

兔*Oct4*启动子驱动RFP基因表达载体的构建及验证

唐 澜¹ 姜伟华² 尹明茹² 周小梅¹ 李和平^{1*} 陈学进² 李善刚^{2*}

(¹东北林业大学野生动物资源学院, 哈尔滨 150040; ²上海交通大学医学院实验动物科学部, 上海 200025)

摘要 转录因子OCT4在维持和调控胚胎干细胞的多能性中发挥着重要的作用。*Oct4*基因启动子驱动标志蛋白的表达对研究胚胎干细胞多能性和建立iPS细胞有重要意义。由于GFP在慢病毒转染过程中常用作转染标记, 计划构建兔*Oct4*基因启动子(r*Oct4*)驱动红色荧光蛋白表达的载体, 这将有利于兔ES细胞和iPS细胞制备的研究。通过PCR方法扩增r*Oct4*, 构建了r*Oct4*驱动RFP基因的表达载体r*Oct4*-RFP。经转染小鼠ES细胞验证正确后, 将r*Oct4*-RFP质粒转染兔成纤维细胞系获得r*Oct4*-RFP成纤维细胞系。经过酶切和测序验证, 证明r*Oct4*-RFP构建成功, 而且能够在小鼠ES细胞系E14中表达细胞红色荧光蛋白, 并受细胞分化状态的调控。通过脂质体介导的基因转移、抗性筛选和PCR鉴定建立了r*Oct4*-RFP转基因成纤维细胞系。

关键词 兔; r*Oct4*启动子; RFP; 干细胞; 转基因

Construction and Validation of Rabbit *Oct4* Promoter-Driven RFP Expression Vector

Tang Lan¹, Jiang Weihua², Yin Mingru², Zhou Xiaomei¹, Li Heping^{1*}, Chen Xuejin², Li Shangang^{2*}

(¹College of Wildlife Resources, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China; ²Department of Laboratory Animal Sciences, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200025, China)

Abstract The OCT4 transcription factor plays an important role in maintaining, regulating and controlling the pluripotency of embryonic stem cells/ES cells. The *Oct4* gene promoter driving the expression of marker protein is significant for the pluripotency research of ES cells and the establishment of induced pluripotent stem cells/iPS cells. The green fluorescent protein (GFP) is always used as transfection marker in lentivirus transfection process, so the rabbit *Oct4* gene promoter driving the expression of red fluorescent protein (RFP) is planned to be established, which will be useful to the study on rabbit ES cells and iPS cells preparation. The *Oct4* promoter of rabbit (r*Oct4*) was cloned through PCR and the expression vector, r*Oct4*-RFP was constructed as the RFP was driven by r*Oct4*. The r*Oct4*-RFP vector was proved to be correct by the mouse ES cells transfection and the rabbit fibroblast cell line was transfected by r*Oct4*-RFP to obtain rabbit r*Oct4*-RFP fibroblasts. By enzyme digestion and sequencing verification, r*Oct4*-RFP construction is not only proved to be successful, but also is able to express the red fluorescent protein in mouse ES cell line, E14. The red fluorescent protein can't be expressed in differentiated r*Oct4*-RFP transgenic E14 cells. The r*Oct4*-RFP transgenic fibroblast cells are established through liposome mediated transgenesis, resistance screening and identification of PCR.

Key words rabbit; r*Oct4* promoter; RFP; stem cells; transgenesis

收稿日期: 2013-09-03 接受日期: 2013-11-04

国家自然科学基金(批准号: 81170756、31101048)和上海市自然科学基金项目(批准号: 11140901600、11ZR1418800)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0451-82192032, E-mail: 461905800@qq.com; Tel: 021-63846590, E-mail: lis101@163.com

Received: September 3, 2013 Accepted: November 4, 2013

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81170756, 31101048) and the Shanghai Natural Science Funding (Grant No.11140901600, 11ZR1418800)

*Corresponding authors. Tel: +86-451-82192032, E-mail: 461905800@qq.com; Tel: +86-21-63846590, E-mail: lis101@163.com

网络出版时间: 2013-12-11 15:31

URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.01.0283.html>

ES细胞(embryonic stem cells, ESCs)是从动物发育早期的胚胎分离得到,具有体外培养无限增殖、自我更新和多向分化特性的全能特性未分化细胞系^[1-3],目前已经成功建立了小鼠、大鼠、猴子和人类等物种的ES细胞系或类ES细胞系^[4-6]。2006年,Yamanaka等^[7]研究通过4个胚胎干细胞中高表达的基因转录因子(*Oct4/Sox2/Klf4/c-Myc*)的过量表达,诱导成纤维细胞去分化,使成体细胞重编程为iPS细胞(induced pluripotent stem cells)。iPS细胞技术出现后立即成为研究热点,并已在小鼠、人类、猕猴、大鼠、猪和兔中先后成功应用^[8-11]。ES细胞和iPS细胞的研究在发育生物学、基因功能研究、疾病模型、干细胞治疗和基因工程等方面具有很重要的价值^[12-13]。家兔作为重要的实验动物,在高血脂症、心血管疾病、代谢性疾病和肺部疾病等疾病模型方面与人类极为相似^[14-20]。另外,兔胚胎干细胞在形态和特性上很接近人的胚胎干细胞,可为人的胚胎干细胞治疗提供模型。因此,深入研究家兔的ES细胞和iPS细胞,为获得基因突变兔和为干细胞治疗提供研究材料,有着重要的意义。

