

山羊体细胞重编程过程中慢病毒对细胞的毒性作用

宋辉^{1,2}, 李卉^{1,2}, 王锋^{2*} (1. 宁夏医科大学生育力保持省部共建教育部重点实验室, 宁夏银川 750004; 2. 南京农业大学江苏省肉羊产业工程技术研究中心, 江苏南京 210095)

摘要 [目的] 检测慢病毒对普通山羊、克隆奶山羊和转基因克隆奶山羊的作用。[方法] 采用慢病毒作为载体感染普通山羊、克隆奶山羊(♂ 12001)和转基因克隆奶山羊(♀ 12003)体细胞, 通过细胞生长曲线, 检测慢病毒对3种山羊细胞的毒性作用。[结果] 感染后的3种体细胞在感染前3 d, 细胞大量凋亡, 4~7 d 筛选出的细胞大量增殖。未经慢病毒感染的3种细胞接种2 d 后数量开始明显增加, 第2~5 天进入对数生长期, 第5~7 天进入平台期, 呈现典型的“潜伏期-对数生长期-停滞期”生长模式。[结论] 慢病毒对细胞有毒性作用, 会引起细胞大量凋亡。
关键词 慢病毒; 细胞生长曲线; 凋亡
中图分类号 S858.27 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2017)35-0082-03

Cytotoxicity of Lentivirus to Goat during Somatic Reprogramming
SONG Hui^{1,2}, LI Hui^{1,2}, WANG Feng^{2*} (1. Key Laboratory of Fertility Preservation and Maintenance, Ningxia Medical University, Ministry of Education, Yinchuan, Ningxia 750004; 2. Jiangsu Engineering Technology Research Center of Meat Sheep & Goat Industry, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095)
Abstract [Objective] The aim is to detect the role of lentivirus in normal goats, cloned dairy goats and transgenic cloned dairy goats. [Methods] Using lentiviral vector infection as a common goat, cloned goats (male 12001) and transgenic cloned goats (female 12003) somatic cells by cell growth curve, toxic effect of lentivirus on three kinds of goat cell was detected. [Result] After infection, the three somatic cells were infected with 3 days, and the apoptosis of cells was large. The cells screened from 4 d to 7d proliferated greatly. Without the lentivirus infected three cells significantly increased after inoculation with 2 d, cells entered the logarithmic growth phase from 2nd day to 5th day, then entered the platform phase from 5th day to 7th day, it was a typical “latency-logarithmic growth period - the period of stagnation” growth mode. [Conclusion] Lentivirus plays a toxic role in cells and can cause apoptosis in a large number of cells.
Key words Lentivirus; Cell growth curve; Apoptosis

目前, 常用的病毒载体主要包括腺病毒、逆转录病毒和慢病毒3类^[1]。腺病毒具有宿主范围广、致病性低、不会整合到宿主基因组等优点, 但是转染效率低。逆转录病毒的转染效率比腺病毒高, 但是只能转染分裂期的细胞。慢病毒是逆转录病毒的一种, 不但可以转染分裂期的细胞, 还可以转染非分裂期的细胞, 大大提高了转染效率, 但是不论是逆转录病毒还是慢病毒都面临着一个问题: 宿主细胞毒性^[1-3]。

诱导性多能干细胞(Induced Pluripotent Stem Cells, iP-SCs)是由分化的体细胞通过转入特定基因诱导体细胞重编程成为多能干细胞, 避免了胚胎干细胞面临的伦理困境和免疫排斥等问题, 给干细胞研究领域带来革命性的变化^[4-6]。在试验过程中, 为了获得高转染效率, 很多试验人员选择慢病毒载体, 但是慢病毒对宿主细胞的毒害作用鲜有报道。细胞生长曲线是测定细胞绝对增长数值的常用方法, 也是检测细胞活力的重要指标。因此, 取地方品种山羊、克隆奶山羊和转基因克隆奶山羊未感染的第3代处于对数生长期的细胞及对应的病毒感染后的细胞, 以培养时间为横坐标, 细胞密度为纵坐标绘制生长曲线, 从而检测体细胞重编程过程中慢病毒对细胞的作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 DMEM 培养基、DMEM/F12 培养基、胎牛血

