

文章编号: 1674 - 5566(2012)03 - 0331 - 06

绿色荧光蛋白在 *IGF2b* 基因慢病毒载体感染鲤受精卵中的标记效果

苏胜彦^{1,2}, 陈为先¹, 马佳璐¹, 张勇¹, 胡鹏晨¹, 闻剑旻¹, 张成锋²,
董在杰^{1,2,3}, 袁新华^{1,2}, 徐跑^{1,2}

(1. 南京农业大学 无锡渔业学院, 江苏 无锡 214081; 2. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心 农业部淡水渔业种质资源利用重点实验室, 江苏 无锡 214081; 3. 南京农业大学 动物科技学院, 江苏 南京 210095)

摘要: 以水母绿色荧光蛋白基因为模板进行 PCR 扩增得到目的基因(Green fluorescence protein, GFP), 然后加上酶切位点 *Bam*HI 和 *Nhe*I, 构建 pLenti6.3-IRES-EGFP 载体, 转染 DH5 α 感受态细胞进行菌落 PCR, 取阳性进行酶切鉴定, 再取呈阳性的质粒进行测序, 使用浓度为 1 μ g/ μ L 的质粒与慢病毒表达载体进行连接, 通过荧光显微镜观察到绿色荧光, 表明本实验获得的 GFP 和慢病毒载体整合成功; 用此转染 293T 细胞, 通过荧光显微镜同样检测到了绿色荧光。使用建鲤的组织提取 RNA, 然后按照 Fermentas 公司的 M-MLV 操作说明书进行反转录, 得到 *IGF2b* 基因后加酶切位点进行扩增, 将 *IGF2b* 整合到用 GFP 作为标记基因的慢病毒载体上, 再以此转染建鲤未分裂的受精卵, 48 h 后通过荧光显微镜也观察到了绿色荧光蛋白的表达。试验表明绿色荧光蛋白在 *IGF2b* 基因慢病毒载体感染鲤受精卵中的标记是成功的。这些结果为基于含有 GFP 慢病毒转基因鱼育种技术的开发奠定了基础。

研究亮点: 试验通过构建用 GFP 标记的含有鲤 *IGF2b* 基因的慢病毒载体转染 293T 细胞、建鲤受精卵, 来研究绿色荧光蛋白在慢病毒转基因鱼中的标记效果。发现其在感染 293T 细胞、建鲤受精卵后, 均可观察到绿色荧光的表达, 说明通过 GFP 标记慢病毒转基因鱼是可行的, 这将有助于基于转基因技术的鱼类育种的发展。

关键词: 绿色荧光蛋白; 慢病毒载体; *IGF2b*; 标记效果

中图分类号: S 917

文献标志码: A

绿色荧光蛋白基因不仅可作为基因表达的标签或经改构后的融合蛋白用于亚细胞定位, 而且可在体外或原位实时监测, 当前, 应用最为广泛的是波长为 490 nm 红移变体增强型 GFP (EGFP)。1995 年, IKAWA 等^[1]首次将以 GFP 为基础的荧光蛋白报告系统应用于小鼠, 成功利用 GFP 快速无创地筛选转基因胚胎。2007 年, 东北农业大学的科学家用脂质体转染猪胎儿成纤维细胞, 筛选绿色荧光蛋白基因转染的阳性细胞作为核供体进行体细胞核移植, 成功构建出绿色荧光蛋白转基因猪^[2]。

在报告基因的基础上, 合适的载体是研究基因功能、构建转基因动物的有力工具。慢病毒载

体(lentiviral vector)源于 HIV1^[3], 以慢病毒基因组为基础, 转移容量大, 无毒性且不易诱发宿主免疫反应, 安全性较好, 不仅能感染分裂细胞, 而且能转染终末分化细胞和非分裂细胞, 整合于靶细胞基因组的目的基因能够长期、稳定表达^[4]。慢病毒载体常用于基因功能的研究^[5-7], 使功能基因用于疾病治疗、转基因动物的生产^[8]、农业上提高家畜生产性能^[9-10]等。因此, 构建含有绿色荧光蛋白的慢病毒载体将成为研究鲤功能基因的重要手段。

