树鼩精原干细胞的转基因操作

Establishing Transgenic Spermatogenic Stem Cells of Tree Shrew

毕蕊^{1, #}, 李聪^{2, #}, 郑全振¹, 李余¹, 郑萍^{2, *}

¹动物模型与人类疾病机理重点实验室, 昆明动物研究所, 中国科学院大学, 昆明市, 云南省; ²遗传资源与进化国家重点实验室, 昆明动物研究所, 中国科学院大学, 昆明市, 云南省;

*通讯作者邮箱: zhengp@mail.kiz.ac.cn

#共同第一作者/同等贡献

引用格式: 毕蕊, 李聪, 郑全振, 李余, 郑萍. (2021). 树鼩精原干细胞的转基因操作. *Bio-101* e1010934. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010934.

How to cite: Bi, R., Lei, C., Zheng, Q. Z., Li, Y. and Zheng, P. (2021). Establishing Transgenic Spermatogenic Stem Cells of Tree Shrew. *Bio-101* e1010934. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010934. (in Chinese)

摘要: 精原干细胞在适当的体外培养条件下可进行自我更新和增殖, 并可进行基因修饰, 移植到受体动物睾丸曲细精管后可以存活, 并通过再生持续产生精子。因此, 精原干细胞是一种极富潜力的转基因细胞载体。我们前期在树鼩精原干细胞中成功建立了高效稳定的转基因操作技术体系, 并产生了国际首例转基因树鼩¹。本实验方案对树鼩精原干细胞转基因操作的具体流程进行了描述, 得到的转基因精原干细胞株, 可直接移植到受体树鼩睾丸中用于生产转基因树鼩后代。

关键词: 树鼩, 精原干细胞, 转基因

材料与试剂

1. 0.45 μ m 滤器 (PALL, catalog number: 4654)
2. 10 ml 注射器 (国产, HMXL-610)
3. 15 ml 离心管 (NEST, catalog number: 601052)
4. 50 ml 离心管 (NEST, catalog number: 602001)
5. 24 孔板 (Corning, catalog number: 3524)
6. 培养皿 (100 mm) (Corning, catalog number: 430167)
7. HEK293T 细胞

8. 载体

病毒载体和包装载体：GAE-CAG-eGFP/WPRE、SIV3+、G-REV 来自 Wianny *et al.*, 2008

9. Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher, catalog number: L3000015)

10. 病毒浓缩试剂盒 (Biomiga, catalog number: V2001-01)

11. PBS (Hyclone, catalog number: SH30256.01B)

12. Polybrene (SIGMA, catalog number: 107689)

13. DMEM 培养基 (Thermo Fisher, catalog number: C11995500BT)

14. 胎牛血清 FBS (Thermo Fisher, catalog number: 10099141)

15. 胰酶 (Thermo Fisher, catalog number: 25200072)

16. 5 mg/ml polybrene (见溶液配方)

17. 树鼩精原干细胞培养基 (见溶液配方)

仪器设备

1. 流式细胞仪 (BD)

2. 细胞培养箱 (Thermo Fisher)

3. 倒置荧光显微镜 (尼康)

4. 超净工作台 (苏净集团安泰公司)

5. 高温高压灭菌锅 (YAMATO)

6. 移液器/移液枪 (Eppendorf)

7. 超纯水系统 (Millipore)

8. 平板离心机 (Thermo Fisher)

9. 细胞计数器 (Countstar)

10. 分析天平 (Mettler Toledo)

实验步骤

1. 病毒包装与浓缩

1.1 病毒载体的选择

前期对适合用于树鼩精原干细胞转基因的病毒载体进行探索和优化, 发现基于

猴免疫缺陷病毒的 SIV 载体 (GAECAG-eGFP/WPRE) 构建的病毒对于树鼩精原干细胞具有较高的感染效率 (班文赞, 2016)。

1.2 细胞转染

转染前 24 h, 将对数生长期的 HEK293T 细胞传至 10 cm 细胞培养皿, 过夜培养。当细胞长至 70-80%, 用 Lipofectamine 3000 将携带目的基因的 CAE-CAG-eGFP/WPRE 载体和包装载体 (SIV3 和 G-REV) 根据以下比例进行转染 (CAE-CAG-eGFP/WPRE : SIV3+ : G-REV = 1.3:1:1), 转染质粒总量为 12.5 μ g。

