GCC CTG AGA AGA AAG AAG AG	CGT ACT GCC CCA TAC TGG AA
<i>β-actin</i>	CAT GGC ATT GTG ATG GAC T	ACG GAT GTC AAC GTC ACA CT

表2 免疫荧光染色抗体

Table 2 The antibody used for immunostaining

干细胞多能性因子 SC markers	一抗 Primary antibody	二抗 Secondary antibody
<i>Oct3/4</i>	Rabbit anti- <i>Oct3/4</i> (Santa Cruz Blotechnology)	Goat anti-rabbit IgG FITC (Abcam)
<i>Nanog</i>	Mouse anti- <i>Nanog</i> (Millipore)	Goat anti-mouse IgG FITC (Abcam)
<i>Sox2</i>	Mouse anti- <i>Sox2</i> (Calbiochem)	Goat anti-mouse IgG FITC (Abcam)
<i>Klf4</i>	Mouse anti- <i>Klf4</i> (Millipore)	Goat anti-mouse IgG FITC (Abcam)

观察, 转染成功的细胞内即可见到强度均匀红色荧光。转染48h后, 在荧光显微镜下观察发现, 运用不同转染条件转染 pEF1alpha-DsRed-Express2 Vector质粒

表3 不同核转染条件对大鼠胚胎干细胞转染效率及引起的细胞死亡率

Table 3 The efficiency and cell death rate of different nucleofection programs on rESCs

实验组	转染效率(%)	细胞死亡率(%)
Groups	The efficiency of transfection (%)	Cell death rate (%)
A-12	29.30±0.33 <sup>##</sup>	46.03±2.27
A-13	39.63±1.75	51.17±10.40
A-23	29.63±5.00 <sup>##</sup>	66.13±3.75
A-27	29.57±1.16 <sup>##</sup>	63.77±5.75
B-16	33.93±3.38	54.23±12.14

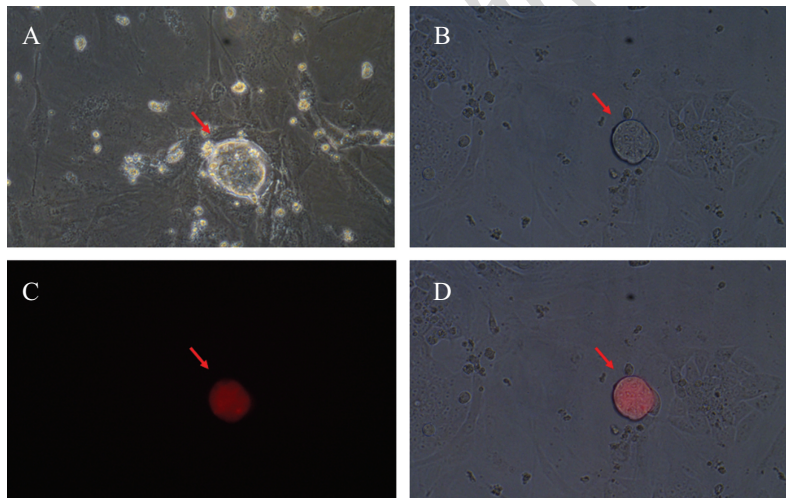
实验重复3次, 数据取平均数±标准差。\* $P<0.05$ , 与B-16组比较; <sup>##</sup> $P<0.01$ , 与A-13组比较。

Each data represents the mean±S.D. of three independent experiments. \* $P<0.05$  vs B-16 group; \*\* $P<0.01$  vs A-13 group.