基金项目 教育部“春晖计划”(Z2016044); 高教一流学科师资队伍建设(30181601); 宁夏高等学校科学技术研究项目(NGY2016090)。
作者简介 宋辉(1983—), 男, 安徽淮南人, 讲师, 博士, 从事干细胞诱导分化研究。*通讯作者, 教授, 博士生导师, 从事动物遗传育种与繁殖研究。
收稿日期 2017-09-20

清(FBS)、非必需氨基酸、双抗、无钙镁 PBS 缓冲液、胰蛋白酶、谷氨酰胺、β-巯基乙醇均购置于美国 Life 公司。

1.2 方法

1.2.1 质粒的转化。将 TOP10 感受态细胞从 -80 ℃ 冰箱取出, 在冰上融化。将 5 μL 高浓度 GOF-18 质粒加入感受态细胞中, 轻晃混匀, 冰上放置 30 min。42 ℃ 热休克 90 s, 不要摇动试管。快速转移至冰浴中, 冷却 2 min。加 500 μL 无抗生素的普通 LB 培养基, 37 ℃, 150 r/min 复苏 45 min。用无菌接种棒将 200 μL 菌液铺于含抗生素的平板上, 37 ℃ 正置 20 min。倒置平板, 37 ℃ 培养 12~16 h, 4 ℃ 保存。

1.2.2 质粒小量制备提取(试剂盒抽提法)。按 Omega 质粒小提试剂盒操作手册抽提质粒, 步骤如下: 取菌液 5~10 mL, 室温 12 000 r/min 离心 2 min, 弃上清。加入 250 μL Buffer S1, 涡旋。加入 250 μL Buffer S2, 上下翻转 5~7 次。加入 350 μL Buffer S3, 上下翻转数次, 室温静置 2 min。12 000 r/min, 离心 10 min。吸取 700 μL 上清液到吸附柱中, 11 000 r/min, 离心 1 min。加 500 μL Buffer HD, 离心同上。加 700 μL Wash Buffer, 离心同上。重复上面的步骤一次。倒去上清液, 空离 1 次, 12 500 r/min, 离心 3 min。取出柱子, 放到无菌 1.5 mL 离心管中, 向柱子中央加入 65 ℃ 预热的 Eluent Buffer 80 μL, 室温静置 2 min, 12 500 r/min, 离心 2 min。用紫外分光光度计测定质粒的浓度和纯度。

1.2.3 细胞复苏、传代和冻存。将冻存细胞从液氮罐里取出, 投入到 37 ℃ 恒温水浴锅中, 迅速解冻, 接种到培养瓶中。当细胞汇合到 80% 以上, 用胰酶进行消化传代, 多余的细胞加冻存液放到冻存管里, 依次放到 4 ℃ 冰箱里 30 min,

-20 ℃冰箱 1~2 h, -80 ℃冰箱过夜,最后放到液氮里长期保存。山羊成纤维细胞使用 F3 代细胞,293FT 细胞解冻后,传代 2~3 次,调整好细胞状态进行病毒包装。