OCT4(octamer-binding transcription factor 4)是胚胎干细胞多能性维持的重要因子之一,利用*Oct4*基因启动子驱动含荧光蛋白的基因表达可以作为直观判断干细胞是否分化的标记,也可定位干细胞在体内的转移,并分析*OCT4*表达程度与早期胚胎分化的关系^[20-22]。另外,*OCT4*-GFP(green fluorescent protein)转基因细胞常被用做iPS细胞和重编程的研究的工具^[23-26]。为了方便建立和研究兔的ES细胞和iPS细胞,我们拟建立兔*Oct4*基因启动子(rabbit *Oct4*, *rOct4*)驱动标志蛋白表达的载体,由于GFP常被用于转染做标记,为了区分在诱导iPS细胞时与*Oct4*启动子驱动的报告基因的表达,我们构建了*rOct4*驱动RFP(red fluorescent protein)表达的质粒*rOct4*-RFP,经过验证正确后,转染获得*rOct4*-RFP兔成纤维细胞

系,为进一步获得的兔核移植ES细胞和iPS细胞的研究提供干细胞多能性的红色荧光蛋白标记。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

PremixLATAq、DNA Marker、限制性内切酶、柱式小量质粒抽提试剂盒、柱式组织DNA抽提试剂盒、T4 DNA Ligase和*E.coli* Competent Cells DH5 α 来自TaKaRa公司。G418、D-PBS、0.25% Trypsin-EDTA、DMEM、DMEM/F12、FBS(fetal calf serum)、NEAA(non-essential amino acids)、L-glutamine和 β -mercaptoethanol来自Gibco公司。LIF(leukemia inhibitory factor)来自CHEMICON公司。DMSO和0.2% Gelatin来自Sigma公司。引物合成和Lipofectamine 2000 Transfection Reagent来自Invitrogen公司。DNA胶回收试剂盒来自Qiagen公司。pEGFPC1质粒购自clontech公司。PCR仪:Biometra, Germany。荧光显微镜及照相:OLYMPUSIX71, Japan。二氧化碳培养箱:Thermo Heracell150i CO₂ incubator, USA。

干细胞培养基mESM:DMEM添加15% FBS、0.1 mmol/L NEAA、2 mmol/L L-glutamine、0.1 mmol/L β -mercaptoethanol和100 U/mL LIF。分化培养基dEBM:mESM中不加LIF。成纤维细胞培养基FM:DMEM/F12添加10% FBS。

1.2 质粒的构建

1.2.1 引物的设计 根据PCR引物的设计原理,并依Gen-Bank数据库中*RFP*和*rOct4*的序列分别设计两对引物用于扩增*RFP*和*rOct4*的序列(表1)。*Age* I和*Mlu* I酶切位点分别被引入*RFP*上下游扩增引物;*Ase* I和*Age* I酶切位点分别被引入*rOct4*上下游扩增引物。根据预构建的*rOct4*-RFP质粒序列,我们在*rOct4*启动子的上游的PEGFPC1骨架内设计了引物RFP F2,与RFP R配对用于质粒的鉴定。引物序列见表1。

表1 引物序列信息

Table 1 The information of primer sequences

| 引物名称 | 序列(5'→3')(下划线为酶切位点) |
|----------------|-------------------------------------------------------------------|
| Primer's names | Sequences (5'→3') (the underline is enzyme cutting site) |
| RFP F | GCA TAC CGG T(<u>Age</u> I)CG CCA CCA TGG CCT CCT CCG AGG AC |
| RFP R | CAT TAC GCG T(<u>Mlu</u> I)CA GGT CGA GGG ATC TCC ATA A |
| <i>rOct4</i> F | TAG TTA TTA AT(<u>Ase</u> I)A GAC CCA GGA GAC TCA AAG |
| <i>rOct4</i> R | TGG CGA CCG GT(<u>Age</u> I)A GCG CTA GTG ATT ACC CAA GAT CCG CG |
| RFP F2 | CCC TGA TTC TGT GGA TAA CCG |

1.2.2 CMVRFP-C1质粒的设计和构建 质粒构建如图1所示,以pCX-mRFP1(CAG驱动RFP表达载体,吴晓晖博士惠赠)为模版,用引物RFP F和RFP R扩增RFP基因编码区和Poly A,预计PCR产物长度为1 256 bp,扩增条件:98 °C预变性10 min;98 °C变性10 s,68 °C退火30 s,72 °C延伸120 s,35个循环。琼脂糖凝胶电泳鉴定并切胶回收PCR产物。用酶Age I和Mlu I(TaKaRa公司)对扩增出的RFP片段和pEGFP-C1分别进行双酶切。对RFP产物和pEGFP-C1骨架(3 690 bp)分别回收,用T4 DNA Ligase连接,转化DH5 α ,涂板于卡那霉素抗性的LB固体培养基过夜培养,次日挑斑、摇菌培养。抽提重组质粒,酶切鉴定,将鉴定结果为阳性克隆的质粒送Invitrogen公司测序,测序正确的质粒命名为CMVRFP-C1。