的大鼠胚胎干细胞中均含有红色荧光蛋白表达的细胞, 说明核转染已将pEF1alpha-DsRed-Express2 Vector质粒成功转入大鼠胚胎干细胞。红色荧光蛋白在48 h表达最清晰, 所以选择48 h时检测转染效率。比较不同核转染条件下含红色荧光蛋白的细胞在总细胞中的比例, 大鼠胚胎干细胞在核转染条件为A-13时的转染效率最佳, 为(39.63±1.75)%(表3), 且与其他转染条件下的转染效率有显著差异( $P<0.05$ )。另外, 不同转染条件造成的大鼠胚胎干细胞死亡率也有差别, 其中转染效率最高的A-13条件下细胞死亡率为(51.17±10.40)%, 最接近50%。

## 2.2 核转染前后大鼠胚胎干细胞的细胞形态比较

经核转染后的大鼠胚胎干细胞内可见红色荧光蛋白的表达。大鼠胚胎干细胞仍呈球形克隆生长, 生长状态仍既有贴壁生长又有悬浮生长, 其形态与

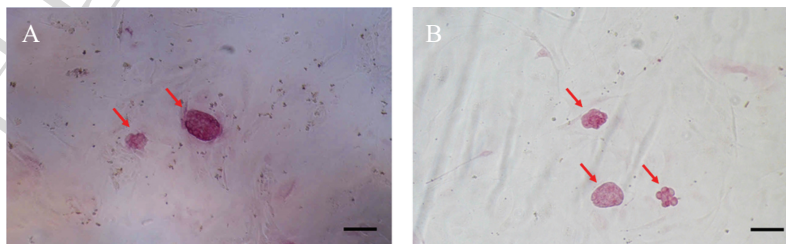


A: 核转染前的大鼠胚胎干细胞形态; B: 核转染后的大鼠胚胎干细胞形态; C: 核转染后荧光显微镜下的大鼠胚胎干细胞形态; D: B和C的合成图。红色箭头所指为大鼠胚胎干细胞克隆。

A: morphology of rESCs before nucleofection; B: morphology of rESCs after nucleofection; C: morphology of rESCs after nucleofection observed under fluorescence microscopy; D: merged B and C. The red arrow indicated the clone of rESCs.

图1 核转染前后大鼠胚胎干细胞细胞形态(100×)

Fig.1 Morphology of rESCs before and after nucleofection (100×)

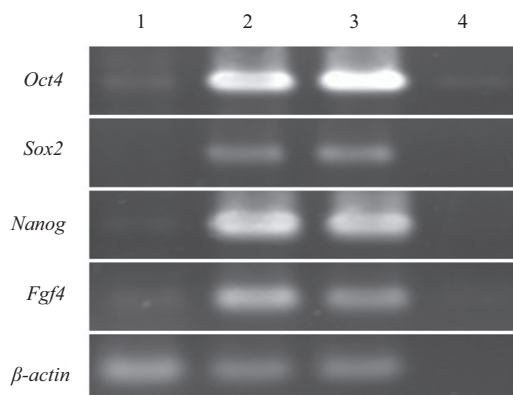


A: 核转染前的大鼠胚胎干细胞碱性磷酸酶染色; B: 核转染后的大鼠胚胎干细胞碱性磷酸酶染色。其中, 红色箭头所指为大鼠胚胎干细胞。标尺=100 μm。

A: AP staining of rESCs before nucleofection; B: AP staining of rESCs after nucleofection. The red arrow indicated rESCs. Scale bars=100 μm.