本研究利用慢病毒载体链接绿色荧光蛋白, 构建了只含有绿色荧光蛋白基因的慢病毒载体, 通过以 GFP 为标记基因, 鲤 *IGF2b* 为目的基因构

收稿日期: 2011-10-26 修回日期: 2011-12-09

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项(CARS-46); 国家“十一五”科技支撑计划项目(2006BAD01A1208); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(2009JBF01); 江苏省自然科学基金(BK2010146)

作者简介: 苏胜彦(1982—), 男, 博士, 研究方向为分子数量遗传学。E-mail: susy@ffrc.cn

通讯作者: 徐跑, E-mail: xup@ffrc.cn

建用于转基因研究和靶基因功能研究的慢病毒载体,并在体内和体外 2 个水平上进行绿色荧光检测,为研究功能基因对鲤生长发育、产肉性能等作用奠定基础。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

试验鱼为来自中国水产科学研究院淡水渔业研究中心的建鲤,试验所用细胞株为 293T 细胞,为贴壁依赖型上皮样细胞,细胞生长所需培养基为 DMEM + 10% FBS。

1.2 慢病毒载体的构建

1.2.1 慢病毒表达载体 pLenti6.3-IRES-EGFP 的构建与包装

以本实验室获取的 T-GFP 载体为模板,PCR 扩增目的片段,在目的片段两端添加酶切位点 *Bam*HI 和 *Nhe*I。回收 PCR 产物,用 *Bam*HI 和 *Nhe*I 双酶切 PCR 回收产物,*T*₄ DNA ligase 连接回收产物至 TVector pMD19-T simple,取 10 μ L 连接液转化 DH5 α 感受态细胞,挑取单菌落进行菌落 PCR,后将菌落 PCR 鉴定呈阳性的质粒进行酶切鉴定,将菌落 PCR 和酶切鉴定均呈阳性的克隆送测序,并进行序列比对,保留测序验证正确的质粒。

将测序正确的对照质粒 pLenti-EGFP 菌液划线培养,并测定质粒浓度:质粒 DNA 最终溶于除菌的 TE 中,以 ThermoNanodrop 仪器测定质粒浓度及纯度,保证抽提质粒的浓度在 1 μ g/ μ L 左右。转染时(细胞状态良好,贴壁牢,密度在 50% ~ 70% 时可用于转染),向无菌的 1.5 mL 离心管中加入 750 μ L Opti-MEM,然后向其中加入所制备的各 DNA 溶液,慢病毒表达质粒 6 μ g,包装质粒 Packaging Mix 6 μ g,混合均匀,在室温下温育 5 min。同时,在另一无菌的 1.5 mL 离心管中加入 750 μ L Opti-MEM,向其中加入 POLOdelivererTM3000 Transfection Reagent 24 μ L,轻轻混匀,室温下温育 5 min。把稀释后的 DNA 与稀释后的 POLOdelivererTM3000 Transfection Reagent 混合,轻轻地颠倒混匀,不要振荡。此步必须在 5 min 之内混合,混匀后,在室温下温育 20 min,以便形成 DNA 与 POLOdelivererTM3000 Transfection Reagent 的复合物。取 1.5 mL DNA

与 POLOdelivererTM3000 Transfection Reagent 混合液均匀地滴加在 293T 细胞的培养液中,前后左右摇匀,于 37 $^{\circ}$ C,5% CO₂ 细胞培养箱中培养。

1.2.2 慢病毒滴度测定(荧光显微镜观察法)

感染前一天,用胰蛋白酶消化细胞并计数,准备每毫升 5×10^5 个细胞的 293T 细胞接种 24 孔板,每孔 0.5 mL。细胞接种后第二天,根据病毒的预期滴度,准备 3 个无菌的 EP 管,10 倍倍比稀释慢病毒浓缩液。13 μ L 慢病毒原液 + 117 μ L DMEM \rightarrow 10^{-1} 病毒液,13 μ L 10^{-1} 病毒液 + 117 μ L DMEM \rightarrow 10^{-2} 病毒液。细胞换液,每孔内加入 500 μ L 无抗生素的 DMEM + 10% FBS 培养液,除对照组外其余各孔均加入 polybrene 至终浓度为 8 μ g/mL。各感染孔内分别加入相应稀释度的病毒液及病毒原液 100 μ L,放入 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的培养箱内。感染 24 h 后换液,每孔内加入 500 μ L DMEM + 10% FBS + 1% Pen-Strep,继续放回培养箱内进行孵育。感染 72 h 后观察荧光表达情况,选取合适的稀释度对应的孔,对 GFP 阳性的细胞进行计数,并依此计算待测慢病毒的滴度。计算感染形成单位 D_u (ifu/mL):