1.2.4 慢病毒包装。将 293FT 细胞传至 T75 的培养瓶中,细胞贴壁后换为无抗生素培养基培养至细胞汇合度达 80%~90%。准备 5 个 10 mL 离心管,前 4 个加 1.5 mL OPTI-MEM,最后一个加 6 mL,依次编号①、②、③、④、⑤。将脂质体 LIPFACTIN 2000 轻轻摇一摇,⑤号管中先吸出 260 μL OPTI-MEM,再加 260 μL(65ULX4)脂质体,上下倒置混匀。向①、②、③、④号管中加包装载体 PAPX:8 μg,PMD:4 μg,并且分别加 4 种因子 12 μg,用手指轻叩管底,混匀,室温放置 5 min。将离心管⑤号管中的溶液分别向①、②、③、④号管各加 1.5 mL,用手指轻叩管底,记时 20 min 到 4 h。293FT 细胞每个瓶子上标号,①、②、③、④号离心管补加到 10 mL,将 293FT 细胞中的培养液吸出,换成 4 个离心管中的溶液。8~11 h 后换成体细胞培养液。转染后 48 h 和 72 h 分别收集病毒,然后用 0.45 μm 滤器过滤后,超低温离心机 4 000 r/min,4 ℃,离心 30 min,进行病毒浓缩,分装后冻于 -80 ℃冰箱。

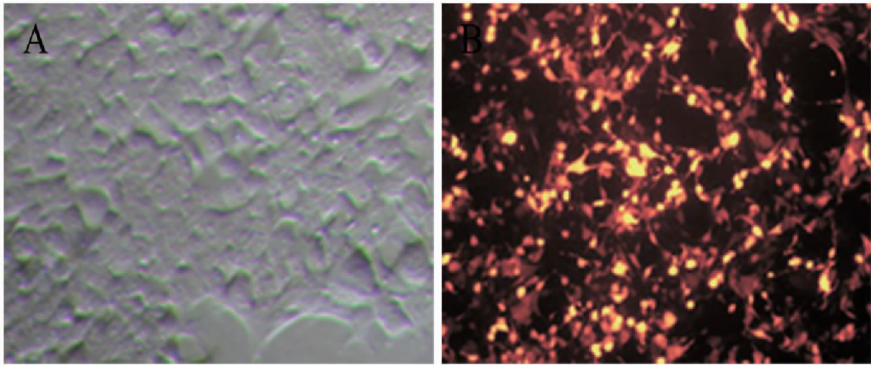
1.2.5 包装病毒质量的检测。在 24 孔板的 9 个孔中铺

293FT 细胞,编号①、②、③、④、⑤、⑥、⑦、⑧、⑨。当细胞密度达 70%~80% 的汇合度时,每个孔加 0.5 mL 培养液,在①、②、③、④孔中分别加适量的 4 种病毒浓缩液:OCT4、SOX2、KLF4 和 CMYC,在⑤、⑥、⑦、⑧孔中分别加适量的 4 种病毒原液:OCT4、SOX2、KLF4 和 CMYC,第⑨个孔什么都不加。40 h 后在荧光显微镜下观察荧光表达。

1.2.6 细胞生长曲线绘制。用胰酶消化羊耳成纤维细胞,用含有病毒感染液的培养液将细胞吹成单细胞悬液,接种到培养板上。取地方品种山羊、克隆奶山羊和转基因克隆奶山羊未感染的第 3 代处于对数生长期的细胞和对应的病毒感染后的细胞,接种于 24 孔培养板中,按 1×10^4 个/mL 的密度,每孔接种 1 mL。接种时记为 0 小时,每隔 24 h 对 3 孔内的细胞密度进行计数,计算平均值,一共计数 7 d。以培养时间为横坐标,细胞密度为纵坐标绘制生长曲线。

2 结果与分析

2.1 病毒质量检测 病毒感染 40 h 后,在荧光显微镜下可以观察到 293FT 细胞带有红色荧光(图 1),说明包装的病毒质量很好,而且浓缩病毒感染后的 293FT 细胞的荧光强度要强于病毒原液感染后 293FT 细胞的荧光强度。



注:A. 明场, B. 荧光
Note: A. Bright, B. Fluorescence

图 1 病毒感染 293FT 细胞
Fig. 1 293FT cells transfected by virus

2.2 诱导前后细胞变化特征 3 种细胞接种 2 d 后数量明显增加,第 2~5 天进入对数生长期,第 5~7 天进入平台期,呈现典型的“潜伏期-对数生长期-停滞期”生长模式(图 2、3、4)。而感染后的 3 种体细胞在感染前 3 d,细胞大量凋亡(图 5A)。4~7 d 筛选出的细胞大量增殖(图 5B)。

