

# pEGFP-hTERT 转染鸡胚胎干细胞建系的研究

黄晓梅<sup>1</sup>, 张 蕾<sup>1</sup>, 左其生<sup>1</sup>, 施青青<sup>1</sup>, 李 东<sup>1</sup>, 汤贝贝<sup>1</sup>, 张亚妮<sup>1</sup>, 宋九州<sup>2</sup>, 李碧春<sup>1\*</sup>

(1. 扬州大学动物科学与技术学院 江苏省动物繁育与分子设计重点实验室, 扬州 225009;

2. Animal and Avian Science Dept, University of Maryland, College Park, MD 20742)

**摘 要:** 本研究旨在通过构建重组质粒 pEGFP-hTERT 转染鸡胚胎干细胞(Chicken embryonic stem cells, cESCs), 优化鸡胚胎干细胞培养体系, 以期构建鸡胚胎干细胞株或细胞系。在获得 *hTERT* 基因后, 构建重组质粒 pEGFP-hTERT, 并利用 FuGENE<sup>®</sup> HD 转染鸡成纤维细胞(DF-1), 转染 24 h 后, 荧光显微镜检测; 再以 80% BRL-CM(大鼠肝细胞条件培养基)与 20% 的 ES 基础培养液混合的条件培养基培养分离的 cESCs, 添加 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  维生素 C, AKP 染色以及相关表面抗原 SSEA-1、SOX2 和 OCT4 检测鉴定后, 以 G418 筛选 pEGFP-hTERT 转染的 cESCs, 传代培养后荧光定量 PCR 检测相关干性基因的表达水平。结果表明: 维生素 C 可以促进 cESCs 增殖, pEGFP-hTERT 转染的 DF-1 细胞中可以检测到绿色荧光表达, pEGFP-hTERT 转染的 cESCs 可持续传至 10 代以上, 且仍保持未分化状态, 干细胞表面特异性抗原检测呈阳性, 且相关干性基因的表达水平差异不显著( $P > 0.05$ )。综上所述: pEGFP-hTERT 转染的 cESCs 在 80% BRL-CM 结合外源因子的作用下, 能够持续稳定传至 10 代且仍保持未分化状态, 可应用于鸡胚胎干细胞的永生化和细胞系建立。

**关键词:** pEGFP-hTERT; *hTERT* 基因; BRL-CM; 鸡胚胎干细胞

中图分类号: S831; S814.8

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2014)08-1253-07

## Research on Establishing Chicken Embryonic Stem Cell Line by pEGFP-hTERT Transfection

HUANG Xiao-mei<sup>1</sup>, ZHANG Lei<sup>1</sup>, ZUO Qi-sheng<sup>1</sup>, SHI Qing-qing<sup>1</sup>, LI Dong<sup>1</sup>,

TANG Bei-bei<sup>1</sup>, ZHANG Ya-ni<sup>1</sup>, SONG Jiu-zhou<sup>2</sup>, LI Bi-chun<sup>1\*</sup>

(1. Key Laboratory of Animal Breeding Reproduction and Molecular Design for Jiangsu Province, College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China;

2. Animal and Avian Science Dept, University of Maryland, College Park, MD 20742, America)

**Abstract:** This experiment was conducted to transfect chicken embryonic stem cells with recombinant plasmid pEGFP-hTERT, optimize culture system of chicken embryonic stem cells, and establish embryonic stem cell lines. *hTERT* gene was obtained and then subcloned into pEGFP-N1 to construct eukaryotic expression vector pEGFP-hTERT. cESCs were transfected with pEGFP-hTERT after transfection DF-1 cells, which were cultured with 80% conditioned medium, 20% ES decarboxylase basal medium and 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  vitamin C. After detection with AKP staining and associated specific surface antigen SSEA-1, SOX2 and OCT4, cESCs were selected with G418 and detected by real-time fluorescent quantitative PCR. The results showed that vitamin C could promote cESCs proliferation, green fluorescence could be detected in DF-1 cells after transfected with pEGFP-hTERT, cESCs transfected with pEGFP-hTERT could be passaged to 10th generation and remained undifferentiated state, and stem cell surface specific antigen detection was positive, as well there were no significant differences in expression levels of related genes ( $P > 0.05$ ).

收稿日期: 2014-01-09

基金项目: 国家自然科学基金(31272429; 31301959); 江苏省研究生培养创新工程(CXLX12\_0934)

作者简介: 黄晓梅(1986-), 女, 山东潍坊人, 硕士生, 主要从事动物胚胎工程与遗传工程研究, E-mail: hxm761145067@sina.com

\* 通信作者: 李碧春, 教授, 博士, 主要从事动物胚胎工程与遗传工程研究, E-mail: yubeli@yzu.edu.cn

The results indicated that cESCs could be passaged to 10th generation consistently, and remained undifferentiated state, which were transfected with pEGFP-hTERT and cultured with 80% BRL-CM added vitamin C. This would be used in embryonic stem cells immortalization and establishing cell lines.

