

## EGFP 小鼠 ES 细胞来源的生殖系嵌合小鼠的获得和鉴定

段彪, 邵华\*, 魏著英, 王凤武, 旭日干

(内蒙古大学 哺乳动物生殖生物学及生物技术教育部重点实验室, 内蒙古 呼和浩特 010021)

**摘要:** 生殖系嵌合体的获得是实现 ES 细胞介导的转基因途径的决定步骤, 而嵌合体的制作及生殖系嵌合体的获得则是判定 ES 细胞系是否具有配子分化能力的有效方法。利用一株表达绿色荧光蛋白的杂种 ES 细胞系制备出嵌合体小鼠, 共获得 9 只表达绿色荧光蛋白的嵌合体小鼠, 其中有 8 只雄性, 1 只雌性, 目前均发育成健康成年小鼠。流式细胞检测显示了绿色荧光蛋白在嵌合鼠以下器官的表达情况: 心 ( $77.96 \pm 15.78$ )%、脾 ( $84.06 \pm 3.60$ )%、肾 ( $42.49 \pm 19.79$ )%、骨髓 ( $52.02 \pm 18.78$ )%。昆明雌鼠与雄性嵌合鼠杂交 1 代 (F1) 毛色表型分析显示该株 ES 细胞具有生殖系嵌合能力。

**关键词:** EGFP 转基因小鼠; 嵌合体; 杂种 ES 细胞; 生殖系

**中图分类号:** Q813.7; Q954.6; Q959.837 **文章标识码:** A **文章编号:** 0254-5853(2007)04-0417-06

## Germ-line Competent Chimeric Mice Derived from Es Cells of EGFP-transgenic Mouse

DUAN Biao, SHAO Hua\*, WEI Zhu-ying, WANG Feng-wu, BOU Shor-gan

(The Key Laboratory for Mammalian Reproductive Biology and Biotechnology, Ministry of Education, Inner Mongolia University, Huhhot 010021, China)

**Abstract:** Generation of germline chimera is the key step in ES cell-mediated transgenesis, whereas the production of chimera, especially germline competent, is the only way to prove whether such potency is maintained. In this experiment, an established ES cell line expressing strong green fluorescence was used to produce chimera mice. After cell passage, ES cells were microinjected into KM's blastocysts. Nine EGFP-expressing chimeric mice were produced including eight male and one female. They developed into healthy adults. Results of a flow cytometry test showed the existence of GFP in several mice tissues: heart ( $77.96 \pm 15.78$ )%, spleen ( $84.06 \pm 3.60$ )%, kidney ( $42.49 \pm 19.79$ )% and marrow ( $52.02 \pm 18.78$ )%. The ES cell line proved to be important for the germ-line in contributing to the coat-color analysis of offspring (F1), produced by the cross between a female KM mouse and a male chimeric mouse.

**Key words:** Transgenic mouse expressing EGFP; Chimera; Hybrid ES cells; Germ line

胚胎干细胞 (embryonic stem cells, ES 细胞) 具有无限增殖和多向分化潜能, Evans et al (1981) 首次成功地从延缓着床的小鼠胚胎中分离建系。Bradley et al (1984) 通过囊胚注射法获得了首例小鼠 ES 细胞的生殖系嵌合体。这些研究表明了经体外培养的 ES 细胞在导入宿主囊胚后可以广泛地参与宿主各种组织的分化, 特别是参与成熟生殖细胞

的形成。至今, ES 细胞介导的遗传操作技术已产生数千种的突变体小鼠, 并已获得许多重要的研究发现 (Liu et al, 2003; Bigot-lasserred et al, 2003)。

由于当前研究所使用的胚胎干细胞系大多来自近交系小鼠, 虽然近交系小鼠具有遗传基因纯合、个体差异小等特点, 但是近交系小鼠本身存在一些发育上的缺陷, 所以由此建立的 ES 细胞系在发育

\* 收稿日期: 2007-03-23; 接受日期: 2007-05-29

基金项目: 国家“863”计划资助项目 (2002AA242061)