$$D_u = \frac{A \times C}{V \times N} \quad (1)$$

式中:A 为平均阳性细胞数/视野;C 为视野数/孔;V 为病毒体积(mL);N 为稀释倍数。

1.3 RNA 提取和反转录

每 50 ~ 100 mg 组织加入 1 mL Trizol,用匀浆器进行匀浆,直至匀浆液无颗粒透明状,将裂解液转移至离心管中,在室温下放置 5 min,使得核酸蛋白复合物完全分离。4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min 离心 15 min,然后小心吸取上清,并转移至新的无 RNase 的离心管中。每管加入 200 μ L 氯仿,用手上下颠倒 eppendorf 管 15 s,室温静置 15 min,4 $^{\circ}$ C,12 000 r/min,离心 15 min。吸取上清移至新的 1.5 mL ep 管,加入等体积 -20 $^{\circ}$ C 预冷的异丙醇,混匀后 -20 $^{\circ}$ C 沉淀 10 min。4 $^{\circ}$ C,12 000 r/min 离心 10 min 后,去上清,加入至少 1 mL 4 $^{\circ}$ C 预冷的 75% 乙醇,洗涤沉淀,4 $^{\circ}$ C,10 000 r/min 离心 5 min,弃上清。吸水纸吸去残液,室温干燥。加入 20 μ L RNase-free 水,至完全溶解,紫外分析测定所抽提 RNA 的浓度。根据 Fermentas 公司的 M-MLV 操作说明书进行反转录。

1.4 *IGF2b* 基因慢病毒载体的构建

针对鲤 *IGF2b* 基因 (AF402958) 的 CDS (Coding domain sequence) 区序列设计并合成含

有酶切位点的 PCR 引物 (表 1), 进行 PCR 扩增, 并进行测序验证, 最后参照上述方法构建慢病毒载体, 然后荧光显微镜观察。

表 1 扩增 *IGF2b* 基因全长的引物序列

Tab.1 The primers of amplified full-length *IGF2b*

引物名称	引物序列	产物大小
<i>IGF2b</i> - <i>Bam</i> HI-F (bp1)	GATCATA C GGATCC GCCACCATGGAGGACCAACTAAAACATCA	658 bp
<i>IGF2b</i> - <i>Nhe</i> I-R (bp624C)	CAGTTGAC GCTAGC TCATCGACTCTGTGCAAAAAGG	

注: 黑体灰色底纹分别为酶切位点 *Bam* HI 和 *Nhe* I。

2 结果

2.1 含有 GFP 慢病毒载体的构建及滴度检测

2.1.1 慢病毒表达质粒的包装和含有 GFP 表达

构建的含有 GFP 基因慢病毒载体在荧光显微镜下观察图如下: 从图 1 中可以看出, 含有 GFP 基因的处理组有 GFP 表达, 说明包装有 GFP 的慢病毒质粒是成功的。

