

# 利用第二型腺病毒伴隨病毒載體轉染建立攜有綠螢光蛋白質與新黴素耐受基因之小鼠胎體成纖維細胞株<sup>(1)</sup>

楊鎮榮<sup>(2)</sup> 廖家信<sup>(3)</sup> 薛佑玲<sup>(4)</sup> 陳立人<sup>(2)(5)</sup>

收件日期：95 年 9 月 15 日；接受日期：95 年 12 月 2 日

## 摘要

本研究之目的係利用第二型腺病毒伴隨病毒載體 (adeno-associated viral vector type 2, AAV2) 進行 STO 小鼠胎體成纖維細胞 (STO mouse embryonic fibroblast) 進行基因轉殖，期建立攜有外源綠螢光 (green fluorescent protein, GFP) 基因及新黴素耐受基因 (neomycin resistant gene, Neo<sup>r</sup>) 之 STO 小鼠胎體成纖維細胞株，以做為豬胚幹細胞之供養層細胞。試驗結果顯示，利用 G418 進行 STO 細胞之篩選試驗，其最適篩選濃度為 400  $\mu$ g/ml，其篩選 7 天後的死亡率為 41.8  $\pm$  11.6%。利用 AAV2 載體轉染 STO 小鼠胎體成纖維細胞後，轉染率可達 50.9  $\pm$  17.1%，利用於培養液中添加 400  $\mu$ g/ml 的 G418 進行轉染後篩選，經過 4 次之繼代篩選後，純度達 70.2  $\pm$  12.0%，再配合以流式細胞分析法 (flow cytometry) 進行 GFP 表現陽性 (GFP<sup>+</sup>) 細胞分離，分離後之 STO/GFP<sup>+</sup> 小鼠胎體成纖維細胞之純度可達 93.6  $\pm$  2.8%。且經過轉染後的 STO/GFP<sup>+</sup> 細胞株，用於培養豬胚幹細胞，能維持幹細胞群落之未分化狀態，顯示本 STO/GFP<sup>+</sup> 細胞株可做為豬胚幹細胞之供養層細胞。並且，因為本 STO/GFP<sup>+</sup> 細胞株攜有外源性 GFP 報導基因及 Neo<sup>r</sup> 基因，未來可作為豬與其他物種的胚幹細胞進行基因轉殖試驗後，以 neomycin 篩選時之供養層細胞，為胚幹細胞之基因轉殖試驗提供有價值的應用基礎。

關鍵詞：第二型腺病毒伴隨病毒載體、綠色螢光蛋白質、新黴素耐受基因、STO 小鼠胎體成纖維細胞。

---

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 1349 號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所生理組。

(3) 財團法人佛教慈濟綜合醫院神經醫學科學中心。

(4) 國立中山大學生物醫學研究所。

(5) 通訊作者，E-mail: lrchen@mail.tlri.gov.tw。

## 緒言

哺乳動物的胚幹細胞 (embryonic stem cells, ESCs) 為具有長期增殖能力, 以及能夠進一步分化成為組成身體各種組織、具有特異型態與特定生理功能的成體細胞之細胞 (Evans and Kaufman, 1981; Martin, 1981; Thomson *et al.*, 1998; Reubinoff *et al.*, 2000)。由於胚幹細胞具多能性分化能力 (pluripotency), 因此利用胚幹細胞配合組織工程的發展, 用來修復損害的成體細胞、組織或甚至器官, 使之重建或回復正常的功能, 乃為再生醫學、癌症醫學、醫療性復殖等研究領域的重點課題 (Bjorklund and Lindvall, 2000)。

