

分类号: Q2 密 级: 公开

UDC: _____ 学校代码: 10127

内蒙古科技大学

硕士学位论文

论文题目: 人 iPS 细胞的诱导及诱导体系的优化
英文题目: The induction of human induced pluripotent stem cells and optimization of inducing system

学 位 类 别: 理学硕士

研究生姓名: 程腾 学号: 201102175

学科(领域)名称: 生物化学与分子生物学

指 导 教 师: 马利兵 职称: 教授

协助指导教师: 贺小英 职称: 讲师

2014年6月7日

独创性说明

本人郑重声明：所提交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得内蒙古科技大学或其他教育机构的学位或证书所使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中做了明确的说明并表示了谢意。

签名：程腾 日期：2014.6.7

关于学位论文使用授权的说明

本人完全了解内蒙古科技大学有关保留、使用学位论文（纸质版和电子版）的规定，即：本人唯一指定研究生院有权保留送交学位论文在学校相关部门存档，允许论文在校内被查阅和借阅，可以采用影印、缩印或其他复制手段保存论文。在论文作者同意的情况下，研究生院可以转授权第三方使用查阅该论文。

（保密的论文在解密后应遵循此规定）

签名：程腾 导师签名：孙明 日期：2014.6.7

摘 要

iPS 细胞(induced pluripotent stem cells, iPS 细胞), 即诱导多潜能干细胞, 是通过向终末分化的体细胞中导入某些基因(Sox2、Oct4、c-Myc 和 Klf4), 使其逆向回到胚胎干细胞样状态。它的特征和胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs) 一致, 能够分化成多种类型细胞。

本论文中, 通过磷酸钙法和 QuickShuttle 转染试剂对慢病毒载体(FU-tet-o-hSox2、FU-tet-o-hOct4、FU-tet-o-hc-Myc、FU-tet-o-hKLF4、FUDeltaGW-rtTA)和逆转录病毒载体 pEYK•E4 进行病毒包装并测定病毒滴度, 同时优化了其转染条件; 对人胎儿成纤维细胞(human fetus fibroblast cells, hFFCs) 进行了原代和传代培养, 并对不同原代培养方法进行了比较; 对小鼠胚胎成纤维细胞(mouse embryonal fibroblasts, MEFs)进行了原代和传代培养, 并将其用丝裂霉素 C 处理制备饲养层, 将 hFFCs 用病毒感染并观察其形态变化, 之后将其接种到饲养层上, 每天换液观察直至克隆出现。本论文对人 iPS 细胞的诱导体系进行了一系列优化, 提供了一个操作简单, 无需复杂仪器, 花费不高的方案, 具体研究内容及结果如下:

采用磷酸钙法和 QuickShuttle 转染试剂对慢病毒载体(FU-tet-o-hSox2、FU-tet-o-hOct4、FU-tet-o-hc-Myc、FU-tet-o-hKLF4、FUDeltaGW-rtTA)和逆转录病毒载体 pEYK•E4 进行病毒包装并测定病毒滴度, 同时研究不同包装体系、不同转染时间、有无明胶包被三个方面对使用磷酸钙法制备病毒和 QuickShuttle 转染试剂制备病毒的影响。从以上三方面设计正交实验摸索最优转染条件。结果表明, 不论是通过磷酸钙法制备病毒还是 QuickShuttle 转染试剂制备病毒, 使用 pLP1、pLP2 和 pLP/VSVG 的 3 质粒包装体系, 并将转染的 293T 细胞铺在用明胶包被的培养皿上, 然后转染 72 h 可获得较理想的结果, 其中, 磷酸钙转染法获得的病毒滴度为 600 TU/mL, QuickShuttle 试剂转染法获得的病毒滴度可达 7130000 TU/mL。

使用单细胞培养法和组织块培养法原代培养了 hFFCs 和 MEFs, 结果表明, 通过组织块培养法获得的原代细胞的细胞形态更好, 且传代后极少出现悬浮的死细胞。将 MEFs 用丝裂霉素 C 处理后, 成功制备了饲养层细胞。将 hFFCs 用病毒感染并观察其形态变化。结果表明, 病毒感染后的 hFFCs 与空白组相比, 细胞的形态逐渐发生改变, 出现如锥形、树杈形、不规则的三角形等形状

将病毒感染后 6 d 的 hFFCs 接种到饲养层细胞上，每天更换干细胞培养液，同时添加 Vc(vitamin C)和 VPA(valproic acid)，并观察细胞变化。结果表明，在饲养层上培养到第 5 d 时，一些细胞的细胞膜会变的相对更厚，使得细胞所占三维空间的整体立体感也更加明显。继续培养到第 11 d 时，会出现类似 ESCs 样的克隆。

关键词：诱导多潜能干细胞；病毒包装；细胞培养；饲养层细胞

Abstract

iPS cells, that is induced pluripotent stem cells, can be derived from terminally differentiated cells when they are driven reversly back to embryonic stem cell-like cells by introducing some genes(Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc). iPS cells have the same characteristics as embryonic stem cells (ESCs), and can differentiate into multiple types of cells.

In this study, virus packaging of lentiviral vectors (FU-tet-o-hSox2, FU-tet-o-hOct4, FU-tet-o-hc-Myc, FU-tet-o-hKLF4, FUDeltaGW-rtTA) and retroviral vector, pEYK•E4, have been performed by transfection of calcium phosphate and QuickShuttle transfection reagent. Then, viral titer was measured, at the same time, its transfection condition was optimized. In addition, human fetus fibroblast cells (hFFCs) were established by primary culture and subculture *in vitro*, and the methods of primary culture were compared. Mouse embryonal fibroblasts (MEFs) were also established by primary culture and subculture *in vitro*, and were treated with mitomycin C to prepare the feeder layer. hFFCs were infected by virus, and the morphologic change of hFFCs was observed. Then they were inoculated on feeder layer, and the medium was replaced every day until clones appeared. In this paper, the inducing system for producing human induced pluripotent stem cells was optimized in a certain way, and a plan with simple operation, simple instruments and cost cheap was provided. The detailed studies and the results are described as follows:

Virus packaging of lentiviral vectors (FU-tet-o-hSox2, FU-tet-o-hOct4, FU-tet-o-hc-Myc, FU-tet-o-hKLF4, FUDeltaGW-rtTA) and retroviral vector, pEYK•E4, have been performed by transfection of calcium phosphate and QuickShuttle transfection reagent. Then, viral titer was measured. Three influencing factors (different packaging systems, different transfection time, presence of gelatin package) in the method of calcium phosphate transfection and QuickShuttle reagent transfection were optimized. The optimum condition of calcium phosphate transfection and QuickShuttle reagent transfection was described as following: pLP1,

pLP2 and pLP/VSVG 3 plasmid packaging system was used, and 293T cells were inoculated on petri dish coated with gelatin, then transfection of 72 h can obtain ideal results. The virus titer of calcium phosphate transfection is 600 TU/mL, the virus titer of QuickShuttle reagent transfection is 7130000 TU/mL.

Using methods of single cell culture and tissue culture, hFFCs and MEFs were cultured *in vitro*. The results show that, primary cells derived from tissue culture exhibited better morphology and had less suspension of dead cells after which were passaged. MEFs were treated with mitomycin C to prepare the feeder layer. hFFCs were infected by virus, and the morphologic change of hFFCs was observed. Compared with the control group, the morphology of hFFCs infected by virus changed gradually. Some cells exhibited conical, branches, irregular triangle shape. After 6 day of infection, hFFCs were inoculated on feeder layer, the stem cell medium was replaced every day, at the same time Vc (vitamin C) and VPA (valproic acid) were added, and the morphologic change of cells were observed. When cultured at the fifth day, the cell membrane of some cells became relatively thicker, moreover, cell's three-dimensional space overall stereo sense became more obvious. Continued to develop to 11 day, ESCs sample clone will appear.

Key Words: *Induced pluripotent stem cells; Virus packaging; Cell culture; Feeding layer of cells*

目 录

摘 要.....	I
Abstract.....	III
引 言.....	1
1 文献综述.....	3
1.1 诱导多能干细胞形成机制的研究.....	3
1.2 iPS 细胞诱导体系的建立.....	4
1.3 受体细胞的选取.....	5
1.4 诱导细胞重编程的多种方式.....	6
1.4.1 使用传统的病毒性载体及腺病毒载体诱导 iPS 细胞.....	6
1.4.2 使用改进的病毒性载体诱导 iPS 细胞.....	7
1.4.3 使用 piggyBac 转座子诱导 iPS 细胞.....	8
1.4.4 使用质粒载体诱导 iPS 细胞.....	8
1.4.5 使用蛋白质诱导 iPS 细胞.....	9
1.4.6 使用 mRNA 诱导 iPS 细胞.....	10
1.4.7 采用 miRNA 诱导 iPS 细胞.....	10
1.5 提高 iPS 细胞诱导效率的方法.....	11
1.5.1 表观遗传途径调控.....	12
1.5.2 细胞信号通路途径调控.....	13
1.6 iPS 细胞存在的问题及展望.....	14
1.6.1 iPS 细胞存在的主要问题.....	14
1.6.2 iPS 细胞的应用及展望.....	15
2 病毒包装体系的优化及病毒滴度的测定.....	17
2.1 材料与方法.....	17
2.1.1 材料与仪器.....	17
2.1.2 实验试剂.....	17
2.1.3 实验所用溶液.....	17
2.1.4 感受态的制备.....	18
2.1.5 质粒的转化及提取.....	18
2.1.6 293T 细胞的复苏.....	19

2.1.7	293T 细胞的传代培养	20
2.1.8	磷酸钙法制备病毒的优化	20
2.1.9	使用 QuickShuttle 转染试剂制备病毒及相关优化	22
2.1.10	病毒滴度的测定	22
2.1.11	数据分析	23
2.2	结果与分析	23
2.2.1	293T 细胞的复苏	23
2.2.2	磷酸钙法制备病毒的优化	23
2.2.3	使用 QuickShuttle 转染试剂制备病毒及相关优化	27
2.3	讨论	30
2.4	本章小结	31
3	人 iPS 细胞的诱导	32
3.1	材料与amp;方法	32
3.1.1	材料与仪器	32
3.1.2	实验试剂	32
3.1.3	实验所用溶液	33
3.1.4	hFFCs 的原代培养	33
3.1.5	hFFCs 的传代培养及冻存	34
3.1.6	MEFs 的原代培养和传代培养	35
3.1.7	饲养层的制备	35
3.1.8	病毒感染 hFFCs	36
3.1.9	重编程过程的观察	37
3.2	结果与分析	37
3.2.1	hFFCs 的原代培养	37
3.2.2	hFFCs 的传代培养及冻存	38
3.2.3	MEFs 的原代培养及传代培养	39
3.2.4	饲养层的制备	40
3.2.5	病毒感染 hFFCs	41
3.2.6	重编程过程的观察	43
3.3	讨论	43
3.4	本章小结	45

结 论.....	46
参考文献.....	47
附录 A 主要仪器设备.....	57
在学研究成果.....	59
致 谢.....	60

引 言

有关于干细胞的实验研究是目前生物学领域中最热门的课题之一,它为现今许多严重困扰人类的重大疾病的特效药物的研究与开发、细胞的病变治疗以及再生医学提供了相关的理论依据。时至今日,干细胞的实验研究涵盖了生物学等众多相关的科学领域。胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)及成体干细胞是当今的研究热点,它们可作为药物筛选质量评估的有效工具。此外,它们还是再生医学的实验对象。最后,它们还是研究细胞内在的信号通路、表观遗传学及发育生物学的理想对象。然而,有诸多因素制约着干细胞的有关研究,最主要的两个制约因素是:①干细胞取材困难,胚胎干细胞的临床实验受道德、伦理等因素的制约。可是有关成体干细胞的分化过程还有诸多方面并不明确,而且其分离、纯化及体外培养十分困难,总之,干细胞的取材是亟待解决的问题之一。②不同个体之间干细胞的移植有着不能忽视的免疫排斥问题。

2006年 Yamanaka 等人^[1]将四种转录因子(分别为 Oct4、Sox2、Klf4 及 c-Myc)的 cDNA 序列导入小鼠皮肤成纤维细胞,获得了具有胚胎干细胞特性的细胞,即诱导多潜能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPS 细胞)。iPS 细胞的出现从根本上解决上述两个问题。所以从诞生之日起, iPS 细胞就成了生物学领域研究的热点。

其后,多种动物及多种类型细胞的 iPS 细胞系相继建立起来。在 2007 年,人的 iPS 细胞系也被建立。由于 iPS 细胞与 ESCs 在细胞形态、表面标志分子、端粒酶活性、体外分化潜能等方面有着高度的一致性,并且在体外可形成拟胚体、体内接种可形成畸胎瘤,也就是说, iPS 细胞基本具有了 ESCs 的特性同时避免了后者在研究及应用中所面临的问题。人 iPS 细胞的出现,极大地激发了科学家们的研究激情,使得有关 iPS 细胞的研究得以迅速发展。

目前,有多种方法可以诱导 iPS 细胞,其中最经典的方法是使用分别(或同时)表达 4 个转录因子的(重组)逆转录病毒载体或(重组)慢病毒载体感染目的细胞,使转录因子在细胞内表达,从而促使重编程过程的发生。而且这种方法的诱导效率高、可操作性强。使用这种方法,首先要将含有转录因子 cDNA 序列的病毒载体导入 293T 细胞中,制备出病毒后感染目的细胞,然后将目的细胞接种到由小鼠胚胎成纤维细胞(mouse embryonal fibroblasts, MEFs)制备的饲养层上,按 ESCs 的培养体系培养,以获得 ESCs 样的细胞克隆。

基于以上原理，本实验采用逆转录病毒载体 pEYK•E4 及慢病毒载体 FU-tet-o-hSox2 、 FU-tet-o-hOct4 、 FU-tet-o-hc-Myc 、 FU-tet-o-hKLF4 、 FUDeltaGW-rtTA 制备病毒颗粒，用其感染体外培养的人胎儿成纤维细胞(human fetus fibroblast cells, hFFCs)，同时优化病毒包装的转染体系，提供一个操作简单、无需复杂仪器、同时花费不高的诱导方案，为进一步优化 iPS 细胞诱导体系奠定基础。

1 文献综述

1.1 诱导多能干细胞形成机制的研究

在 2006 年, Yamanaka 和 Takahashi 发表了哺乳动物体细胞通过 4 个转录因子: Sox2、Oct4、c-Myc 和 Klf4 的表达重编程为 iPS 细胞^[1]。鉴于 iPS 细胞的研究对于细胞生物学、表观遗传学、发育生物学、人类再生医学和特异的细胞治疗所产生的巨大影响, 使人们发觉深入了解细胞重编程机制至关重要。研究人员为此做了众多工作, 众多研究表明, 人和小鼠的 iPS 细胞与各自的 ESCs 在许多方面都是高度相似的, 例如在形态、功能、转录以及全基因组分布的染色质修饰的分子水平等方面^[2-4]。因此, 将终末分化的体细胞重编程为 iPS 细胞状态的核心是通过某种手段消除体细胞自身程序, 同时构建 ESCs 样的程序性转录网络, 从而回到多能性细胞状态。研究人员经过各种尝试, 向成体细胞中导入重编程因子, 但是最终仅有极少量的细胞可以重新回到多能性状态。成体细胞与多能性细胞的转化关系就如同滑雪者从山脚爬向山顶和从山顶滑向山脚一般, 见图 1.1。

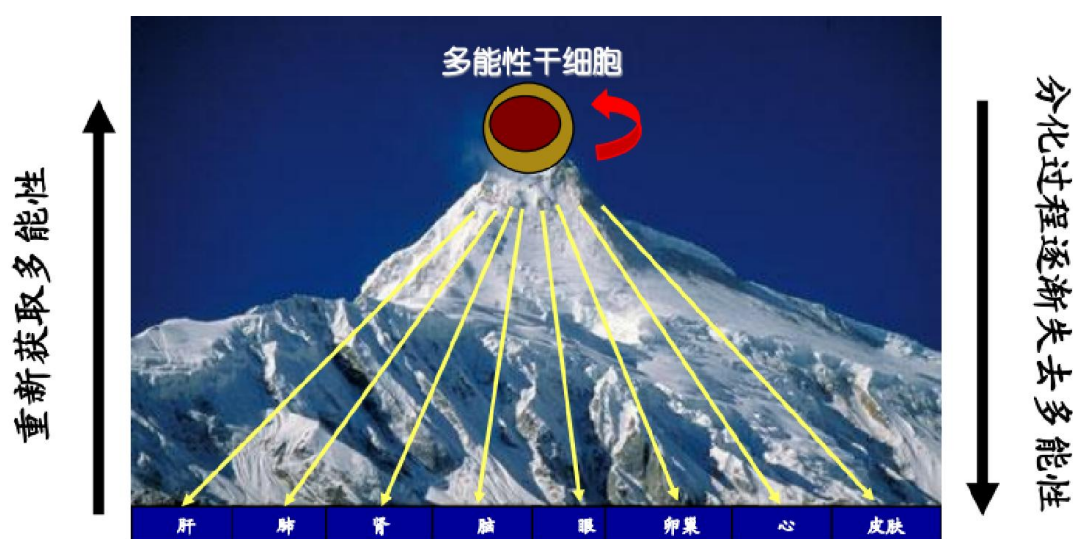


图 1.1 多能性干细胞与终末分化细胞的转化关系示意图

多能性干细胞向具有特定功能细胞的分化过程就像是滑雪者从山顶滑向山脚, 这个过程是相对容易的, 在有关基因的特异性表达调控下即可发生。然而, 具有特定功能的细胞重编程为多能性干细胞则困难的多, 就像图 1.1 中, 从山脚爬向山顶, 并不是所有的体细胞都能重新获得多能性。

体细胞重编程为多能干细胞的效率低下, 是因为这一过程受多方面因素的影

响,其中只要一个方面没有达到要求,细胞就不能完全达到多能性状态。在内源多能性网络被激活之前,有越来越少的细胞可以继续完成重编程程序^[5~7]。目前,科学家们认为表观遗传修饰障碍导致了细胞重编程的效率低下^[8,9]。也有证据表明,处于抑制状态的染色质会对诱导多能性产生阻碍作用^[10~12]。细胞内的信号通路会受到多种外源信号的影响,进而可以在某种程度上改变细胞重编程过程,甚至可以影响重编程因子的表达,说明在调节细胞重编程和细胞特性中,内源通路与外源通路存在紧密的联系^[13]。有研究认为,可以通过改变细胞周期或提高细胞重编程效率从而降低细胞重编程所耗时间^[14]。也有研究表明,重编程过程中细胞之所以难以达到多能性状态,可能是由于重编程得到的 iPS 细胞携带有诱导所用细胞的表观遗传记忆^[15,16]。

综上所述,多种因素影响致使重编程细胞达不到多能性状态,如诱导重编程细胞的表观遗传记忆未完全逆转,重编程细胞的自身重编程因子表达水平过低等。此外,通过对核移植过程中重编程事件的研究,以及 iPS 细胞后续的实验成果,揭示出组蛋白修饰以及 DNA 甲基化在 iPS 细胞形成过程中发挥着重大作用。

1.2 iPS 细胞诱导体系的建立

iPS 细胞的诱导培养就是将已分化的体细胞通过特定的转录因子和在适宜的培养条件下,将其诱导成具有多能性细胞的过程。目前,iPS 诱导技术已日趋成熟,并且在很多物种上取得了成功。但是不论怎样改进,整个诱导过程都是在初期建立 iPS 细胞的经典方法上优化而来的,基本流程仍是相似的,经典的诱导流程见图 1.2。

将外源的转录因子通过病毒载体转染的方式导入供体细胞,然后在培养 ESCs 的体系中培养转染后的细胞,可以根据需要在培养液中加入影响细胞信号网络或表观遗传修饰的蛋白质、小分子化合物等提高诱导效率,待 ESCs 样的克隆出现后,可从细胞形态、基因表达谱、畸胎瘤形成等方面对其进行鉴定,同时进行筛选。小鼠或人的成纤维细胞形成 iPS 细胞所需时间大约为 3~4 周。

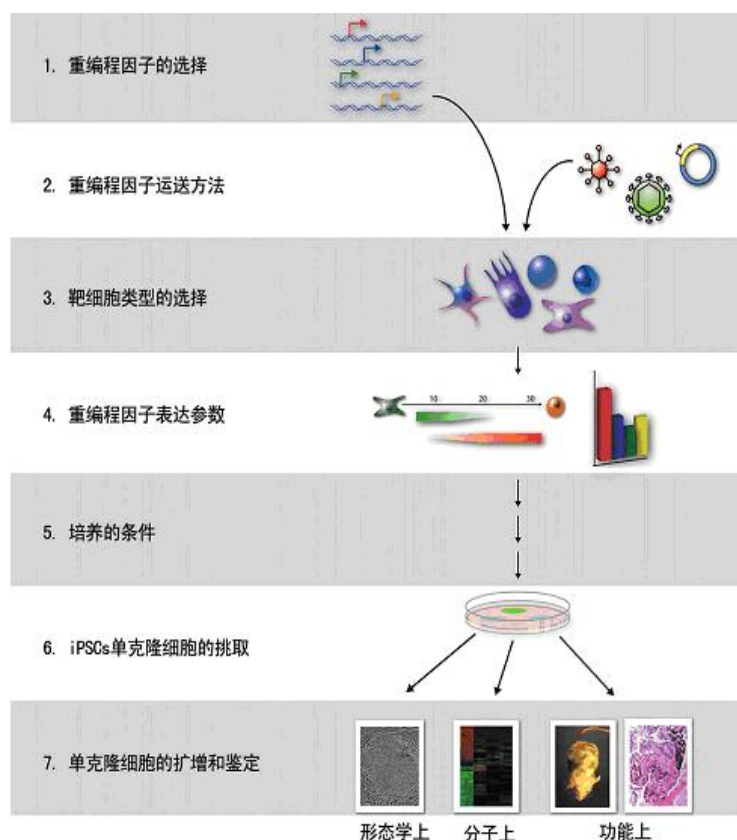


图 1.2 具代表性的 iPS 细胞诱导流程

1.3 受体细胞的选择

最初科学家诱导小鼠胎儿成纤维细胞和小鼠皮肤成纤维细胞为 iPS 细胞时发现，胎儿成纤维细胞更容易诱导，并且其诱导效率更高一些，这可能是由于胎儿细胞的分化程度较低、甲基化程度低、同时增殖活力强。在之后的实验中，iPS 细胞的诱导在多种类型细胞上获得成功，其中包括小鼠的肝脏细胞^[17]、成熟的 B 淋巴细胞^[18]、胃上皮细胞^[17]、脂肪前体细胞^[19]、胰腺 β 细胞^[20]、肾细胞^[21]及人类骨骼肌成肌细胞^[22]等。然而不同类型细胞之间的细胞重编程效率差异显著，同时得到的 iPS 细胞的质量差异明显。这一现象表明不同类型的成体细胞都具有被诱导成多能性细胞的潜能；另一方面也说明不同的细胞类型对于诱导重编程产生相应的影响。

