

犬胎儿成纤维细胞基因编辑

Gene Editing of Canine Fetal Fibroblasts

王晓民^{1,2}, 赖良学^{1,*}

¹中国科学院广州生物医药与健康研究院, 广州, 广东省; ²生命科学学院, 西湖大学, 杭州, 浙江省

*通讯作者邮箱: lai_liangxue@gibh.ac.cn

引用格式: 王晓民, 赖良学. (2022). 犬胎儿成纤维细胞基因编辑. *Bio-101* e1010973. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010973.

How to cite: Wang, X. M. and Lan, L. X. (2022). Gene Editing of Canine Fetal Fibroblasts. *Bio-101* e1010973. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010973. (in Chinese)

摘要:

犬胎儿成纤维细胞在体外培养具有较强的增殖能力, 可进行复杂的基因编辑操作。通过分离培养犬的胎儿成纤维细胞, 可在体外对其进行基因编辑, 筛选阳性的细胞克隆, 再用阳性的细胞做体细胞克隆, 可一步获得纯合的基因编辑犬。同时, 该方法还可进行一些复杂的基因操作, 包括基因敲入, 多基因打靶, 大片断删除等。与其它类型体细胞相比, 犬胎儿成纤维细胞体外增殖能力更强, 可进行复杂的基因修饰操作, 同时具有较高的克隆效率。

关键词: 胎儿成纤维细胞, 基因编辑, 增殖

研究背景

利用胎儿成纤维细胞、卵丘细胞或成体成纤维细胞进行体细胞克隆, 已成功地培育了各种克隆哺乳动物。关于哪种供体细胞最适合 SCNT 有很多讨论, 但一般认为未分化的供体细胞 (即胚胎卵裂球) 更适合用于 SCNT。此外, 由于胎儿成纤维细胞具有高增殖率, 因此被广泛用于生产转基因克隆动物。因此, 胎儿成纤维细胞被认为是在几个物种中产生克隆后代的最合适的供体细胞。然而, 犬和猫的第一个克隆后代分别来自成体皮肤成纤维细胞和卵丘细胞。

材料与试剂

1. DMEM (Hyclone)
2. FBS (Gibco)
3. 丙酮酸钠 (Gibco)
4. 谷氨酰胺 (Gibco)
5. NEAA (Gibco)
6. 质粒 (Addgene)
7. G418 (Merk)
8. 电转液 (Neon Transfection System 100 μ L Kit)
9. 胰酶 (Gibco)
10. 克隆环 (国产)
11. 培养板 (Corning)

仪器设备

1. 电转仪 (Invitrogen Neon)
2. 培养箱 (Thermo-4111)
3. 生物安全柜 (ESCO-AC2-6S1)
4. 倒置显微镜 (Olympus-IX73)

实验步骤

1. 复苏犬胎儿成纤维细胞 (30 天胎儿) 于 10 cm 培养皿中;
2. 待细胞长到约 90%汇合时, 消化细胞;
3. 将细胞用 PBS 清洗两遍;
4. 用含有 Cas9 和 sgRNA 质粒的 PBS (100 μ l) 重悬细胞, 1x10⁵ 细胞电转 0.5 μ g 质粒 (CMV-CAS9:U6-sgRNA = 1:1);
5. 吸入电转枪中, 并插入到电转液中准备电转;
6. 电转 (电转参数: 电压 1350 V; 时间 30 ms; 脉冲次数 1 次);
7. 电转后将细胞再养到 10 cm 培养皿中;
8. 电转后 48 h 再消化细胞, 准备分盘;

9. 细胞分盘，将细胞进行稀释，再种入 10 cm 培养皿中，40X 显微镜视野中可见 5-7 个细胞即可；
10. 在分盘后 24h 更换成含 G418（300 $\mu\text{g/ml}$ ）的培养基，每三天换一次液；
11. 第 8 至 10 天根据细胞克隆大小选择挑取克隆时间；
12. 用克隆环进行挑克隆，挑出的细胞培养到 24 孔板中；
13. 细胞长满后传至 12 孔板中，留取约 1/4 的细胞进行鉴定；
14. 鉴定后的阳性克隆细胞在 12 孔板中长满后进行冷冻，保存于液氮中。