1.2.3 rOct4-RFP质粒的设计和构建 以兔基因组为模版用引物rOct4 F和rOct4 R扩增rOct4(约3.2 Kb, GenBank NW_003159279.1)序列,预计产物长度为3 217 bp,扩增条件为:98 °C预变性10 min;98 °C变性10 s,62 °C退火30 s,72 °C延伸240 s,35个循环。琼脂糖凝胶电泳鉴定并切胶回收PCR产物。用Age I和Ase I双酶切rOct4序列和CMVRFP-C1,回收rOct4和CMVRFP-C1骨架(4 332 bp),连接重组构建质粒。将酶切鉴定结果为阳性克隆的质粒送Invitrogen公司测序,测序正确的质粒命名为rOct4-RFP。

1.3 细胞转染和筛选建系

1.3.1 建立rOct4-RFP转染小鼠ES细胞系 小鼠E14细胞(刘峻岭博士惠赠)在mESM液体中无饲养层培养。将约 1×10^6 E14细胞传至3.5 cm dish中。第二天,

按Lipofectamine 2000 Transfection Reagent使用说明,将4 μ g质粒rOct4-RFP和pCX-mRFP1分别转染到E14细胞中。转染48 h后,荧光显微镜下观察细胞。按1:10的比例将转染后的E14细胞传代培养2 d,在荧光显微镜下挑选出生长状态良好的阳性克隆标记后在显微镜下用10 μ L的小枪头吸出,放入0.25% Trypsin-EDTA微滴消化为单个细胞后转入4孔板培养,培养条件为37 °C、5% CO₂。用含200 μ g/mL G418的mESM培养基培养,每一代生长周期为48 h,观察每一代的红色荧光蛋白表达情况并拍照。第3代后在荧光显微镜下用同样的方法再一次挑选完全表达红色荧光蛋白的克隆,培养建系、并冻存。

1.3.2 诱导rOct4-RFP转基因E14细胞体外分化 将正常生长的rOct4-RFP和pCX-mRFP1转基因E14细胞的其中一个细胞系分别以1:3和1:5的比例传代,各传入2个非贴壁处理的3.5 cm dish中,在同样条件下培养:dish 1用于每天观察,dish 2用于贴壁分化。用dEBM培养液在37 °C、5% CO₂培养箱中培养。传代3~7 d后可观察拟胚体(embryoid body, EB)形成。7~10 d时,在荧光显微镜下挑选dish 2中生长状态良好并完全表达红色荧光蛋白的EB移入贴壁dish中继续诱导分化。12~15 d时EB边缘细胞可贴壁分化为单层细胞,在荧光显微镜下观察分化为单层细胞的红色荧光表达。

1.3.3 rOct4-RFP转染雄性兔体细胞 将 2×10^5 兔成纤维细胞传入24孔板,加入1 mL的FM。细胞生长至60%汇合时按上述脂质体转染方式将1 μ g rOct4-RFP质粒转染到细胞兔成纤维细胞中,6 h后更换新

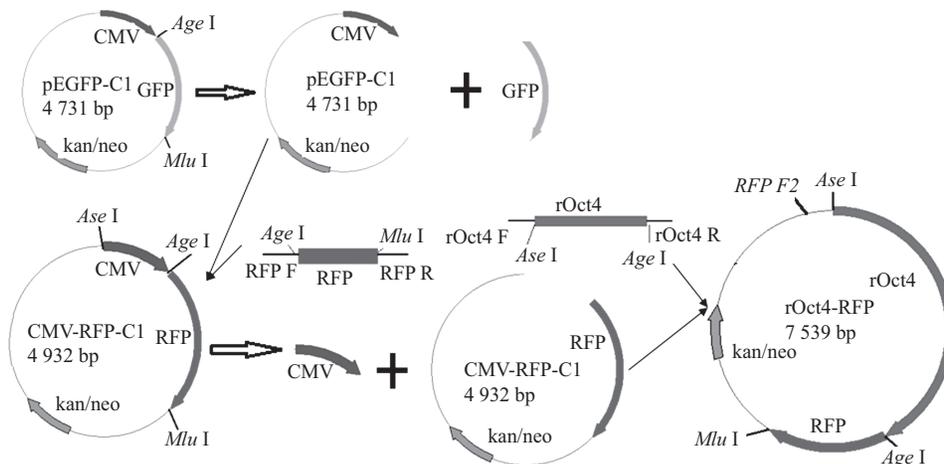


图1 rOct4-RFP质粒构建示意图

Fig.1 Plasmid rOct4-RFP construction scheme

鲜的FM, 48 h后将细胞传入4个48孔板中。在48孔板中培养48 h后加入G418(培养液G418的终浓度为1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)进行细胞筛选。10~14 d后在显微镜下观察, 进行单克隆细胞挑选。将挑选出来的单克隆用含400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ G418的培养基进行扩大培养, 建立rOct4-RFP雄性兔成纤维细胞系、并冻存。

1.3.4 转基因成纤维细胞PCR鉴定 按柱式组织DNA抽提试剂盒操作方法从rOct4-RFP成纤维细胞系中提取DNA, 用引物“鉴定RFP F”和“RFP R”进行PCR扩增, 可鉴定基因组DNA中是否含有*rOct4*和*RFP*的完整序列。