由于 iPS 细胞的诱导在一定程度上受到体细胞分化程度的影响，人们发现，在一定程度上具有多能性的成体干细胞，如牙源性间充质细胞^[23]、神经干细胞^[24]和羊水干细胞^[25]等作为受体细胞可使诱导重编程的效率得以显著提高。还有研究表明，人的成纤维细胞和角质细胞诱导效率相比^[21,26]，后者的重编程效率比前者高 10^2 倍以上，并且重编程所需的时间是后者的 $1/3$ 。研究发现：小鼠的胃上

皮细胞和肝脏细胞被诱导时呈现出较高的诱导重编程效率，且由于得到的 iPS 细胞具有基因组不容易被病毒整合和低致癌率的特点，所以将其应用于一些实践活动中如临床治疗^[17]更加适合。综合诸多相关研究结果表明：重编程上皮样细胞要比诱导成纤维样细胞更容易，不仅诱导效率更高，而且得到的 iPS 细胞质量更佳。这可能是由于成纤维细胞被诱导成为 iPS 细胞的过程中有一个间叶细胞上皮性发生的过程，但上皮样细胞则能够略过该过程^[5]的缘故。

就整体来说，iPS 细胞技术虽然在众多类型的细胞上都取得了成功，但是细胞的传代数、细胞的生长状态以及不同种类的受体细胞都会对细胞重编程产生不小的影响。所以选取何种类型的细胞作为被诱导的对象对于细胞重编程能否顺利进行和取得结果的好坏十分重要。参考各种类型细胞的长短处，由于成纤维细胞具有来源广泛、取材简便、体外增殖迅速等特性，所以代数较低的（3-5 代）成纤维细胞成为很多物种细胞重编程中惯用的原材料。

1.4 诱导细胞重编程的多种方式

从 Yamanaka 第一次使用逆转录病毒载体将 Sox2、Oct4、c-Myc 和 Klf4 四种转录因子导入小鼠成纤维细胞获得 iPS 细胞之后，研究人员尝试了通过各种不同途径来诱导获取 iPS 细胞。目前，诱导获得多能性干细胞的方法有许多种，主要包括传统的病毒性载体及腺病毒载体诱导、改进的病毒性载体诱导、piggyBac 转座子诱导、质粒载体诱导、蛋白质诱导、mRNA 诱导、microRNA 诱导等，每一种途径方法都各有其优缺点（见表 1.1），从 iPS 细胞在临床实际应用中的安全性和简便性等方面考虑，用质粒载体和蛋白质等诱导都是简便、安全的方法。

1.4.1 使用传统的病毒性载体及腺病毒载体诱导 iPS 细胞

在 iPS 细胞的研究早期，科学家使用基于莫罗尼氏鼠白血病病毒改造的逆转录病毒载体，如 pMXs^[27]、pMSCV 或 pLib12^[26]将 Oct4、Sox2、c-Myc 及 Klf4 导入受体细胞并表达这 4 种转录因子。而且这种载体在干细胞中表现出自我沉默的特性。因为逆转录病毒载体可以将外源目的基因插入受体细胞的基因组中并能持续表达该基因，激活细胞内在的多能性基因网络，促使体细胞向干细胞方向逆转，所以获得 iPS 细胞的概率较大。

慢病毒载体以 HIV 为基础构建而来，它属于逆转录病毒中的一种，但前者

可以转染处于分裂期及非分裂期的细胞^[28]，而后者仅可以转染分裂期的细胞^[29]。常用的慢病毒载体可分为组成型表达和诱导型表达两种：前者通常在多能干细胞中并不表现出明显的基因沉默性状^[30]，后者则可以对受体细胞中重编程因子的表达进行人为调节，研究揭示了强力霉素（Doxycycline, Dox）诱导重编程的慢病毒载体可以对受体细胞中外源基因的表达水平进行调节^[31~33]。研究表明：慢病毒载体可以将外源基因随机插入到基因组中的某个位置，而逆转录病毒载体通常将外源基因插入到基因组中的特定位点^[34]。逆转录病毒与慢病毒载体还有其它方面的差异：前者在出现 iPS 细胞后会表现出完全自我失活的特性，而后者在 iPS 细胞出现后外源基因仍会以较低的水平继续表达^[35]，这在一定程度上会抑制 iPS 细胞的分化。

虽然逆转录病毒载体与慢病毒载体具有较高的诱导重编程效率和一定的可重复性，但二者使用时可能产生一定量的、有副作用的病毒颗粒，同时会表达致癌基因，如 c-Myc 最终导致肿瘤的发生。此外，逆转录病毒与慢病毒载体都有将外源基因插入受体细胞的基因组中从而导致插入突变发生的可能性。所以从安全性角度考虑，采用逆转录病毒与慢病毒载体诱导 iPS 细胞这一流程存在不足。

除了逆转录病毒与慢病毒载体之外，还存在非传统整合病毒载体的腺病毒载体，它是非整合载体，即它的特点是不需要将外源基因整合到受体细胞的基因组中。Zhou 等^[36]使用腺病毒载体将人胚胎成纤维细胞诱导重编程为不含外源基因的 iPS 细胞，然而，使用这种载体诱导 iPS 细胞的效率要比传统的逆转录病毒与慢病毒载体低很多，例如：使用腺病毒载体诱导小鼠 iPS 细胞的效率只有 1/1000000~18/1000000，而且还需要重复感染目的细胞^[37,38]。

1.4.2 使用改进的病毒性载体诱导 iPS 细胞

虽然传统的逆转录病毒载体或慢病毒载体有较高的诱导重编程效率，但也具有将外源基因整合到受体细胞基因组中引发插入突变进而导致肿瘤发生的危害。为了避免上述现象的发生，传统的病毒性载体在一定程度上被研究人员进行了改造。诱导 iPS 细胞的早期，传统的逆转录病毒或慢病毒载体只携带一个细胞重编程因子。后来研究人员构建出能够同时表达多个诱导细胞重编程的外源基因的逆转录病毒载体和慢病毒载体^[33,39]，即在相邻的两个重编程因子之间插入 2A 肽链片段或内部核糖体进入位点，从而可以同时表达多个重编程因子的单一病毒载体。Sommoler 等人^[40]用上述方法构建出可同时表达 Oct4、Klf4、Sox2 及 c-Myc

四个重编程因子的慢病毒载体，并成功诱导出小鼠 iPS 细胞，诱导效率也不低。除了同时可以表达多个诱导细胞重编程因子的逆转录病毒载体及慢病毒载体外，科学家们也构建出了可以同时表达三个或四个细胞重编程因子的腺病毒载体^[37,38]。利用上述载体可极大简化病毒制备及细胞感染过程，并能有效地降低外源基因插入受体细胞基因组中所引发的插入突变的概率。Kaji 等人^[41]构建出含有四个重编程因子的慢病毒载体，并利用 Cre/loxP 技术在重编程因子两端添加 loxP 位点，然后通过重组酶 Cre 识别并将上述区间删除，从而获得了不含外源基因的 iPS 细胞。

1.4.3 使用 piggyBac 转座子诱导 iPS 细胞

除了传统的病毒性载体和在此基础上改进而来的病毒性载体以及腺病毒载体，科学家还构建出了非病毒性的载体。Woltjen 等人^[42]和 Yusa 等人^[43]使用 piggyBac 转座子介导细胞重编程因子来获得小鼠及人的 iPS 细胞。由于 piggyBac 转座子在人和小鼠的细胞中能够更高效地将外源基因导入其基因组中，随后还可以自发的将外源基因剔除掉，最终受体细胞的基因组中并不含有外源基因。所以用这种方法获得的 iPS 细胞是非常安全的，这对于实际应用具有重大意义。但是这种方法诱导 iPS 细胞所用的时间比较长。

不论是利用传统的逆转录病毒与慢病毒载体诱导，还是在此基础上改进的病毒性载体诱导，即使是重组 Cre 酶剔除外源基因也会留下一小段的外源 loxP DNA 片段，甚至在使用 piggyBac 转座子时，也可能在一定程度上使受体细胞的基因组产生相应的变化。所以研发不含病毒的、非整合的细胞诱导方法，不论对于实验研究还是临床应用都具有重大意义。

1.4.4 使用质粒载体诱导 iPS 细胞

采用质粒载体介导细胞重编程因子从而获取 iPS 细胞的关键在于：构建出含有一个或多个与细胞重编程有关的外源基因的质粒载体，并通过某种途径将其导入需要诱导的目的细胞中，但是外源基因并不会整合到受体细胞的基因组中，待到了特定的阶段，这些细胞重编程因子会表达从而促使 iPS 细胞的形成。

通过这种途径，Okita 等^[38,44]构建出一种携带有 Oct4、Sox2 及 Klf4 三个重编程因子的质粒，还有一种携带有 c-Myc 的质粒，利用脂质体多次反复转染 MEF，

获得了基因组中不含外源基因的 iPS 细胞。虽然，通过这种方法得到的 iPS 细胞具有不易发生插入突变的优点，但是，通过这种途径诱导 iPS 细胞的效率很低，仅有 0.0001 % 左右，同时也不是特别稳定；同时，由于使用这种方法需要多次反复感染受体细胞从而增加了工作量，耗时、费力；此外，在以后的实验中还发现通过这种方法并不能保证所有的细胞都能够避免插入突变的可能性，仍有一些外源基因被整合到极少量细胞的基因组中。

Yu^[45]等在 EB 病毒载体的基础上构建出 oriP/EBNA1 这种非整合的附加体载体，通过其介导细胞重编程因子进入受体细胞，促使 iPS 细胞产生。这种载体具有一定的稳定性，且不会将外源基因整合到受体细胞的基因组中，当去除药物筛选后，这种载体会在之后的细胞培养中逐渐消失，这样便可以获得不含任何外源基因的 iPS 细胞。然而，通过这种方法获得 iPS 细胞的效率仍然很低，诱导效率不到 0.0001%。所以要通过各种方法提高诱导效率，使这种能得到不含任何外源基因的 iPS 细胞的方法得以普遍推广，这对于实验研究和临床治疗等具有重大意义。

1.4.5 使用蛋白质诱导 iPS 细胞

由于蛋白质在生命有机体中是重要的组成部分，即使在外源基因表达诱导 iPS 细胞产生的过程中，也得转录翻译成蛋白质才可以进行后续步骤。因此，通过蛋白质来诱导 iPS 细胞是安全可行的，同时在这一过程中也不会有外源基因整合到受体细胞的基因组中，也没有病毒颗粒等毒性副产物产生。从原理上来说，合成的重编程因子蛋白连接上适宜的穿膜肽，就可导入受体细胞，通过其作用最终诱导 iPS 细胞产生。

Kim 等^[46]将重编程因子蛋白与 9 个精氨酸的穿膜肽相结合形成融合蛋白，利用其将人新生儿成纤维细胞诱导为 iPS 细胞，但是诱导效率仅有 0.001 % 左右。Zhou 等^[47]构建了 Yamanaka 因子蛋白质，并让其与穿膜肽 11R 连接，随后导入 MEFs 中，在组蛋白去乙酰化酶抑制剂丙戊酸 (valproic acid, VPA) 的协助下，诱导产生了小鼠的 iPS 细胞，但诱导效率很低。Cho 等^[48]利用从小鼠胚胎干细胞中得到的蛋白质，也诱导获得了 iPS 细胞，不过这种方法所需时间很长，需要八周左右时间，且诱导效率也较低，仅有 0.001% 左右。然而，用蛋白质诱导的 iPS 细胞发生插入突变的危险性小很多。

因为利用蛋白质诱导 iPS 细胞的过程中，不会向受体细胞基因组中插入外源

基因，所以对其不造成任何危害，具有很高的安全性，这无论是对于实验研究还是实际应用都具有重大意义。但鉴于这种方法重编程效率极低，所以研究通过何种途径可以极大地提高诱导重编程效率成为关键。

1.4.6 使用 mRNA 诱导 iPS 细胞

Warren 等人^[49]通过体外合成编码重编程因子的 mRNA，并对其进行一些修饰，通过多次反复感染细胞，最终获得 iPS 细胞。这种方法不会引发插入突变，即不会对受体细胞基因组进行整合，说明该途径具有很高的安全性。同时这种方法相比其他非整合方法具有更高的诱导效率，可达 2~4%。此外，相比用传统的逆转录病毒或慢病毒诱导 iPS 细胞所需的 30d 左右的诱导时间，这种方法只需 15~18 d 即可获得 iPS 细胞。但是研究发现：mRNA 进入细胞后，不久就会被降解掉，所以需要多次反复感染细胞才能获得重编程的 iPS 细胞，这就要消耗更多的时间与精力。

1.4.7 采用 miRNA 诱导 iPS 细胞

以上介绍了多种诱导方式，不管是病毒性载体还是非病毒性载体，也不管是整合性载体还是非整合性载体，它们都离不开细胞重编程因子，即其可以是本身携带重编程因子，也可以是重编程因子表达的蛋白质，甚至可以由重编程因子转录的 mRNA。

Anokye-Danso 等^[50]第一次发现在没有任何重编程因子的情况下，将 miR-302/367 导入小鼠和人的体细胞中，就可将其诱导为 iPS 细胞，且重编程效率是传统病毒性载体诱导效率的 $10^2 \sim 10^3$ 倍。此外，也有研究^[5,51,52]表明：miR-302 和 miR-372，miR-93 和 miR-106b，这些 miRNA 可以抑制一些与细胞周期紧密关联的特定基因，也可以促进诱导早期间充质-上皮细胞转变的过程，进而促进 iPS 细胞的产生，提高诱导效率。但是，利用 miRNA 诱导 iPS 细胞的工作量较大，技术要求高，过程复杂。

以上介绍了多种诱导 iPS 细胞的方法，它们的优缺点都比较明显，见表 1.1。

表 1.1 传统病毒载体及腺病毒载体优缺点示意表

	优点	缺点
逆转录病毒	具有较高的诱导效率, 基因沉默	基因组整合诱导突变, 只能感染有分裂能力的细胞
慢病毒	具有较高的诱导效率, 能感染分裂期和非分裂期的细胞	基因组整合诱导突变, 不完全的基因沉默
腺病毒	不会将外源基因整合到细胞基因组中	诱导效率很低, 需要重复感染
改进的病毒性载体	具有较高的诱导效率, 极大地简化了病毒的制备及细胞的感染过程	仍会有一定程度的基因组整合诱导突变
piggyBac 转座子	无外源基因和载体干扰, 能精确地自我切割	诱导周期长, 还会残留少量外源基因
质粒载体	无外源基因和载体干扰, 无基因组整合	缓慢且诱导效率低下, 需要做大量重复工作
蛋白质	无外源基因和载体干扰, 无基因组整合	缓慢且诱导效率低下
mRNA	无外源基因和载体干扰, 无基因组整合, 诱导效率高, 周期短	需要多次重复感染
miRNA	无外源基因和载体干扰, 无基因组整合, 诱导效率高	工作量较大, 技术要求高, 过程复杂

1.5 提高 iPS 细胞诱导效率的方法

在早期诱导 iPS 细胞的实验中, 细胞的重编程效率极低不到 0.01%, 且存在插入突变等危害性; 在随后的实验中, 虽然有许多方法可以极大地提高 iPS 细胞诱导重编程的安全性, 但是这些方法大多数是以牺牲诱导效率为代价的, 如腺病毒的诱导效率仅有 0.0001% 左右。因此, 如何能够提高 iPS 细胞的诱导效率是研究者们始终关注的热点。目前, 提高细胞重编程效率的方法主要是添加一些小分子化合物、蛋白质等物质, 这些物质能够从几个方面来影响细胞重编程的过程,

而其中的重点是通过调控表观遗传和信号通路这两个途径来影响 iPS 细胞的形成，见图 1.3。

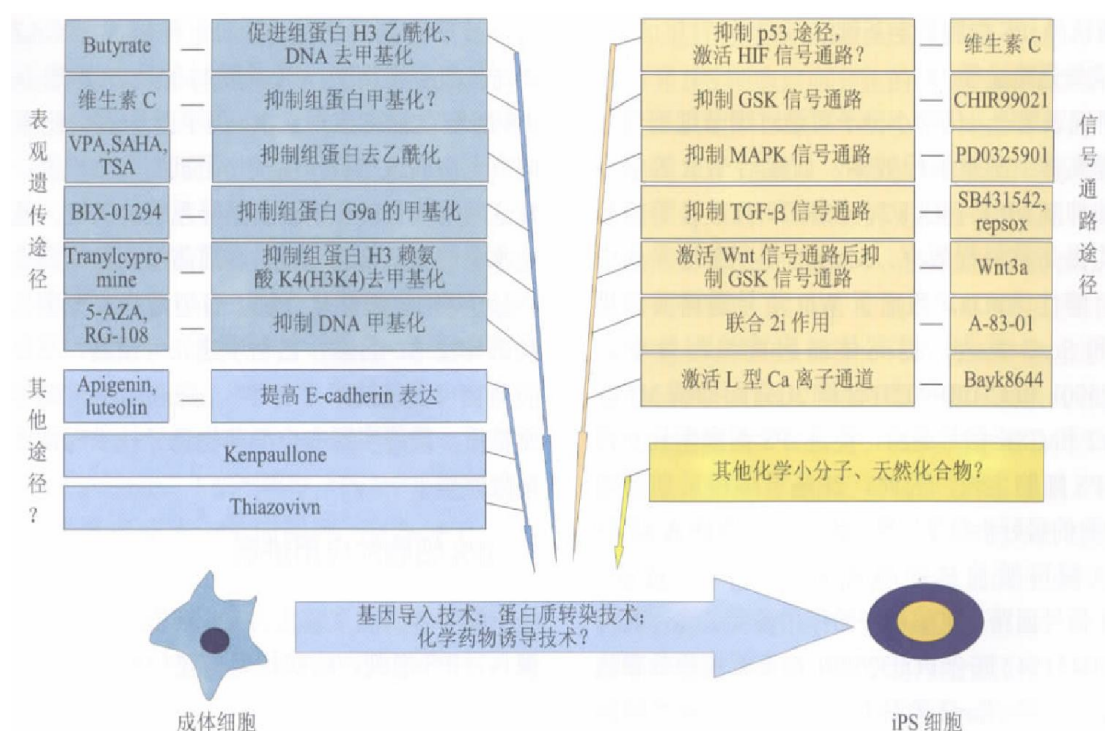


图 1.3 化学物质通过表观遗传和信号通路等途径促进 iPS 细胞的诱导

1.5.1 表观遗传途径调控

研究发现，一些小分子化合物可以影响表观遗传修饰进而提高 iPS 细胞的诱导效率。其中一些可以替代部分的 Yamanaka 因子的功能，已有实验表明：可以通过三个、两个，甚至一个 Yamanaka 因子来诱导 iPS 细胞^[53]。研究人员已利用小分子化合物替代 Yamanaka 因子来诱导 iPS 细胞。Huangfu 等人^[10,54]研究发现，组蛋白去乙酰化酶抑制剂 VPA(valproic acid)可以将 iPS 细胞的诱导效率提高 10² 倍，且 VPA 能够替代 Klf4 及 c-Myc，将人成纤维细胞诱导为 iPS 细胞。此外，曲古抑菌素和辛二酰苯胺异羟肟酸也属于组蛋白去乙酰化酶，也可以促进 iPS 细胞的诱导。丁酸盐 (butyrate) 则可以提高细胞的乙酰化水平，同时降低细胞的 DNA 甲基化水平，从而明显地提高诱导效率^[22]，而且还能在只有 Oct4 及 Sox2 的情况下，促进细胞的重编程。

5-氮杂胞苷^[10,55]和 RG-108^[12]都属于 DNA 甲基转移酶抑制剂，均可以抑制 DNA 的甲基化进而促进细胞重编程。BIX-01294 属于组蛋白甲基转移酶抑制剂

[10,56], 可以降低组蛋白甲基化水平, 并促进 iPS 细胞的诱导。BIX-01294 还具有 Sox2 的功能, 可以与 BayK8644 (L 型钙离子通道活化剂) 一同促进 Oct4 和 Klf4 两个因子对 MEF 的重编程^[12]。反苯环丙胺 (tranylcypromine) 可以抑制组蛋白 H3 赖氨酸 K4 (H3K4) 甲基转移酶活性, 促进细胞重编程。

Singhal 等人研究表明: Baf155、Ini1 和 Brg1 这三种蛋白质可以明显地提高细胞重编程效率, 而且在缺失 c-Myc 的条件下也可以将诱导效率提高^[57]。另有研究发现^[58], LiCl 能够抑制 H3K4 甲基转移酶的活性, 促进 Nanog 发挥其功能, 进而影响表观遗传途径; 同时 LiCl 能够阻碍 GSK3 β 信号通路的正常运行, 从而促进 iPS 细胞的形成。