图2 核转染前后的大鼠胚胎干细胞碱性磷酸酶染色

Fig.2 Alkaline phosphatase staining of rESCs before and after nucleofection

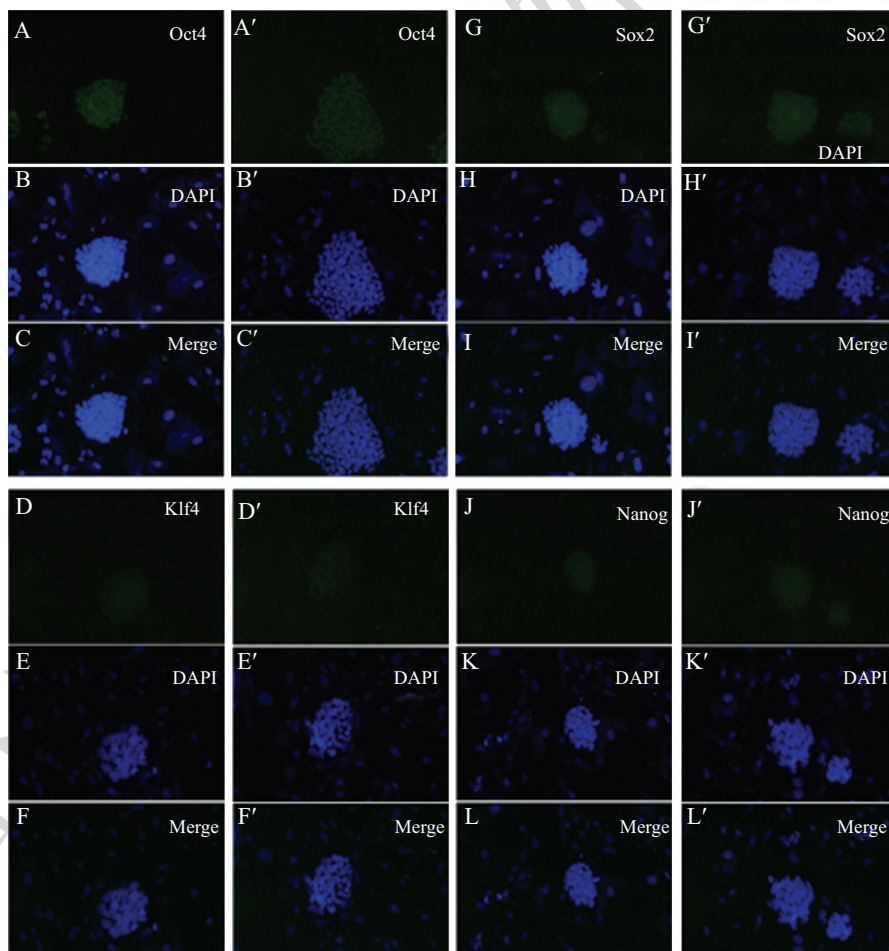


1: RT-PCR扩增的大鼠心肌纤维细胞的 *Oct4*、*Sox2*、*Nanog*、*Fgf4*和 $\beta$ -*actin*基因; 2: RT-PCR扩增的核转染后大鼠胚胎干细胞的 *Oct4*、*Sox2*、*Nanog*、*Fgf4*和 $\beta$ -*actin*基因; 3: RT-PCR扩增的核转染前大鼠胚胎干细胞的 *Oct4*、*Sox2*、*Nanog*、*Fgf4*和 $\beta$ -*actin*基因; 4: 以ddH<sub>2</sub>O为模板的对照组。其中, *Oct4*、*Sox2*、*Nanog*、*Fgf4*为干细胞多能性标志基因,  $\beta$ -*actin*为内参基因。

1: *Oct4*、*Sox2*、*Nanog*、*Fgf4*和 $\beta$ -*actin* gene of rat cardiac fibroblasts by RT-PCR; 2: *Oct4*、*Sox2*、*Nanog*、*Fgf4* and  $\beta$ -*actin* gene of rESCs after nucleofection by RT-PCR; 3: *Oct4*、*Sox2*、*Nanog*、*Fgf4* and  $\beta$ -*actin* gene of rESCs before nucleofection by RT-PCR; 4: control with ddH<sub>2</sub>O template. *Oct4*、*Sox2*、*Nanog* and *Fgf4* were ESCs marker genes, and  $\beta$ -*actin* was the control gene.

图3 核转染前后大鼠胚胎干细胞的干细胞多能性标志基因的RT-PCR检测

Fig.3 RT-PCR of ESC marker genes of rESCs before and after nucleofection



A、B、C、D、E、F、G、H、I、J、K、L: 核转染前大鼠胚胎干细胞免疫荧光染色(200 $\times$ ); A'、B'、C'、D'、E'、F'、G'、H'、I'、J'、K'、L': 核转染后大鼠胚胎干细胞免疫荧光染色(200 $\times$ )。其中, DAPI表示细胞核染色结果。

A,B,C,D,E,F,G,H,I,J,K,L: immunostaining of rESCs before nucleofection (200 $\times$ ); A',B',C',D',E',F',G',H',I',J',K',L': immunostaining of rESCs after nucleofection (200 $\times$ ). DAPI was the immunostaining of cell nucleus.