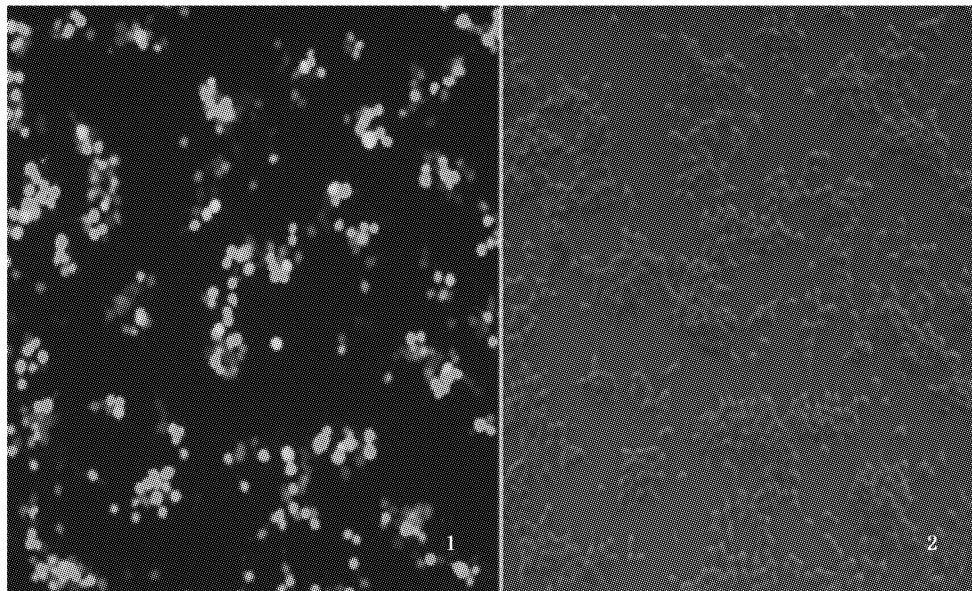


图 1 慢病毒表达质粒及包装质粒共转染 293T 细胞

Fig.1 Lentiviral expression plasmid and packaging plasmids co-transfected 293T cells

1 和 2 为 pLenti-EGFP Normal Control; 1 为荧光检测; 2 为对照组。

2.1.2 慢病毒滴度测定

为了确定构建的慢病毒载体的浓度, 并能为下一步慢病毒感染细胞、活鱼做基础, 我们用荧光显微镜测定了滴度。在 20 倍物镜 \times 10 倍目镜下, 从 10^{-2} 孔内各随机选取 3 个视野, 加入 100 μ L 病毒液, 获得了阴性对照 Lenti-EGFP NC 滴度为 3.04×10^6 。

2.1.3 用 GFP 标记的含有 *IGF2b* 基因慢病毒表达质粒及包装质粒共转染 293T 细胞

构建的 *IGF2b* 基因慢病毒载体在荧光显微镜下观察如图 2。从图 2 中可以看出, 含有 *IGF2b* 基因的质粒有 GFP 表达。

2.2 慢病毒感染鲤受精卵后的标记效果

用 GFP 作为标记基因的 *IGF2b* 载体感染未分裂的受精卵, 48 h 后通过荧光显微镜观察到了绿色荧光蛋白的表达, 而对照组没有发现绿色。如图 3 所示。

3 讨论

绿色荧光蛋白是进行转基因研究的重要标记基因,通过绿色荧光蛋白转基因动物的研究可以为其他各类具有重要应用价值的转基因动物的研究提供良好的基础数据^[2,11]。在鱼类研究上,通过绿色荧光蛋白(GFP)基因,龙华等对嵌合

体的转基因青鳉(F_1)进行了两代的杂合体(F_2 和 F_3)筛选和一代的纯合体筛选,获得第4代转基因青鳉纯系品种^[12]。喻丹等通过精子载体法获得转 GFP 基因文昌鱼活体胚胎^[13]。因此,绿色荧光蛋白(GFP)基因可用于转基因鱼的开发,并且有助于基于转基因技术的鱼类育种。