2 结果

2.1 质粒构建及鉴定

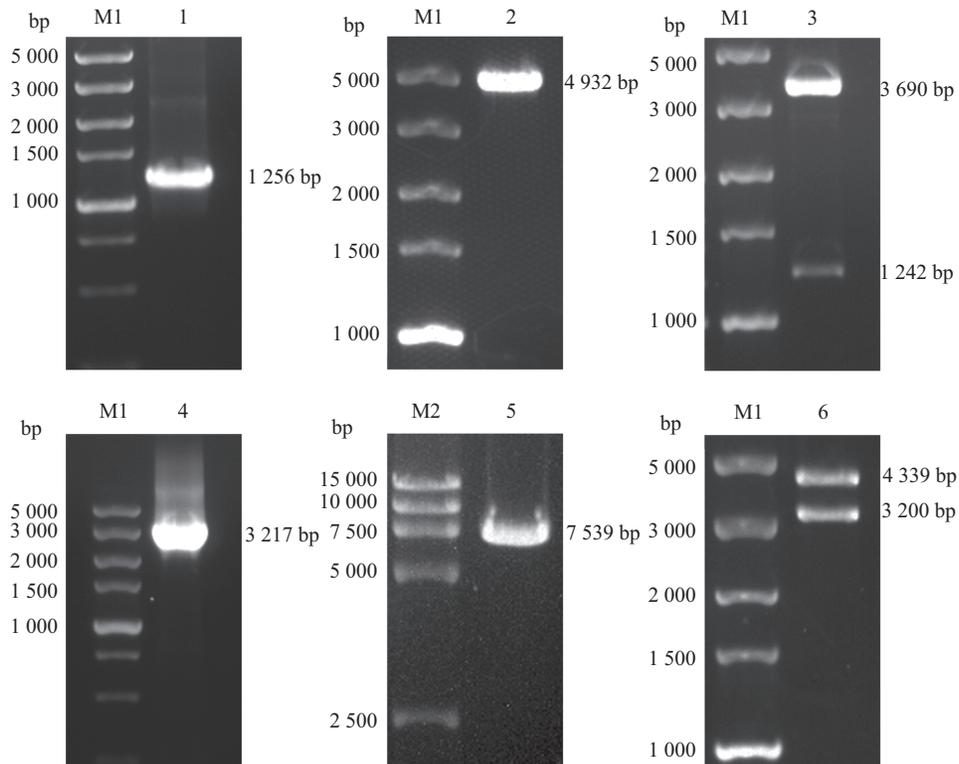
2.1.1 CMVRFP-C1质粒 用引物RFP F和引物RFP R扩增*RFP*片段, 扩增长度为1 256 bp(图2A), 将构建完成的CMVRFP-C1质粒经*Age* I单酶切后长度为4 932 bp(图2B), 用*Age* I和*Mlu* I双酶切CMVRFP-C1质粒后

的长度为3 690 bp和1 242 bp(图2C), 证明所构建的质粒符合设计预期。质粒的测序结果也说明了质粒构建正确。

2.1.2 rOct4-RFP质粒 根据设计, *rOct4*启动子扩增长度为3 217 bp(图2D)。经过酶切替换CMVRFP-C1质粒中的*CMV*启动子形成rOct4-RFP质粒。用rOct4-RFP质粒*Mlu* I单酶切后, 长度为7 539 bp(图2E); 用*Age* I和*Ase* I双酶切rOct4-RFP质粒后得到4 339 bp和3 200 bp两个片段(图2F), 上述结果说明构建的rOct4-RFP符合预期。质粒测序结果也证明了*rOct4*序列PCR扩增的正确性。

2.2 胚胎干细胞转染鉴定

为验证rOct4-RFP构建的正确与否, 我们选取长势良好、细胞群落结构紧凑、边缘清晰、呈隆起状的小鼠E14细胞进行基因转染, 作为实验组。小鼠E14细胞转染rOct4-RFP质粒48 h后, 在荧光显微镜下观察有部分小鼠E14细胞克隆表达红色荧光蛋白(图3)。将转染2 d后的E14细胞传代培养, 2 d后挑选



1: *RFP*的PCR产物; 2: 用酶*Age* I使CMVRFP-C1质粒线性化产物; 3: 用酶*Age* I和*Mlu* I双酶切CMVRFP-C1的产物; 4: *rOct4*的PCR产物; 5: 用酶*Mlu* I使rOct4-RFP质粒线性化产物; 6: 用酶*Ase* I和*Age* I双酶切质粒rOct4-RFP的产物。M1: 5 000 bp DNA maker; M2: 15 000 bp DNA maker。

1: the PCR product of *RFP*; 2: the product of CMVRFP-C1 plasmid linearized by *Age* I; 3: the product of CMVRFP-C1 double-enzyme digested by *Age* I and *Mlu* I; 4: the PCR product of *rOct4*; 5: the product of rOct4-RFP plasmid linearized by *Mlu* I; 6: the product of rOct4-RFP plasmid double-enzyme digested by *Ase* I and *Age* I. M1: 5 000 bp DNA maker; M2: 15 000 bp DNA maker.

图2 PCR扩增和质粒酶切鉴定

Fig.2 PCR amplification and enzyme digestion of plasmids

出8个生长状态良好的阳性克隆,用G418筛选后,培养第1代,可见大多数克隆可表达红色荧光蛋白,但单个阳性克隆中并非全部细胞完全表达红色荧光蛋白(图3),经第二次挑选克隆筛选后,单个阳性克隆的全部细胞都表达红色荧光蛋白(图3)。最终获得了3个生长状态良好的rOct4-RFP-E14细胞系。用pCX-mRFP1转小鼠E14细胞作为对照组,并用同样的方法筛选出4个阳性克隆。