\* 通讯作者 (Corresponding author), E-mail: sh\_hua2000@sohu.com; Tel: 0471-4992443

第一作者: 段彪 (1981—), 男, 硕士研究生, 研究方向: 发育生物学与干细胞工程。

全能性,尤其是在生殖系嵌合能力上一般表现较弱。考虑到杂种细胞在发育上具有优势的特点,我们从EGFP转基因雄鼠(来自C57BL/6J)和昆明雌鼠的杂种囊胚中分离得到了ES细胞系(命名为EGFP-ES细胞)。通过嵌合体技术探讨该ES细胞的在各脏器上的分化能力,特别是在生殖系转化能力方面具有重大意义。由于该ES细胞表达为绿色荧光蛋白,所以,可以使用荧光显微镜直接观察由ES细胞来源的分化细胞的发育过程。具有表达绿色荧光蛋白同时又具有生殖系转化能力的ES细胞可更直观地用于配子发生过程的研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

EGFP (enhanced green fluorescent protein) 转基因小鼠(来自C57BL/6J)购自南京大学模式动物研究所。昆明小鼠由内蒙古大学国家清洁级实验动物繁育室提供。本实验中所用的小鼠均为8周龄以上。

### 1.2 实验试剂及仪器

胎儿成纤维细胞培养基:高糖型DMEM+10%标准胎牛血清(天津TBD)+1% Penicillin-Streptomycin (Invitrogen)。ES细胞培养基组成:DMEM (High Glucose, Invitrogen), 0.29 mg/mL 谷氨酰胺 (Invitrogen), 0.1 mmol/L 非必需氨基酸 (Invitrogen), 7.8 mg/L  $\beta$ -巯基乙醇 (SIGMA), 0.11 mg/mL 丙酮酸钠 (Invitrogen), 1% Penicillin-Streptomycin (Invitrogen), 15% 胎牛血清 (Hyclone), 1 000 units/mL Leukemia inhibitory factor (LIF, Chemicon)。配制KSOM和M2培养液所使用的药品均购自日本和光工业株式会社;胰蛋白酶购自GIBCO公司。显微操作仪和实体显微镜均为日本Nikon公司产品。

### 1.3 小鼠的准备

① 假孕鼠:将超排后成年雌性昆明鼠与结扎昆明雄鼠1:1合笼,次日查看,若见阴栓,定为假孕第0.5天并单独饲养,准备于见栓后2.5d进行胚胎移植。② 供体鼠:将超排后成年雌性昆明鼠与昆明雄鼠1:1合笼,次日查见阴栓并单独饲养,准备于见栓后3.5d进行子宫冲胚。

### 1.4 胚胎采集及囊胚的准备

将见栓后3.5d小鼠的子宫完整取下来,置于无菌的培养皿中。沿宫颈中部将子宫剪成两半,用M<sub>2</sub>液分别进行冲胚。收集冲出的囊胚和桑椹胚,用

KSOM培养液清洗3遍后,放入预平衡好的KSOM滴中,置于德国BINDER培养箱(37℃、5% CO<sub>2</sub>)中培养。观察囊胚的发育情况,并记录。

### 1.5 ES细胞的准备

复苏EGFP-ES细胞,培养2d后,细胞集落长大,形态良好,无分化,然后使用浓度为0.05%的胰蛋白酶消化,传代。根据细胞的浓度,将细胞悬液分为三份,一部分冻存,一部分继续传代,剩余部分转移至无饲养层的培养皿内培养1h后吸去液体,加入200 mL ES培养液,轻轻吹打,将轻微黏附在培养皿底的ES细胞吹起,转移液体至1.5 mL EP管内,0℃保存待用。