哺乳動物胚幹細胞與生殖幹細胞 (embryonic germ cells, EGCs) 之體外培養系統中, 除了小部分的小鼠與人類胚幹細胞株外, 常必須使用供養層細胞 (feeder layer cells) 進行共培養。作為供養層之細胞除了提供胚幹細胞關鍵性的生長因子與細胞激素, 並移除培養過程中所產生的有害物質外, 其最重要的功用為透過細胞接觸 (cell-contact mediated) 的機制, 維持胚幹細胞的未分化狀態 (Laslett *et al.*, 2003)。常用的供養層細胞為初級培養的小鼠胎體成纖維細胞 (primary mouse embryonic fibroblasts, PMEFs), 然而 PMEFs 係分離自小鼠之胎兒, 分離取得手續較為繁複且繼代次數有限, 且在繼代培養過程中會喪失維持幹細胞增生的能力 (Park *et al.*, 2003), 因此, 在許多培養人類、小鼠與豬的 EGCs 和 ESCs 的研究, 都改用株化的 STO 小鼠胎體成纖維細胞 (STO 細胞) 作為供養層細胞之來源。STO 細胞係衍生自 SIM 品系小鼠之胎體成纖維細胞, STO 細胞對於 6-thioguanine 與 ouabain 具有抗性, 且對於 HPRT (hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase) 與 HAT (hypoxanthine, aminoperin, and thymidine) 具有敏感性, 經常被用作於培養畸胎瘤細胞 (teratocarcinoma cells)、融合瘤細胞 (hybridomas)、ESCs 與 EGCs (Martin and Evans, 1975; Martin *et al.*, 1977; Shim *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1999; Shambloot *et al.*, 2001; Talbot *et al.*, 2002)。許多學者利用二維電泳法 (two-dimensional electrophoresis) 與質譜儀 (mass spectrometry) 技術, 探討 STO 細胞之細胞培養液的蛋白質體學 (proteomics)。在 Lim and Bodnar (2002) 的研究結果中, 發現於經 STO 細胞條件化的培養液 (conditioned medium) 中, 有 136 種獨特的蛋白質分子, 具參與細胞生長、調控細胞分化與細胞外基質形成等作用; 而 Shi *et al.* (2005) 亦在經 STO 細胞條件化的培養液中, 發現有包括細胞外基質、攜鐵蛋白與分泌蛋白等 13 種獨特的蛋白質, 其分子量在 20 至 70KD、等電點在 4 至 8 之間。這些在供養層細胞條件化培養液中發現之蛋白質, 顯示 STO 細胞對於幹細胞之維持、生長與分化控制有很重要的影響 (Amano *et al.*, 2006)。

因鑑於供養層細胞對於幹細胞培養之重要性, 本試驗期能藉由外源基因轉殖之操作, 建立攜外源綠螢光蛋白質 (green fluorescent protein, GFP) 基因及新黴素耐受基因 (Neo<sup>r</sup>) 之 STO/GFP<sup>+</sup> 細胞株, 以做為未來胚幹細胞轉染試驗後, 進行新黴素耐受篩選時所需之供養層細胞。

## 材料與方法

### I. STO 細胞之培養與繼代

STO 細胞係購自食品工業研究所菌種中心編號 60003 之細胞株 (ATCC CRL-1503, USA)。培養方式係以培養液為 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM, high glucose and no pyruvate, Invitrogen, Grand Island, NY, USA) 添加 4.5 g/L 之葡萄糖 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 與 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS, Invitrogen), 培養條件為 37°C、5% CO<sub>2</sub> 以及相對濕度 95%, 每週更換培養液 2 至 3 次。繼代培養為先移除培養液後, 再以磷酸鹽緩衝溶液 (phosphate buffered saline, PBS,

Sigma-Aldrich) 洗滌細胞 1 至 2 次後，加入 0.25% 胰蛋白酶 -0.02 mM EDTA (trypsin- EDTA, Invitrogen) 溶液，使其能浸潤所有細胞後，於 37°C 下作用 3 至 5 分鐘，輕拍培養皿使細胞自培養皿底部脫落，再以新鮮的培養液重新懸浮，並以  $400 \times g$  離心 5 分鐘去除懸浮液後，調整細胞濃度至  $1 \times 10^5$  個 /ml 進行繼代培養。

## II. STO 細胞對 G418 之耐受試驗

STO 細胞對 G418 sulfate (G418, InvivoGen, San Diego, CA, USA) 之耐受試驗，係於依據 InvivoGen 建議之步驟進行，於上述之 STO 細胞培養液中分別添加 100、200、400、800 或 1000  $\mu g/ml$  的 G418，進行為期 7 天培養之耐受試驗。試驗期間每隔 2 天更新培養液並維持 G418 之濃度，並於培養之第 1、3、5 與 7 天觀察細胞型態之變化，記錄其死亡率，以決定利用 G418 篩選 STO 細胞時最適之使用濃度。