**Key words:** pEGFP-hTERT; *hTERT* gene; BRL-CM; cESCs

禽类的受精卵排出体外时处于胚胎发育的第 X 期, 形成了具有约 60 000 个细胞的盘状囊胚<sup>[1]</sup>。鸡胚胎干细胞是指从鸡 X 期胚胎的胚盘细胞(BDCs)分离出来后, 经体外纯化培养仍具生殖传递能力以及发育多能性的细胞。细胞核较大, 有一个或多个核仁。体外培养时呈克隆状贴壁生长, 克隆形态不规则。未分化的胚胎干细胞碱性磷酸酶活性(Alkaline phosphatase, AKP)检测呈红棕色, 且表达胚胎早期的多种特异性标记, 如 SSEA-1、SOX2、OCT4。孟国良等<sup>[2]</sup>用 RH-CM 在 PMEF 饲养层上建立小鼠 ES-细胞系; 有研究者用 2 种小分子替代潘氏细胞来维持干细胞并促进它们增殖, 通过添加抑制剂和激活剂等控制最终生成的细胞类型<sup>[3-4]</sup>。而禽类胚胎干细胞被越来越多地用作治疗性抗体和生产病毒疫苗, 其培养、建系也再次成为研究和应用的热点<sup>[5]</sup>。但是在鸡 ES 建系方面的研究还不成熟, 孟春花等<sup>[6]</sup>比较了 BRL-CM 培养的 cESC 在不同饲养层上的生长情况; 张曼玉等<sup>[7]</sup>利用细胞因子的培养液, 在鸡成纤维细胞饲养层上培养鸡胚盘细胞, 并将类 ES-细胞传至 9 代; 郑蒙蒙等<sup>[8]</sup>利用因子培养基建立无滋养层培养体系, 将 cESCs 传至 6 代; A. Pauline 等<sup>[9]</sup>利用 STO 做滋养层, 以 ESA 完全培养基培养 cESCs, 并制备嵌合体动物。但是, 由于制作滋养层过程复杂且获得的细胞纯度不高, 而无滋养层培养的干细胞又难以长期传代培养, 因此寻找最佳的 cESCs 培养体系, 探究合适的建系方法, 建立一株具有正常细胞生理特性的永生化细胞株是非常重要的。

人端粒酶逆转录酶(Human telomerase catalytic subunit, hTERT)是人端粒酶催化亚单位, 其基因为单拷贝基因<sup>[5]</sup>。

本研究探讨了一种经济简捷且能够获得高纯度的 cESCs 的培养方法, 是国内首次转染 *hTERT* 基因在 cESCs 永生化中的应用。在本试验中, 成功构建了重组质粒 pEGFP-hTERT, 并转染鸡胚胎干细胞, 采用 BRL-CM 与 ES 基础培养液按 8:2 比例混合培养的无滋养层培养体系, 添加  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的

VC 促进细胞分裂增殖, 使细胞在保持其未分化状态下能够持续稳定的传代, 最终应用于建立稳定的鸡胚胎干细胞株或细胞系。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

新鲜受精蛋源自于中国农业科学院家禽研究所实验禽场。按照 H. Eyal-Giladi 等<sup>[10]</sup>方法分期为 IX~XI 期, 用产蛋后 5 h 以内的鸡蛋分离鸡胚盘细胞。重组质粒 PCI-neo-hTERT 由西北农林科技大学馈赠; 质粒 pEGFP-N1、大鼠肝细胞(BRL)及鸡胚成纤维细胞(DF-1)由本实验室保存培养。

高糖 DMEM(美国 Gibco 公司); 胎牛血清(美国 Hyclone 公司);  $\beta$ -巯基乙醇(加拿大 BBI 公司); 胚胎阶段特异抗原 1(SSEA-1)、SOX2 和 IgG-FITC (Genetimes)均购自北京博奥森公司; 鸡血清、L-谷氨酰胺、L-抗坏血酸(VC)、碱性成纤维生长因子(bFGF)、人干细胞因子(hSCF)、鼠白血病抑制因子(mLIF)均为美国 Sigma 公司产品。EcoR I、BamH I 和 Sal I 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、1 kb DNA Marker、5 000 bp DNA Marker 均购自 TaKaRa 公司; 胶回收试剂盒、质粒小提试剂盒、反转录试剂盒、荧光定量试剂盒购自 TIANGEN 公司; FuGENE<sup>®</sup> HD 购自 Promega 公司; 其余试剂均为国内或进口分析纯。