2.3 诱导rOct4-RFP转基因E14细胞体外分化

ES细胞在体外分化所形成的EB在结构上能够模仿早期胚胎发育过程,经过EB的形成和贴壁分化

我们发现,在形成的EB中,实验组rOct4驱动的RFP和对照组中CAG驱动的RFP均仍有高的表达(图4),而EB贴壁分化后,实验组EB边缘分化的细胞不再表达红色荧光蛋白,而对照组EB边缘分化的细胞仍然表达红色荧光蛋白(图5)。

2.4 rOct4-RFP转染兔成纤维细胞及鉴定

我们将rOct4-RFP转染雄性兔成纤维细胞,发现转染后没有RFP表达(图6),经过G418筛选后获得7个细胞系,命名为:rOct4-RFP转基因成纤维细胞系3、8、9、13、14、16、17。从这7个细胞系中分别提取DNA作为模版,用引物RFP F2和引物RFP R对其

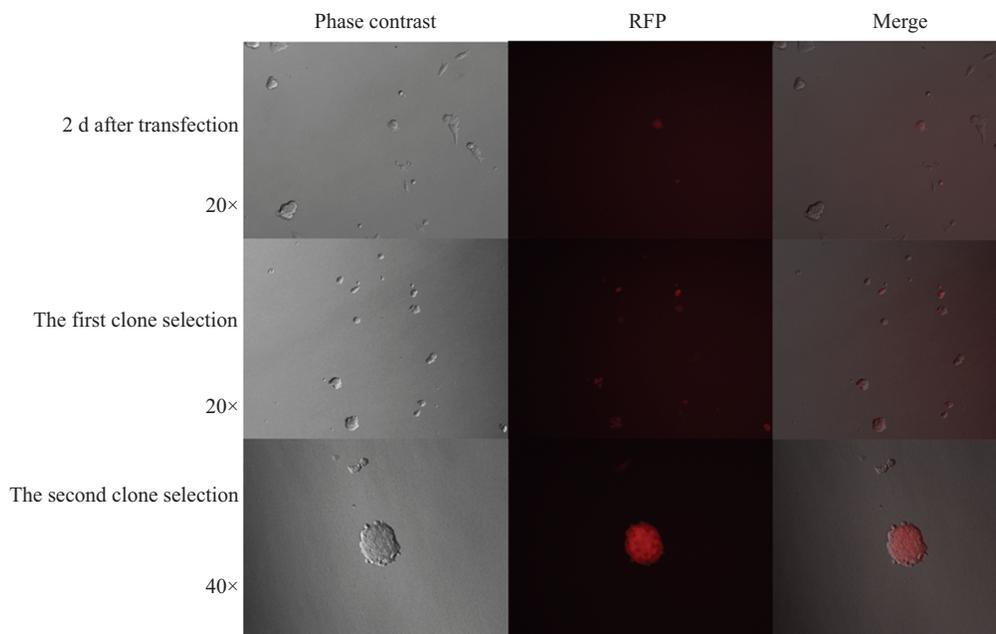


图3 实验组rOct4-RFP质粒转染小鼠E14细胞后各时期表达红色荧光蛋白图

Fig.3 The figure of the experimental group rOct4-RFP plasmid expressing the red fluorescent protein in each period after transfecting mouse E14 cells

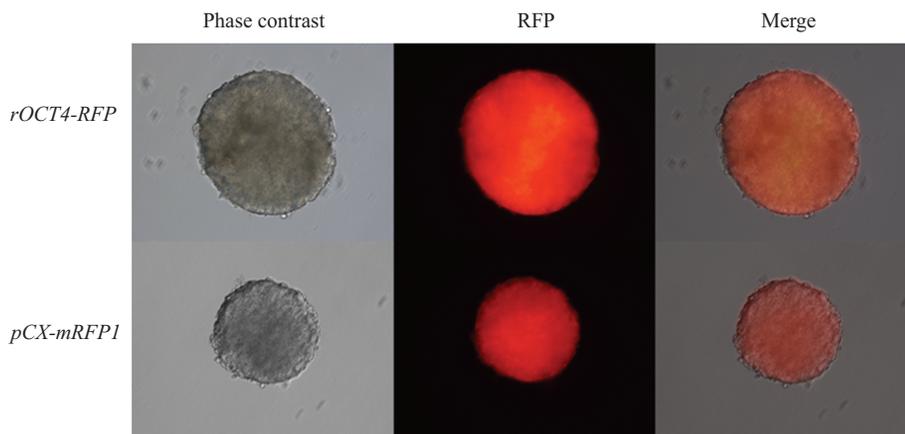
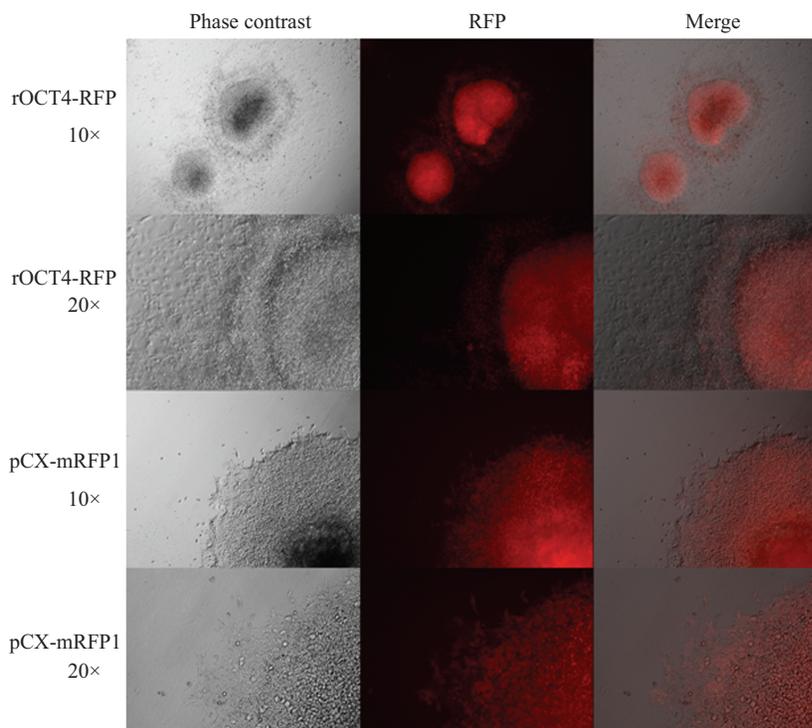