### 1.6 显微注射及胚胎移植

用注射针吸取15—20个ES细胞,找到两个滋养层细胞连接处放到囊胚腔9点的位置进行注射。注射后囊胚腔消失,用KSOM培养液洗涤3次,放入新的KSOM培养液中,置于37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养1—3h后囊胚腔恢复。采用常规的子宫内移植方法进行移植,两侧子宫中,每侧植入7—8枚胚胎,之后将母鼠放入笼中饲养待产。实验重复8次。囊胚注射过程见图1所示。

### 1.7 小鼠嵌合情况的观察

通过毛色观察小鼠嵌合程度。一般,高度嵌合小鼠的毛色基本为黑或灰色,中度嵌合小鼠毛色介于高度和中度嵌合之间,低度嵌合小鼠的毛色仅有一小片黑或灰色。

### 1.8 生殖系嵌合检测

选取雄性毛色嵌合小鼠分别与昆明雌鼠交配。记录每一组的产仔情况并分析仔鼠的毛色类型。子一代小鼠中若出现白色以外的其它毛色类型则认定该雄性嵌合小鼠是生殖系嵌合。

### 1.9 流式细胞仪检测和统计分析

分别将2只高度嵌合小鼠和1只中度嵌合小鼠的心、脾、肾、骨髓消化成为单细胞悬液,进行流式细胞检测。按照如下步骤进行操作:

① 心脏、肾脏(取皮质):剪碎组织,用胰蛋白酶消化20 min,以含10%FBS的PBS液终止消化,再用注射器反复吹吸,直至液体浑浊。用注射器吸取组织液并置于装有100目钢网的滤器中过滤,滤液放入离心管中。② 脾脏直接在钢网上研磨,以PBS冲洗,过滤后,将滤液置入离心管中。③ 用1 mL注射器吸取PBS冲洗骨髓腔,冲洗液放入离心管中。④ 对上述所制备的各类细胞悬液进行离心处理

图 1 ES 细胞囊胚的注射过程  $\times 100$ Fig. 1 Process of blastocyst cavity microinjection of ES cells  $\times 100$ 

(1 500 r/min、5 min)。⑤ 离心后倒掉上清液，加入 1 mL PBS，用枪头吹打均匀，使之成为悬液。⑥ 用 Percoll 密度梯度（先加入 60% 的 Percoll 液后再在其上加入 30% 的 Percoll 液），以 3 000 r/min 进行离心 10 min。⑦ 离心后将细胞层用枪头取出，放入 1.5 mL Eppendorf 塑料管中。加入 1 mL PBS 液体，用枪头把细胞悬液吹匀。⑧ 将制备好的各器官之细胞悬液进行流式细胞分选检测。

应用 SPSS 软件对流式细胞检测结果进行统计分析。

## 2 结果

### 2.1 ES 细胞的准备

细胞克隆（集落）呈岛屿状隆起，边缘整齐，

表面平滑，结构致密，细胞间界限不清（图 2A）；荧光显微镜下可见克隆（集落）发出较强绿色荧光，表面荧光强度均匀，而周围滋养层细胞无荧光（图 2）。

### 2.2 ES 细胞囊胚腔注射和嵌合体小鼠的建立

在囊胚注射后囊胚腔消失后。继续培养 1—3 h 后，选择 84 枚囊胚腔复原的胚胎分别植入到 8 只假孕母鼠子宫中继续发育，孕期 19.5 d 左右。有 5 只孕鼠自然生产，共产仔 13 只，其中 9 只为毛色嵌合小鼠（表 1）。