1.3 病毒收集浓缩

转染后 48 小时, 收集细胞培养基上清, 以 0.45 μ M 滤器过滤上清; 用 Biomiga 病毒浓缩试剂盒根据说明书进行浓缩。

1.4 病毒滴度测定

将 293T 细胞传至 24 孔板中的 10 个孔。取 10 μ l 浓缩好的病毒, 加到 1 ml 细胞培养基中, 得到 10^{-2} 浓度的病毒培养液, 并将其以 10 倍的比例倍比稀释, 依次得到 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 浓度的培养基各 1 ml。将 24 孔板中的培养基换成不同浓度的病毒培养液。24 小时后, 在荧光显微镜下观察细胞的病毒感染情况, 选取 GFP 阳性细胞数量为 10 个左右的孔, 如果该孔的病毒浓度是 10^{-7} , 那么我们包装的病毒的滴度大概为: $10/10^{-7} = 10^8$ TU/ml。

2. 精原干细胞慢病毒感染

2.1 细胞准备

精原干细胞的生长周期一般是 7 天, 准备一个 24 孔板的传代后 5 天左右精原干细胞, 用 PBS 重悬, 转移至 15 ml 离心管, 用细胞计数器计数, 细胞总数在 3×10^6 - 5×10^6 个。

2.2 配制病毒孵育液

1 ml 精原干细胞培养基 + 1 μ l Polybrene (5 mg/ml) + 100 μ l 浓缩的病毒 (10^8 TU/ml)。

2.3 病毒感染

将细胞 $161 \times g$ 离心 5 min, 弃去上清, 吸取配制好的病毒孵育液重悬细胞, 置于培养箱中悬浮感染 24 小时。

2.4 细胞接种

病毒感染 24 小时后， $161 \times g$ 离心 5 min，弃去病毒孵育液，将细胞用 6 ml 精原干细胞培养基重悬，接种到提前制备好的饲养层细胞上（24 孔板的 12 个孔，关于饲养层细胞的制备，详见研究方案“树鼩精原干细胞系的分离和建系培养”）。隔天换液培养。

3. 转基因精原干细胞筛选

3.1 病毒感染后 48 小时，可以通过荧光显微镜看到发绿色荧光的精原干细胞集落；

3.2 通过流式细胞仪，分选出绿色荧光阳性的细胞，继续传代扩增培养。

注：以上实验过程中，涉及到使用病毒转基因工具，因此所有操作均应在生物安全柜中进行，并佩戴一次性口罩和手套。每次实验后，立即清理所有接触过病毒的器具，高压灭菌以后再进行下一步处理。显微镜和生物安全柜台面等使用后，用 70%乙醇擦拭，并紫外照射消毒。

经验总结

流式分选过程容易导致精原干细胞污染，因此需要多加注意。也可用挑取单克隆的方式富集转基因阳性的精原干细胞。

溶液配方

1. 5 mg/ml polybrene

用分析天平称取 5 mg 的 polybrene，用 1 ml 的 PBS 溶解，分装冻存于 -20°C 。

2. 树鼩精原干细胞培养基

详见研究方案“树鼩精原干细胞系的分离和建系培养”

致谢

相关工作得到了中国科学院(XDB13000000 和 XDA01010203)、云南省（2015HA038）、NSFC-云南联合基金项目（U1702284）以及昆明动物所“135”项目资助。利用本研究相似的方案，我们建立了 GFP 转基因树鼩，相关工作于 2017 年发表于《Cell Research》（Li et al., 2017）。前期班文赞、李朝晖等系统探索了不同病毒载体在精原干细胞中的转基因效率，为本实验方案提供了非常有价值的参考（班文赞，2016）。

参考文献

1. 班文赞. (2016). 树鼯精原干细胞转基因载体的构建. 昆明理工大学硕士学位论文.
2. Li, C. H., Yan, L. Z., Ban, W. Z., Tu, Q., Wu, Y., Wang, L., Bi, R., Ji, S., Ma, Y. H., Nie, W. H., Lv, L. B., Yao, Y. G., Zhao, X. D. and Zheng, P. (2017). [Long-term propagation of tree shrew spermatogonial stem cells in culture and successful generation of transgenic offspring](#). *Cell Res* 27(2): 241-252.
3. Wianny, F., Bernat, A., Huissoud, C., Marcy, G., Markossian, S., Cortay, V., Giroud, P., Leviel, V., Kennedy, H., Savatier, P. and Dehay, C. (2008). [Derivation and cloning of a novel rhesus embryonic stem cell line stably expressing tau-green fluorescent protein](#). *Stem Cells* 26(6): 1444-1453.