### 1.2 试验方法

1.2.1 条件培养基的制备 细胞因子培养液: DMEM +  $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\beta$ -巯基乙醇 +  $5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  SCF +  $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  bFGF +  $1 000 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$  LIF + 15% FBS + 2% 鸡血清。条件培养基制备参照孟春花等<sup>[11]</sup>的方法, 以 80% BRL-CM 与 20% 细胞因子培养液混合即为条件培养液。

1.2.2 鸡 X 期胚盘细胞的传代 眼科镊沿边缘直接夹取剪刀剪取的鸡 X 期胚盘, 收集后吹散, 经过滤离心后重悬, 将细胞悬液培养至第 3 天后用 PBS 轻轻吹打贴壁细胞, 收集入离心管吹匀后,  $1 200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 8 min 去除大部分卵黄细胞, 弃

上清后,用 PBS 重悬,然后用  $1\ 800\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 8 min,弃上清后,用新鲜 DMEM 重悬细胞,最后平铺于细胞培养孔板中。

当细胞铺满培养孔板底部,细胞克隆隆起明显,细胞形态未表现分化时进行再次传代。在培养皿中,用胶原酶 IV 短暂消化,再以 0.25% 胰酶作用 2 min 后,终止消化, $1\ 200\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 8 min,弃上清后,重新加入条件培养液吹打均匀,将细胞悬液移入新的培养孔板中,在  $37^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  饱和湿度的条件下,48 h 后观察换半液或加液 1 次。后续传代同上。

### 1.2.3 pEGFP-hTERT 真核表达载体的构建

按照质粒 DNA 小提中量纯化试剂盒步骤提取质粒 PCI-neo-hTERT,用 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切重组质粒,并用胶回收试剂盒回收 3.5 kb 的片段,即为目的基因 *hTERT*。

利用 T4 连接酶将目的片段连接到荧光真核表达载体 pEGFP-N1,即为 pEGFP-hTERT。琼脂糖凝胶电泳检测正确后,*EcoR* I 和 *Bam*H I 双酶切鉴定,鉴定正确后,送上海英骏生物有限公司测序。

1.2.4 pEGFP-hTERT 转染 DF-1-细胞 采用 FuGENE<sup>®</sup> HD 转染法进行转染 DF-1-细胞,以  $5 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$  接种到 24 孔板内。试验组:转染重组质粒 pEGFP-hTERT;阴性对照组:转染空载体质粒 pEGFP-N1;空白对照组:未转染质粒。转染 24 h

后于荧光倒置显微镜下观察。

1.2.5 pEGFP-hTERT 转染 cESCs 将培养至第 3 代的 cESCs 制备成细胞悬液,以  $5 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$  的密度接种到 24 孔板内,将 pEGFP-hTERT 与 FuGENE<sup>®</sup> HD 分别按 1.5 : 1.0, 2 : 1, 2.5 : 1.0, 3 : 1, 3.5 : 1.0 混合,然后加入到各细胞培养液中,24 h 后在荧光显微镜下观察,pEGFP-hTERT 与 FuGENE<sup>®</sup> HD 最佳转染比例为 3 : 1。添加 cESCs 的最佳筛选浓度  $300\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 G418 筛选阳性细胞,添加  $10\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 VC 浓度促进细胞增殖,进行持续传代。

1.2.6 cESCs 形态学鉴定及表面抗原检测 参照施青青等<sup>[12]</sup> AKP 染色及免疫荧光鉴定的步骤进行。

1.2.7 RT-qPCR 检测 cESCs 相关干性基因表达量的变化 试验组为转染 pEGFP-hTERT 传至第 2、4、6、8、10 代 cESCs,对照组为转染 pEGFP-N1,空白组为添加等量 Opti-MEM,试验组、对照组和空白组均采用 Trizol 试剂提取 mRNA,按 First Strand cDNA Synthesis Kit 说明书进行反转录,以  *$\beta$ actin* 为内参基因,进行 RT-qPCR 检测。RT-qPCR 引物序列见表 1,由中国英潍捷基(上海)贸易有限公司合成。反应体系为  $20\ \mu\text{L}$ ,RT-qPCR 扩增条件采用试剂盒推荐条件。

表 1 RT-qPCR 鉴定所需基因引物及片段大小

Table 1 Primers information for RT-qPCR

基因名称 Gene	引物序列(5' → 3') Primer sequence		片段大小/bp Size
<i>Nanog</i>	F:TGGTTTCAGAACCAACGAATGAAG	R:TGCACTGGTCACAGCCTGAAG	180
<i>Sox2</i>	F:GAAGATGCACAACCTCGGAGATCAG	R:GAGCCGTTTGGCTTCGTCA	100
<i>Oct4</i>	F:ACCAGCATCGAGACCAACGTGA	R:TTGCAGAACCCAGACCCGGACA	117
<i>GDF3</i>	F:CAAAGCCCAGCCCCAAAATC	R:CCACCCTACAACCATCCACC	114
<i><math>\beta</math>actin</i>	F:CAGCCATCTTTCTTGGGTAT	R:CTGTGATCTCCTTCTGCATCC	164