### 2.3 嵌合程度观察

9 只毛色嵌合小鼠，其中高度嵌合、中度嵌合和低度嵌合小鼠分别是 5、2 和 2 只（表 2，图 3）。

### 2.4 生殖系嵌合

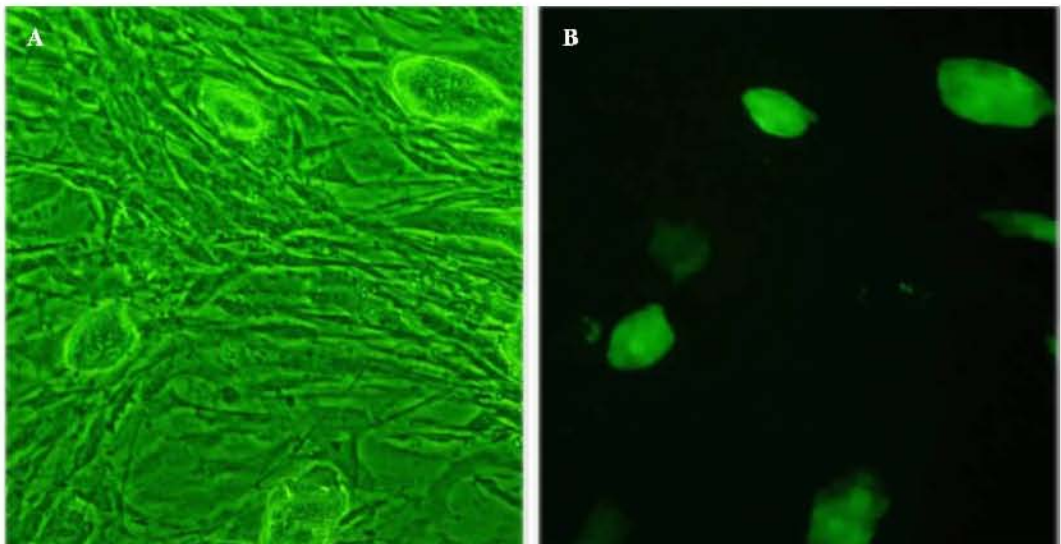


图 2 EGFP-ES 细胞克隆形态

Fig. 2 Cloning morphology of EGFP-ES cells

A. 相差显微镜下 EGFP-ES 细胞克隆形态 (Morphology of EGFP-ES cells)  $\times 200$ ;

B. EGFP-ES 细胞克隆在荧光显微镜下发出绿色荧光 (Morphology of EGFP-ES cells expressing GFP under UV)  $\times 200$



表 1 嵌合体小鼠的产生情况

Tab. 1 Establishment (Production) of chimeric mice using EGFP-expressing ES cells

移植囊胚数 Number of transferred embryos	假孕母体数 Number of pseudo pregnant recipients	生仔假孕母体数 Number of recipients with live pups	产仔数 Number of live pups	产仔率 Rates of live pups	嵌合鼠数 Number of chimeras
84	8	5	13	62.5%	9

表 2 嵌合体小鼠的毛色嵌合情况统计

Tab. 2 Statistics of skin-color expression of chimeras

(只)

		高度嵌合 High-degree chimerism	中度嵌合 Medium-degree chimerism	低度嵌合 Low-degree chimerism	总计 Total number	
嵌合体数量 Number of chimera	雌 Female	0	1	0	1	9
	雄 Male	5	1	2	8	