结果与分析

1. 不同克隆基因型不一样；
2. 挑克隆时如果两个克隆相距很近则舍弃，避免不同克隆细胞间的相互污染。

失败经验

1. 细胞分盘时密度过大，导致最后形成的克隆间距太小，无法挑取克隆。

溶液配方

1. 细胞培养液

DMEM+15%FBS+1% 丙酮酸钠+1%谷氨酰胺+1NEAA

致谢

1. 感谢十二五国家科技重大专项“实验用 Beagle 犬及疾病模式犬研究开发平台”[2011ZX09307-304]提供的经费支持；
2. 感谢广州生物医药研究总院有限公司提供的实验场地、实验用犬及相关技术支持；
3. 感谢北京希诺谷生物科技有限公司共同参与的技术研究；
4. 研究成果以“Generation of gene-target dogs using CRISPR/Cas9 system；Generation of ApoE deficient dogs via combination of embryo injection of CRISPR/Cas9 with somatic cell nuclear transfer”分别发表在 Journal of Molecular Cell Biology 和 Journal of Genetics and Genomics 杂志上。

参考文献

1. 胡敏华，周志东，王晓民，龙海斌，倪庆纯，刘运忠. (2015) [实验用 Beagle 犬的繁殖性能分析](#). 广东畜牧兽医科技, 3: 41-44.
2. 张敦伟，王晓民，连雪科，刘运忠，高翔，倪庆纯. (2013) [Beagle 犬活体取胎及其成纤维细胞的培养](#). 实验动物与比较医学, 3: 210-214.
3. Bouchard, G. F., Solorzano, N., Concannon, P. W., Youngquist, R. S., Bierschwal, C. J. (1991) [Determination of ovulation time in bitches based on teasing, vaginal cytology, and elisa for progesterone](#). *Theriogenology* 3: 603-11.
4. Feng, C., Wang, X. M., Shi, H., Yan, Q. M., Zheng, M., Li, J., Zhang, Q. J., Qin, Y. M., Zhong, Y. G., Mi, J. D., Lai, L. X. (2018) [Generation of ApoE deficient dogs via combination of embryo injection of CRISPR/Cas9 with somatic cell nuclear transfer](#). *J Genet Genomics* 45: 47-50.
5. Concannon, P. W. (1986) [Canine pregnancy and parturition](#). *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 16: 453-75.
6. Evans, J.M., and Savage, T.J. (1970) [The collection of vaginal smears from bitches](#). *The Veterinary record* 87: 598-599.
7. Jang, G., Kim, M. K., Oh, H. J., Hossein, M. S., Fibrianto, Y. H., Hong, S. G., Park, J. E., Kim, J. J., Kim, H. J., Kang, S. K., Kim, D. Y., Lee, B. C. (2007) [Birth of viable female dogs produced by somatic cell nuclear transfer](#). *Theriogenology* 5: 941-7.
8. Zou, Q. J., Wang, X. M., Liu, Y. Z., Ouyang, Z., Long, H. B., Wei, S., Xin, J. G., Zhao, B. T., Lai, S. S., Shen, J., Ni, Q. C., Yang, H. Q., Zhong, H. L., Li, L., Hu, M. H., Zhang, Q. J., Zhou, Z. D., He, J. X., Yan, Q. M., Fan, N. N., Zhao, Y., Liu, Z. M., Guo, L., Huang, J., Zhang, G. G., Ying, J., Lai, L. X., Gao, X. (2015) [Generation of gene-target dogs using CRISPR/Cas9 system](#). *J Mol Cell Biol* 6: 580-3.