1.5.2 细胞信号通路途径调控

小分子化合物及蛋白质等物质除了可以影响表观遗传修饰, 从而促进 iPS 细胞的形成, 还可以调节细胞信号网络, 进而提高 iPS 细胞的诱导重编程效率。

在培养液中添加可溶性蛋白 Wnt3a-CM, 可激活 Wnt 信号通路, 促进小鼠成纤维细胞的重编程, 即使在没有 c-Myc 的情况下, 在三因子诱导 iPS 细胞的过程中, Wnt3a-CM 仍能够将诱导效率提高近 20 倍^[59]。PD0325901 和 CHIR99021 可分别抑制 MAPK1/2 和 GSK3 信号通路, 在缺失 c-Myc, 甚至没有 c-Myc 和 Sox2 的情况下, 促进 iPS 细胞的重编程^[24]。此外, PD0325901 与 CHIR99021 再结合 A-83-01 可以促进大鼠肝脏细胞的重编程^[60]。A-83-01 和 PD0325901 可以提高二因子对胎儿表皮角质化细胞的诱导效率, 在结合 PS48 的情况下, 即使只有 Oct4 也能促进 iPS 细胞的生成^[61]。

Maherali 等人发现: Tgf- β 通路抑制剂能促进小鼠 iPS 细胞的诱导, 同时 Tgf- β 抑制剂可以在没有 c-Myc 和 Sox2 的条件下, 代其行使功能, 提高 iPS 细胞的诱导效率^[62]。Ichida 等人发现: RepSox 可阻碍 Tgf- β 通路的正常运行, 并且具有 Sox2 的功能, 提高 Nanog 在 iPS 细胞诱导中功能的发挥^[63]。还有研究表明: SB431542 (Tgf- β 通路抑制剂) 联合 PD0325901, 可提高诱导效率 200 倍^[64]。也有研究发现: VPA、CHIR99021、616452 (Tgf- β 通路抑制剂) 联合反苯环丙胺, 在只有 Oct4 的条件下也可以促进小鼠 iPS 细胞的诱导^[65]。

研究表明: Vc (vitamin C) 可提高 iPS 细胞诱导效率达 10 倍^[66], Vc 的作用机理有以下几点: (1) 抑制 p53 基因的表达从而减缓细胞的衰老与凋亡, 使细胞寿命得以延长, 这就使得细胞被诱导为 iPS 细胞的概率大大提高; (2) Vc 可以

增强 HIF 脯氨酰羟化酶活性，作为 HIF 通路的兴奋剂能够促进 iPS 细胞的生成，这与在低 O₂ 环境中可以促进 iPS 细胞的生成同一原理^[67]；(3) Vc 是组蛋白甲基转移酶抑制剂，它能够阻碍组蛋白的甲基化进而促进 iPS 细胞的生成。

除了添加小分子化合物和蛋白质可以提高 iPS 细胞的重编程效率之外，还有一些其他的物质也可以促进 iPS 细胞的形成。Judson 等人^[68]研究发现 miR-291-3p、miR-294 和 miR-295 可以在缺失 c-Myc 的情况下，与其余三个 Yamanaka 因子共同作用促进 iPS 细胞的生成。尤其是 miR-294 可以替代 c-Myc，可提高重编程效率近 10 倍。let-7 是对 iPS 细胞诱导具有抑制作用，且在终末分化的细胞中大量表达的一类 miRNAs。Melton 等^[69]将 let-7 的反序列抑制剂与 Oct4、Klf4 及 Sox2 共同作用促进 MEF 的重编程，使诱导效率增加到近 4 倍左右。此外，添加一些在终末分化细胞中特异性表达的 miRNAs 的抑制剂，如 miR-21、miR-29a 等的抑制剂，也能促进 iPS 细胞的诱导。由此可以得出一个推论：添加在干细胞中特异性表达的 miRNAs 可以提高 iPS 细胞的诱导效率，同样，添加在终末分化细胞中特异性表达的 miRNAs 的抑制剂也能促进 iPS 细胞的生成。

Chou 等人^[70]研究发现：p53 基因的抑制剂 shRNA p53 可以将 Oct4、Klf4、Sox2、c-Myc、Lin28 及 SV40T 抗原(Tg)介导的人 iPS 细胞的诱导效率提高 50~100 倍。在此之前也有其他的研究已经证明添加 p53 基因的抑制剂对细胞重编程具有促进作用^[71,72]。

1.6 iPS 细胞存在的问题及展望

1.6.1 iPS 细胞存在的主要问题

虽然近年来 iPS 细胞的研究得以飞速发展，并取得了巨大成就，Yamanaka 也于 2012 年 10 月 8 日获得了诺贝尔医学奖。但是到目前为止，iPS 细胞仍然存在诸多问题，其中最主要的还是诱导效率低下和安全性的问题。

诱导效率低下是 iPS 细胞实验研究和临床应用必须克服的一个问题。iPS 细胞研究初期，科学家曾认为普通的、终末分化的体细胞并不适于诱导 iPS 细胞，但随后的研究表明，iPS 细胞的诱导并不受体细胞的影响，现在已经证明多种类型的、不同阶段的成体细胞都可以被重编程为 iPS 细胞。当然，不同类型的体细胞的诱导效率是各不相同的，例如：羊水干细胞比成纤维细胞容易诱导的多，

重编程效率高且诱导周期极短^[73]。此外，即便是同种类型的体细胞，也是传代次数越低效果越好。时至今日，虽然关于如何提高 iPS 细胞诱导效率的研究已经有了重大突破，但是对其机理仍然没有十分准确的了解。因此，只有更深入地了解诱导重编程的机理才能更有效地促进 iPS 细胞的诱导。已有研究^[5,6]表明，iPS 细胞形成的早期要经历一个间充质-上皮细胞转变的阶段，在这一过程中骨形成蛋白发挥着重要作用，此类更细致的揭露诱导机制的实验研究为提高重编程效率提供了理论依据。

此外，提高诱导效率的同时不能忽略实验的安全性，例如：使用改进的病毒性载体重编程体细胞可以达到较高的诱导效率，同时工作量也不大，操作简便，所以这种方法很多实验室都在使用，但这种方法仍然无法摆脱将外源基因整合到受体细胞基因组中的缺陷。所以，虽然相比传统的逆转录病毒与慢病毒载体，改进的病毒性载体具有诸多优点，但是仍存在较大的安全隐患，使得这种方法不能在临床治疗中广泛应用。但随着 mRNA、miRNA 及蛋白质诱导方法的出现，再加上小分子化合物等物质参与诱导过程，更高效、更安全重编程手段也已确立。并且随着对 iPS 细胞形成机制的不断深入了解，相信在不久的将来就可以出现符合应用与实践的诱导技术。

虽然 iPS 细胞具有诸多优点，但其仍存在一些缺陷没有解决。iPS 细胞的致癌性：不同的体细胞重编程的 iPS 细胞具有不同的致癌性^[17]。已有研究^[74]表明：胃细胞重编程的 iPS 细胞致瘤率为零，而由尾尖成纤维细胞诱导的 iPS 细胞致瘤率则高达 90%。因此，在实际临床应用中就必须选取适宜的供体细胞或已经筛选出的安全的 iPS 细胞^[75]。此外，由于只有部分完成重编程的 iPS 细胞，或由于 iPS 细胞携带前体细胞的表观遗传记忆^[15,16,76]，或是 iPS 细胞分化不定向等原因都会产生细胞异质性，进而使得 iPS 细胞具有一定的致癌性。另外，iPS 细胞体外定向分化的相关机理研究并不充分，特别在临床应用上，能否具有实际的能效并且部分引发肿瘤等并发症等是亟需说明的问题。

1.6.2 iPS 细胞的应用及展望

到目前为止，iPS 细胞的研究取得了一系列重大成果，并随着诱导技术的逐渐成熟，使 iPS 细胞技术可以取代胚胎干细胞移植用于组织器官衰老及病变的治疗，从而可以避免一些伦理问题及由于个体不同造成的免疫排斥反应问题。此外，iPS 细胞技术还能够用于建立疾病模型，从而促进对疾病机理、药物筛选及新的

细胞（组织）治疗方法等的研究。

利用 iPS 细胞技术已经建立了多种疾病模型，其中，神经系统的疾病模型所取得的的成绩可以说备受瞩目。近年来，神经系统疾病的多个模型已经构建起来，并通过 iPS 细胞技术对帕金森病^[77-80]、脊髓性肌萎缩症^[81]、肌萎缩性脊髓侧索硬化症^[82,83]、雷特综合症^[84,85]、脆性 X 染色体综合征^[86,87]等诸多疾病进行了生理机制等相关方面的研究，取得了不小的成果。

传统的药物筛选工作主要是通过对动物个体进行实验或是对癌细胞系进行测试，这样很难既快又准地取得所期望的效果。但是利用 iPS 细胞技术，科学家可以根据人 iPS 细胞及其衍生的功能细胞的一系列生理学特性等相关变化，筛选出可以改善病变细胞状态并恢复其生理功能的药物。

iPS 细胞技术已逐渐成为细胞疾病治疗的新技术手段。患者可利用自身 iPS 细胞技术生成所需的细胞（组织或器官），进而实现个性化治疗是人们所向往的目标。从原理上讲，患者能够利用 iPS 细胞技术生成特异性的健康细胞，治疗各种遗传性及退行性疾病。已有研究^[88-90]表明，可以利用 iPS 细胞技术将人外周血 T 细胞诱导成无遗传修饰的 iPS 细胞，进而能够促进其早日并广泛地应用于临床治疗中。

2 病毒包装体系的优化及病毒滴度的测定

在 iPS 细胞重编程研究中, 病毒性载体的应用最为广泛, 不论是逆转录病毒载体还是慢病毒载体, 每一种都具有较高的重编程效率。

将病毒载体及包装质粒共同转染 293T 细胞, 在适宜条件下培养 2~4 d 就可收集病毒液。制备病毒的方法有多种, 常见的有: 磷酸钙转染制备方法、脂质体转染制备方法、电穿孔制备等方法。脂质体转染所用的大多为现成产品, 转染效果好, 然而成本较高。磷酸钙转染成本低, 但条件较为苛刻, 需要对转染方法进行一定的改进才能取得较好的转染效果。电穿孔法的过程并不复杂, 但是也需要不断尝试各种条件, 只有在适宜的条件下, 才能获得较好的效果, 且转染时细胞的损耗较大。本实验同时使用磷酸钙法和 QuickShuttle 转染试剂制备病毒, 并对转染体系进行一定的优化, 为后续工作提供了基础。

2.1 材料与方法

2.1.1 材料与仪器

本实验中所用的慢病毒载体 FU-tet-o-hSox2、FU-tet-o-hOct4、FU-tet-o-hc-Myc、FU-tet-o-hKLF4、FUdeltaGW-rtTA 及包装质粒载体 pCMV-VSV-G、pCMV-dR8.2dvpr 均来自于 Addgene 公司, 由贺小英老师惠赠; 逆转录病毒载体 pEYK•E4 由内蒙古科技大学王建英教授惠赠, 其包装质粒载体 pLP1、pLP2、pLP/VSVG 购于 Invitrogen 公司, pLEGFP-N1 购自 Clontech 公司, 实验所用 293T 细胞冻存于本实验室液氮罐中, 大肠杆菌 DH5 α 为学院基因工程实验室保存。本实验中所用仪器设备见附录 A。

2.1.2 实验试剂

酵母提取物、琼脂粉、胰化蛋白胨购于广东环凯微生物科技有限公司(进口分装), 无内毒素质粒大提试剂盒购于天根生物科技有限公司, 胰蛋白酶、台盼蓝购于 Amresco 公司, 无内毒素胎牛血清(Fetal Bovine Serum, FBS)购于杭州四季青公司, Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)购于 Gibco 公司, 青霉素、硫酸链霉素购于华北制药, QuickShuttle 转染试剂购于北京博奥龙免疫技术有限公司, EDTA、DMSO、CaCl₂•2H₂O 及其余试剂购于 Sigma-Aldrich 公司。

2.1.3 实验所用溶液

溶液：CaCl₂溶液(0.1 M)、氨苄青霉素浓缩液、LB 液体培养基、LB 固体培养基、D-Hanks 液、胰蛋白酶消化液(0.05% (m/v)胰蛋白酶及 0.025%(m/v)EDTA)、0.4%(m/v)台盼蓝染液、含 10%FBS(v/v)的 DMEM 培养液(青霉素 100 IU/mL、链霉素 100 μg/mL)、质粒 DNA 溶液、CaCl₂溶液(0.25 M)、2×BES 缓冲液、Polybrene 浓缩液。

2.1.4 感受态的制备

- (1)在无菌操作台中，用一次无菌接种环直接蘸取冻存的 DH5α，在 LB 固体培养基表面划线，于 37℃培养 16 h。
- (2)将平板上一单克隆挑入含有 5 mL LB 液体培养基的锥形瓶中，在 37℃下，以 180~200 r/min 振摇过夜。
- (3)取 2 mL 的过夜菌液，加入含有 100 mL LB 液体培养基的锥形瓶中，在 37℃空气摇床中，以 180~230 r/min 培养约 2~3 h，直到菌液中出现明显的絮状物(或测量其 OD₆₀₀ 值为 0.4)。
- (4)将锥形瓶含有菌液的部分埋于冰中 20~30 min，使菌液冷却至 0℃。
- (5)在超净台中，将锥形瓶中的菌液移到已预冷、灭菌的 10 mL 离心管中，整个过程都在冰上进行。
- (6)手持离心管上部，不接触菌液部分，将离心管放入已预冷到 4℃的低温离心机中，以 4000 r/min 离心 10 min，吸去上清。
- (7)加入 6 mL 已预冷的 0.1 M CaCl₂ 溶液，将沉淀吹打均匀，在冰上放置 5 min。
- (8)在 4℃下，以 4000 r/min 离心 10 min，吸去上清，再加入 4 mL 已预冷的 0.1 M CaCl₂ 溶液，将沉淀吹打均匀，在冰上放置 5 min。
- (9)在 4℃下，以 4000 r/min 离心 10 min，吸去上清，加 3 mL 已经预冷的 0.1 M CaCl₂、10%~15%甘油的无菌混合溶液，重悬沉淀，用 1.5 mL 离心管分装，-80℃贮存备用。

2.1.5 质粒的转化及提取

- (1)将 100 μL 感受态细胞悬液转移到已灭菌的 1.5 mL 离心管中，加入相应的质粒 DNA (体积≤10 μL, DNA≤50 ng)，轻轻旋转混匀，冰浴 30 min。
- (2)将离心管置于 42℃水浴锅中，热激 60 s~90 s，水浴过程中不要晃动。

- (3)迅速将离心管转移到冰上，冷却 2 min。
- (4)每支离心管中加 400 μL LB 液体培养基，再转移到 37 $^{\circ}\text{C}$ 空气浴摇床中，以 120~150 r/min 温育 45 min，可使细菌复苏并能够表达质粒上所含有 的 抗 生 素 抗 性 基 因。
- (5)取出离心管，12000 r/min 离心 5 min，吸去 350~400 μL 上清，然后将沉淀吹打均匀，将离心管中的菌液均匀涂至含相应抗生素(氨苄青霉素浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 固 体 LB 平 板 上。
- (6)将平板倒置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 的 CO_2 培养箱中，培养 12~16 h 后可出现菌落。
- (7)挑取状态良好、面积较大的单克隆，将其接种至含有 10 mL 已灭菌 LB 液体培养基的锥形瓶中，再加入适量的抗生素浓缩液(氨苄青霉素浓度为 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 空气摇床中，180~200 r/min 培养 12~14 h。
- (8)后续的病毒包装实验要用高浓度的质粒 DNA，所以需要进行质粒的大提，使用天根无内毒素质粒大提试剂盒提取质粒，相关流程见其使用说明书。

2.1.6 293T 细胞的复苏

- (1)从液氮罐中取出冻存的 HEK 293T 细胞，迅速放入 37 $^{\circ}\text{C}$ ~40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中，等待冻存液融化。
- (2)待冻存管中的晶状体消失后，立刻取出，并用 75% 的酒精棉球擦拭冻存管，然后移至超净台中。
- (3)将冻存管中的细胞溶液移入已经准备好的 10mL 无菌离心管中，再加入等体积的 DMEM 培养液，将溶液吹打 20~30 次，使溶液充分混匀。
- (4)将试管放入离心机中，以 1000 r/min 离心 5 min。然后取出离心管，并用 75% 的酒精棉球擦拭，再移至超净台中。
- (5)小心吸去上清，向离心管中加入 2~3 mL DMEM 培养液，将细胞沉淀吹打均匀。
- (6)重复第 4~5 步，取 50 μL 细胞培养液，加入 100 μL 0.4% 台盼蓝染液，轻轻反复吹打使细胞充分混匀并注意不要产生气泡，室温放置 3~5 min，再次轻轻反复吹打，用血球计数板计数。将细胞的密度调至 $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 个/mL，随后，将细胞溶液移到 100 mm 细胞培养皿中，小心摇动培养皿作“8”运动，使培养皿中的细胞均匀分布。
- (7)将培养皿用 75% 的酒精棉球擦拭 2 遍后，放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、饱和湿度的

CO₂ 培养箱中培养。培养一段时间后观察细胞形态。

2.1.7 293T 细胞的传代培养

(1)从 CO₂ 培养箱中取出培养皿，置于倒置显微镜下观察，待细胞生长所占面积约占皿底面积的 80%~90%时，进行传代培养。

(2)将培养皿置于超净台中，倒掉细胞培养液，添加 2 mL D-Hanks 液清洗细胞，倒掉废液，再添加 2 mL D-Hanks 液重复清洗一遍。

(3)向培养皿中添加 2 mL 胰酶消化液，一边旋转一边摇动培养皿，使 293T 细胞充分消化，在倒置显微镜下观察，发现大部分细胞脱离皿底，漂浮在溶液中后，向培养皿中添加等体积的 2 mL 细胞培养液终止消化，将细胞培养液转移至无菌的 10 mL 离心管中。

(4)以 1000 r/min 离心 5 min，取出离心管并用 75%的酒精棉球擦拭，再移至超净台中。小心吸去上清液，以免将细胞沉淀吸掉，再加入 2 mL 细胞培养液，将细胞沉淀吹打均匀。

(5)重复第 4 步，使用 0.4%台盼蓝染液及血球计数板进行活细胞计数，将细胞密度调至 $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 个/mL，将细胞培养液转移到 100 mm 细胞培养皿中，小心摇动培养皿作“8”运动，使培养皿中的细胞均匀分布。

(6)将培养皿用 75%的酒精棉球擦拭 2 遍，放入 37℃、5% CO₂、饱和湿度的 CO₂ 培养箱中继续培养。

2.1.8 磷酸钙法制备病毒的优化

2.1.8.1 磷酸钙法制备病毒及收集病毒液的基本流程

(1)转染前 24 h，取对数生长期的 293T 细胞，通过胰酶消化处理，以适宜的密度接种于 100 mm 培养皿中，加入 5~10 mL 细胞培养液，置于 5% CO₂、饱和湿度、37℃的 CO₂ 培养箱过夜培养细胞。

(2)当细胞的密度达到 50%~70%时，即可转染。转染前 1~2 h 换液，取适量的质粒 DNA 溶于 0.5 mL 0.25 M CaCl₂ 中，充分吹打混匀，然后将其加至 0.5 mL 2× BES 缓冲液中，室温下孵育 10~20 min。

(3)将 CaCl₂-DNA-BBS 溶液加入细胞培养皿中，轻轻作“8”运动混匀。放入 3%CO₂ 浓度、饱和湿度、37℃的 CO₂ 培养箱中，培养 12~24 h。

(4)小心取出培养皿，置于超净台中，倒掉培养液，添加 10 mL DMEM 培养液，于 5% CO₂、37℃、饱和湿度的 CO₂ 培养箱培养 36~48 h。转染 48~72 h 后，细胞培养液中即产生病毒，可以收集病毒液。

(5)将收集的病毒液移至 10 mL 离心管中，并在 4℃低温离心机中，以 4500 r/min 离心 5 min，取出离心管并用 75%的酒精棉球擦拭，再移至超净台中。小心吸取上清液，并用 0.45 μm 滤膜的滤器过滤上清液，将病毒液分装于 4 mL 的离心管中，置于-80℃下冻存。

(6)在相同条件下运用磷酸钙法分别对慢病毒载体 pLEGFP-N1、FU-tet-o-hSox2、FU-tet-o-hOct4、FU-tet-o-hc-Myc、FU-tet-o-hKLF4、FUdeltaGW-rtTA 及逆转录病毒载体 pEYK•E4 进行包装。取表达 pLEGFP-N1 的病毒液进行病毒滴度测定。

2.1.8.2 磷酸钙法制备病毒的进一步改进

(1)不同的包装体系对磷酸钙法制备病毒的影响：在同等条件下转染 48 h，通过磷酸钙法制备表达绿色荧光蛋白的病毒液，只改变包装体系，一组用 pCMV-dR8.2 dvpr 和 pCMV-VSV-G 的 2 质粒包装体系，其表达绿色荧光蛋白的质粒和包装质粒的比（质量比）为：pLEGFP-N1:pCMV-dR8.2 dvpr:pCMV-VSV-G=1:0.5:0.25；另一组用 pLP1、pLP2 和 pLP/VSVG 的 3 质粒包装体系，其表达绿色荧光蛋白的质粒和包装质粒的比为 pLEGFP-N1:pLP1:pLP2:pLP/VSVG=1:0.45:0.45:0.8，其中表达绿色荧光蛋白的质粒 pLEGFP-N1 的量均为 24 μg。转染完成后，收集病毒液并测定其滴度，比较 2 质粒包装体系与 3 质粒包装体系的转染效果。