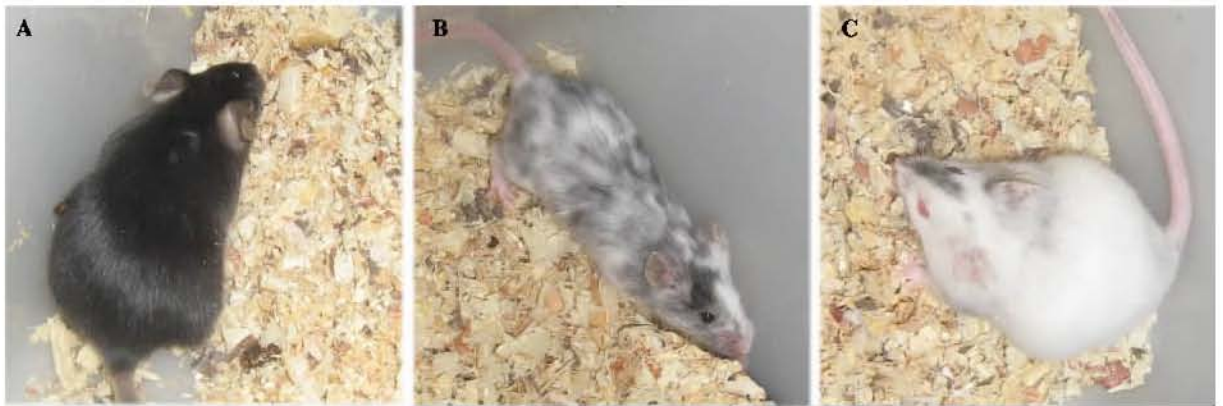


图 3 嵌合小鼠的毛色嵌合程度分级

Fig. 3 Classification of coat color in chimeric mice

- A: 高度嵌合小鼠 (毛色基本为黑或灰色) (High-degree chimeric mouse, coat color is basically black or gray);  
 B: 中度嵌合小鼠 (介于高度和中度嵌合之间) (Medium-degree chimeric mouse, between high-degree and low-degree chimeric mouse);  
 C: 低度嵌合小鼠 (毛色仅有一小片黑或灰色) (Low-degree chimeric mouse, coat color has a slice of black or gray)。

选取 5 只毛色高度嵌合的雄性小鼠分别与 5 只昆明雌鼠交配, 有两组各产仔 13 只, 其中每组分别有 8 只其它毛色表型 (除白色外, 图 4)。另外 3

个交配组合除了一组产生全白的后代, 其余两组未见有后代出生 (表 3)。

## 2.5 流式细胞检测

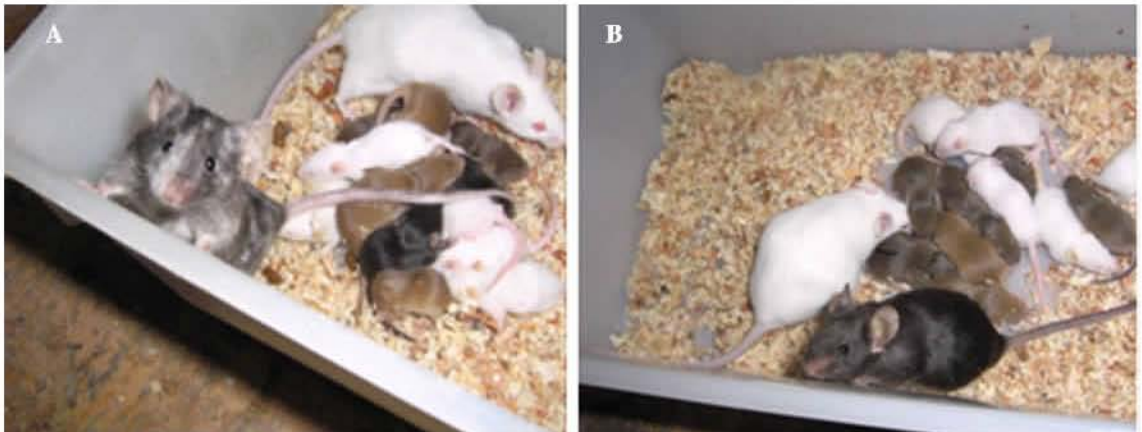


图 4 雄鼠嵌合小鼠与昆明白雌鼠及后代

Fig. 4 Two groups of offspring born from mating between male chimera and female KM mouse

表 3 嵌合体雌雄鼠不同方式合笼的实验结果

Tab. 3 Results of different mating between male chimera and female mouse

	MC1 + FK	MC2 + FK	MC3 + FK	MC4 + FK	MC5 + FK
交配结果 Results	4G + 2B + 2BG + 5W (13)	3G + 5BG + 5W (13)	无后代	无后代	17 W

MC: 嵌合雄性 (Male chimera); FK: 昆明白雌性 (Female KM mouse); G: 灰色 (Gray); B: 黑色 (Black); BG: 黑灰色 (Black and gray); W: 白色 (White)。