## III. STO 細胞之轉染與篩選試驗

試驗係參照 Nicklin *et al.* (2001) 所敘之方法，以第二型腺病毒伴隨病毒載體 (Adeno-associated viral vector, AAV2) 進行 STO 細胞之轉染試驗。轉染方法如下：將 STO 細胞繼代培養在 24 孔細胞培養盤中，將構築綠螢光蛋白質報導基因 (GFP reporter gene) 及新黴素耐受基因 (Neo<sup>r</sup>) 之 pLEGFP-N1 載體 (Clontech 632343, Palo Alto, CA, USA) 與 AAV2 共培養，以進行 STO 細胞之轉染。共培養後 48 小時後，經轉染之 STO 細胞於上述培養系統下進行培養，並於培養液中添加最適濃度之 G418 進行篩選，篩選過程中每隔 2 天更新培養液，且約每週繼代一次。篩選期間於螢光顯微鏡下觀察其 GFP 螢光表現，以計算轉染率。轉染後之 STO 細胞歷經數代之培養、繼代與 G418 篩選，以擴增攜有 GFP 基因之 STO 細胞數量，再配合使用流式細胞儀 (Cytometer, FACSVantage SE, BD Biosciences, USA) 分離篩檢表現 GFP 之 STO 細胞，以加速篩選效率。

## IV. 轉染後之 STO 細胞供養豬胚幹細胞試驗

本試驗所使用的豬胚幹細胞，乃係衍生自畜試黑豬一號之囊胚內細胞群的 M215-3 細胞株。豬胚幹細胞的體外培養係參照 Chen *et al.* (1991, 1999) 之方法，將轉染後帶有 GFP 與 Neo<sup>r</sup> 基因之 STO 細胞，經以絲裂黴素 -C (mitomycin-C, Sigma-Aldrich) 去活化處理後製備成為供養層，並培養於豬胚幹細胞培養液 (ES-cell culture medium, ESM) 中，以進行後續之豬胚幹細胞體外培養試驗。

ESM 之組成為 DMEM 添加 1 mM L-glutamine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 0.1 mM  $\beta$ -2-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich)、10 mM MEM non-essential amino acids (Sigma-Aldrich)、0.03 mM adenosine (Sigma-Aldrich)、0.03 mM guanosine (Sigma-Aldrich)、0.03 mM cytidine (Sigma-Aldrich)、0.03 mM uridine (Sigma-Aldrich)、0.01 mM thymidine (Sigma-Aldrich)、antibiotics (50 units/ml penicillin G and 50  $\mu g/ml$  streptomycin sulfate, Invitrogen) 與 16% FBS。體外培養過程中觀察帶有 GFP 與 Neo<sup>r</sup> 之 STO 細胞是否仍可支持豬胚幹細胞之未分化之群落型態。

# 結果與討論

## I. STO 細胞對 G418 之耐受試驗

G418 是係由 *Micromonospora rhodorangea* 所產生的氨基糖類 (aminoglycoside) 抗生素，在基因轉移、基因剔除、抗性篩選以及轉基因動物試驗中常被用作抗性篩選，其通過 transposon Tn5 基

因對原核和真核等細胞產生毒素，阻斷 80S 核糖體在 polypeptide 合成過程中的加長步驟 (elongation step)，進而抑制原核細胞與真核細胞的蛋白質轉譯作用 (translation)，使得細胞生長受到抑制 (Bar-Nun *et al.*, 1983)。因此 G418 常於細胞轉染試驗中，用作篩選不帶有 Neor<sup>r</sup> 基因之轉染後細胞，以提升成功轉染之比例。依據 Davies and Jimenez (1980) 之試驗與 InvivoGen 轉染手冊之建議，過程進行為期 7 天耐受試驗，並於培養後第 7 天觀察細胞型態之變化與存活率，選用存活率接近 50% 之結果為最適濃度。本試驗以 100、200、400、800 與 1000  $\mu$ g/ml 的 G418 添加於培養液中，進行為期 7 天耐受試驗後，觀察 STO 細胞隨著培養液中 G418 濃度增加，產生細胞偽足的收縮與細胞膜的完整性破壞等型態上的變化，同時，培養液中發現許多懸浮的細胞碎片 (圖 1)。體外培養第 7 天