(2)不同转染时间对磷酸钙法制备病毒的影响：其他条件与上一步骤中相同，分别在 2 质粒及 3 质粒包装体系下包装病毒，同时各转染二组，一组转染 48 h，另一组转染 72 h。转染完成后，收集病毒液并测定其滴度，比较转染 72 h 与转染 48 h 转染效果的好坏。

(3)有无明胶包被对磷酸钙法制备病毒的影响：采用上一步中最佳的转染时间，分别在 2 质粒包装体系及 3 质粒包装体系下包装病毒，同时各转染二组，一组将转染的 293T 细胞铺在用明胶包被的培养皿上，另一组将转染的 293T 细胞直接铺在培养皿上。转染完成后，收集病毒液并测定其滴度，以比较有明胶包被与无明胶包被转染效果的好坏。

磷酸钙法制备病毒中，影响病毒包装效率因素的正交实验：以上述三步骤中所得的最优条件设计三因素二水平正交实验。以确定三因素中的主次关系及病毒

包装的最优化转染条件。

2.1.9 使用 QuickShuttle 转染试剂制备病毒及相关优化

2.1.9.1 使用 QuickShuttle 转染试剂制备病毒的基本流程

(1)转染前 18~24 h, 取对数生长期的 293T 细胞, 并通过胰酶消化处理, 以 3×10^6 个细胞/皿的密度接种于 100 mm 培养皿中, 加入 5~10 mL 细胞培养液, 置于 5% CO₂、饱和湿度、37℃的 CO₂ 培养箱过夜培养。

(2)当细胞密度达到 50%~70%时, 即可转染。取 42 μg 质粒 DNA 和 84 μL 转染试剂分别稀释到 400 μL 无菌生理盐水中, 合并上述两种溶液并吹打混匀。

(3)将上述混合溶液加入 100 mm 培养皿中, 小心摇动培养皿作“8”运动, 使培养皿中的溶液充分混匀。随后将培养皿放入 5%CO₂ 浓度、饱和湿度、37℃的 CO₂ 培养箱中, 培养 12~24 h。

(4)小心取出培养皿, 置于超净台中, 倒掉培养液, 添加 16 mL DMEM 培养液。再置于 5% CO₂、饱和湿度、37℃的 CO₂ 培养箱培养 48 h。即可收集病毒液。

2.1.9.2 使用 QuickShuttle 转染试剂制备病毒的优化

与磷酸钙法制备病毒的改进方法一致, 分别在不同的包装体系、不同的转染时间和有无明胶包被的情况下包装病毒, 并通过测定病毒滴度评价转染效果。此外, 进行了影响病毒包装效率因素的正交实验: 以上述三步骤中所得的最优条件设计三因素二水平的正交实验, 以确定三因素中的主次关系及病毒包装的最优化转染条件。

2.1.10 病毒滴度的测定

(1)病毒滴度测定前 18~24 h, 将生长状态良好的 293T 细胞消化并计数, 将细胞密度调至 $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 个/mL, 接种至 96 孔板中, 每孔 100 μL。针对不同病毒设立多个重复孔, 将 96 孔板置于 5% CO₂、饱和湿度、37℃的 CO₂ 培养箱中过夜培养。

(2)培养 24 h 后, 弃去 96 孔板中原培养液, 分别将通过磷酸钙法在不同条件下制备的表达绿色荧光蛋白的病毒液以及用 QuickShuttle 转染试剂制备的表达绿色荧光蛋白的病毒液加入对应的孔中。同时每孔中加入 Polybrene 浓缩液, 使其浓度达 6 μg/mL。再将 96 孔板置于 5% CO₂、饱和湿度、37℃的 CO₂ 培养箱中过夜

培养。

(3)48 h 后，每孔补加 100 μ L DMEM 培养液。

(4)培养第 5 d，荧光显微镜下观察结果，计数每个孔中的荧光细胞克隆数，则病毒滴度(TU/mL)=荧光细胞克隆个数/孔中的病毒液体积。

2.1.11 数据分析

使用 SPSS 18.0 软件和正交设计助手 II 3.1 软件设计正交实验并进行正交极差分析和差异显著性检验($P < 0.05$ 差异显著, $P > 0.05$ 差异不显著)。

2.2 结果与分析

2.2.1 293T 细胞的复苏

由于 293T 细胞的生长状态对后续病毒的包装等一系列实验有重要影响，因此，要在细胞复苏 24 h 后观察细胞状态，293T 细胞的正常形态为典型的两端尖中间大的枣胡形，挑选出生长状态良好的细胞进行传代扩增，为后续实验做准备，见图 2.1。

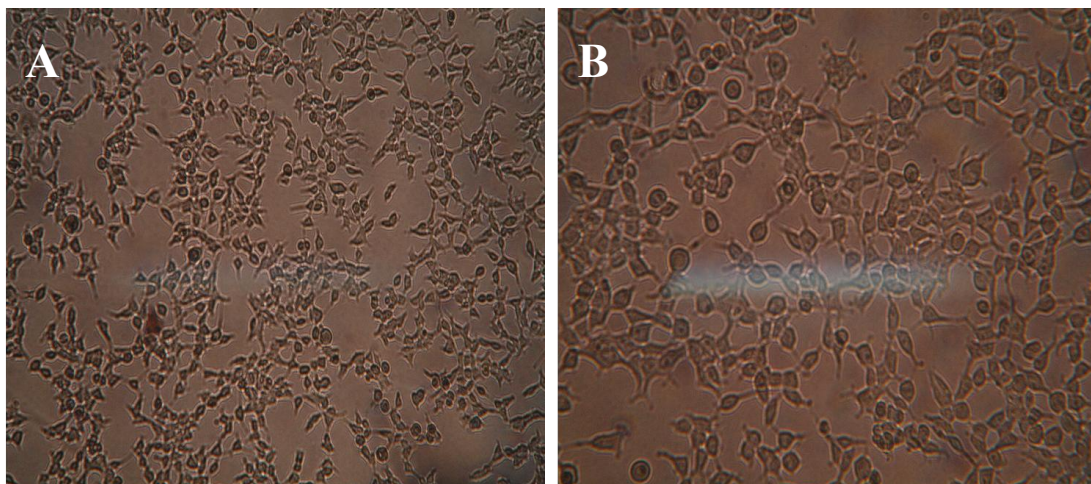


图 2.1 复苏 24 h 后的 293T 细胞
(A: 放大 100 倍的细胞形态; B: 放大 200 倍的细胞形态)

2.2.2 磷酸钙法制备病毒的优化

2.2.2.1 不同包装体系对磷酸钙法制备病毒的影响

在其他条件相同的情况下，分别通过 2 质粒包装体系及 3 质粒包装体系包装

pLEGFP-N1 载体，其中表达绿色荧光蛋白的质粒 pLEGFP-N1 的量均为 24 μg 。转染 48 h 后在荧光倒置显微镜下观察，所获得的转染效果见图 2.2。

由图 2.2 可知：通过磷酸钙法制备病毒，转染 48 h 后，在其他条件相同的情况下，2 质粒包装体系要比 3 质粒包装体系的包装效果略差一些，但二者的包装效率都不高，大部分细胞都没有包装病毒，前者的病毒滴度为 230 TU/mL，后者的滴度为 260 TU/mL，两者之间相比差异不显著($P > 0.05$)。这一结果表明，不同的包装体系对病毒包装效率具有一定影响，且 3 质粒包装体系比 2 质粒包装体系的包装效率更高。因此，在采用磷酸钙法制备病毒时，pLP1、pLP2 及 pLP/VSVG 的 3 质粒包装体系效果更好。

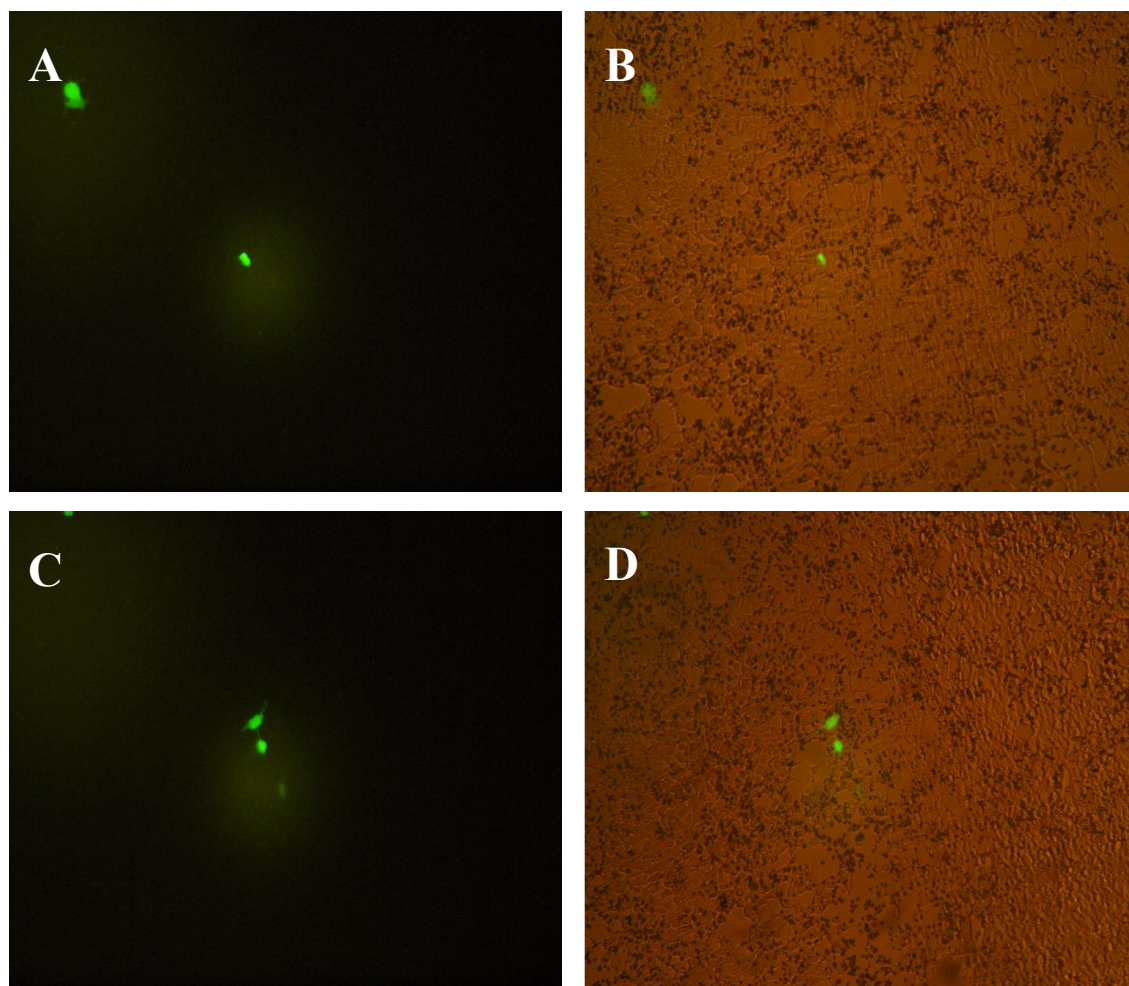


图2.2 不同包装体系下表达绿色荧光蛋白的293T细胞
(A: 2质粒体系仅激发光下的细胞($\times 40$); B: 2质粒体系激发光加自然光下的细胞($\times 40$);
C: 3质粒体系仅激发光下的细胞($\times 40$); D: 3质粒体系激发光加自然光下的细胞($\times 40$))

2.2.2.2 不同转染时间对磷酸钙法制备病毒的影响

其他条件与上一步骤中相同,分别在 2 质粒包装体系及 3 质粒包装体系下包装病毒时,同时各转染二组,一组转染 48 h 后,另一组转染 72 h 后,在荧光倒置显微镜下观察荧光,所获得的转染效果见图 2.3。

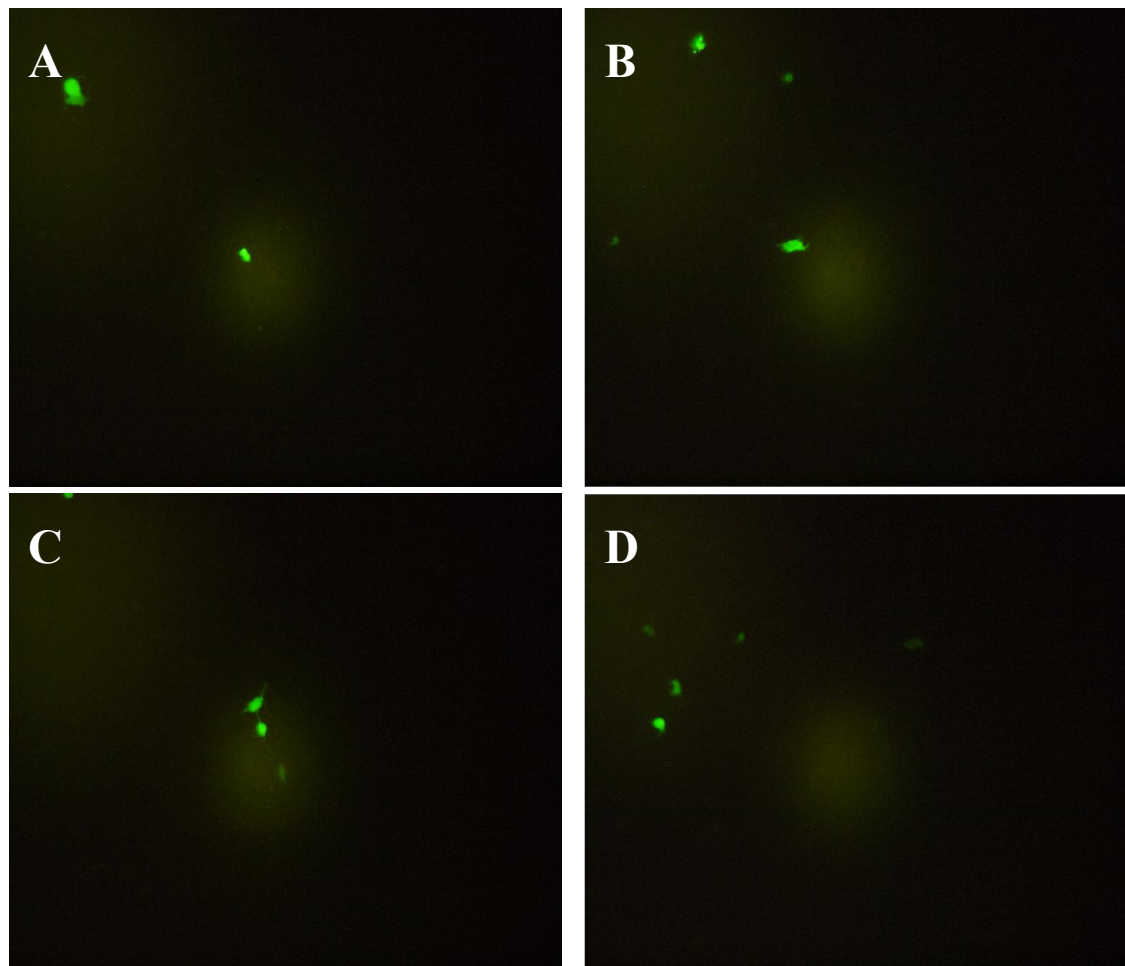


图2.3 不同转染时间下表达绿色荧光蛋白的293T细胞
(A: 2质粒体系转染48 h的细胞($\times 40$); B: 2质粒体系转染72 h的细胞($\times 40$); C: 3质粒体系转染48 h的细胞($\times 40$); D: 3质粒体系转染72 h的细胞($\times 40$))

由图 2.3 可知: 不论 2 质粒包装体系还是 3 质粒包装体系, 通过磷酸钙法制备病毒, 在其他条件相同的情况下, 将转染时间由 48 h 延长至 72 h, 后者比前者的包装效果略高一些, 但二者的包装效率都不高。在 2 质粒包装体系下转染 48 h 和 72 h 的病毒滴度分别为 230 TU/mL 和 255 TU/mL, 两者之间相比差异不显著($P>0.05$)。在 3 质粒包装体系下转染 48 h 和 72 h 的病毒滴度分别为 260 TU/mL 和 275 TU/mL, 两者之间相比差异不显著($P>0.05$)。转染 72 h 后, 由于细胞大量死亡, 因此, 72 h 的表达量最大。上述结果表明, 不同的转染时间对病毒的包装效率具有一定影响, 虽然包装 48 h~72 h 都可获取病毒, 但转染 72 h 比

48 h 时产生的病毒更多一些，即可收集更多的病毒，因此，在通过磷酸钙法制备病毒时，转染 72 h，转染效果更好。

2.2.2.3 有无明胶包被对磷酸钙法制备病毒的影响

其他条件与上一步骤中相同，转染 72 h，分别在 2 质粒包装体系及 3 质粒包装体系下包装病毒，同时各转染二组，一组将转染后的 293T 细胞铺在用明胶包被的培养皿上，另一组将转染后的 293T 细胞直接铺在培养皿上。在荧光倒置显微镜下观察荧光，所获得的转染效果见图 2.4。

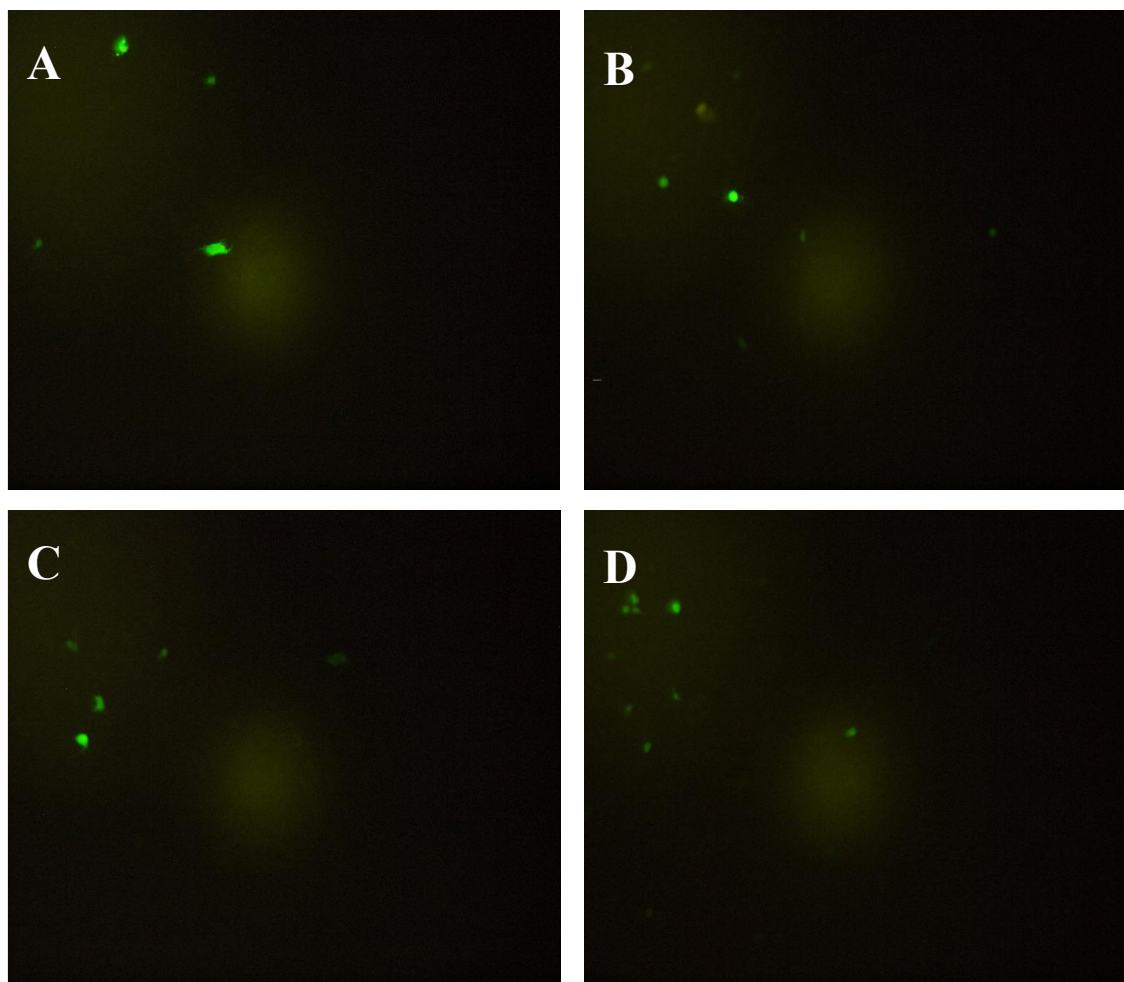


图2.4 有无明胶包被下表达绿色荧光蛋白的293T细胞

(A: 2质粒体系转染无明胶包被的细胞($\times 40$); B: 2质粒体系转染有明胶包被的细胞($\times 40$); C: 3质粒体系转染无明胶包被的细胞($\times 40$); D: 3质粒体系转染有明胶包被的细胞($\times 40$))

由图 2.4 可知：不论是在 2 质粒包装体系还是在 3 质粒包装体系下，通过磷酸钙法制备病毒，在其他条件相同的情况下，将转染的 293T 细胞铺在用明胶包被的培养皿上，由于换液时，细胞能更好的贴壁而不被冲掉，所以转染的效果优于无明胶包被组。2 质粒包装体系在无明胶包被和有明胶包被的情况下，病毒的

滴度分别为 255 TU/mL 和 480 TU/mL，二者之间差异显著($P<0.05$)。3 质粒包装体系在无明胶包被和有明胶包被的情况下，病毒的滴度分别为 275 TU/mL 和 600 TU/mL，二者之间差异显著($P<0.05$)。因此，在有明胶包被的情况下，能有效地提高病毒包装的效率。