3 结论与讨论

实验室已经成功地批量生产转基因克隆奶山羊,通过检测发现,转基因 *hLF* 已经很好地整合到这些克隆羊的基因组中^[7]。取地方品种山羊、克隆奶山羊和转基因克隆奶山羊未感染的第 3 代处于对数生长期的细胞及对应的病毒感染后的细胞,以培养时间为横坐标,细胞密度为纵坐标绘制生长曲线。3 种细胞接种 2 d 后数量开始明显增加,第 2~5 天进入对数生长期,第 5~7 天进入平台期,呈现典型的“潜伏期-对数生长期-停滞期”生长模式。而感染后的 3 种体细胞在感染前 3 d,由于病毒的侵染,引起了细胞免疫应答,相

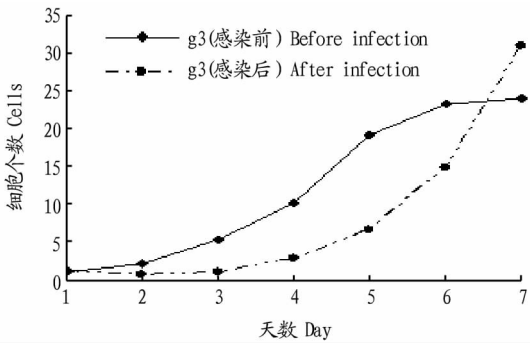


图 2 普通羊诱导前后细胞生长曲线
Fig. 2 Growth curves of uninduced and induced goat fibroblast cells

关基因的表达,外源 dsRNA 和多肽引起细胞凋亡,氧化还原,DNA 重置和抗原反应。由于病毒侵入引起的这些突出的生物学过程还伴随着细胞凋亡,0~4 d 细胞增殖速度加快,