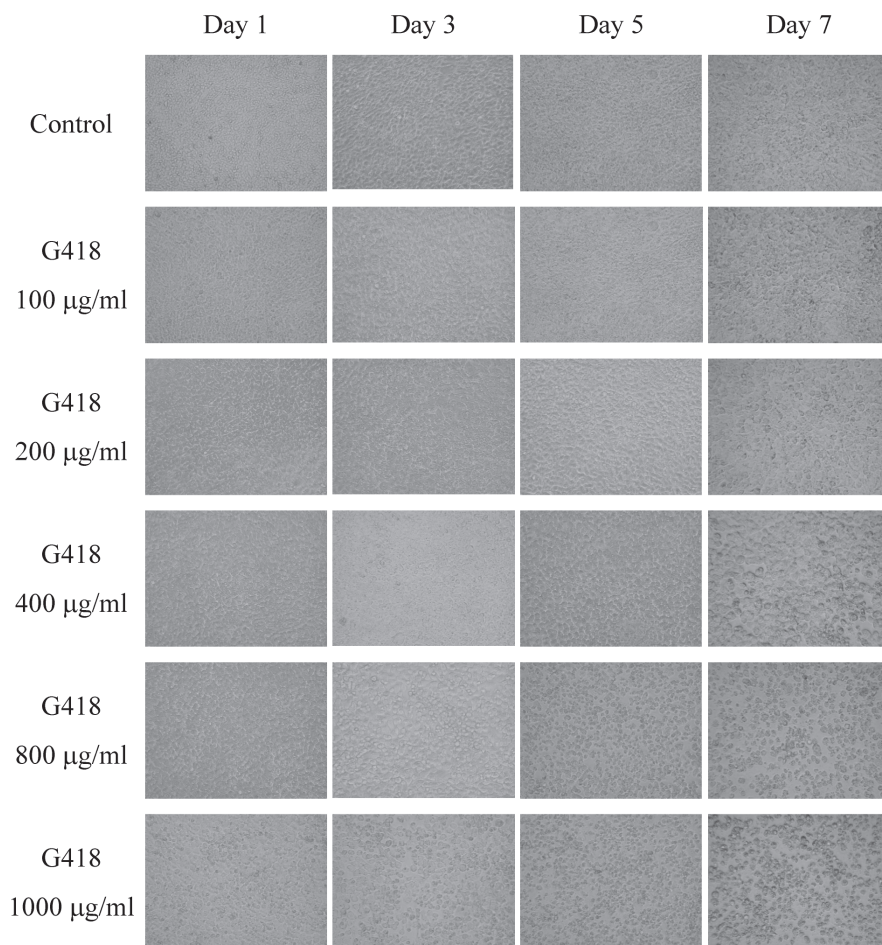


圖 1. 培養液中添加不同濃度之 G418 對小鼠胎體成纖維細胞 (STO) 細胞生長與型態之影響。當培養液中 G418 濃度增加，小鼠胎體成纖維細胞產生偽足收縮與細胞膜完整性破壞等型態上變化，且培養液中可發現許多懸浮的細胞碎片。

Fig. 1. The effects of different concentration of G418 in culture medium on the proliferation and morphology of STO mouse embryonic fibroblast. The level of cell shrinking, membrane damage, and detachment of STO cells were increased along with the increment of G418 concentration in the culture medium.

時，對照組之 STO 細胞僅呈現  $1.0 \pm 0.0\%$  的死亡率，然而在處理組添加 100、200、400、800 與 1000  $\mu\text{g/ml}$  不同濃度之 G418 時，其 STO 細胞之死亡率則分別為  $12.9 \pm 0.8\%$ 、 $21.9 \pm 3.5\%$ 、 $41.8 \pm 11.6\%$ 、 $85.6 \pm 19.6\%$  與  $88.9 \pm 18.5\%$ （表 1）。結果顯示高濃度（800 與 1000  $\mu\text{g/ml}$ ）的 G418 因殺滅太多的 STO 細胞，將造成無論是否帶有 Neo<sup>r</sup> 基因之 STO 細胞均因耐受力不足而死亡；而低濃度（100 與 200  $\mu\text{g/ml}$ ）者則因篩選效率不佳，不利於轉染後之篩選操作。因此，在後續的篩選試驗中選用的 G418 添加濃度為 400  $\mu\text{g/ml}$  為篩選之最適濃度。