图4 rOct4-REP转基因E14细胞和pCX-mRFP1转基因E14细胞分化为EB(20×)

Fig.4 rOct4-REP transgenic E14 cells and pCX-mRFP1 transgenic E14 cells differentiation into EB (20×)



在荧光显微镜于10×和20×镜下观察到的rOct4-RFP EB贴壁分化与pCX-mRFP1 EB贴壁分化图像。

The adherence differentiated images of rOct4-RFP EB and the pCX-mRFP1 EB observed at 10 magnification and 20 magnification under the fluorescence microscope.

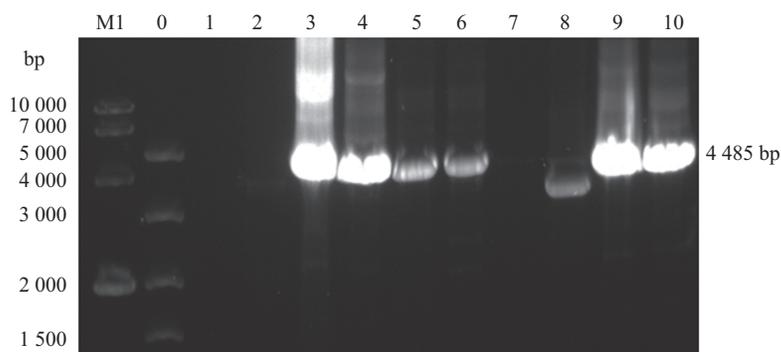
图5 不同启动子驱动*RFP*在贴壁分化后的EB中的表达

Fig.5 *RFP* expression driven by different promoters in adherent differentiated EB



图6 RFP在rOct4-RFP转染雄性兔成纤维细胞系中的表达(10×)

Fig.6 The expression of RFP in rOct4-RFP transfecting male rabbit fibroblast cell line (10×)



M1: 10 000 bp DNA maker; 0: 5 000 bp DNA maker. 1: 水(空白)对照; 2: 公兔子成纤维细胞DNA(阴性)对照; 3: Oct4-RFP质粒(阳性)对照; 4-10: 分别为筛选出的*rOct4-RFP*转基因兔成纤维细胞系3、8、9、13、14、16、17。

M1: 10 000 bp DNA maker; 0: 5 000 bp DNA maker. 1: water (blank) control; 2: male rabbit fibroblast cell DNA (negative) contrast; 3: Oct4-RFP plasmid (positive) contrast; 4-10: the selected *rOct4-RFP* transgenic rabbit fibroblast cell line 3, 8, 9, 13, 14, 16, 17.

图7 转基因成纤维细胞PCR分析

Fig.7 PCR analysis of transgenic fibroblast cells

进行PCR鉴定,结果可见有5个rOct4-RFP转基因成纤维细胞系(3、8、9、16、17)得到4 485 bp的预测片段(图7)。

3 讨论

我们构建了rOct4-RFP质粒,转染小鼠ES细胞系E14细胞后成功地观察到红色荧光蛋白表达,并筛选得到转基因克隆;再将rOct4-RFP转染兔的成纤维细胞,并且建立rOct4-RFP成纤维细胞系,为进一步获得兔核移植ES细胞和iPS细胞的研究提供干细胞多能性的红色荧光蛋白标记。

*Oct4*基因是ES细胞多能性维持和胚胎早期发育中的重要基因。相继小鼠、人和牛等*Oct4*基因的研究,人们对兔的*Oct4*基因的研究也不断深入。兔*Oct4*基因的全序列已经发表^[27],而且发现兔*Oct4*在兔卵母细胞到囊胚的表达与人相似,兔的*Oct4*启动子CR4区和人有高度的相似性^[28]。已经成功克隆得到*Oct4*基因的启动子序列,长度约2.2 Kb,包括四个高度保守的启动子区域(CR1-4)^[28]。兔与小鼠、人和牛*Oct4*启动子的对比结果显示物种间具有较高的保守性^[29]。其中兔和人的保守结构域序列相似程度最高,特别是CR-4区^[21]。为了尽可能最大限度地表达报告基因,提高外源转基因效率并保持CR-4区的完整性。我们选择兔完整*Oct4*基因启动子来驱动*RFP*的表达,兔启动子约2.2 Kb,我们扩增的长度为3.2 Kb,在上游区域延长约1 Kb,用来保证兔*Oct4*启动子的完整性。