2.2.2.4 正交实验结果

以各单因素实验(包装体系、转染时间、有无明胶包被)的最适条件为依据，设计三因素二水平的正交实验，见表 2.1，所得结果见表 2.2。

表 2.1 $L_4(2^3)$ 正交实验因素和水平

水平	A 包装体系	B 有无明胶包被	C 转染时间
1	pCMV-dR8.2 dvpr 和 pCMV-VSV-G	有	48 h
2	pLP1、pLP2 和 pLP/VSVG	无	72 h

表 2.2 $L_4(2^3)$ 正交实验结果及分析

实验号	A	B	C	病毒滴度(TU/mL)
1	1	1	1	470.000
2	1	2	2	255.000
3	2	1	2	600.000
4	2	2	1	260.000
k1	735.000	1070.000	730.000	
k2	860.000	515.000	855.000	
x1	362.500	535.000	365.000	
x2	430.00	257.500	427.500	
R	67.500	277.500	62.500	

由表 2.2 中的极差分析可知，在采用磷酸钙法制备病毒的三个影响因素中，其主次关系依次为 $B>A>C$ ，即有无明胶包被>包装体系>转染时间。从收集的病毒滴度可知最佳的组合为 $A_2B_1C_2$ ，因此，通过磷酸钙法制备病毒时，最好使用 pLP1、pLP2 和 pLP/VSVG 的 3 质粒包装体系，并且将转染的 293T 细胞铺在明胶包被的培养皿上，转染 72 h 所获得的病毒液滴度最大，病毒滴度可 600 TU/mL。

2.2.3 使用 QuickShuttle 转染试剂制备病毒及相关优化

不同包装体系对转染效果的影响：在相同的条件下，使用 QuickShuttle 转染试剂，分别采用 2 质粒包装体系及 3 质粒包装体系包装表达绿色荧光蛋白的慢病

毒载体 pLEGFP-N1, 其中表达绿色荧光蛋白的质粒 pLEGFP-N1 的量均为 24 μg , 转染 48 h, 收集病毒并测定其滴度, 前者的病毒滴度为 $4.12 \times 10^6 \text{ TU/mL}$, 后者为 $4.16 \times 10^6 \text{ TU/mL}$, 二者之间相比差异不显著($P > 0.05$)。

不同转染时间对转染效果的影响: 其他条件与上一步骤中相同, 分别在 2 质粒包装体系及 3 质粒包装体系下包装病毒, 同时各转染二组, 一组转染 48 h, 另一组转染 72 h, 收集病毒并测定其滴度。在 2 质粒包装体系下转染 48 h 和 72 h 的病毒滴度分别为 $4.12 \times 10^6 \text{ TU/mL}$ 和 $4.15 \times 10^6 \text{ TU/mL}$, 二者之间相比差异不显著($P > 0.05$)。在 3 质粒包装体系下转染 48 h 和 72 h 的病毒滴度分别为 $4.16 \times 10^6 \text{ TU/mL}$ 和 $4.20 \times 10^6 \text{ TU/mL}$, 二者之间相比差异不显著($P > 0.05$)。

有无明胶包被对转染效果的影响: 其他条件与上一步骤中相同, 转染 72 h, 分别在 2 质粒包装体系及 3 质粒包装体系下包装病毒, 同时各转染二组, 一组将转染的 293T 细胞铺在用明胶包被的培养皿上, 另一组将转染的 293T 细胞直接铺在培养皿上, 收集病毒并测定其滴度。将使用 2 质粒包装体系分别在无明胶包被和有明胶包被的情况下, 转染 72 h 的细胞置于荧光倒置显微镜下观察, 所获得的转染效果见图 2.5。

由图 2.5 可知: 散发荧光的位置几乎就是有贴壁细胞的位置, 即 QuickShuttle 转染试剂的转染效率很高, 而将转染的 293T 细胞铺在有明胶包被的培养皿上, 能提高其贴壁性, 因此, 有明胶包被实验组的转染效果优于无明胶包被的实验组。使用 QuickShuttle 转染试剂, 2 质粒包装体系, 在无明胶包被和有明胶包被的情况下, 病毒滴度分别为 $4.15 \times 10^6 \text{ TU/mL}$ 和 $6.42 \times 10^6 \text{ TU/mL}$, 二者之间相比差异显著($P < 0.05$)。3 质粒包装体系在无明胶包被和有明胶包被的情况下, 病毒滴度分别为 $4.20 \times 10^6 \text{ TU/mL}$ 和 $7.13 \times 10^6 \text{ TU/mL}$, 二者之间相比差异显著($P < 0.05$)。因此, 无论 2 质粒包装体系还是 3 质粒包装体系, 有明胶包被实验组的病毒包装效率均高于无明胶包被实验组的病毒包装效率。

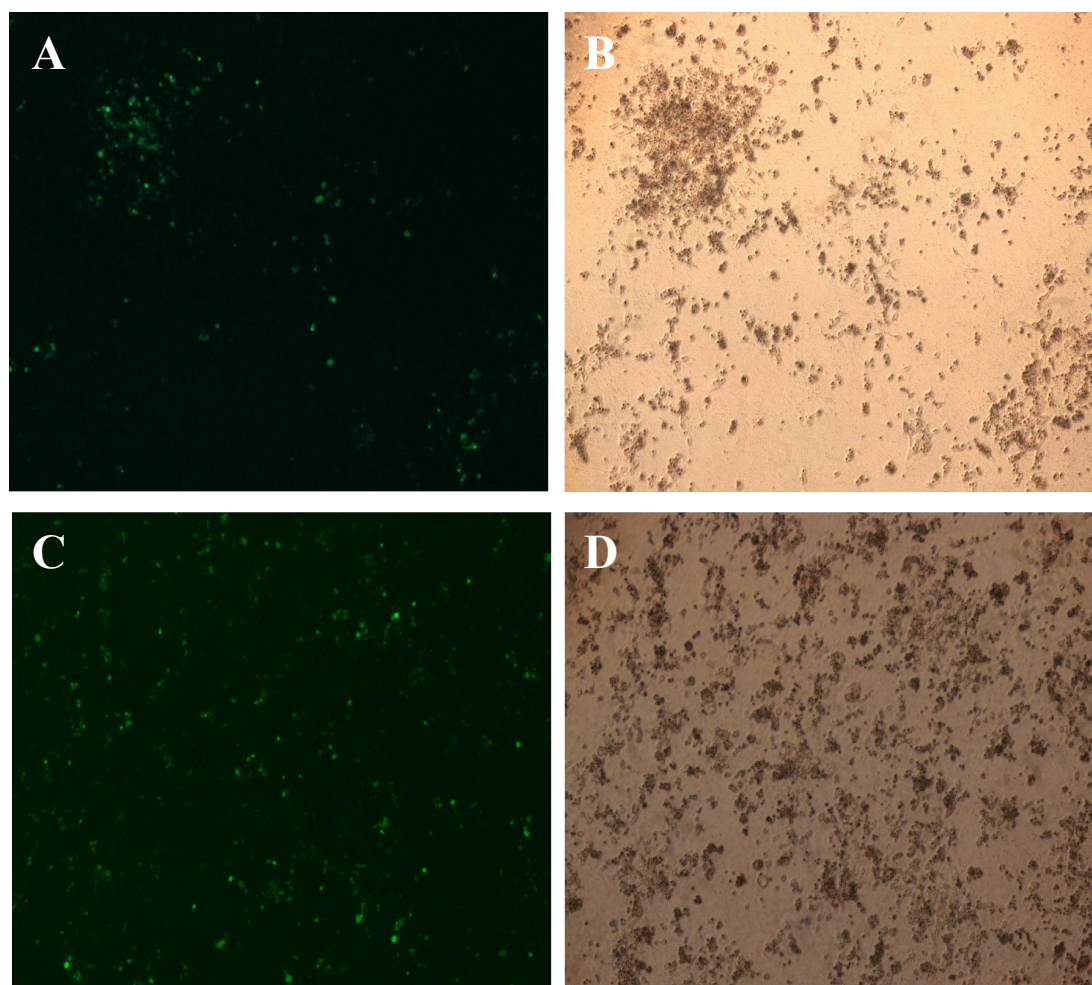


图2.5 使用QuickShuttle转染试剂在有无明胶包被下表达绿色荧光蛋白的293T细胞
 (A: 2质粒体系无明胶激发光下的细胞($\times 40$); B: 2质粒体系无明胶自然光下的细胞($\times 40$);
 C: 2质粒体系有明胶激发光下的细胞($\times 40$); D: 2质粒体系有明胶自然光下的细胞($\times 40$))

以各单因素实验(包装体系、转染时间、有无明胶包被)的最适条件为依据,设计三因素二水平的正交实验,同表 2.1, 所得结果如表 2.3 所示。

表 2.3 $L_4(2^3)$ 正交实验结果及分析

实验号	A	B	C	病毒滴度(TU/mL)
1	1	1	1	6410000
2	1	2	2	4150000
3	2	1	2	7130000
4	2	2	1	4160000
k1	10560000.000	13540000.000	10570000.000	
k2	11290000.000	8310000.000	11280000.000	
x1	5280000.000	6770000.000	5285000.000	
x2	5645000.000	4155000.000	5640000.000	
R	365000.000	2615000.000	355000.000	

由表 2.3 中的极差分析可知,在采用 QuickShuttle 转染试剂进行病毒包装时,影响病毒包装效率的三个因素的主次关系依次为 $B>A>C$,即有无明胶包被>包装体系>转染时间。从收集的病毒滴度可知最佳的组合为 $A_2B_1C_2$ 。因此,通过使用 QuickShuttle 转染试剂制备病毒时,最好使用 pLP1、pLP2 和 pLP/VSVG 的 3 质粒包装体系,并要将转染的 293T 细胞铺在明胶包被的培养皿上,转染 72 h 所得的病毒液滴度最大,病毒滴度可达 7.13×10^6 TU/mL。

2.3 讨论

由于慢病毒载体 FU-tet-o-hSox2、FU-tet-o-hOct4、FU-tet-o-hc-Myc、FU-tet-o-hKLF4、FUdeltaGW-rtTA 以及逆转录病毒载体 pEYK•E4 均不含有绿色荧光蛋白基因,所以直接测定其包装产生的病毒滴度并不方便,但可以用相同的包装体系在相同的转染条件下包装慢病毒载体 pLEGFP-N1,通过测定其病毒滴度从而间接得到所收集病毒液的滴度。

本实验中参照了《分子克隆实验指南》中^[91]改进型的磷酸钙法制备病毒的方法,这种方法具有价格低廉,性质稳定等优点。本实验对可以影响转染效果的几个相关因素进行了优化。

病毒的包装体系对转染效果有着直接的影响。pCMV-dR8.2 dvpr 和 pCMV-VSV-G 的 2 质粒包装体系是第二代包装系统,而 pLP1、pLP2 和 pLP/VSVG 的 3 质粒包装体系则是第三代包装系统,后者比前者具有更高的安全性,且后者的适用范围更广。在 pLEGFP-N1 载体的量相同的情况下,按照每种包装体系各自的比例加入相应的包装质粒,从所收集的病毒液的滴度可以看出,后者的包装效率优于前者,虽然采用后者进行包装会增大工作量,但对于需要高滴度病毒液的实验来说,pLP1、pLP2 和 pLP/VSVG 的 3 质粒包装体系更合适。

转染时间对转染效果也有一定的影响。已有大量研究表明磷酸钙法制备病毒的转染时间是 48~72 h,由于病毒的包装需要一段时间,同时还受转染细胞生理状态的影响,而且合成的病毒在空气中的存活时间也不是无限的,所以随着转染的开始,起初病毒的量是增加的,但随着转染时间的延长及一些外界生长环境的改变,如随着时间的延长,培养液中的营养成分会越来越,这就导致了细胞凋亡的加速,同时一些已经合成的蛋白质等物质也可能开始变性或降解,因此,在整个病毒合成的过程中,培养液中的病毒量会有一个峰值。本实验中做了多个对照,发现转染 72 h 比 48 h 能收集更多的病毒。

有无明胶包被对转染效果有着明显的影响。293T 细胞是转染常用的细胞，这种类型细胞虽然生长很快，但其贴壁性很差。而 293T 细胞的生长状态对转染效果有着重要影响，由于转染前 2 h~2.5 h 需要换液且转染后 12 h~24 h 仍要换液，但是换液时，293T 细胞很容易被冲掉，贴壁能力减弱。将 293T 细胞铺在用明胶包被的培养皿上，其目的在于增加其贴壁性，避免被冲掉，从而维持其正常的生长状态，保证转染及包装的顺利进行。本实验中进行了有无明胶包被的对照实验，结果明显。293T 细胞铺在用明胶包被的培养皿上转染时能获得更高的病毒滴度。

本实验中得出一个磷酸钙法制备病毒的优化条件，即使用 pLP1、pLP2 和 pLP/VSVG 的 3 质粒包装体系，并将转染的 293T 细胞铺在用明胶包被的培养皿上，然后转染 72 h，可获得较理想的结果。

QuickShuttle 转染试剂专门用于转染 293T 系列细胞，其操作简单，转染时间短，转染效果非常好。同磷酸钙法制备病毒的优化流程一致，采用 pLP1、pLP2 和 pLP/VSVG 的 3 质粒包装体系，并将转染的 293T 细胞铺在用明胶包被的培养皿上，转染 72 h 后可获得理想的结果。但是由于该试剂价格相对较贵，因此，在所需包装病毒量并不是很大且需要较高的病毒滴度时，QuickShuttle 转染试剂是理想的选择，但如果需要大量包装病毒时，在能够严格控制溶液 PH 值的情况下，磷酸钙转染的方法更合适。

2.4 本章小结

不论采用磷酸钙法或 QuickShuttle 转染试剂制备病毒，使用 pLP1、pLP2 和 pLP/VSVG 的 3 质粒包装体系，并将转染的 293T 细胞铺在用明胶包被的培养皿上，转染 72 h 后，均可获得较理想的包装效率。用磷酸钙法制备的病毒滴度可达 600 TU/mL，而使用 QuickShuttle 转染试剂制备的病毒滴度可达 7.13×10^6 TU/mL。

3 人 iPS 细胞的诱导

到目前为止,多种类型的动物细胞都已诱导出 iPS 细胞,并且受体细胞的类型也多种多样,如肝脏细胞^[17]、成熟的 B 淋巴细胞^[18]、胃上皮细胞^[17]、脂肪前体细胞^[19]、胰腺 β 细胞^[20]、肾细胞^[21]及人类骨骼肌成肌细胞^[22]等。但是综合各种因素,使用最多的还是成纤维细胞。诱导人的 iPS 细胞需要大量的细胞,由于成人的组织取材不方便且成人的细胞体外培养时生长状态等生理活性不佳,但人胎儿组织可从流产的胎儿取材,而且胎儿组织来源的细胞易于进行体外培养,其生理状态也好。其中人胎儿成纤维细胞(human fetus fibroblast cell, hFFCs, 也称为人胚胎成纤维细胞, human embryo fibroblasts, hEFs)是常用的受体细胞。此外, iPS 细胞的培养体系和 ESC 的培养体系类似,如果要使用饲养层细胞,可将小鼠胚胎成纤维细胞(mouse embryonal fibroblasts, MEFs)经丝裂霉素 C 处理后制备饲养层细胞。

本实验使用 hEFs 细胞作为受体细胞,采用有饲养层的诱导方法,用上一章中包装出的病毒诱导 iPS 细胞,在诱导过程中加入 Vc 和 VPA 之类的小分子化合物提高 iPS 细胞的诱导效率,为后续 iPS 细胞诱导流程的优化奠定基础。

3.1 材料与方法

3.1.1 材料与仪器

包头医学院第一附属医院采集一小块流产胎儿组织,流产胎儿约十周大小,从其背部、腹部取小部分组织块,用无菌的生理盐水浸泡,迅速带回实验室。采集胎儿组织已经流产孕妇及医院同意。两周龄昆明小鼠购于内蒙古大学动物实验中心。本实验中的所有仪器设备见附录 A。

3.1.2 实验试剂

胰蛋白酶、台盼蓝购于 Amresco 公司,无内毒素胎牛血清(Fetal Bovine Serum, FBS)购于杭州四季青公司, DMEM、DMEM/F-12、KnockOut™ Serum Replacement、NEAA(MEM Non-Essential Amino Acids Solution, 10 mmol)、L-Glutamine(200 mmol)、2-Mercaptoethanol(10 mmol)、bFGF 均购于 Gibco 公司,青霉素、硫酸链霉素购于华北制药, Fetal Bovine Serum(FBS)购于 Hyclone 公司,孕马血清促性腺激素、人绒毛膜促性腺激素购于宁波激素二厂, EDTA、

DMSO、CaCl₂·2H₂O、Polybrene 及其余试剂购于 Sigma-Aldrich 公司。

3.1.3 实验所用溶液

溶液：D-Hanks 液、胰蛋白酶消化液(0.25%胰蛋白酶、0.05%EDTA)、0.4% 台盼蓝染液、10%FBS 的 DMEM 完全培养液(青霉素 100 IU/mL、链霉素 100 μg/mL)、细胞冷冻液、丝裂霉素 C 溶液、0.2%明胶溶液、干细胞培养液、Polybrene 浓缩液。

3.1.4 hFFCs 的原代培养

3.1.4.1 利用单细胞培养法进行 hFFCs 的原代培养

(1)将采集的新鲜人胎儿组织用灭菌的生理盐水浸泡，移至超净台中，将组织放入含 100×双抗的 D-Hanks 液中，清洗多次，去除组织块上的血渍等多余杂质，在无双抗的 D-Hanks 液中清洗 2 次。

(2)取一个无菌的 100 mm 培养皿，将组织块放入培养皿中，加入 2 mL 胰蛋白酶消化液，一边消化一边用剪刀将组织块剪碎，尽量剪成约 1 mm³ 的小块。

(3)消化 5 min 后，加入等体积含 10% FBS 的 DMEM 完全培养液混匀以终止消化，将含有组织块及细胞的混合溶液通过无菌的 100 目筛子，过滤去除较大的组织块。

(4)将过滤后收集的混合溶液移入无菌的 10 mL 离心管中，将试管放入离心机中，以 500 r/min 离心 3~5 min(将残留的组织块沉降)。然后取出离心管，并用 75% 的酒精棉球擦拭，再移至超净台中。

(5)将上清液收集到另一个无菌的 10 mL 离心管中，然后将筛子上和离心管中沉降的组织块收集并放入培养皿中。

(6)重复第 2~5 步。将多次收集的上清液都移入同一支无菌的 10 mL 离心管中，将试管放入离心机中，以 1000 r/min 离心 5 min，然后取出离心管，并用 75% 的酒精棉球擦拭，再移至超净台中。

(7)吸去上清，添加 2 mL DMEM 完全培养液，轻轻吹打 20~30 次将细胞沉淀充分悬浮，将试管放入离心机中，再以 1000 r/min 离心 5min，然后取出离心管，并用 75% 的酒精棉球擦拭，再移至超净台中。

(8)吸去上清，添加 3 mL DMEM 完全培养液，再吹打轻轻 20~30 次将细胞沉淀

充分悬浮，移入新的 60 mm 培养皿中，置于 37℃、饱和湿度、5% CO₂ 培养箱中培养。3d 后取出观察、换液。

3.1.4.2 利用组织块培养法进行 hFFCs 的原代培养

(1)将采集的新鲜人胎儿组织用灭菌的生理盐水浸泡，移至超净台中，将组织放入含 100×双抗的 D-Hanks 液中，清洗多次，去除组织块上的血渍等多余杂质，在无双抗的 D-Hanks 液中清洗 2 次。

(2)取一个无菌的 100 mm 培养皿，将组织块放入培养皿中，加入 2 mL 胰蛋白酶消化液，一边消化一边用剪刀将组织块剪碎，尽量剪成约 1 mm³ 的小块

(3)用眼科镊子将小组织块有规则、整齐地摆放在无菌的 60 mm 培养皿中，每个组织块相隔约 5 mm。

(4)将小组织块摆放完毕后，小心地将培养皿上下颠倒，置于 37℃、饱和湿度、5% CO₂ 培养箱中培养 2~4 h。

(5)取出培养皿，小心翻转平放置于超净台中，缓慢地添加少量 DMEM 完全培养液(小心别让组织块漂浮离开皿底)，将组织块完全浸没于培养液中，小心地将培养皿放入 37℃、饱和湿度、5% CO₂ 培养箱中继续培养。3 d 后取出，置于倒置显微镜下观察组织块周围是否有迁移出的细胞，同时进行换液。

3.1.5 hFFCs 的传代培养及冻存

3.1.5.1 hFFCs 的传代培养

同 293T 细胞的传代步骤一样，不过由于 hFFCs 比 293T 细胞贴壁更牢固，所以用胰蛋白酶消化液(0.25%胰蛋白酶、0.05%EDTA)消化传代。

3.1.5.2 hFFCs 的冻存

(1)选取细胞形态正常，且生长态势旺盛的细胞进行冻存。

(2)冷冻前 24 h，为冻存的细胞更换新鲜的 DMEM 培养液，等到细胞生长所占面积达到皿底面积的 75%~85%时，用胰蛋白酶消化液(0.25%胰蛋白酶、0.05%EDTA)消化细胞。

(3)一边旋转一边摇动培养皿，使 hFFCs 充分消化，在倒置显微镜下观察，发现大部分细胞脱离皿底，漂浮在溶液中后，向培养皿中添加等体积的细胞培养液以终止消化，将培养液移至无菌的 10 mL 离心管中。

(4)以 1000 r/min 离心 5 min, 取出离心管并用 75%的酒精棉球擦拭, 再移至超净台中。小心吸去上清液, 以免将细胞沉淀吸掉, 再加入 2 mL 细胞培养液, 将细胞沉淀吹打均匀。

(5)重复第 4 步, 在离心后, 用细胞冷冻液重悬细胞, 并用 0.4%台盼蓝染液和血球计数板进行活细胞计数, 将细胞密度调至 5×10^5 个/mL。

(6)将细胞冷冻液移至冻存管中, 标记好后 4℃放置 40 min, -20℃放置 60 min, 然后放入超低温冰箱(-70℃~-80℃)过夜, 第 2 d 放入液氮中。