图4 核转染前后大鼠胚胎干细胞的干细胞多能性因子的免疫荧光检测

Fig.4 Immunostaining of ESC markers of rESCs before and after nucleofection



转染前比较, 未见明显变化(图1)。

### 2.3 核转染前后大鼠胚胎干细胞的干细胞特性的检测

对转染前后的大鼠胚胎干细胞进行碱性磷酸染色, 转染后的大鼠胚胎干细胞染色结果与转染前比较无明显差别。结果表明, 转染前后的细胞均处于多能性激活状态(图2)。

进一步利用 RT-PCR 方法检测转染前后大鼠胚胎干细胞的干细胞多能性标志基因 *Oct4*、*Nanog*、*Sox2*、*Fgf4* 的表达情况, 结果表明, 以大鼠心肌成纤维细胞作为阴性对照, 核转染前后的大鼠胚胎干细胞在上述多能性标志基因的表达情况无明显差异(图3)。同时, 利用免疫荧光染色的方法检测了核转染前后的大鼠胚胎干细胞, 均检测到了 *Oct4*、*Nanog*、*Sox2*、*Klf4* 等干细胞多能性因子的表达(图4); 且转染前后的大鼠胚胎干细胞中的 *Oct4*、*Nanog*、*Sox2*、*Klf4* 等多能性因子的表达情况无明显差别。

## 3 讨论

大鼠胚胎干细胞作为一类胚胎干细胞, 因其独特的物种特性, 一经建系成功就备受再生医学研究领域学者的关注。近几年来, 已有运用核转染技术转染胚胎干细胞的研究发表<sup>[21]</sup>, 但发表的研究中并未提到核转染技术在干细胞基因转染中的瞬时转染效率, 而且在转染后仍需药物筛选辅助来提高干细胞的转染效率。因此, 本实验尝试利用核转染技术将红色荧光蛋白表达载体质粒转染导入大鼠胚胎干细胞中, 并初步探讨该技术在干细胞瞬时转染方面的效率。

红色荧光蛋白是科学家 Matz 等<sup>[22]</sup>在珊瑚虫中分离出的与绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 同源的荧光蛋白, 在紫外光的激发下可发射红色荧光。本实验购置的红色荧光蛋白表达载体 pEF1alpha-DsRed-Express2 Vector 是由 Clontech 公司研制的, 该载体能够表达低毒、低寡聚化及成熟快的红色荧光蛋白<sup>[23]</sup>, 而且其表达的红色荧光蛋白具有荧光强度高、对细胞毒性小等特点, 因此可以作为较理想的细胞标志物。本实验使用核转染技术将红色荧光蛋白表达载体 pEF1alpha-DsRed-Express2 Vector 转染导入大鼠胚胎干细胞中, 使大鼠胚胎干细胞能够表达 RFP, 进而使后续的运用大鼠胚胎干细胞的实验可以更直观地观测结果, 便于实验的开展。

在运用核转染方法之前, 我们曾分别采用脂质体转染和传统电穿孔的方法将红荧光表达载体 pEF1alpha-DsRed-Express2 Vector 转染导入大鼠胚胎干细胞内, 但这两种方法的转染效率都很低。其中, 脂质体转染红荧光蛋白表达载体后的大鼠胚胎干细胞几乎未见红色荧光蛋白的表达, 而传统电穿孔获得的转染效率最高也只达到了 4.7%。这也印证了利用脂质体和传统电穿孔方法很难高效转染胚胎干细胞的结论<sup>[14-15]</sup>, 干细胞的细胞膜结构和干细胞群体生长的特征可能是导致这一结果的主要因素。鉴于这两种转染方法并不能高效地实现大鼠胚胎干细胞的基因转染, 我们采用了核转染技术对大鼠胚胎干细胞进行转染, 并比较了不同转染条件下大鼠胚胎干细胞的核转染效率。结果证明, 核转染大鼠胚胎干细胞的效率不仅显著高于脂质体转染和传统电穿孔技术, 且最高能够达到  $(39.63 \pm 1.75)\%$  的转染效率。