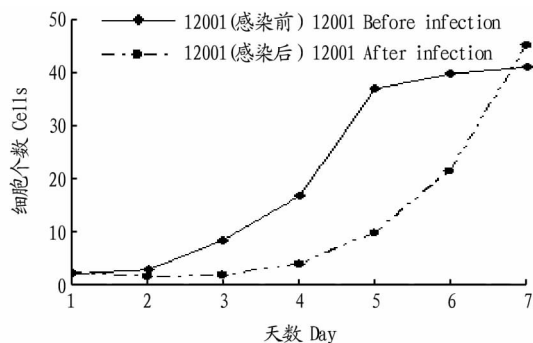


图3 ♂ 12001 诱导前后细胞生长曲线

Fig.3 Growth curves of uninduced and induced ♂ 12001 fibroblast cells

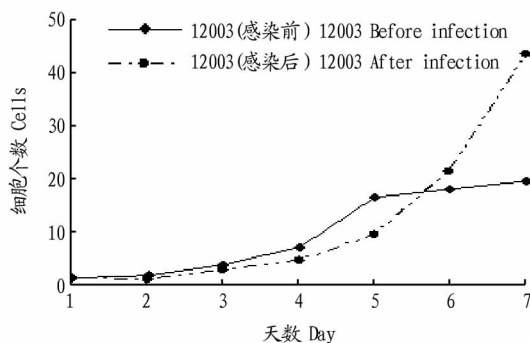


图4 ♀ 12003 诱导前后细胞生长曲线

Fig.4 Growth curves of uninduced and induced ♀ 12003 fibroblast cells

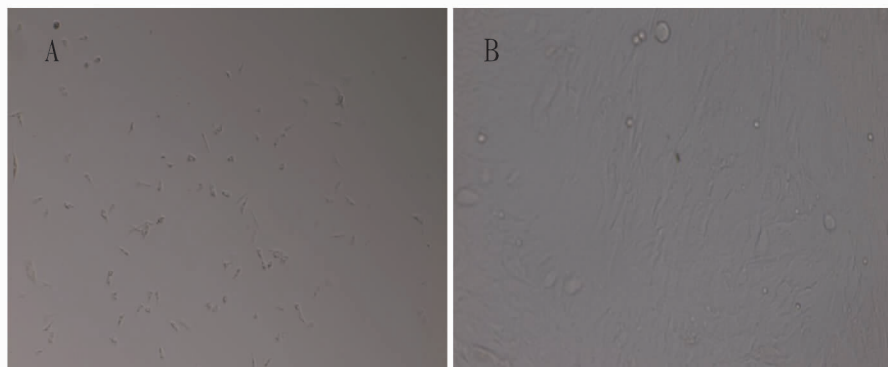


图5 ♀ 12003 诱导后3 d(A)和7 d(B)的细胞形态

Fig.5 ♀ 12003 induced cell morphology 3 days(A) and 7 days(B) after induction

但是伴随有大量的诱导凋亡的过程。这个时间段的作用可能是使外源转录因子融入细胞,并筛选更加强壮的病毒感染后的细胞,4~7 d 筛选出的细胞大量增殖。

参考文献

- [1] TAMURA T, KANUMA T, NAKAZATO T, et al. A new system for regulated functional gene expression for gene therapy applications: Nuclear delivery of a p16INK4A-estrogen receptor carboxy terminal fusion protein only in the presence of estrogen[J]. International journal of oncology, 2010, 36(4): 905-912.
- [2] MAUTINO M R. Lentiviral vectors for gene therapy of HIV-infection[J]. Curr Gene Ther, 2002, 2(1): 23-43.
- [3] SCHAMBACH A, BAUM C. Clinical application of lentiviral vectors-con-

cepts and practice[J]. Curr Gene Ther, 2008, 8(6): 474-482.

- [4] TAKAHASHI K, YAMANAKA S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors[J]. Cell, 2006, 126: 663-676.
- [5] 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.
- [6] YU J Y, VODYANIK M A, THOMSON J A, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells[J]. Science, 2007, 318(5858): 1917-1920.
- [7] WAN Y J, ZHANG Y L, ZHOU Z R, et al. Efficiency of donor cell preparation and recipient oocyte source for production of transgenic cloned dairy goats harboring human lactoferrin[J]. Theriogenology, 2012, 78(3): 583-592.

(上接第81页)

交试验结果,红茶箱式提香的工艺参数应控制在含水量6%左右,提香机温度控制在95~105℃,提香时间20 min左右。

参考文献

- [1] 龚淑英,鲁成银,刘栩,等. 茶叶感官审评方法:GB/T 23776—2009[S]. 北京:中国标准出版社,2008.
- [2] 张正竹. 茶叶生物化学实验教程[M]. 北京:中国农业出版社,2009.

- [3] 周卫龙,孙安华,钟梦. 茶水浸出物测定:GB/T 8305—2002[S]. 北京:中国标准出版社,2002.

- [4] 严峻,林刚. 测色技术在茶叶色泽及品质评价中的应用研究(一)表色系的选择[J]. 茶叶通报,1995,17(1): 7-9.
- [5] 严峻,林刚. 测色技术在茶叶色泽及品质评价中的应用研究(二)茶叶色泽的测定[J]. 茶叶通报,1995,17(2): 1-3.
- [6] 严俊,林刚,赖国亮,等. 测色技术在炒青绿茶品质评价中的应用研究[J]. 食品科学,1996,17(7): 21-24.

科技论文写作规范——题名

以最恰当、最简明的词句反映论文、报告中的最重要的特定内容,题名应避免使用不常见的缩略语、首字母缩写词、字符、代号和公式等。一般字数不超过20字。英文与中文应相吻合。英文题名词首字母大写,连词及冠词除外。