## 2 结果

### 2.1 *hTERT* 基因片段的获得

PCI-neo-hTERT 重组质粒经内切酶 *EcoR*I 和 *Sal* I 双酶切后,所得片段分别为 5 448 和 3 045 bp,而 3 045 bp 即为试验所需的 *hTERT* 基因片段(图 1)。

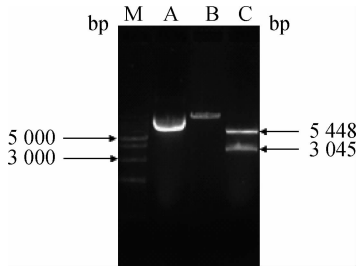
### 2.2 真核表达载体 pEGFP-hTERT 的鉴定

所得重组质粒经内切酶 *EcoR* I 和 *Bam*H I 双酶切得到与目的基因约 3.5 kb 及载体约 4.7 kb 大

小一致的 2 个片段,结果显示,在 8.2 kb 有明显单一条带,与预期结果一致(图 2)。

### 2.3 真核表达载体 pEGFP-hTERT 的亚细胞定位

转染 48 h 后,选用 445~490 nm 的激发光于荧光倒置显微镜下观察细胞,转染重组质粒 pEGFP-hTERT 的 DF1-细胞可见绿色荧光,荧光集中于细胞核部分,细胞质中有少量荧光,转染 pEGFP-N1 的 DF-1-细胞,荧光均匀分布于整个细胞,核内外荧光强度无明显区别(图 3)。

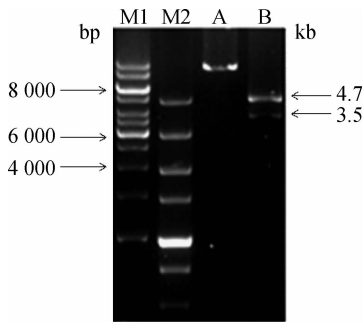


M. DNA 相对分子质量标准 DL10000; A. PCI-neo-hTERT; B. PCI-neo-hTERT 的单酶切结果; C. PCI-neo-hTERT 双酶切结果

M. DL10000 marker; A. PCI-neo-hTERT; B. PCI-neo-hTERT digested by *EcoR* I; C. PCI-neo-hTERT digested by *EcoR* I and *Sal* I

图 1 PCI-neo-hTERT 的双酶切鉴定

Fig. 1 Restriction enzyme digestion of PCI-neo-hTERT

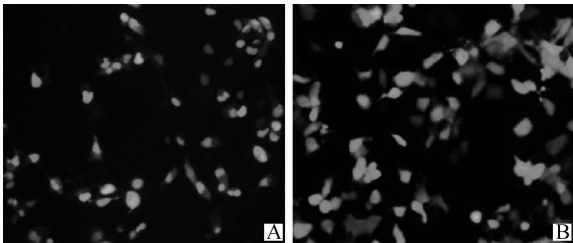


M1. DNA 相对分子质量标准 DL10000; M2. DNA 相对分子质量标准 DL5000; A. pEGFP-hTERT 的单酶切结果; B. pEGFP-hTERT 双酶切结果

M1. DL10000 marker; M2. DL5000 marker; A. pEGFP-hTERT digested by *EcoR* I; B. pEGFP-hTERT digested by *EcoR* I and *BamH* I

图 2 pEGFP-hTERT 的双酶切鉴定

Fig. 2 Restriction enzyme digestion of pEGFP-hTERT



A. 转染重组载体的 DF-1 细胞(暗场); B. 转染空载体 pEGFP-N1 的 DF-1 细胞(暗场)

A. DF-1 cells transfected with pEGFP-N1(dark field); B. DF-1 cells transfected with pEGFP-hTERT(dark field)

图 3 重组质粒 pEGFP-hTERT 及空载体 pEGFP-N1 转染 DF-1 细胞 100×

Fig. 3 Expression of fluorescent gene after transfection with pEGFP-hTERT and pEGFP-N1 100×