本研究表明, 经过核转染后的大鼠胚胎干细胞与转染前的细胞相比, 其碱性磷酸酶染色结果未发生明显变化; RT-PCR 和免疫荧光染色结果表明, 核转染技术并未对大鼠胚胎干细胞的干细胞特性造成明显影响。这些结果说明了核转染可以有效地将外源基因转染导入大鼠胚胎干细胞内, 并且不影响其干细胞的特性。因此, 该技术有望进一步应用于大鼠胚胎干细胞的基因修饰研究。

另外, 实验表明, 核转染试剂盒所提供的五个核转染条件均能有效地将编码红色荧光蛋白的 pEF1alpha-DsRed-Express2 Vector 质粒引入大鼠胚胎干细胞内, 其中转染条件 A-13 能够实现最高的转染效率  $(39.63 \pm 1.75)\%$ , 其造成的细胞死亡率  $(51.17 \pm 10.40)\%$  也未明显高于其他实验组。Kristi 等<sup>[2]</sup>在人类胚胎干细胞的基因转染中使用的转染条件 A-23 在本实验中的效率仅为  $(29.63 \pm 5.00)\%$ , 并无明显优势, 说明核转染的某一转染条件并不能广泛适用于所有类型的细胞, 转染条件 A-13 更适合于大鼠胚胎干细胞的基因转染。我们在分析这五个核转染条件下的细胞死亡率与转染效率之间的关系时发现, 核转染后的细胞死亡率为 50%~55% 时, 转染效率相对高。这与电转染的特点相吻合, 即转染效率及转染造成的细胞死亡率之间存在明显的相关性。这也提示我们, 对特定类型的细胞进行基因修饰研究前, 可以通过细胞死亡率的预实验选择出合适的核转染条件。

转染后,大鼠胚胎干细胞的荧光表达量在48 h时达到最大,但随后荧光表达量有所降低。这可能是由于编码RFP的质粒未稳定整合入大鼠胚胎干细胞的基因组内,导致编码RFP的基因只能实现瞬时表达,也可能是载体基因的启动子被大鼠胚胎干细胞沉默,从而使转入的基因不能稳定表达。因此,我们在后续的实验仍需进一步探究如何实现外源基因在转入大鼠胚胎干细胞后稳定表达。此外,我们在实验中还发现,核转染方法虽然在效率上优于其他转染方法,但也存在对细胞毒性较大、会引起较高的细胞死亡率的问题,这一问题需要我们在后续的实验条件优化加以解决。

综上所述,核转染技术仍不失为一种高效、便捷地将外源基因导入大鼠胚胎干细胞的基因转染方法,且其转染过程对大鼠胚胎干细胞的干细胞特性无明显影响。本实验研究结果为大鼠胚胎干细胞的相关研究提供了一定的方法和借鉴。