## II. 建立攜有 GFP 與 Neo<sup>r</sup> 基因之 STO 細胞株

病毒媒介轉染法（virus-mediated transfection）是常見的基因轉殖方法之一，其所使用的病毒載體包括有反轉錄病毒載體（retroviral vector）（Robertson *et al.*, 1986）、腺病毒載體（adenoviral vector）（Smith-Arica *et al.*, 2003）或緩慢病毒載體（lentiviral vector）（Pfeifer *et al.*, 2002）。然而反轉錄病毒會引起外遺傳修飾（epigenetic modification）造成轉染後的基因僅短暫表現（Chan *et al.*, 1998），而腺病毒的高度產生免疫性（highly immunogenic）使得轉染後的基因表現不甚穩定（Yang *et al.*, 1994），緩慢病毒對於哺乳動物細胞的轉染效率目前仍未有定論（Wolfgang *et al.*, 2001），因此腺病毒伴隨病毒載體（adeno-associated viral vector, AAV）的高轉染效率、敏感性，安全性與趨性修飾（tropism modification）（Nicklin *et al.*, 2001），為哺乳動物細胞進行基因轉殖時常用之病毒載體。AAV 在轉染時會固定嵌入人類第 19 對染色體之特定位置（Kotin *et al.*, 1990；Samulski *et al.*, 1991），曾被用於人類基因治療時之病毒載體（Xie *et al.*, 2002；Manno *et al.*, 2003）。AAV 具有多種不同的血清型（serotype）如 AAV2、AAV4 與 AAV5 等（Davidson *et al.*, 2000），其中 AAV2 具有最佳基因轉染

表 1. 小鼠胎體成纖維細胞培養於不同濃度之 G418 篩選培養液培養七天後的死亡率

Table 1. The mortality (%) of STO mouse embryonic fibroblast after 7 days of selection culture in medium containing different concentration of G418

Items	Mortality (%) after G418 treatment			
	Day 1	Day 3	Day 5	Day 7
Control	0	0	$1.0 \pm 0.0^*$	$1.0 \pm 0.0$
G418 100 $\mu\text{g/ml}$	0	$5.1 \pm 0.1$	$12.3 \pm 0.6$	$12.9 \pm 0.8$
G418 200 $\mu\text{g/ml}$	0	$9.7 \pm 0.3$	$15.3 \pm 1.9$	$21.9 \pm 3.5$
G418 400 $\mu\text{g/ml}$	0	$10.0 \pm 0.1$	$22.5 \pm 4.9$	$41.8 \pm 11.6$
G418 800 $\mu\text{g/ml}$	$4.6 \pm 0.2$	$19.5 \pm 1.0$	$45.5 \pm 10.1$	$85.6 \pm 19.6$
G418 1000 $\mu\text{g/ml}$	$8.9 \pm 1.2$	$32.6 \pm 4.3$	$52.9 \pm 12.9$	$88.9 \pm 18.5$

\* Mean  $\pm$  SD, n=5.



效率與安全性，目前已運用於人類醫學之臨床治療上（Moss *et al.*, 2004；Maheshri *et al.*, 2006）。本試驗利用 AAV2 載體轉染 STO 細胞，經轉染 48 小時後於螢光顯微鏡下觀察，結果顯示經轉染後表現綠螢光之 STO 細胞的比率（即其轉染率）為  $50.9 \pm 17.1\%$ 。依上述試驗所得之 G418 最適篩選濃度（ $400 \mu\text{g/ml}$ ）進行抗 neomycin 之篩選。經篩選培養第二繼代之 STO 細胞中，可表現 GFP 的細胞佔  $66.6 \pm 19.3\%$ ，持續篩選至第四繼代時，有  $70.2 \pm 12.0\%$  的 STO 細胞可表現 GFP。此等細胞經以流式細胞儀進行 GFP 表現陽性細胞之分離篩選，經篩選後表現 GFP 的 STO 細胞之比例高達  $93.6 \pm 2.8\%$ （圖 2）。因本研究所獲致的轉基因 STO 細胞攜有 Neo<sup>r</sup> 之外源性基因，可應用於利用抗 neomycin 篩選的策略，對豬以及其他物種的胚幹細胞進行基因轉殖操作後，可做為後續進行篩選培養之供養層細胞來源。