## 2.4 真核表达载体 pEGFP-hTERT 转染鸡胚胎干细胞

### 2.4.1 转染前 cESC 的特异性鉴定

#### 2.4.1.1 AKP 染色: 对第 2 代的 cESC 集落进行

AKP 染色后, cESCs 集落呈红棕色, 为 AKP 阳性; 分化的 cESCs 呈黄色或不着色(图 4)。

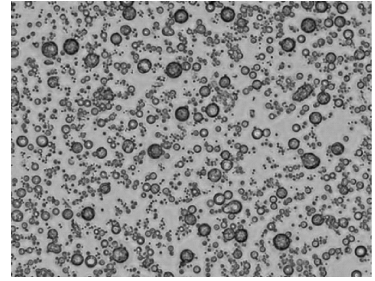


图 4 cESCs 克隆的 AKP 染色 200×

Fig. 4 cESCs dyed with AKP 200×

2.4.1.2 特异性表面抗原检测: 对第 2 代的 cESC 集落进行胚胎干细胞特异性表面抗原 SSEA-1、SOX2 以及 OCT4 鉴定, 检测结果显示: cESCs 集落呈阳性反应, 荧光下呈黄绿色; DAPI 染色为蓝色, 对照的 cESCs 呈阴性(图 5)。

#### 2.4.2 重组表达载体 pEGFP-hTERT 转染 cESCs

转染空载体 pEGFP-N1 和重组质粒 pEGFP-hTERT 的第 3 代 cESCs 培养 48 h, 于倒置荧光显微镜下观察 pEGFP-hTERT 在 cESCs 中的表达情况。结果显示, pEGFP-N1 和 pEGFP-hTERT 转染的细胞中均有绿色荧光, 且分布于整个细胞(图 6)。表明 pEGFP-hTERT 已成功转染 cESCs。

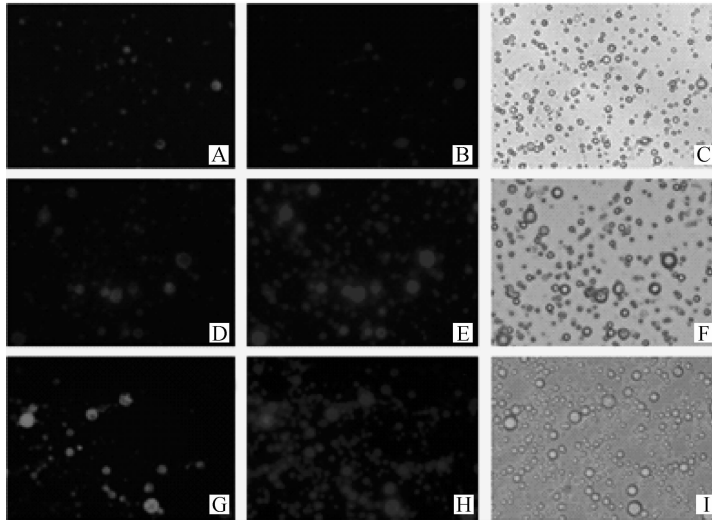
#### 2.4.3 转染后第 10 代 cESCs 的鉴定

2.4.3.1 培养第 2~10 代的 cESCs: 在荧光倒置显微镜下观察第 2~10 代的 cESCs, 第 2 代为转染之前的细胞, 第 3~10 代为转染后培养的细胞, 可以看出细胞形态无明显变化。对转染前第 2 代的 cESCs 以及转染后传至第 10 代的 cESCs 进行干细胞核型分析, 结果表明, 细胞染色体数目未发生变化(图 7)。

2.4.3.2 AKP 染色: 对转染后传至 10 代的 cESCs 集落进行 AKP 染色, 细胞呈红棕色, 为 AKP 阳性(图 8)。

2.4.3.3 特异性表面抗原检测: 对转染后传至 12 代 cESCs 集落进行表面抗原 SSEA-1、SOX2 和 OCT4 检测的结果显示: cESCs 集落呈阳性反应, 荧光下呈黄绿色; DAPI 染色为蓝色, 对照的 cESCs 呈阴性(图 9)。

2.4.4 cESCs 转染重组质粒后相关干性基因的 RT-PCR 检测 以  $\beta$ actin 为内参基因, 应用 RT-qPCR 技术对胚胎干细胞各代相关干性基因 *Nanog*、*Sox2*、*Oct4*、*GDF3* 的表达情况进行比较,