分别将 2 只高度嵌合小鼠和 1 只中度嵌合小鼠的心、脾、肾、骨髓消化成为单细胞悬液, 进行流式细胞检测, 结果显示 EGFP-ES 细胞在心、脾、

肾、骨髓上的嵌合率分别是 77.96%、84.06%、42.49% 和 52.02% (表 4)。流式细胞仪检测的组方图如图 5 所示。

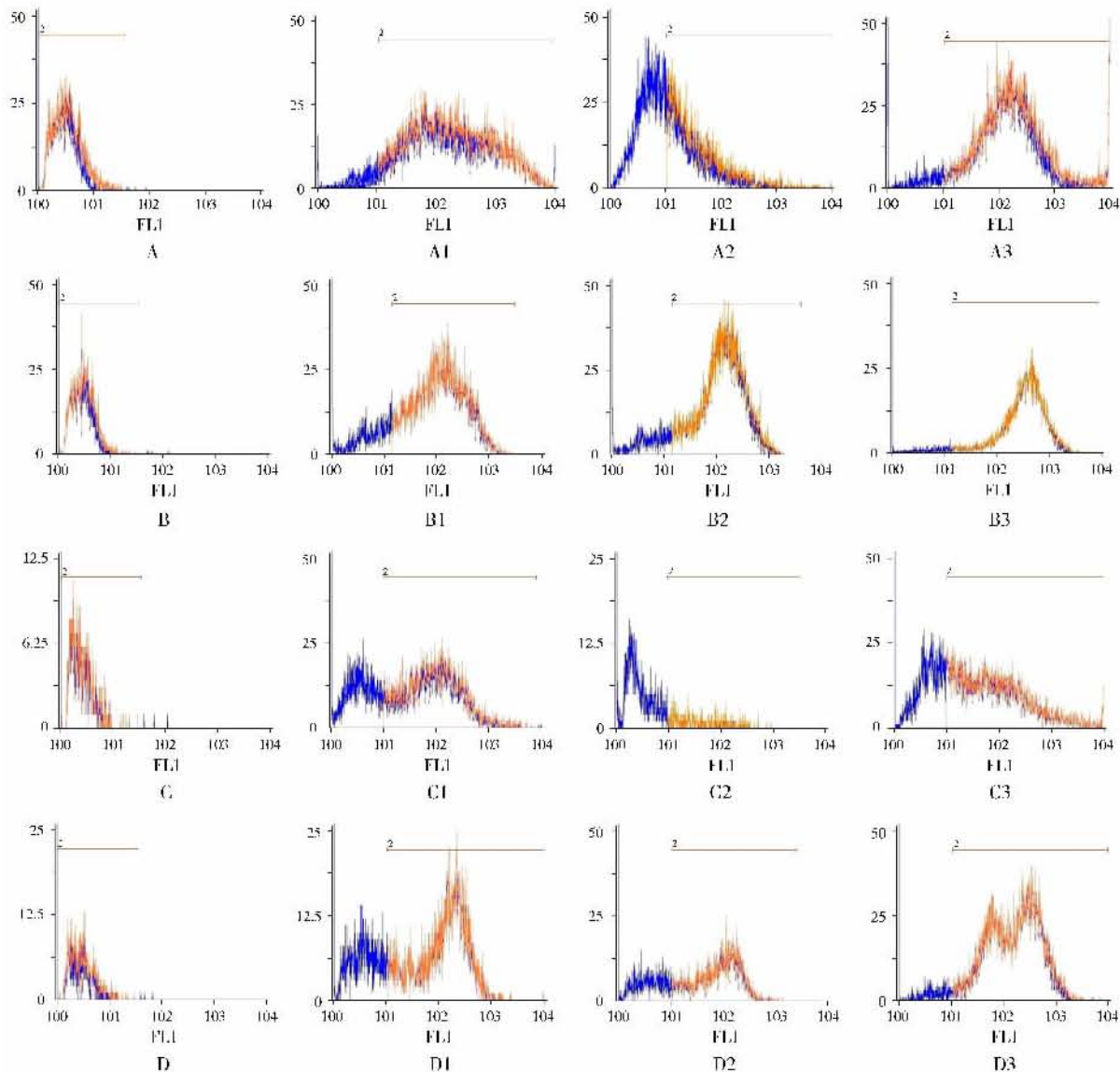


图 5 流式细胞分选检验 EGFP-ES 细胞在嵌合组织上的嵌合程度

Fig. 5 Four chimeric organs (heart, spleen, kidney and marrow) were examined by FACS analysis