3.1.6 MEFs 的原代培养和传代培养

(1)向母鼠腹腔注射 0.1mL(15 IU)的孕马血清促性腺激素, 2 d 后再注射等量的人绒毛膜促性腺激素, 并将公鼠与母鼠合笼, 使母鼠受孕。

(2)当母鼠受孕 14~16 d 后, 采用椎脱臼法处死受孕母鼠, 用 75%的酒精浸泡 5 s 后, 迅速取出移入超净台中。

(3)用已灭菌的眼科剪将腹部的皮毛层剪开, 再用镊子将腹部的皮毛层剥离, 用剪刀剪开其腹腔薄膜露出内脏。

(4)将大、小肠等器官组织拨到两旁, 用剪刀将子宫剪下后取出, 放入含有 D-Hanks 溶液的无菌玻璃皿中。

(5)小心地从子宫中取出胎儿, 剪去头、四肢、内脏, 用 D-Hanks 清洗 2~3 次, 洗掉血渍等杂质, 用剪刀剪成 1 mm^3 大小的小块。

(6)分别采用单细胞培养法和组织块培养法进行 MEFs 的原代培养, 取生长状态良好的细胞进行传代培养、冻存, 具体的操作流程见第二章 hFFCs 的原代培养、传代培养及冷冻保存。

3.1.7 饲养层的制备

(1)取生长状态良好的第 3 代 MEFs, 待细胞长满皿底的 75%~80%时, 吸去培养液, 添加含 $10 \mu\text{g/mL}$ 丝裂霉素 C 的 DMEM 培养液, 置于 37℃、饱和湿度、5% CO_2 培养箱中培养 2~2.5 h。

(2)取出培养皿, 置于超净台中, 倒掉培养液, 用 D-Hanks 液清洗 5 次后, 添加 2 mL 胰蛋白酶消化液(0.05%胰蛋白酶、0.025%EDTA)消化细胞。

(3)一边旋转一边摇动培养皿, 使 MEFs 充分消化, 在倒置显微镜下观察, 发现大部分细胞脱离皿底, 漂浮于消化液中后, 向培养皿中添加等体积的细胞培养液

以终止消化，将溶液移至无菌的 10 mL 离心管中。

(4)以 1000 r/min 离心 5 min，取出离心管并用 75%的酒精棉球擦拭，再移至超净台中。小心吸去上清液，以免将细胞沉淀吸掉。再加入 2 mL 细胞培养液，将细胞沉淀吹打均匀。

(5)重复第 5 步，以 1.0×10^5 个/mL 的密度接种于已用 0.2%明胶包被的 60 mm 培养皿中，置于 37℃、饱和湿度、5% CO₂ 培养箱中培养。

3.1.8 病毒感染 hFFCs

(1)取处于对数期生长期且形态良好的 hFFCs，倒掉培养液，用 D-Hanks 液清洗 2 次，用胰酶消化液(0.05%胰蛋白酶、0.025%EDTA)消化。

(2)一边旋转一边摇动培养皿，使 hFFCs 充分消化，在倒置显微镜下观察，发现大部分细胞脱离皿底，漂浮于溶液中后，向培养皿中添加等体积的细胞培养液以终止消化，将溶液移至无菌的 10 mL 离心管中。

(3)以 1000 r/min 离心 5 min，取出离心管并用 75%酒精棉球擦拭，再移至超净台中。小心吸去上清液，以免将细胞沉淀吸掉。再加入 2 mL 细胞培养液，将细胞沉淀吹打均匀。

(4)重复第 3 步，用 0.4%台盼蓝染液和血球计数板进行活细胞计数，并以 6.0×10^4 个/皿的密度接种于 60 mm 皿中，置于 37℃、饱和湿度、5% CO₂ 培养箱中培养。

(5)待 hFFCs 长满皿底的 60%~70%，将通过磷酸钙法制备的重组逆转录病毒 pEYK•E4 和分别含有人类 Sox2、Oct4、c-Myc 及 Klf4 四个转录因子及反向四环素反式激活因子 rtTA 的慢病毒 FU-tet-o-hSox2、FU-tet-o-hOct4、FU-tet-o-hc-Myc、FU-tet-o-hKLF4 及 FUDeltaGW-rtTA 感染 hFFCs。其中 pEYK•E4、FU-tet-o-hSox2、FU-tet-o-hOct4、FU-tet-o-hc-Myc、FU-tet-o-hKLF4 的量均为 2 mL，FUDeltaGW-rtTA 的量为 4 mL。pEYK•E4 单独感染一个培养皿的细胞，其他病毒共同感染一个培养皿的细胞，同时每个培养皿中添加与每种病毒体积相等的培养液，另添加终浓度为 8 μg/mL 的 Polybrene，置于 37℃、饱和湿度、5% CO₂ 培养箱中培养 12 h。

(6)取出培养皿，倒掉溶液，用 D-Hanks 液清洗 2 次，添加新鲜的 DMEM 培养液。置于 37℃、饱和湿度、5% CO₂ 培养箱中培养 12 h。

(7)再次用病毒液感染 hFFCs，感染 12 h 后更换新鲜的 DMEM 培养液，置于 37℃、饱和湿度、5% CO₂ 培养箱中培养 12 h。之后每天换液。

(8)第二次感染后的第4 d, 用 D-Hanks 液清洗 2 次, 用胰酶消化液(0.05%胰蛋白酶、0.025%EDTA)消化, 接种到饲养层细胞上。设置空白对照: 用 DMEM 培养液代替病毒液, 其它操作同上。

3.1.9 重编程过程的观察

将病毒感染后的 hFFCs 接种到饲养层上后, DMEM 培养液更换为干细胞培养液, 并向其中添加 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 Vc 及 1 mmol/mL 的 VPA。其中逆转录病毒 pEYK•E4 感染的 hFFCs, 每天换液, 并观察细胞形态的变化。此外, 慢病毒 FU-tet-o-hSox2、FU-tet-o-hOct4、FU-tet-o-hc-Myc、FU-tet-o-hKLF4 及 FUdeltaGW-rtTA 感染的 hFFCs, 除每天换液外, 前 10 d 还需添加 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 Dox, 第 11 d 开始换成 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 Dox 直到克隆出现。

3.2 结果与分析

3.2.1 hFFCs 的原代培养

3.2.1.1 利用单细胞培养法进行 hFFCs 的原代培养

利用单细胞培养法进行 hFFCs 的原代培养, 如图 3.1 所示。

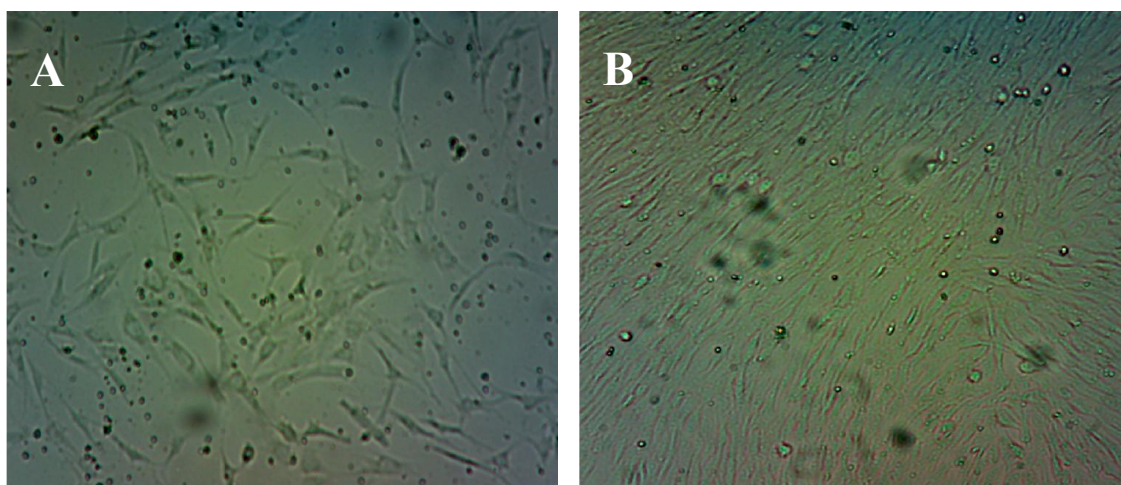


图3.1 单细胞法原代培养的hFFCs

(A: 培养第3 d 的细胞($\times 100$); B: 培养第5 d 的细胞($\times 100$))

由图 3.1 可知: 单细胞法培养的原代 hFFCs, 细胞形态为长条形。培养至第 3 d 时, 细胞贴壁良好, 生长旺盛。培养至第 5 d 时, 细胞密度增大, 占皿底面

积的 80%。细胞的排列呈现典型的成纤维样细胞形态。

3.2.1.2 利用组织块培养法进行 hFFCs 的原代培养

利用组织块培养法进行 hFFCs 的原代培养，如图 3.2 所示。

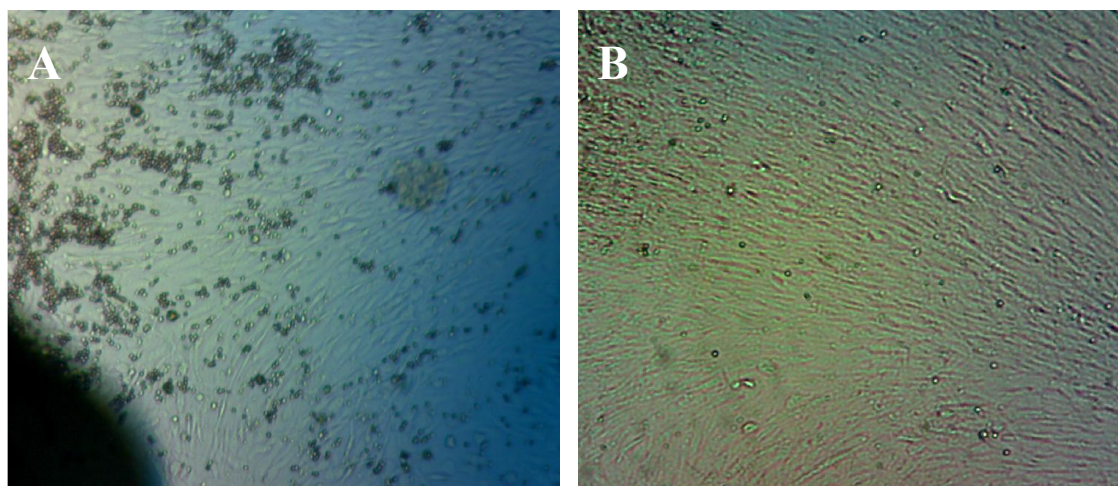


图3.2 组织块法原代培养的hFFCs
(A: 培养3 d 的细胞($\times 100$); B: 培养5 d 的细胞($\times 100$))

由图 3.2 可知：组织块法培养的原代 hFFCs，细胞形态为纤维状。培养至第 3 d 时，细胞贴壁整齐排列，生长状态良好。培养至第 5 d，细胞迅速扩增，占皿底面积的 80%。细胞的排列呈放射状。

通过单细胞或组织块法培养原代 hFFCs 都是可行的，经过后续的传代实验培养到第 8 代、第 9 代，细胞形态都不会发生太大的变化。但是通过对比发现，组织块法培养的原代细胞形态比单细胞法培养的细胞更好一些，多次的传代过程中很少有不贴壁的死细胞。所以为了能使后续实验取得更好的结果，相关细胞的原代培养尽可能采用组织块法培养。

3.2.2 hFFCs 的传代培养及冻存

通过单细胞法或组织块法原代的 hFFCs 经传代后，观察细胞形态，见图 3.3，从中选取生长状况良好的细胞冻存。

由图 3.3 可知：单细胞法或组织块法培养的原代细胞经过传代培养，最初的几代细胞形态及贴壁性均表现良好。都可作为冻存的细胞种保留。

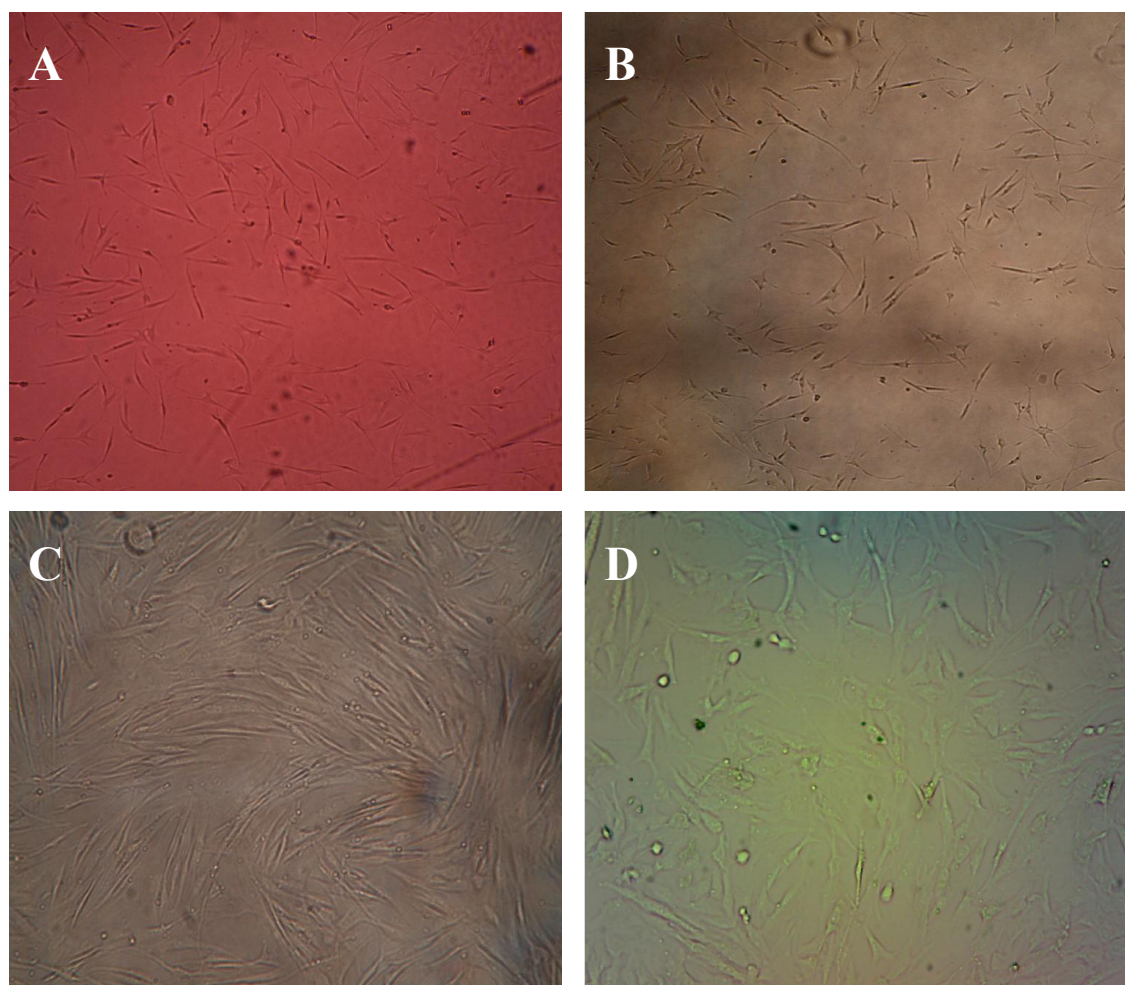


图 3.3 传代后的 hFFCs

(A: 第 3 代细胞接种后 12 h 的细胞形态(组织块法, $\times 40$); B: 第 3 代细胞接种后 12 h 的细胞形态(单细胞法, $\times 40$); C: 第 5 代细胞接种后 12 h 的细胞形态(组织块法, $\times 200$); D: 第 5 代细胞接种后 12 h 的细胞形态(单细胞法, $\times 200$))

3.2.3 MEFs 的原代培养及传代培养

同样采用单细胞法或组织块法培养原代 MEFs, 再经传代培养, 见图 3.4。

采用组织块培养法在第 2 d 便会迁移出许多贴壁细胞, 细胞形态良好, 通过单细胞培养法在第 2 d 观察细胞, 细胞都表现出良好的贴壁性。原代培养的 MEFs 中会掺杂少量其他细胞, 但细胞生长旺盛, 增值速度很快。并且经过传代培养, 传至第 3~4 代时, MEFs 中几乎不再掺杂其他细胞, 细胞充分铺展开来, 单个细胞的体积会相对变大, 细胞核会愈加突显。

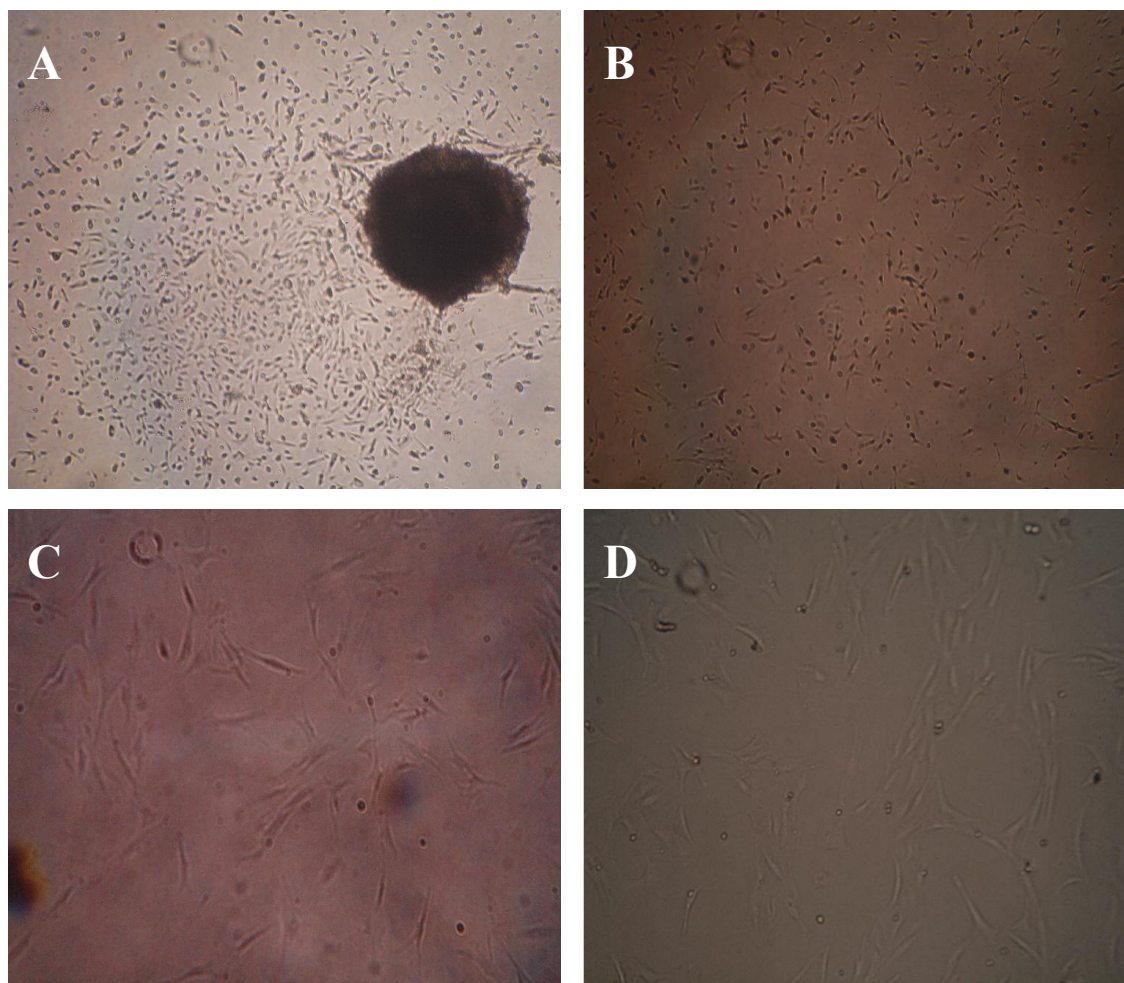


图 3.3 原代和传代培养的 MEFs

(A: 组织块培养法培养 2 d 后的 MEFs($\times 40$); B: 单细胞培养法培养 2 d 后的 MEFs($\times 40$);
C: 第 3 代培养 24 h 的 MEFs($\times 100$); D: 第 3 代培养 24 h 的 MEFs($\times 100$))

3.2.4 饲养层的制备

将 MEFs 用 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的丝裂霉素 C 处理 2~2.5h, 所得细胞见图 3.4。

如图 3.4 所示: 经过丝裂霉素 C 处理后的饲养层细胞形态良好, 饲养层细胞更加扁平舒展, 再经过消化转移至明胶包被的培养皿上, 可以将病毒感染后的 hFFCs 接种到饲养层上。

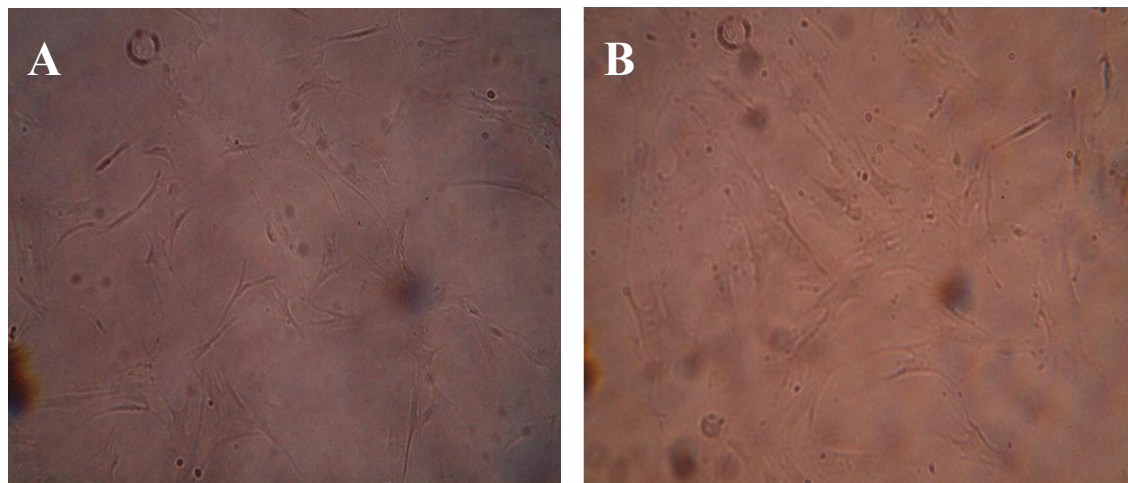


图3.4 丝裂霉素C处理前后的MEFs
(A: 处理前的细胞($\times 100$); B: 处理后的的细胞($\times 100$))