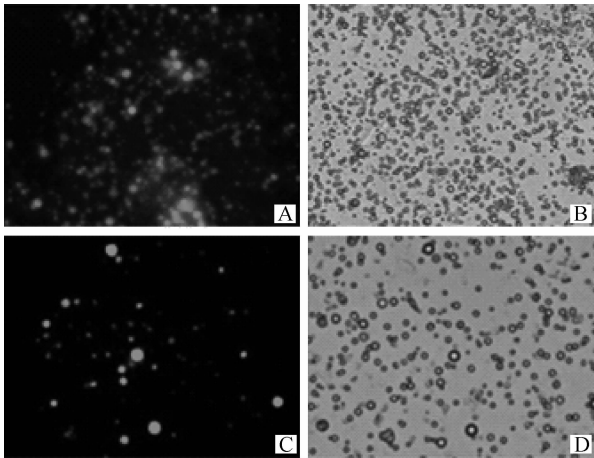


A、C、SSEA-1 抗体检测 cESCs(A 暗场,C 明场);B、E、H. cESCs 的 DAPI 染色; D、F. SOX2 抗体检测 cESCs(D 暗场,F 明场); G、I. OCT4 抗体检测 cESCs(G 暗场,I 明场)。图 9 同

A、C. cESCs detected with SSEA-1(dark field(A),light field(C));B、E、H. cESCs dyed with DAPI;D、F. cESCs detected with SOX2(dark field(D),light field(F));G、I. cESCs detected with OCT4(dark field(G),light field(I)). The same as table 9

图 5 cESCs 表面抗原检测及 DAPI 染色 200×

Fig. 5 cESCs detected with specific surface antigen and dyed with DAPI 200×



A、B. 转染 pEGFP-N1 的 cESCs(A 暗场,B 明场);. C、D. 转染 pEGFP-hTERT 的 cESCs(C 暗场,D 明场)

A、B. cESCs transfected with pEGFP-N1(dark field(A), light field(B)); C、D. cESCs transfected with pEGFP-hTERT(dark field(C),light field(D))

图 6 重组质粒 pEGFP-hTERT 及空载体 pEGFP-N1 转染 cESCs 200×

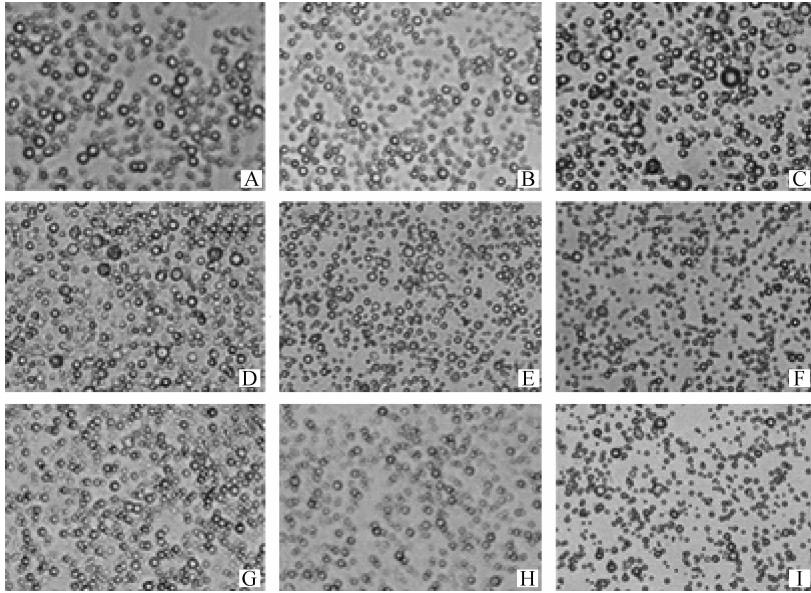
Fig. 6 Expression of fluorescent gene after transfection with pEGFP-hTERT and pEGFP-N1 200×

相对定量结果采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法<sup>[13]</sup> 分析得到的数据,各组表达量差异用 SPSS16.0 统计软件进行单因素方差分析。结果显示:cESCs 各代细胞相关干性基因的表达差异性不显著(图 10)。

### 3 讨论

ES-细胞系既是研究细胞分化的模型,也是研究前体细胞起源和细胞谱系演变较理想的试验体系<sup>[14]</sup>。目前,使用较多的 ES 培养方法有因子培养基培养、条件培养基培养以及在饲养层细胞如 PMEF、STO 等细胞上培养等,但是仅靠改善外部培养条件不能使细胞在体外进行长期培养,培养至后期的细胞增殖缓慢且与饲养层细胞共培养获得的细胞纯度不高,杂细胞较多。而通过 *hTERT* 基因转染法建立的细胞系仍能保持正常细胞的生理特性,且具有正常的核型、正常的生长速率及生长锚着依赖性和接触生长抑制性等。转染传代的细胞生长仍需添加血清,并不会像转化细胞具有致癌作用和软琼脂生长能力<sup>[15]</sup>。

在探讨 ES-细胞无滋养层的最佳培养体系时,当仅用 BRL-CM 或外源因子培养时,cESCs 可传至 6 代,后期细胞生长缓慢甚至停滞;仅用添加  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  VC 的培养液时,细胞开始增殖有所加快,但是不能长期培养及持续传代;而将 *hTERT* 基因导入到 3 代 cESCs,在条件培养基中进行培养时,细胞能稳定传代,但培养传代至后期增殖较慢;本研究采用 pEGFP-hTERT 转染 cESCs 后,在添加外源