在我们的实验中,rOct4-RFP质粒通过两次构建完成,通过酶切鉴定的结果和测序结果可以证明CMVRFP-C1质粒和rOct4-RFP质粒构建均正确。用引物RFP F2和引物RFP R进行PCR扩增出长度为4 485 bp的片段,通过测序说明载体包含完整的*rOct4*和*RFP*序列。大量的实验说明,*Oct4*基因启动子驱动含荧光蛋白的基因表达可作为ES细胞和iPS细胞研究的备选标记和工具。为了验证我们构建的rOct4-RFP载体能否在多能干细胞中表达,我们选择了小鼠E14细胞作为测试对象,而没有选择兔ES细胞,其主要原因是目前还没有建立能够形成性腺嵌合体的兔ES细胞系。本实验中rOct4驱动*RFP*在小鼠E14细胞中得到了良好的表达。通过rOct4-RFP质粒转染小鼠E14细胞和转染后阳性克隆的筛选以及传代扩大培养,我们得到了3个阳性细胞系。继而,rOct4-RFP转基因E14细胞在特定的条件下分化为EB,由于EB在生长时常聚集生长,不可避免会常

有两个或几个EB融合为一个大的EB,因此在同样的条件下EB的个体大小有较大差异。为避免荧光照射对荧光表达的影响,我们将实验组rOct4-RFP转基因E14细胞培养的EB分到两个dish中培养,其中一个dish中的EB用于每天观察荧光表达情况;另一个dish中的EB只经过一次荧光照射并且完全表达红色荧光蛋白,将其EB贴壁培养再分化后,观察到边缘分化的单层细胞已不表达红色荧光蛋白。而对照组pCX-mRFP1转基因E14细胞在同样条件下分化后,观察到的分化细胞全部表达红色荧光蛋白,说明*CAG*启动子不受胚胎干细胞分化的影响。兔成纤维细胞转染rOct4-RFP后,*RFP*并不能表达红色荧光蛋白,初步验证*rOct4*启动子特异性地驱动含*RFP*的报告基因在多能干细胞中表达,而在成纤维细胞中不表达。实验结果也进一步验证了*rOct4*启动子可以在异种动物的多能干细胞中表达^[30],而且受细胞分化状态调控。

通常我们所见到的用于ES细胞的转基因技术有电穿孔法^[31]、慢病毒感染法^[32]和脂质体转染法^[17,33]等。由于慢病毒转染的方法安全性不易控制,所以我们从安全和便捷的角度考虑,选择了易于操作的脂质体转染方法,用适当的DNA/脂质体的比例转染ES细胞,可以顺利得到转基因ES细胞。由于脂质体转染的方法只能对表面细胞进行转染,而ES细胞生长呈克隆状,我们不易于得到完全阳性的克隆,于是,我们将转染后的ES细胞先进行一次传代培养,再经过两次单克隆挑选培养,得到完全表达红色荧光蛋白的阳性细胞系。

我们将rOct4-RFP质粒转染到兔成纤维细胞后,用G418筛选出7个细胞系。通过鉴定确定转染后的5个细胞系中包含了*rOct4*启动子和*RFP*的完整序列。为进一步研究兔核移植ES细胞和iPS细胞打下了基础。

参考文献 (References)

- 1 Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos. *Nature* 1981; 292(5819): 154-6.
- 2 Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78(12): 7634-8.
- 3 Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, Trounson A, Bongso A. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: Somatic differentiation *in vitro*. *Nat Biotechnol* 2000; 18(4): 399-404.
- 4 Iannaccone PM, Taborn GU, Garton RL, Caplice MD, Brenin DR. Pluripotent embryonic stem cells from the rat are capable of producing chimeras. *Dev Biol* 1994; 163(1): 288-92.
- 5 Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA,