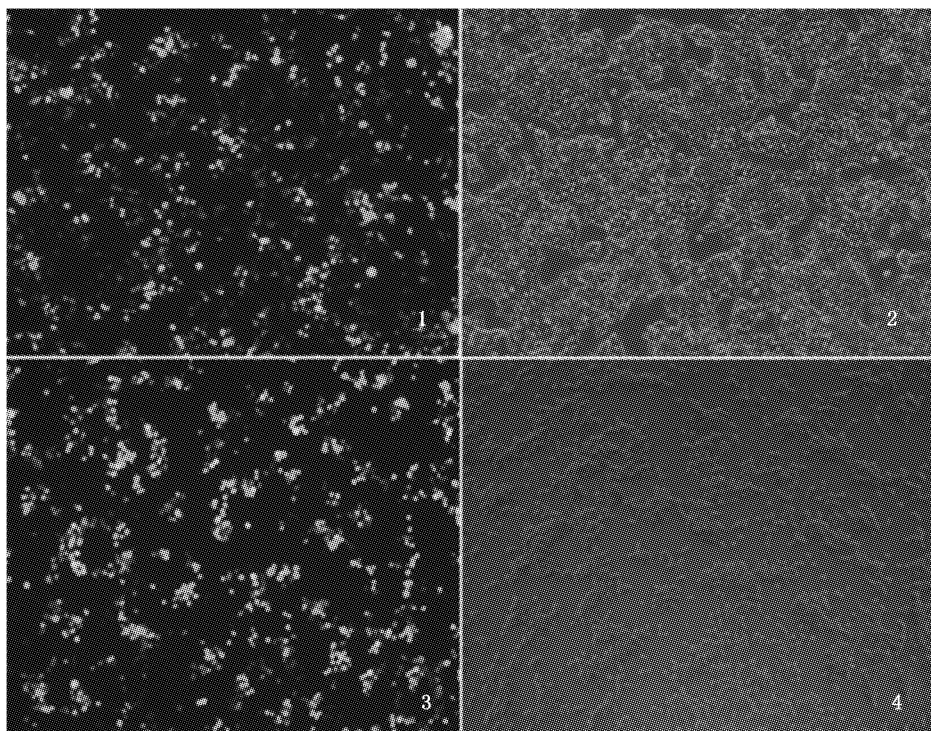


图2 慢病毒表达质粒及包装质粒共转染 293T 细胞

Fig. 2 Lentiviral expression plasmid and packaging plasmids co-transfected 293T cells

1 和 2: pLenti-IGF2b-IRES-EGFP; 3 和 4: pLenti-EGFP Normal Control; 1 和 3 为荧光检测, 2 和 4 为对照组。

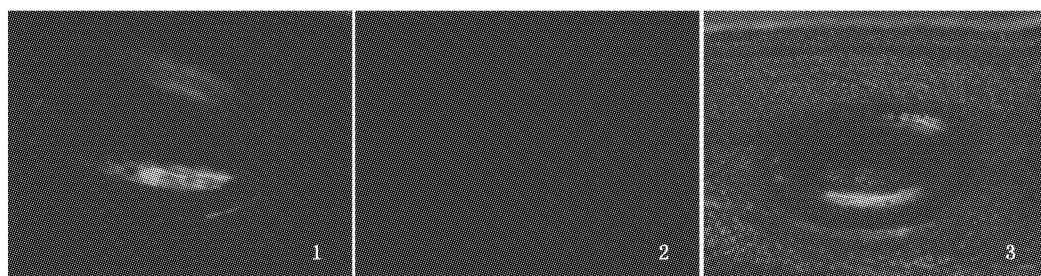


图3 慢病毒感染鲤受精卵后的标记效果

Fig. 3 Result of lentiviral contained IGF2b vector infected common carp fertilized egg

1. 慢病毒感染组; 2. 对照组; 3. 明场视野下慢病毒感染组。

以 GFP 标记,通过病毒载体获得转基因动物成为近年来研究的热点。孟宇航等以腺病毒和

GFP 感染的鸭胚,在 24 ~ 72 h 能在鸭胚肝脏及心肌细胞中表达,在感染后 1 ~ 5 d, GFP 基因可在

雏鸭肝脏、脾脏、腔上囊中稳定表达^[14]。张敬之等^[15]以慢病毒载体为骨架,将携带绿色荧光蛋白(GFP)基因的假病毒,通过小鼠受精卵周隙注射,证明了 GFP 基因的整合率达到 40% 以上,染色体荧光原位杂交分析结果显示 GFP 基因在小鼠染色体上的整合是随机的,并通过交配可将外源基因遗传至子代,获得的多整合位点和不同表达水平的转基因小鼠具有明显的实际应用和研究价值。本文通过构建含有 GFP 标记基因的慢病毒载体,检测其感染 293T 细胞后,观察到绿色荧光的表达,通过含有 GFP 标记基因的含有鲤 *IGF2b* 基因慢病毒感染鲤受精卵的试验,发现 GFP 可在鱼苗中表达,这充分说明通过 GFP 标记慢病毒转基因鱼是可行的。