3.2.5 病毒感染 hFFCs

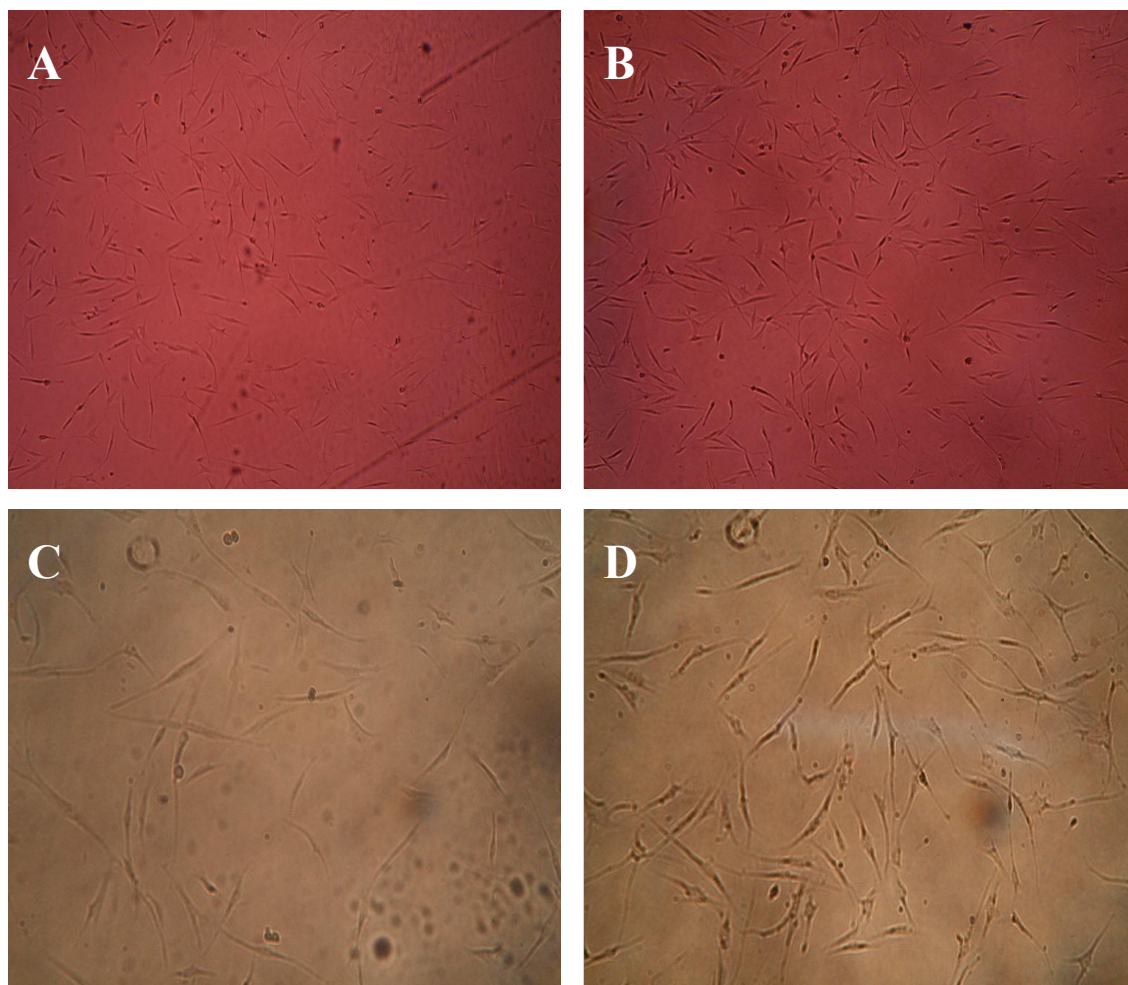


图 3.5 病毒感染前后的 hFFCs
(A: 首次感染前的空白对照组细胞($\times 40$); B: 首次感染后的空白对照组细胞($\times 40$);
C: 首次感染前的实验组细胞($\times 100$); D: 首次感染后的实验组细胞($\times 100$))

hFFCs 首次感染病毒前后及空白组的细胞形态变化见图 3.5。

如图 3.5 所示：病毒没有感染的细胞，细胞形态并无改变且会不断增殖。然而，经过第一次病毒感染的 hFFCs，与感染前相比，虽然细胞的形态并无太大改变，可是细胞核颜色相对更深，同时会有微量的细胞死亡悬浮于培养液中。

hFFCs 经过第二次病毒感染后的细胞变化见图 3.6。

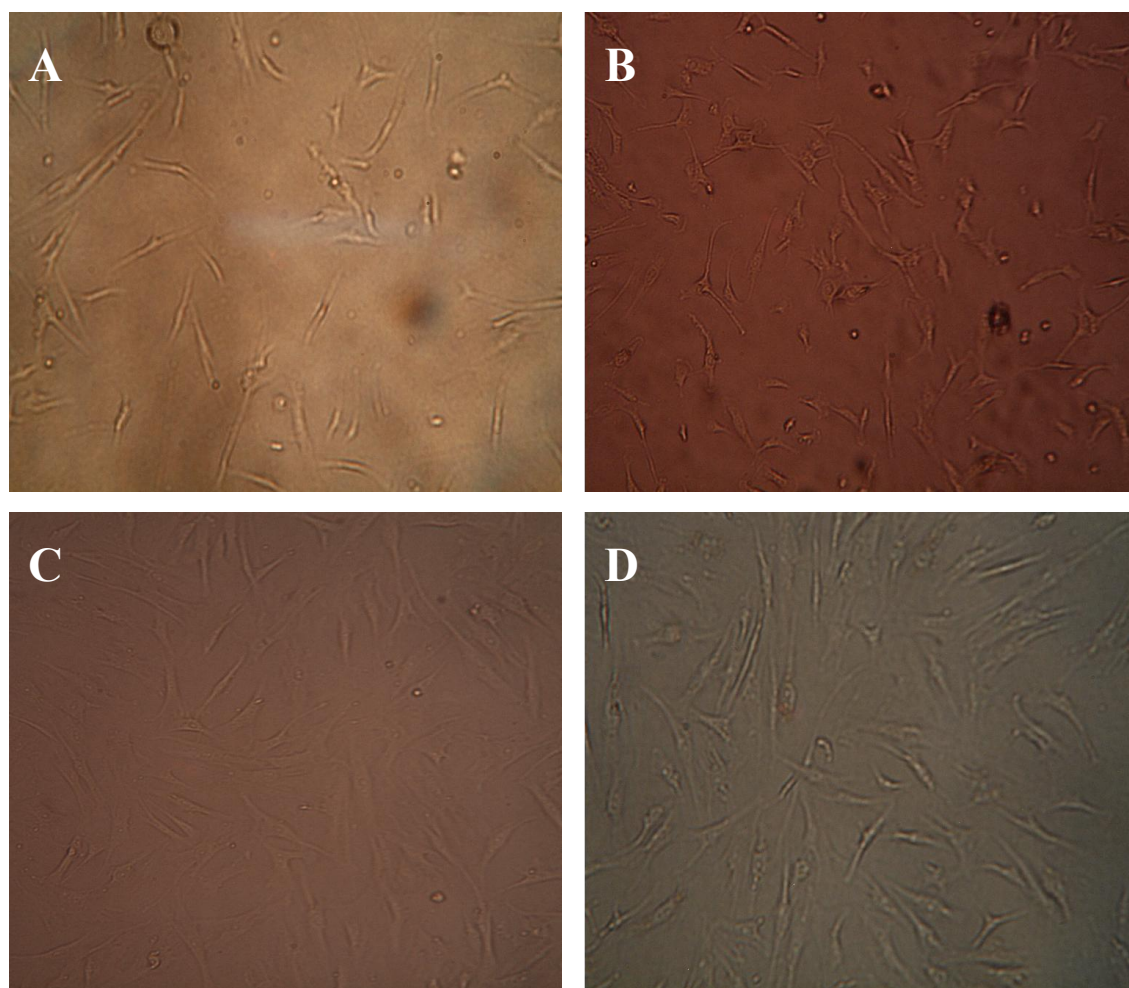


图 3.6 病毒感染后的 hFFCs

(A: 首次感染后实验组细胞($\times 100$); B: 二次感染后 2 d 的实验组细胞($\times 100$);
C: 二次感染后 3 d 的实验组细胞($\times 200$); D: 二次感染后 4 d 的实验组细胞($\times 200$))

如图 3.6 所示：第二次感染后 2 d，细胞形态也发生细微的改变。二次感染后 3 d，会出现少量非典型长条状形态的细胞，并且还有少量细胞死亡悬浮。二次感染后 4 d，还会出现其他形状的细胞，如锥形、树杈形、不规则的三角形等形状的细胞。

3.2.6 重编程过程的观察

将病毒感染后第 6 d 的 hFFCs 经胰蛋白酶消化，接种于饲养层细胞上后，每天更换干细胞培养液并观察细胞形态的变化，在饲养层上培养到第 5 d 时，发现一些细胞的细胞膜相对会变的更厚，使得细胞所占三维空间的整体立体感也更加明显。随后的观察发现，这种趋势会越来越明显。发生形变的细胞并没有脱离皿底，贴壁性仍良好。当培养到第 11 d 时，可看到类似 ESC 样的克隆，见图 3.7。

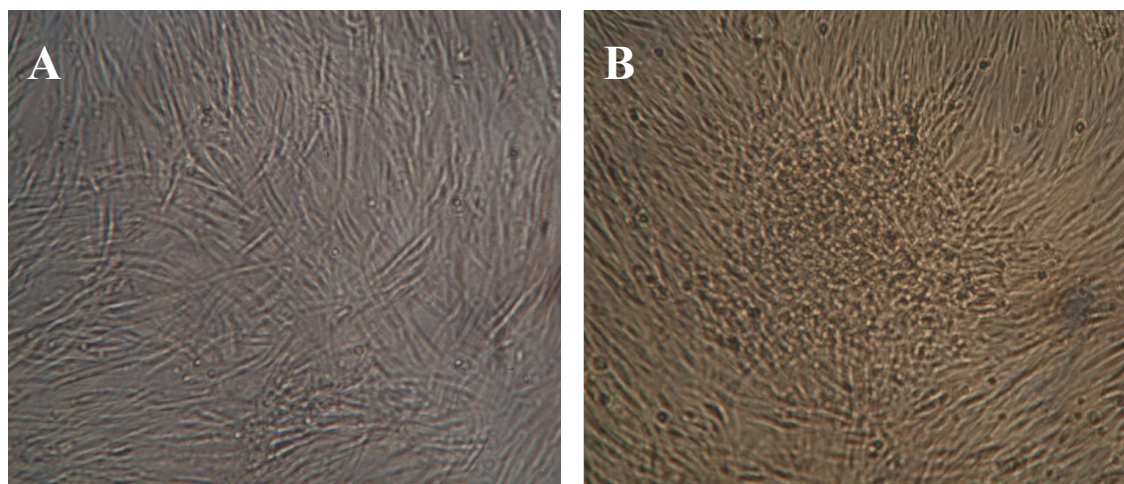


图 3.7 饲养层上培养的 hFFCs ($\times 100$)
(A: 培养第 5 d 的细胞($\times 100$); B: 培养第 11 d 的细胞($\times 100$))

本实验中病毒感染后的 hFFCs 接种密度为 2×10^4 个/皿，每个皿中 iPS 细胞的克隆数平均为 5 个，iPS 细胞诱导效率=克隆数/细胞数。本实验中 iPS 细胞的诱导效率为 0.025%。

3.3 讨论

本实验以 hFFCs 作为受体细胞，分别采用单细胞培养法和组织块培养法从原代 hFFCs 开始培养，二种方法培养的原代 hFFCs，不论是细胞形态还是细胞贴壁性等生理表现都呈现良好状态。并且经过数次传代，hFFCs 仍具有很强的增殖能力同时呈现出良好的细胞形态。本实验中传至第 9 代细胞的形态、增殖能力以及贴壁性等方面与第 4 代并没有明显区别，这与相关的研究报道相一致^[92]。通过对二种方法获得的细胞进行比较后发现，通过组织块培养法获得的原代细胞经胰蛋白酶消化传代后几乎没有死亡的细胞，但通过单细胞法获得的原代细胞传代后会有少量悬浮的死细胞。而且通过组织块培养法获得的原代细胞也比单细胞培

养法获得的原代细胞具有更好的细胞形态。其原因可能是单细胞培养时，细胞处于胰酶环境中的时间要比组织块培养法稍长一些。由于诱导 iPS 细胞时，供体细胞最好不要使用传代次数多的 hFFCs，使用第 3 代或第 4 代的 hFFCs 即可。所以本实验只传至第 9 代，并且经过冷冻保存处理，之后复苏的细胞仍表现出良好的细胞形态，可以正常增殖，没有明显的衰老、凋亡现象发生。据有关研究报道^[93,94]，hFFCs 传至 15 代甚至 25 代以上也不会大量衰老、凋亡。

iPS 细胞的诱导可分为有饲养层诱导和无饲养层诱导，本实验采用有饲养层诱导方法。而饲养层细胞则是由 MEFs 制备得来。同 hFFCs 一样，MEFs 在进行原代培养时，不要使组织细胞在胰酶环境中存在时间过长。有相关实验研究^[95-97]所用胰酶的浓度较低，但本实验中使用了较常见的 0.25% 的胰酶，这样可以缩短原代培养时消化所用时间，只需 5 min，然后重复消化，这样得到的原代细胞其活性没有降低，具有良好的细胞形态及很高的增殖能力，表明这种方法具有可行性。MEFs 传代培养时，室温下胰酶消化 1~2 min 即可，加培养液终止消化，再吹打使细胞悬浮。小鼠胎儿的大小亦或成熟程度对 MEFs 的原代培养有着重要影响，太大或太小都严重影响 MEFs 原代培养的效果，大小适中的小鼠胎儿，四肢、内脏和头恰好能够辨认，也易去除，同时骨骼也没有完全形成，组织非常幼嫩，容易剪碎也易于消化。所以本实验采用的胎鼠的孕龄为 15~16 d。最好采用早期传代的 MEFs 制作饲养层，因为第 4 代以后的 MEFs，不论是细胞形态还是增殖能力都已大不如前^[98]，这样会影响后续 iPS 细胞的诱导。相关的研究^[99]表明，用原代的 MEFs 制作的饲养层效果更好。MEFs 经丝裂霉素 C 处理后，虽然不再具备增殖能力，但仍细胞仍然存活，能够提供某些促进 iPS 细胞诱导的小分子化合物，如 LIF。

本实验中使用了慢病毒 FU-tet-o-hSox2、FU-tet-o-hOct4、FU-tet-o-hc-Myc、FU-tet-o-hKLF4、FUdeltaGW-rtTA 和重组逆转录病毒 pEYK•E4 感染 hFFCs，经过病毒感染的 hFFCs 会发生细胞形态等相关变化。实验中添加了终浓度为 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Polybrene 以促进病毒对细胞的感染^[100]。将病毒感染后的 hFFCs 接种到饲养层细胞上，由于 FU-tet-o-hSox2、FU-tet-o-hOct4、FU-tet-o-hc-Myc、FU-tet-o-hKLF4、FUdeltaGW-rtTA 是诱导表达型慢病毒系统，通过 Dox 诱导，使外源基因得以表达。每天更换干细胞培养液，同时添加能够提高重编程效率的小分子化合物，如 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 Vc 和 1 mmol/mL 的 VPA。本实验将病毒感染后的 hFFCs 在饲养层细胞上培养到第 11 d 时，出现类似 ESC 样的克隆。但是诱导

效率仍然很低，仅为0.025%，还需要继续摸索更佳的诱导条件，再加上其他鉴定方法使整体更加完善。不管怎样，本实验还是为 iPS 细胞的诱导提供了一个操作简单，无需复杂仪器，花费不高的实验方案。

3.4 本章小结

分别通过单细胞培养法及组织块培养法成功获得了 hFFCs 和 MEFs，用病毒感染 hFFCs，将 MEFs 经丝裂霉素 C 处理制备饲养层，发现其细胞形态发生一定变化，之后接种到饲养层上，每天更换干细胞培养液，同时添加适量的 Vc 和 VPA，培养 11 d 后可出现类似 ESC 样的克隆，本实验中 iPS 细胞的诱导效率为 0.025%。

结 论

本实验将重组逆转录病毒载体 pEYK•E4 和慢病毒载体 FU-tet-o-hSox2、FU-tet-o-hOct4、FU-tet-o-hc-Myc、FU-tet-o-hKLF4、FUdeltaGW-rtTA 通过磷酸钙法和 QuickShuttle 转染试剂转染到 293T 细胞中,进行病毒包装,提取病毒并测定病毒滴度;同时,改进了使用磷酸钙法和 QuickShuttle 转染试剂制备病毒的转染条件,实验结果表明三个影响因素的主次关系依次为:有无明胶包被>不同的包装体系>不同的转染时间,即使用 pLP1、pLP2 和 pLP/VSVG 的 3 质粒包装体系,并将转染的 293T 细胞铺在用明胶包被的培养皿上,然后转染 72 h 可获得较理想的结果。在此条件下可获得 600 TU/mL 的病毒滴度,而使用 QuickShuttle 转染试剂制备的病毒滴度可达 7.13×10^6 TU/mL。

本实验分别通过单细胞培养法和组织块培养法成功培养出原代 hFFCs。鉴于通过组织块培养法得到的原代 hFFCs 细胞形态更好,经过传代后很少出现死细胞,所以更适于后续实验;同样通过单细胞培养法和组织块培养法获得原代的 MEFs,经过传代,使用第 3 代 MEFs,经丝裂霉素 C 处理后制备饲养层;用病毒感染 hFFCs,结果表明病毒感染的 hFFCs 其细胞形态发生了一定的改变,与空白对照组相比,hFFCs 由纤长的细胞形态向树杈形、锥形、三角形等不规则形态转变;将病毒感染后的 hFFCs 接种到饲养层上后,每天更换干细胞培养液,同时添加可促进 iPS 细胞诱导的小分子化合物(Vc 和 VPA),培养到第 11 d 时出现类似 ESC 样的克隆,本实验中 iPS 细胞的诱导效率为 0.025%。

本实验初步探索并提供了一个操作简单,无需复杂仪器,花费不高的实验方案,为后续 iPS 细胞诱导流程的优化奠定了基础。

参考文献

- [1] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors[J]. *Cell*, 2006, 126(4): 663-676.
- [2] Chin M H, Mason M J, Xie W, et al. Induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells are distinguished by gene expression signatures[J]. *Cell Stem Cell*, 2009, 5(1):111-123.
- [3] Chin M H, Pellegrini M, Plath K, et al. Molecular analyses of human induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, 2010, 7(2):263-269.
- [4] Hawkins R D, Hon G C, Lee L K, et al. Distinct epigenomic landscapes of pluripotent and lineage-committed human cells[J]. *Cell Stem Cell*, 2010, 6(5):479-491.
- [5] Li R, Liang J, Ni S, et al. A mesenchymal-to-epithelial transition initiates and is required for the nuclear reprogramming of mouse fibroblasts[J]. *Cell Stem Cell*, 2010, 7(1):51-63.
- [6] Samavarchi-Tehrani P, Golipour A, David L, et al. Functional genomics reveals a BMP-driven mesenchymal-to-epithelial transition in the initiation of somatic cell reprogramming[J]. *Cell Stem Cell*, 2010, 7(1):64-77.
- [7] Sridharan R, Tchieu J, Mason M J, et al. Role of the murine reprogramming factors in the induction of pluripotency[J]. *Cell*, 2009, 136(2):364-377.
- [8] Hanna J, Saha K, Pando B, et al. Direct Cell Reprogramming Is a Stochastic Process Amenable to Acceleration[J]. *Nature*, 2009, 462(7273): 595-601.
- [9] Smith Z D, Nachman I, Regev A, et al. Dynamic Single-Cell Imaging of Direct Reprogramming Reveals an Early Specifying Event[J]. *Nat Biotechnol*, 2010, 28(5):521-526.
- [10] Huangfu D, Maehr R, Guo W, et al. Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds[J]. *Nature biotechnology*, 2008, 26(7):795-797.