致谢——

衷心感谢中国科学院动物研究所的赵小阳研究员为本实验慷慨惠赠了实验材料,也感谢李天达老师对本实验提供了理论指导和技术支持。

### 参考文献 (References)

- 1 Smith AG. Embryo-derived stem cells: Of mice and men. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001; 17: 435-62.
- 2 Keller G. Embryonic stem cell differentiation: Emergence of a new era in biology and medicine. *Genes Dev* 2005; 19(10): 1129-55.
- 3 Jacob HJ. Functional genomics and rat models. *Genome Res* 1999; 9(11): 1013-6.
- 4 Mullins JJ, Ganten D. Transgenic animals: New approaches to hypertension research. *J Hypertens Suppl* 1990; 8(7): S35-7.
- 5 Brenin D, Look J, Bader M, Hübner N, Levan G, Iannaccone P. Rat embryonic stem cells: A progress report. *Transplant Proc* 1997; 9(3): 1761-5.
- 6 Prella K, Vassiliev IM, Vassilieva SG, Wolf E, Wobus AM. Establishment of pluripotent cell lines from vertebrate species—present status and future prospects. *Cells Tissues Organs* 1999; 165(3/4): 220-36.
- 7 Buehr M, Meek S, Blair K, Yang J, Ure J, Silva J, *et al.* Capture of authentic embryonic stem cells from rat blastocysts. *Cell* 2008; 135(7): 1287-98.
- 8 Li P, Tong C, Mehrian-Shai R, Jia L, Wu N, Yan Y, *et al.* Germline competent embryonic stem cells derived from rat blastocysts. *Cell* 2008; 135(7): 1299-310.
- 9 Tong C, Li P, Wu NL, Yan Y, Ying QL. Production of p53 gene knockout rats by homologous recombination in embryonic stem cells. *Nature* 2010; 467(7312): 211-3.
- 10 Yamamoto S, Nakata M, Sasada R, Ooshima Y, Yano T, Shinozawa T, *et al.* Derivation of rat embryonic stem cells and generation of protease-activated receptor-2 knockout rats. *Transgenic Res* 2012; 21(4): 743-55.
- 11 Cao N, Liao J, Liu Z, Zhu W, Wang J, Liu L, *et al.* *In vitro* differentiation of rat embryonic stem cells into functional cardiomyocytes. *Cell Res* 2011; 21(9): 1316-31.
- 12 Chew JL, Loh YH, Zhang W, Chen X, Tam WL, Yeap LS, *et al.* Reciprocal transcriptional regulation of Pou5f1 and Sox2 via the Oct4/Sox2 complex in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* 2005; 25(14): 6031-46.
- 13 Pfeifer A, Ikawa M, Dayn Y, Verma IM. Transgenes is by lentiviral vectors: Lack of gene silencing in mammalian embryonic stem cells and preimplantation embryos. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(4): 2140-5.
- 14 Vetere A, Marsich E, Di Piazza M, Koncan R, Micali F, Paoletti S. Neurogenin-3 triggers beta-cell differentiation of retinoic acid-derived endoderm cells. *Biochem J* 2003; 371(Pt 3): 831-41.
- 15 Li GB, Lu GX. Gene delivery efficiency in bone marrow-derived dendritic cells: Comparison of four methods and optimization for lentivirus transduction. *Mol Biotechnol* 2009; 43(3): 250-6.
- 16 Ma Y, Ramezani A, Lewis R, Hawley RG, Thomson JA. High-level sustained transgene expression in human embryonic stem cells using lentiviral vectors. *Stem Cells* 2003; 21(1): 111-7.
- 17 Zaehres H, Lensch MW, Daheron L, Stewart SA, Itskovitz-Eldor J, Daley GQ. High-efficiency RNA interference in human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2005; 23(3): 299-305.
- 18 Coonrod A, Li FQ, Horwitz M. On the mechanism of DNA transfection: Efficient gene transfer without viruses. *Gene Ther* 1997; 4(12): 1313-21.
- 19 Isakari Y, Harada Y, Ishikawa D, Matsumura-Takeda K, Sogo S, Ishida T, *et al.* Efficient gene expression in megakaryocytic cell line using nucleofection. *Int J Pharm* 2007; 338(1/2): 157-64.
- 20 Goffinet C, Keppler OT. Efficient nonviral gene delivery into primary lymphocytes from rats and mice. *FASEB J* 2006; 20(3): 500-2.
- 21 Hohenstein KA, Pyle AD, Chern JY, Lock LF, Donovan PJ. Nucleofection mediates high-efficiency stable gene knockdown and transgene expression in human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2008; 26(6): 1436-43.
- 22 Matz MV, Fradkov AF, Labas YA, Savitsky AP, Zaraisky AG, Markelov ML, *et al.* Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nat Biotechnol* 1999; 17(10): 969-73.
- 23 Yanushevich YG, Staroverov DB, Savitsky AP, Fradkov AF, Gurskaya NG, Bulina ME, *et al.* A strategy for the generation of non-aggregating mutants of Anthozoa fluorescent proteins. *FEBS Lett* 2002; 511(1/2/3): 11-4.