参考文献

- [1] IKAWA M, KOMINAMI K, YOSHIMURA Y, et al. Green fluorescent protein as a marker in transgenic mice [J]. *Development, Growth & Differentiation*, 1995, 37(4): 455 - 459.
- [2] 刘忠华, 宋军, 王振坤, 等. 体细胞核移植生产绿色荧光蛋白转基因猪 [J]. *科学通报*, 2008, 53(5): 556 - 560.
- [3] JAKOBSSON J, LUNDBERG C. Lentiviral vectors for use in the central nervous system [J]. *Molecular therapy*, 2006, 13(3): 484.
- [4] COCKRELL A, KAFRI T. Gene delivery by lentivirus vectors [J]. *Molecular Biotechnology*, 2007, 36(3): 184 - 204.
- [5] ZHANG L, PROCUIK M, FANG T, et al. Functional analysis of the quantitative expression of a costimulatory molecule on dendritic cells using lentiviral vector-mediated RNA interference [J]. *Journal of Immunological Methods*, 2009, 344: 87 - 97.
- [6] 刘真, 甄艳, 于晓黎, 等. 人 *NESG1* 基因慢病毒载体的构建及其在 293FT 细胞中的表达 [J]. *南方医科大学学报*, 2011, 31(1): 65 - 68.
- [7] 汤展毅, 严云勤, 高学军, 等. 牛 *myf6* 基因真核表达载体的构建及在成肌细胞中的表达 [J]. *中国农业科学*, 2010, 43(13): 2793 - 2799.
- [8] MOTONO M, YAMADA Y, HATTORI Y, et al. Production of transgenic chickens from purified primordial germ cells infected with a lentiviral vector [J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2010, 109(4): 315 - 321.
- [9] KEEN J, HUNGERFORD L, LITLEDIKE E, et al. Effect of ewe ovine lentivirus infection on ewe and lamb productivity [J]. *Preventive Veterinary Medicine*, 1997, 30: 155 - 169.
- [10] BLASCO A. The role of genetic engineering in livestock production [J]. *Livestock Science*, 2008, 113(2/3): 191 - 201.
- [11] 徐世永, 丁红梅, 孙岩, 等. 慢病毒载体介导外源基因在不同细胞及鸡体不同组织中的表达 [J]. *南京农业大学学报*, 2008, 31(3): 61 - 66.
- [12] 龙华, 木下政人. GFP 标记在转基因青鳞同系繁殖纯化中的应用 [J]. *遗传*, 2003, 25(4): 409 - 413.
- [13] 喻丹, 张培军. 精子载体法转 GFP 基因文昌鱼活体胚胎的获得 [J]. *科学通报*, 2005, 50(4): 402 - 404.
- [14] 孟宇航, 汤承, 杨发龙, 等. 腺病毒载体介导 GFP 基因在鸭胚和雏鸭体内的表达 [J]. *西南民族大学学报: 自然科学版*, 2008, 34(3): 491 - 494.
- [15] 张敬之, 郭歆冰, 谢书阳, 等. 用慢病毒载体介导产生绿色荧光蛋白(GFP)转基因小鼠 [J]. *自然科学进展*, 2006, 16(5): 571 - 577.

Flag results of GFP in fertilized eggs infected by lentiviral vector contained common carp (*Cyprinus carpio* L.) *IGF2b*

SU Sheng-yan^{1,2}, CHEN Wei-xian¹, MA Jia-lu¹, ZHANG Yong¹, HU Peng-chen¹, WEN Jian-min¹, ZHANG Cheng-feng², DONG Zai-jie^{1,2,3}, YUAN Xin-hua^{1,2}, XU Pao^{1,2}

(1. Wuxi Fishery College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081, Jiangsu, China; 2. Key Laboratory of Freshwater Fisheries and Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, Jiangsu, China; 3. College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu, China)

Abstract: The vector pLenti6.3-IRES-EGFP was established using cloned jellyfish GFP gene and connected *Bam* HI and *Nhe* I restriction sites. Then, the vector was approved by transfecting the DH52 competent cells, restriction enzyme digestion and sequencing. After that, 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ plasmid was connected with lentiviral vector. To explore the GFP marked effect flag on lentiviral vector mediated transgenic fish production, this article observes the expression of GFP using fluorescence microscope after infecting 293 T cells by lentiviral vectors which contained only GFP and contained both GFP and functional gene at cell levels; at vivo level, the expression of GFP during the developed fertilized fingers of Jian carp which were infected by lentiviral vector containing the GFP and *IGF2b*. The results showed that: the green fluorescence was found in 293T cells infected by both GFP contained vector and GFP-*IGF2b* contained vector. After 48h, the expression of GFP was also observed when lentiviral vector (Lenti-*IGF2b*-IRES-EGFP) was infecting the undivided fertilized eggs from bright field and dark field. So, the GFP can be used successfully to flag the integrated effect through observing the green fluorescence in vivo when the undivided fertilized egg was infected by Lenti-*IGF2b*-IRES-EGFP. These illustrated that this study may lay a solid foundation for developing the transgenic fish breeding based on the lentiviral vector contained GFP.

Key words: GFP; lentiviral vector; *IGF2b*; flag results