A~I. 第 2~10 代的 cESCs

A-I. The 2nd to 10th generation of cESCs

图 7 第 2~10 代的 cESCs 200×

Fig. 7 cESCs of the 2nd to 10th generation 200×

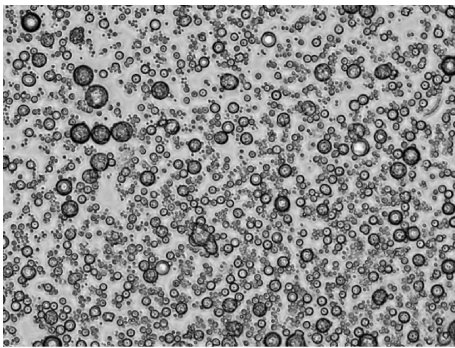


图 8 cESCs 克隆的 AKP 染色 200×

Fig. 8 cESCs dyed with AKP 200×

因子和  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  VC 的条件培养基中培养, 细胞可延长培养至 12 代。且经 AKP 染色呈红棕色, SSEA-1、SOX2、OCT4 抗体鉴定呈黄绿色荧光, 表明 cESCs 处于未分化状态; 通过对转染前后的 cESCs 进行细胞核型分析, 显示细胞染色体数目无变化。由此可知, BRL-CM 能提供分化抑制因子, 对 cESCs 的体外培养有一定作用, 但要维持 cESCs 的无限增殖和未分化状态, 只依靠 BRL-CM 提供的少量生长因子是不够的, 必须添加外源因子抑制细胞分化, 同时还要添加适宜浓度的 VC 等促进细胞