A. 昆明小鼠心脏组织细胞的流式细胞分选 (KM mouse heart was examined by FACS analysis); A1-A3. 嵌合小鼠心脏组织细胞的流式细胞分选 (Three chimeric hearts were examined by FACS analysis, respectively); B. 昆明小鼠脾组织细胞的流式细胞分选 (KM mouse spleen was examined by FACS analysis); B1-B3. 嵌合小鼠脾组织细胞的流式细胞分选 (Three chimeric spleens were examined by FACS analysis, respectively); C. 昆明小鼠肾组织细胞的流式细胞分选 (KM mouse kidney was examined by FACS analysis); C1-C3. 嵌合小鼠肾组织细胞的流式细胞分选 (Three chimeric kidneys were examined by FACS analysis, respectively); D. 昆明小鼠骨髓组织细胞的流式细胞分选 (KM mouse marrow was examined by FACS analysis); D1-D3. 嵌合小鼠骨髓组织细胞的流式细胞分选 (Three chimeric mice marrow were examined by FACS analysis, respectively)。

表 4 流式细胞分选检验 EGFP-ES 细胞在嵌合组织上的嵌合率 (%)

Tab. 4 Contribution of EGFP-ES cells in chimeric offsprings (Mean  $\pm$  SE)

样本 Sample	心 Heart	脾 Spleen	肾 Kidney	骨髓 Marrow
嵌合鼠 1 Chimera 1	93.68	79.62	60.03	36.13
嵌合鼠 2 Chimera 2	46.39	81.38	2.99	30.50
嵌合鼠 3 Chimera 3	93.80	91.18	64.45	89.43
平均值 Average	77.96 $\pm$ 15.78	84.06 $\pm$ 3.60	42.49 $\pm$ 19.79	52.02 $\pm$ 18.78

### 3 讨论

目前,随着“治疗性克隆”概念的提出,胚胎干细胞的研究已经成为生命科学的热点领域之一。当前胚胎干细胞的应用主要集中在两个方面,一个是细胞分化,另一个是功能基因研究。胚胎干细胞可以诱导分化成为多种特定组织类型细胞,通过绿色荧光蛋白的表达可以直观追踪和实时观察 ES 细胞的分化进程 (Shen et al, 2003; Yang & Pu, 2001)。由于绿色荧光蛋白性质稳定,表达绿色荧光蛋白的组织经固定后不仅能够在紫外线激发下发出绿色荧光而且可以使用绿色荧光蛋白抗体进行免疫组化分析,表达绿色荧光蛋白的胚胎干细胞为发育生物学、遗传学、肿瘤学、毒理学等众多领域的研究提供了很大的便利。本研究将已得到的来源于昆明白雌鼠和 EGFP 转基因雄鼠的杂种 ES 细胞注射到囊胚腔内 (昆明小鼠),经移植后,共获得了 9 只表达绿色荧光蛋白的嵌合体小鼠。9 只小鼠均发育到成年,且健康状况良好。为了调查 EGFP-ES 细胞在心脏、脾、肾和骨髓等四个方向上的分化能力,2 只高度嵌合小鼠和 1 只中度嵌合小鼠的心、脾、肾、骨髓被消化成为单细胞悬液,进行流

式细胞检测,结果显示 EGFP-ES 细胞在心、脾、肾、骨髓上的嵌合率分别是 77.96%、84.06%、42.49% 和 52.02%。与近交系来源的小鼠胚胎干细胞相比 (Allen et al, 1994; Hikichi et al, 2007),杂种 EGFP-ES 细胞在心脏、脾和骨髓上有更强的分化潜能。这些结果表明杂种 EGFP-ES 细胞不仅能够表达绿色荧光蛋白而且至少可以在心脏、脾和骨髓三个方向上进行分化研究。