- Swiergiel JJ, Marshall VS, *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282(5391): 1145-7.
- 6 Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, *et al.* Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 2007; 318(5858): 1917-20.
- 7 Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126(4): 663-76.
- 8 Ezashi T, Telugu BP, Alexenko AP, Sachdev S, Sinha S, Roberts RM. Derivation of induced pluripotent stem cells from pig somatic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106(27): 10993-8.
- 9 Liu H, Zhu F, Yong J, Zhang P, Hou P, Li H, *et al.* Generation of induced pluripotent stem cells from adult rhesus monkey fibroblasts. *Cell Stem Cell* 2008; 3(6): 587-90.
- 10 Honda A, Hirose M, Hatori M, Matoba S, Miyoshi H, Inoue K, *et al.* Generation of induced pluripotent stem cells in rabbits: Potential experimental models for human regenerative medicine. *J Biol Chem* 2010; 285(41): 31362-9.
- 11 Li W, Wei W, Zhu S, Zhu J, Shi Y, Lin T, *et al.* Generation of rat and human induced pluripotent stem cells by combining genetic reprogramming and chemical inhibitors. *Cell Stem Cell* 2009; 4(1): 16-9.
- 12 Gerrard L, Zhao D, Clark AJ, Cui W. Stably transfected human embryonic stem cell clones express OCT4-specific green fluorescent protein and maintain self-renewal and pluripotency. *Stem Cells* 2005; 23(1): 124-33.
- 13 Do JT, Scholer HR. Regulatory circuits underlying pluripotency and reprogramming. *Trends Pharmacol Sci* 2009; 30(6): 296-302.
- 14 Chowdhury JR, Grossman M, Gupta S, Chowdhury NR, Baker JR, Wilson JM. Long-term improvement of hypercholesterolemia after *ex vivo* gene therapy in LDLR-deficient rabbits. *Science* 1991; 254(5039): 1802-5.
- 15 Hoeg JM, Santamarina-Fojo S, Berard AM, Cornhill JF, Herderick EE, Feldman SH, *et al.* Overexpression of lecithin: Cholesterol acyltransferase in transgenic rabbits prevents diet-induced atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(21): 11448-53.
- 16 Helft G, Worthley SG, Fuster V, Zaman AG, Schechter C, Osende JJ, *et al.* Atherosclerotic aortic component quantification by noninvasive magnetic resonance imaging: An *in vivo* study in rabbits. *J Am Coll Cardiol* 2001; 37(4): 1149-54.
- 17 Chew JL, Loh YH, Zhang W, Chen X, Tam WL, Yeap LS, *et al.* Reciprocal transcriptional regulation of Pou5f1 and Sox2 via the Oct4/Sox2 complex in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* 2005; 25(14): 6031-46.
- 18 Aikawa M, Sugiyama S, Hill CC, Voglic SJ, Rabkin E, Fukumoto Y, *et al.* Lipid lowering reduces oxidative stress and endothelial cell activation in rabbit atheroma. *Circulation* 2002; 106(11): 1390-6.
- 19 Largo R, Sanchez-Pernaute O, Marcos ME, Moreno-Rubio J, Aparicio C, Granado R, *et al.* Chronic arthritis aggravates vascular lesions in rabbits with atherosclerosis: A novel model of atherosclerosis associated with chronic inflammation. *Arthritis Rheum* 2008; 58(9): 2723-34.
- 20 Yoshimizu T, Sugiyama N, De Felice M, Yeom YI, Ohbo K, Masuko K, *et al.* Germline-specific expression of the Oct-4/green fluorescent protein (GFP) transgene in mice. *Dev Growth Differ* 1999; 41(6): 675-84.
- 21 Yeom YI, Fuhrmann G, Ovitt CE, Brehm A, Ohbo K, Gross M, *et al.* Germline regulatory element of Oct-4 specific for the totipotent cycle of embryonal cells. *Development* 1996; 122(3): 881-94.
- 22 Plachta N, Bollenbach T, Pease S, Fraser SE, Pantazis P. Oct4 kinetics predict cell lineage patterning in the early mammalian embryo. *Nat Cell Biol* 2011; 13(2): 117-23.
- 23 Sumer H, Jones KL, Liu J, Heffernan C, Tat PA, Upton KR, *et al.* Reprogramming of somatic cells after fusion with induced pluripotent stem cells and nuclear transfer embryonic stem cells. *Stem Cells Dev* 2010; 19(2): 239-46.
- 24 Kunisato A, Wakatsuki M, Kodama Y, Shinba H, Ishida I, Nagao K. Generation of induced pluripotent stem cells by efficient reprogramming of adult bone marrow cells. *Stem Cells Dev* 2010; 19(2): 229-38.
- 25 Huangfu D, Maehr R, Guo W, Eijkelenboom A, Snitow M, Chen AE, *et al.* Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. *Nat Biotechnol* 2008; 26(7): 795-7.
- 26 Premrirut PK, Dow LE, Kim SY, Camiolo M, Malone CD, Miething C, *et al.* A rapid and scalable system for studying gene function in mice using conditional RNA interference. *Cell* 2011; 145(1): 145-58.
- 27 Shi JJ, Cai DH, Chen XJ, Sheng HZ. Cloning and characterization of the rabbit POU5F1 gene. *DNA Seq* 2008; 19(1): 56-61.
- 28 Kobolak J, Kiss K, Polgar Z, Mamo S, Rogel-Gaillard C, Tancos Z, *et al.* Promoter analysis of the rabbit POU5F1 gene and its expression in preimplantation stage embryos. *BMC Mol Biol* 2009; 10: 88.
- 29 Nordhoff V, Hubner K, Bauer A, Orlova I, Malapetsa A, Scholer HR. Comparative analysis of human, bovine, and murine Oct-4 upstream promoter sequences. *Mamm Genome* 2001; 12(4): 309-17.
- 30 张颖, 史芳瑜, 高绍荣, 林爱星. 异源Oct-4基因启动子在猪、兔和小鼠早期胚胎中的时空表达活性. *生物化学与生物物理进展*(Zhang Ying, Shi Fangyu, Gao Shaorong, Lin Aixing. Spatio-temporal expression of heterologous Oct-4 promoter in preimplantation embryos of pig, rabbit and mouse. *Progress in Biochemistry and Biophysics*) 2009; 36(9): 1180-5.
- 31 张梅英, 李华, 董婉维, 杨葳, 秦英, 汪瑛, 等. 稳定整合pTet-on载体小鼠胚胎干细胞株的建立. *中国实验动物学报*(Zhang Meiyong, Li Hua, Dong Wanwei, Yang Wei, Qin Ying, Wang Ying, *et al.* Establishment of a mouse embryonic stem cell line integrated with pTet-on gene. *Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica*) 2006; 14(3): 161-6.
- 32 Pfeifer A, Ikawa M, Dayn Y, Verma IM. Transgenesis by lentiviral vectors: Lack of gene silencing in mammalian embryonic stem cells and preimplantation embryos. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(4): 2140-5.
- 33 陈天姬, 杜娟, 卢光琇. 小鼠胚胎干细胞转染条件的优化. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*(Chen Tianji, Du Juan, Lu Guangxiu. Optimization of the transfection efficiency of mouse embryonic stem cells. *Journal of Northwest A&F University (Nat Sci Ed)* 2010; 12(38): 20-4.