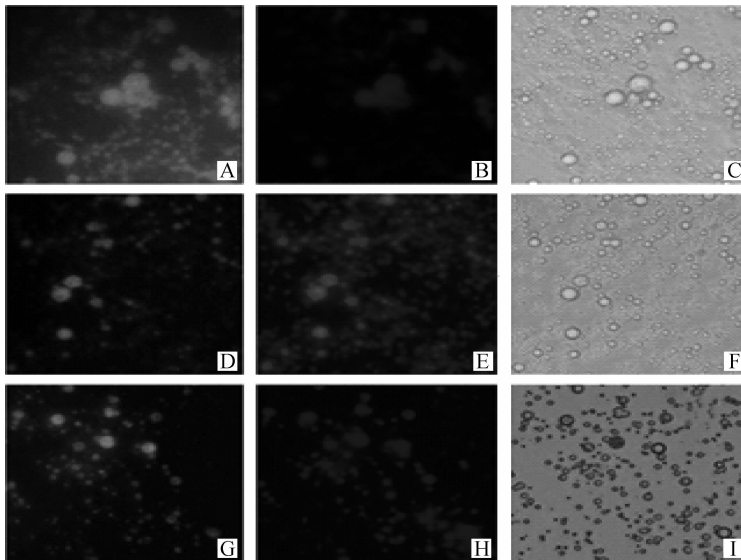


图 9 cESCs 表面抗原检测及 DAPI 染色 200×

Fig. 9 cESCs detected with specific surface antigen and dyed with DAPI 200×

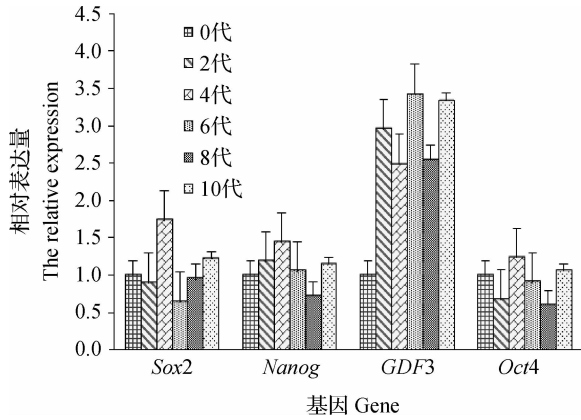


图 10 转染 pEGFP-hTERT 后 cESCs 的相关干性基因的表达

Fig. 10 Relative expression level of Sox2, Nanog, GDF3 and Oct4

分裂增殖, 转染 *hTERT* 基因延长其在体外的培养时间。

维持 cESCs 未分化状态下长期培养, 需要注意 cESCs 生长培养的细节, 防止污染, 除此之外还要有来自经验的判断, 如判断何时传代、加培养基及胰酶消化时间、吹打细胞悬液的力度与频率等, 这些基本的操作都与细胞的生长有关系, 需要长期的摸索与练习。与过去建立的 ES 培养方法相比, 本研究首先是分离胚盘时用眼科镊直接夹取胚盘, 与之前的滤纸环法及药勺法相比, 大大降低了卵黄细胞等杂细胞的含量; 其次是采用差速贴壁培养 2 d 的纯化方法, 这样可以得到纯度较高且密度较大的 cESCs; 再次是传代方法的优化, 本研究采用的是胶原酶 IV 与胰酶结合的消化方法, 与胰酶单独消化及 PBS 吹打等方法相比, 既无需机械吹打, 又降低了消化过程中细胞的损伤; 最后, 采用转基因方法建立无滋养层培养体系, 将 *hTERT* 基因转入 cESCs 中, 再结合条件培养基培养, 可排除细胞接触抑制作用及饲养层细胞分泌其它因子的干扰, 得到大量高纯度的 cESCs, 而利用滋养层细胞培养, 操作复杂且 ES 细胞不易生长, 得到的细胞中非 ES 细胞太多且难纯化, 不利于后续克隆的形成、鉴定及其诱导分化等试验的进行。每种细胞培养都有其特异性, cESCs 作为一种难纯化、易分化、增殖慢的干细胞, 时常监测与悉心观察对维持其长期生长是必须的。

## 4 结 论

本研究不仅优化了鸡胚胎干细胞分离培养方法, 而且构建重组质粒 pEGFP-hTERT 并转染 cESCs, 使其在添加  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  VC 的条件培养基

中, 可以在未分化状态下持续传至 12 代, 且通过间接免疫荧光及荧光定量 PCR 检测细胞仍具有多能性, 找到了适合 cESCs 的高效分离方法与最佳无滋养层培养体系, 为建立可无限增殖的鸡胚胎干细胞株或细胞系提供了研究依据。

## 参考文献:

- [1] ETCHES R J, CARASIENCE R S, CLARK M E. Chimeric chickens and their use in manipulation of the chicken's genome [J]. *Poult Sci*, 1993, 73: 882-889.
- [2] 孟国良, 滕路, 薛友纺, 等. 小鼠胚胎干细胞系建立的方法学探讨 [J]. *遗传学报*, 2002, 29(7): 581-588.
- [3] FABRICE L, ROBERT L. Chicken embryonic stem cells as a non-mammalian embryonic stem cell model [J]. *Dev Growth Differ*, 2010, 52(1): 101-104.
- [4] XIAOLEI Y, HENNER F F, JOHAN H E, et al. Niche-independent high-purity cultures of Lgr5<sup>+</sup> intestinal stem cells and their progeny [J]. *Nat Methods*, 2013, 11: 1-9.
- [5] LOHR V, GENZEL Y, JORDAN I, et al. Live attenuated influenza viruses produced in a suspension process with avian AGE1. CR. pIX cells [J]. *BMC Biol*, 2012, 12: 79.
- [6] 孟春花, 张传生, 杨娜娜, 等. 用 BRL-3A 条件培养基培养鸡胚胎干细胞的初步研究 [J]. *细胞生物学杂志*, 2008, 30(4): 532-536.
- [7] 张曼玉, 陈志胜, 计慧琴, 等. 鸡胚胎干细胞分离方法和培养体系的优化 [J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2011, 15(45): 8429-8434.
- [8] 郑蒙蒙, 李伟, 施青青, 等. 鸡 *Dazl* 基因的克隆及其亚细胞定位研究 [J]. *中国家禽*, 2013, 35(6): 8-13.
- [9] PAULINE A, BERTRAND P. Chicken embryonic stem cells: establishment and characterization [J]. *Epiblast Stem Cells*, 2013, 11: 137-150.
- [10] EYAL-GILADI H, KAYAK S. From cleavage to primitive streak formation: a complementary normal table and a new look at the first stage of the development of the chick; I. General morphology [J]. *Dev Biol*, 1976, 49: 321-337.
- [11] 孟春花, 杜立新. BRL 条件培养基分离克隆鸡胚胎干细胞及诱导分化 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2005.
- [12] 施青青, 孙敏, 郑蒙蒙, 等. 鸡胚原始生殖细胞生物学特性鉴定及相关基因表达研究 [J]. *扬州大学学报*, 2012, 33(2): 23-28.
- [13] TYRING S K. Interferons: biochemistry and mechanisms of action [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 1995, 172: 1350-1353.
- [14] 梁琳, 王振飞, 李煜, 等. 胚胎干细胞建系方法 [J]. *生物技术通报*, 2006, 1: 38-40.
- [15] JERRY W S, WOODRING E W. Senescence and immortalization: role of telomeres and telomerase [J]. *Oxford Journals (Life Sciences)*, 2004, 26(5): 867-874.