在 ES 细胞上进行的遗传修饰一般要通过嵌合体的生殖细胞才能传递给后代,因而生殖系嵌合体的获得是实现 ES 细胞途径的决定步骤,仅仅得到非种系嵌合体对于功能基因研究而言是没有意义的 (Chen et al, 1999)。本实验选取其中 5 只雄性嵌合鼠分别与昆明雌鼠进行交配实验,发现有 2 只雄性嵌合鼠的后代的毛色出现白色之外的其它颜色。这说明该 ES 细胞具有生殖系嵌合能力。一般除 129 系以外,其它近交系来源的 ES 细胞的生殖系转化能力大多较弱。我们的结果证明来自近交系 (雄性 EGFP 转基因小鼠) 和远交系 (雌性昆明小鼠) 的杂种 ES 细胞也具有生殖系嵌合能力。因此,我们所建立的 EGFP-ES 细胞系也为今后方便地制备转基因动物和基因敲除动物等研究奠定了基础。

### 参考文献:

- Allen ND, Barton SC, Hilton K, Norris ML, Surani MA. 1994. A functional analysis of imprinting in parthenogenetic embryonic stem cells [J]. *Development*, **120** (6): 1473-1482.
- Bigot-Iasserre D, Chuzel F, Debljnye EL, Bars R, Carmichael NG. 2003. Tumorigenic potential of carbaryl in the heterozygous p53 knockout mouse model [J]. *Food and Chemical Toxicology*, **41** (1): 99-106.
- Bradley A, Evans M, Kaufman MH, Robertson E. 1984. Formation of germ-line chimeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines [J]. *Nature*, **309**: 255-256.
- Chen WS, Han R, Shang KG. 1999. Formation of Germline Chimeras from mouse embryonic stem cells [J]. *Acta Genetica Sinica*, **26** (2): 126-134. [陈伟胜, 韩嵘, 尚克刚. 1999. 小鼠 ES 细胞种系嵌合体的获得. *遗传学报*, **26** (2): 126-134.]
- Evans MJ, Kaufman MH. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos [J]. *Nature*, **292**: 154-156.
- Hikichi T, Wakayama S, Mizutani E, Takashima Y, Kishigami S, Van Thuan N, Ohta H, Thuy Bui H, Nishikawa SI, Wakayama T. 2007. Differentiation potential of parthenogenetic embryonic stem cells is improved by nuclear transfer [J]. *Stem Cells*, **25** (1): 46-53.
- Liu B, Sun Y, Jiang F, Zhang S, Wu Y, Lan Y, Yang X, Mao N. 2003. Disruption of Smad5 gene leads to enhanced proliferation of high-proliferative potential precursors during embryonic hematopoiesis [J]. *Blood*, **101** (1): 124-133.
- Shen G, Cong XQ, Wang Z. 2003. Establishment of mouse ES-cell line and GFP marker [J]. *J Southeast Univ (Med Sci Edi)*, **22** (2): 71-74. [沈干, 丛笑倩, 汪铮. 2003. 小鼠 ES 建系及 GFP 标记. *东南大学学报 (医学版)*, **22** (2): 71-74.]
- Shen XD, Ke B, Zhai Y, Gao F, Anselmo D, Lassman CB, Busuttil RW, Kupiec-weqlinski JW. 2003. Stat4 and Stat6 signaling in hepatic ischemia/reperfusion injury in mice: HO-1 dependence of Stat4 disruption-mediated cytoprotection [J]. *Hepatology*, **37** (2): 296-303.
- Yang H, Fu JL. 2001. Biological characteristics of mouse ES cell line expressing GFP [J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, **22** (4): 319-321. [杨桦, 傅继梁. 2001. 表达 GFP 的小鼠 ES 细胞系的生物学特性. *第二军医大学学报*, **22** (4): 319-321.]