- [11] Mali P, Chou B K, Yen J, et al. Butyrate greatly enhances derivation of human induced pluripotent stem cells by promoting epigenetic remodeling and the expression of pluripotency-associated genes[J]. *Stem Cells*, 2010, 28(4):713-720.
- [12] Shi Y, Desponts C, Do J T, et al. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic fibroblasts by Oct4 and Klf4 with small-molecule compounds[J]. *Cell Stem Cell*, 2008, 3(5):568-574.
- [13] Han D W, Greber B, Wu G, et al. Direct reprogramming of fibroblasts into epiblast stem cells[J]. *Nature cell biology*, 2011, 13(1):66-71.
- [14] Ruiz S, Panopoulos A D, Herreras A, et al. A High Proliferation Rate Is Required for Cell Reprogramming and Maintenance of Human Embryonic Stem Cell Identity[J]. *Curr Biol*, 2011, 21(1):45-52.
- [15] Kim K, Doi A, Wen B, et al. Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells[J]. *Nature*, 2010, 467(7313):285-290.
- [16] Polo J M, Liu S, Figueroa M E, et al. Cell type of origin influences the molecular and functional properties of mouse induced pluripotent stem cells[J]. *Nature biotechnology*, 2010, 28(8):848-855.
- [17] Aoi T, Yae K, Nakagawa M, et al. Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells[J]. *Science*, 2008, 321(5889):699-702.
- [18] Hanna J, Markoulaki S, Schorderet P, et al. Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency[J]. *Cell*, 2008, 133(2):250-264.
- [19] Tat P A, Sumer H, Jones K L, et al. The Efficient Generation of Induced Pluripotent Stem(Ips)Cells from Adult Mouse Adipose Tissue-Derived and Neural Stem Cells[J]. *Cell Transplant*, 2010, 19(5):525-536.
- [20] Stadtfeld M, Brennand K, Hochedlinger K. Reprogramming of pancreatic beta cells into induced pluripotent stem cells[J]. *Curr Biol*, 2008, 18(12):890-894.

- [21] Song B, Niclis J C, Alikhan M A, et al. Generation of Induced Pluripotent Stem Cells from Human Kidney Mesangial Cells[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2011, 22(7):1213-1220.
- [22] Trokovic R, Weltner J, Manninen T, et al. Small molecule inhibitors promote efficient generation of induced pluripotent stem cells from human skeletal myoblasts[J]. *Stem Cells Dev*, 2013, 22(1):114-123.
- [23] Takahashi C, Yoshida H, Komine A, et al. Newly Established Cell Lines from Mouse Oral Epithelium Regenerate Teeth When Combined with Dental Mesenchyme[J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2010, 46(5):457-468.
- [24] Silva J, Barrandon O, Nichols J, et al. Promotion of Reprogramming to Ground State Pluripotency by Signal Inhibition[J]. *PLoS Biol*, 2008, 6(10):e253.
- [25] Zhao H X, Li Y, Jin H F, et al. Rapid and Efficient Reprogramming of Human Amnion-Derived Cells into Pluripotency by Three Factors Oct4/Sox2/Nanog[J]. *Differentiation*, 2010, 80(2-3):123-129.
- [26] Aasen T, Raya A, Barrero M J, et al. Efficient and Rapid Generation of Induced Pluripotent Stem Cells from Human Keratinocytes[J]. *Nat Biotechnol*, 2008, 26(11):1276-1284.
- [27] Takahashi K, Okita K, Nakagawa M, et al. Induction of pluripotent stem cells from 59 fibroblast cultures[J]. *Nature Protoc*, 2007, 2(12):3081-3089.
- [28] Yu J, Vodyanik M A, Smuga-Otto K, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells[J]. *Science*, 2007, 318(5858): 1917-1920.
- [29] Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germLine-competent induced pluripotent stem cells[J]. *Nature*, 2007, 448(7151): 313-317.
- [30] Brambrink T, Foreman R, Welstead G G, et al. Sequential expression of pluripotency markers during direct reprogramming of mouse somatic cells[J]. *Cell Stem Cell*, 2008, 2(2): 151-159.
- [31] Maherali N, Ahfeldt T, Rigamonti A, et al. A high-efficiency system for the generation and study of human induced pluripotent stem cells[J]. *Cell Stem Cell*, 2008, 3(3): 340-345.

- [32] Hockemeyer D, Soldner F, Cook E G, et al. A drug-inducible system for direct reprogramming of human somatic cells to pluripotency[J]. *Cell Stem Cell*, 2008, 3(3): 346-353.
- [33] Carey B W, Markoulaki S, Hanna J, et al. Reprogramming of murine and human somatic cells using a single polycistronic vector[J]. *PNAS*, 2009, 106(1): 157-162.
- [34] Wu X, Li Y, Crise B, et al. Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration[J]. *Science* 2003; 300(5626): 1749-1751.
- [35] Hotta A, Ellis J. Retroviral vector silencing during iPS cell induction: An epigenetic beacon that signals distinct pluripotent states[J]. *J Cell Biochem* 2008; 105(4): 940-948.
- [36] Zhou W, Freed CR. Adenoviral Gene Delivery Can Reprogram Human Fibroblasts to Induced Pluripotent Stem Cells[J]. *Stem Cells*, 2009, 27(11):2667-2674.
- [37] Stadtfeld M, Nagaya M, Utikal J, et al. Induced pluripotent stem cells generated without viral integration[J]. *Science*, 2008, 322(5903): 945-949.
- [38] Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, et al. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors[J]. *Science*, 2008, 322(5903): 949-953.
- [39] Rodríguez-Pizà I, Richaud-Patin Y, Vassena R, et al. Reprogramming of human fibroblasts to induced pluripotent stem cells under xeno-free conditions. *Stem Cells*, 2010, 28(1):36-44.
- [40] Sommler CA, Stadtfeld M, Murphy G J, et al. Induced pluripotent stem cell generation using a single lentiviral stem cell cassette[J]. *Stem Cells*, 2009, 27(3): 543-549.
- [41] Kaji K, Norrby K, Paca A, et al. Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors[J]. *Nature*, 2009, 458(7239): 771-775.

- [42] Woltjen K, Michael I P, Mohseni P, et al. piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells[J]. *Nature*, 2009, 458(7239): 766-770.
- [43] Yusa K, Rad R, Takeda J, et al. Generation of transgene-free induced pluripotent mouse stem cells by the piggyBac transposon. *Nat Methods*, 2009, 6(5):363-369.
- [44] Okita K, Hong H, Takahashi K, et al. Generation of mouse-induced pluripotent stem cells with plasmid vectors[J]. *Nature Protoc*, 2010, 5(3):418-428.
- [45] Yu J, Hu K, Smuga-Otto K, et al. Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences[J]. *Science*, 2009, 324(5928): 797-801.
- [46] Kim D H, Kim C H, Moon J I, et al. Generation of Human Induced Pluripotent Stem Cells by Direct Delivery of Reprogramming Proteins[J]. *Cell Stem Cell*, 2009, 4(6):472-476.
- [47] Zhou H, Wu S, Joo J Y, et al. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins[J]. *Cell Stem Cell*, 2009, 4(5): 381-384.
- [48] Cho H J, Lee C S, Kwon Y W, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult somatic cells by protein-based reprogramming without genetic manipulation[J]. *Blood*, 2010, 116(3): 386-395.
- [49] Warren L, Manos P D, Ahfeldt T, et al. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA[J]. *Cell Stem Cell*, 2010, 7(5): 618-630.
- [50] Anokye-Danso F, Trivedi CM, Juhr D, et al. Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency[J]. *Cell Stem Cell*, 2011, 8(4): 376-388.
- [51] Subramanyam D, Lamouille S, Judson R L, et al. Multiple targets of miR-302 and miR-372 promote reprogramming of human fibroblasts to induced pluripotent stem cells[J]. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(5):443-448.
- [52] Li Z, Yang C S, Nakashima K, et al. Small RNA-mediated regulation of iPSC generation[J]. *EMBO J*, 2011, 30(5): 823-834.

- [53] Kim J B, Sebastiano V, Wu G, et al. Oct4-induced pluripotency in adult neural stem cells[J]. *Cell*, 2009, 136(3):411-419.
- [54] Huangfu D, Osafune K, Maehr R, et al. Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2[J]. *Nat Biotechnol*, 2008, 26(11):1269-1275.
- [55] Mikkelsen T S, Hanna J, Zhang X, et al. Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis[J]. *Nature*, 2008, (7200): 49-55.
- [56] Shi Y, Do J T, Despons C, et al. A combined chemical and genetic approach for the generation of induced pluripotent stem cells[J]. *Cell Stem Cell*, 2008, 2(6): 525-528.
- [57] Singhal N, Graumann J, Wu G, et al. Chromatin-remodeling components of the BAF complex facilitate reprogramming[J]. *Cell*, 2010, 141(6): 943-955.
- [58] Wang Q, Xu X, Li J, et al. Lithium, an anti-psychotic drug, greatly enhances the generation of induced pluripotent stem cells[J]. *Cell Res*, 2011, 21(10): 1424-1435.
- [59] Marson A, Foreman R, Chevalier B, et al. Wnt signaling promotes reprogramming of somatic cells to pluripotency[J]. *Cell Stem Cell*, 2008, 3(2): 132-135.
- [60] Li W, Wei W, Zhu S, et al. Generation of rat and human induced pluripotent stem cells by combining genetic reprogramming and chemical inhibitors[J]. *Cell Stem Cell*, 2009, 4(1): 16-19.
- [61] Zhu S, Li W, Zhou H, et al. Reprogramming of human primary somatic cells by OCT4 and chemical compounds[J]. *Cell Stem Cell*, 2010, 7(6):651-655.
- [62] Maherali N, K Hochedlinger. Tgfbeta signal inhibition cooperates in the induction of iPSCs and replaces Sox2 and cMyc[J]. *Curr Biol*, 2009, 19(20):1718-1723.
- [63] Ichida J K, Blanchard J, Lam K, et al. A small-molecule inhibitor of TGF- β signaling replaces Sox2 in reprogramming by inducing Nanog[J]. *Cell Stem Cell*, 2009, 5(5): 491-503.

- [64] Lin T X, Ambasudhan R, Yuan X, et al. A chemical platform for improved induction of human iPSCs[J]. *Nature Methods*, 2009,6(11): 805-808.
- [65] Li Y, Zhang Q, Yin X, et al. Generation of iPSCs from mouse fibroblasts with a single gene, Oct4, and small molecules[J]. *Cell Res*, 2010, 21(1):196-204.
- [66] Esteban M A, Wang T, Qin B, et al. Vitamin C enhances the generation of mouse and human induced pluripotent stem cells[J]. *Cell Stem Cell*, 2009, 6(1): 71-79.
- [67] Yoshida Y, Takahashi K, Okita K, et al. Hypoxia enhances the generation of induced pluripotent stem cells[J]. *Cell Stem Cell*, 2009, 5(3): 237-241.
- [68] Judson R L, Babiarz J E, Venero M, et al. Embryonic stem cell-specific microRNAs promote induced pluripotency[J]. *Nat Biotechnol*, 2009, 27(5):459-561.
- [69] Melton C, Judson R L, Blalock R. Opposing microRNA families regulate self-renewal in mouse embryonic stem cells[J]. *Nature*, 2010, 463:621-626.
- [70] Chou B K, Mali P, Huang X, et al. Efficient human iPS cell derivation by a non-integrating plasmid from blood cells with unique epigenetic and gene expression signatures[J]. *Cell Res*, 2011, 21(3): 518-529.
- [71] Hong H, Takahashi K, Ichisaka T, et al. Suppression of induced pluripotent stem cell generation by the p53-p21 pathway[J]. *Nature*, 2009, 460(7259): 1132-1135.
- [72] Lower S, Cabili N M, Guttman M, et al. Large intergenic non-coding RNA-RoR modulates reprogramming of human induced pluripotent stem cells[J]. *Nature Genetics*, 2010, 42(12): 1113-1117.
- [73] Li C, Zhou J, Shi G, et al. Pluripotency can be rapidly and efficiently induced in human amniotic fluid-derived cells[J]. *Human Molecular Genetics*, 2009, 18(22): 4340-4349.
- [74] Miura K, Okada Y, Aoi T, et al. Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines[J]. *Nat Biotechnol*, 2009, 27(8): 743-745.

- [75] Tsuji O, Miura K, Okada Y, et al. Therapeutic potential of appropriately evaluated safe-induced pluripotent stem cells for spinal cord injury Proc[J]. Natl Acad Sci USA, 2010, 107(28): 12704-12709.
- [76] Ghosh Z, Wilson K D, Wu Y, et al. Persistent donor cell gene expression among human induced pluripotent stem cells contributes to differences with human embryonic stem cells[J]. PLoS One, 2010, 5(2): e8975.
- [77] Byers B, Lee H, Reijo Pera R. Modeling Parkinson's disease using induced pluripotent stem cells[J]. Curr Neurol Neurosci Rep, 2012, 12(3): 237-242.
- [78] Seibler P, Graziotto J, Jeong H, et al. Mitochondrial Parkin recruitment is impaired in neurons derived from mutant PINK1 induced pluripotent stem cells[J]. J Neurosci, 2011, 31(16): 5970-5976.
- [79] Nguyen H N, Byers B, Cord B, et al. LRRK2 mutant iPSC-derived DA neurons demonstrate increased susceptibility to oxidative stress[J]. Cell Stem Cell, 2011, 8(3): 267-280.
- [80] Liu GH, Qu J, Suzuki K, et al. Progressive degeneration of human neural stem cells caused by pathogenic LRRK2[J]. Nature, 2012, 491(7425): 603-607.
- [81] Corti S, Nizzardo M, Simone C, et al. Genetic correction of human induced pluripotent stem cells from patients with spinal muscular atrophy[J]. Sci Transl Med, 2012, 4(165): 165ra162.
- [82] Mitne-Neto M, Machado-Costa M, Marchetto MC, et al. Downregulation of VAPB expression in motor neurons derived from induced pluripotent stem cells of ALS8 patients[J]. Hum Mol Genet, 2011, 20(18): 3642-3652.
- [83] Egawa N, Kitaoka S, Tsukita K, et al. Drug screening for ALS using patient-specific induced pluripotent stem cells[J]. Sci Transl Med, 2012, 4(145): 145ra104.
- [84] Farra N, Zhang W B, Pasceri P, et al. Rett syndrome induced pluripotent stem cell-derived neurons reveal novel neurophysiological alterations[J]. Mol Psychiatry, 2012, 17(12): 1261-1271.

- [85] Ananiev G, Williams E C, Li H, et al. Isogenic pairs of wild type and mutant induced pluripotent stem cell (iPSC) lines from Rett syndrome patients as in vitro disease model[J]. PLoS One, 2011, 6(9): e25255.
- [86] Wang T, Bray SM, Warren ST. Perspectives on the biology of fragile X syndrome[J]. Curr Opin Genet Dev, 2012, 22(3): 256-263.
- [87] Liu J, Koscielska K A, Cao Z, et al. Signaling defects in iPSC-derived fragile X premutation neurons[J]. Hum Mol Genet, 2012, 21(17): 3795-3805.
- [88] Seki T, Yuasa S, Oda M, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from human terminally differentiated circulating T cells[J]. Cell Stem Cell, 2010, 7(1): 11-14.
- [89] Staerk J, Dawlaty M M, Gao Q, et al. Reprogramming of human peripheral blood cells to induced pluripotent stem cells[J]. Cell Stem Cell, 2010, 7(1): 20-24.
- [90] Brown M E, Rondon E, Rajesh D, et al. Derivation of induced pluripotent stem cells from human peripheral blood T lymphocytes[J]. PLoS Biol, 2010, 5(6) : e11373.
- [91] (美)J. 萨姆布鲁克, (美)D. W. 拉塞尔著, 黄培堂等译. 分子克隆实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 1286-1287.
- [92] 张怡, 赵连三, 汪成孝, 等. 人胚胎成纤维细胞与小鼠胚胎成纤维细胞生物学特性比较[J]. 生物医学工程学杂志, 2003, 20 (2) : 251-254.
- [93] 王英, 何津, 李玉林. 人胚胎成纤维细胞的分离、培养和鉴定及人胚胎生殖细胞体外生长所需细胞因子的表达[J]. 吉林大学学报(医学版), 2007, 33 (2) : 245-248.
- [94] 刘柳, 李武德, 蔡国斌. 人胚胎成纤维细胞作为组织工程皮肤种子细胞的可行性研究[J]. 中国美容医学, 2011, 20 (4) : 605-608.
- [95] 刘民, 李柏青. 小鼠胚胎成纤维细胞的分离、扩增和抑制[J]. 中国实验动物学杂志, 2002, 12 (4) : 215-219.
- [96] 张怡, 赵连三, 汪成孝, 等. 小鼠胚胎成纤维细胞的分离和培养[J]. 四川大学学报(医学版), 2003, 34 (2) : 344-346.

- [97]王孟丽. Oct4、Sox2、c-Myc、Klf4-慢病毒载体构建与包装及感染人皮肤成纤维细胞的实验研究[D]. 福建福州: 福建医科大学, 2010 届硕士学位论文.
- [98]R. I. 弗雷谢尼等著, 章静波等译. 人干细胞培养[M]. 北京: 科学出版社, 2009.
- [99]熊吉信, 刘小春, 杨春江, 等. 小鼠胚胎干细胞饲养层的制备及两种不同饲养层的比较[J]. 江西医学院学报, 2006, 46 (4) : 5-8.
- [100]Masurier C, Boutin S, Veron P, et al. Enhanced lentiviral transduction of monocyte-derived dendritic cells in the presence of conditioned medium from dying monocytes[J]. Hum Gene Ther, 2007, 18(2): 161-170.

附录A 主要仪器设备

HH - 8型数显恒温水浴锅	国华电器有限公司
MP6001电子天平	上海精密科学仪器有限公司
TGL - 16GB台式高速离心机	上海安亭科学仪器厂
ZRD - 5110型电热恒温鼓风干燥箱	上海智城分析仪器制造有限公司
CX - 250型超声波清洗机	北京市医疗设备二厂
Purelab ulfra 超纯水制备系统	ELGA
CH20BIMF200生物显微镜	Olympus optical co.LTD.JAPAN
Galaxy S CO2 培养箱	RS BIOTECH 公司
XD - 203倒置显微镜	南京江南新光学有限公司
CO2 Heated Reducer	青岛中力仪器仪表有限公司
XK02 - 2010025型液氮生物容器	四川亚西橡塑机器有限公司
核酸定量仪ND - 100	基因公司
Synergy HT型酶标仪	BioTek
SW - CJ - 2FD型超净工作台	苏净集团苏州泰安空气技术有限公司
BCD - 216F TB 型海尔冰箱	青岛海尔股份有限公司
YX - 280D + 型手提式压力蒸汽式灭菌锅	合肥华泰医疗设备有限公司
YP502型电子天平	上海精密科学仪器有限公司
DNP - 9272BS - III电热恒温培养箱	上海新苗医疗器械制造有限公司
TG16 - W微量高速离心机	长沙湘仪离心机仪有限公司
H1650 - W大容量低速离心机	长沙湘仪离心机仪有限公司

XW -80A旋涡混合器	上海精科实业有限公司
WP700型微波炉	顺德市格兰仕电器实业有限公司
HZQ -C空气振荡器	哈尔滨市东明医疗仪器厂
AE30/31+ 倒置荧光显微镜	MOTIC CHINA GROUP CO.LTD
所有细胞培养耗材	CORNING
DHG -9123A型电热恒温鼓风干燥箱	上海一恒科技有限公司
血球计数板	上海市求精生化仪器有限公司
移液器	芬兰大龙
离心管、移液枪头等耗材	江苏海门
0.25cm滤器、0.22 μ m、0.45 μ m滤膜	上海兴亚净化设备有限公司
PB -10酸度计	Satorious
其他玻璃器皿	四川蜀牛

在学研究成果

一、 在学期间发表的论文

- [1] 李佳佳, **程腾**, 贺小英, 等. 二甲基亚砷和胎牛血清对 293T 细胞冷冻效果的影响[J]. 信阳师范学院学报(自然科学版), 2013, 26(2): 217-220. (核心期刊)
- [2] **程腾**, 李佳佳, 贺小英, 等. 培养方法及胎牛血清浓度对人胎儿成纤维细胞体外生长的影响(自然科学版)[J]. 信阳师范学院学报, 2013, 26(4): 523-526. (核心期刊)
- [3] **程腾**, 贺小英, 马利兵. 诱导性多潜能干细胞研究进展[J]. 湖北农业科学, 2014, 53(5): 993-997. (核心期刊)
- [4] **程腾**, 李佳佳, 贺小英, 等. 磷酸钙转染方法的优化[J]. 内蒙古师范大学学报(自然科学版)(核心期刊, 已录用, 将于 2014 年发表)
- [5] Ma LiBing, He XiaoYing, Wang FengMei, **Cheng Teng**, Liu XiYu. Somatic cell reprogrammed by oocyte: process and barricade. Animal Cells and Systems (SCI 期刊, 已录用, 待发表).
- [6] Ma Li-Bing, He Xiao-Ying, Wang Feng-Mei, Cao Jun-Wei, **Cheng Teng**. The development in vitro and expression of pluripotency genes of intra- and interspecies cloned embryos. Zygote, (SCI 期刊, 已录用, 待发表).

致 谢

岁月如梭，转眼之间，在内科大已经过了三个春秋。三年研究生的学习和生活是我人生最珍贵的一段经历，虽然在实验研究期间遇到了各种问题，但是在身边各位老师和朋友的教导和帮助下，我克服了种种困难，在即将毕业之际，我要向这些帮助与支持我的人表示衷心的感谢。

首先，我要感谢我的导师马利兵教授，三年来，导师给予了极大的关心与鼓励，恩师严谨的治学态度，敏捷的科研思路、渊博的知识，宽广的胸襟，良好的大局观，崇高的师德，强烈的责任感和敬业精神是我一生学习的榜样。在恩师的教导下，我才得以迅速成长，在此，谨向我的导师致以崇高敬意和衷心感谢！！

同时感谢贺小英老师在实验中给予的众多宝贵建议和帮助，使我的实验和论文能够顺利地完成。同时也感谢李佳佳师兄、刘希宇师弟、刘娟师妹、吴飞同学、贺海鹏同学、朱佳莉同学对我的帮助，他们在实验过程中给予了大力支持和帮助，在此深表谢意。

本论文获得国家自然科学基金项目：“绵羊卵母细胞对体细胞再程序化机理的研究”（项目编号：31160245），内蒙古自治区高等学校青年科技英才支持计划的资助，在此一并表示感谢。