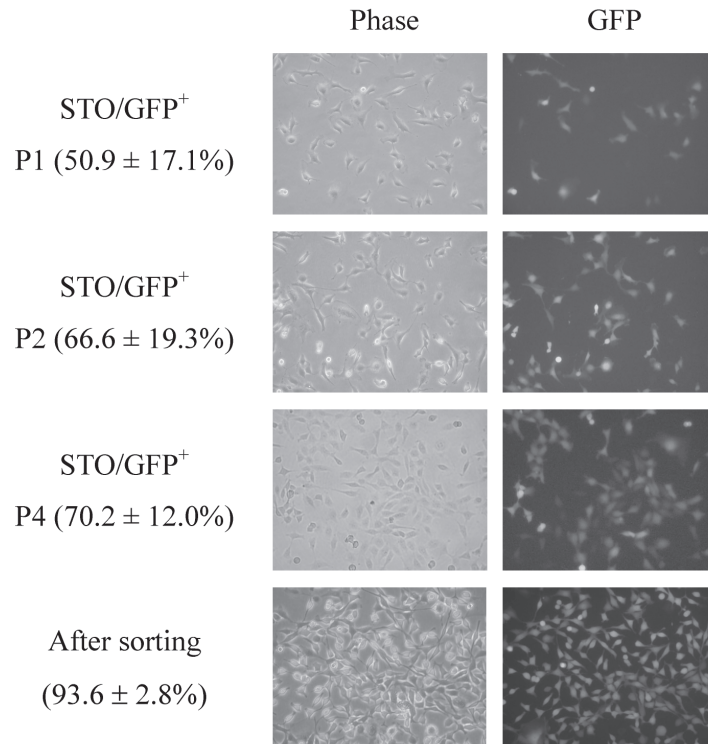


圖 2. 以第二型腺病毒伴隨病毒載體（AAV2）轉染小鼠胎體成纖維細胞（STO）經抗新黴素篩選與經流式細胞儀篩檢對其綠螢光基因表現之影響。以 AAV2 轉染後，STO 細胞表現綠螢光蛋白（STO/GFP<sup>+</sup>）的比例為  $50.9 \pm 17.1\%$ 。經 G418 篩選後，STO/GFP<sup>+</sup> 表現比例分別為第 2 繼代之  $66.6 \pm 19.3\%$  與第 4 繼代之  $70.2 \pm 12.0\%$ ，在流式細胞儀篩檢後，STO/GFP<sup>+</sup> 表現比例提昇至  $93.6 \pm 2.8\%$ 。

Fig. 2. The expression of GFP in STO mouse embryonic fibroblast transfected with adeno-associated viral vector type 2 (AAV2) after G418 selection and flowcytometry sorting,  $50.9 \pm 17.1\%$  of transfected STO cells expressed GFP. Following with the G418-selection and flowcytometry sorting, the proportion of GFP-expressing STO cells (STO/GFP<sup>+</sup>) was promoted to  $66.6 \pm 19.3\%$  (passage 2),  $70.2 \pm 12.0\%$  (passage 4) and  $93.6 \pm 2.8\%$  (after sorting), respectively.

### III. 轉染後之 STO 細胞供養豬胚幹細胞試驗

轉染後攜有 GFP 與  $\text{Neo}^r$  基因之 STO 細胞，經絲裂黴素 -C 去活化後，作為豬胚幹細胞之供養層細胞。經培養後之豬胚幹細胞群落維持典型未分化之型態（圖 3），顯示轉染後的 STO 細胞可以作為培養胚幹細胞之供養層細胞。

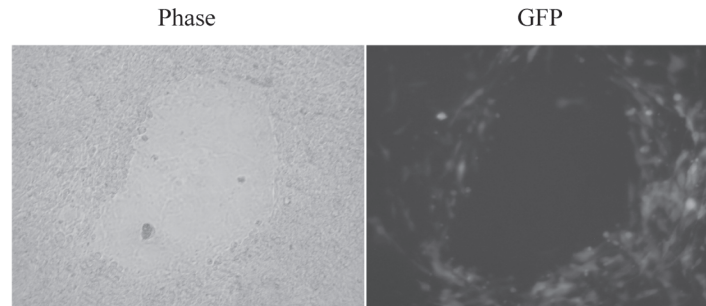


圖 3. 經轉染後攜有綠螢光蛋白質（GFP）與新黴素耐受基因（ $\text{Neo}^r$ ）之小鼠胎體成纖維細胞能維持豬胚幹細胞群落之生長與未分化狀態。

Fig. 3. The STO mouse embryonic fibroblast transfected with GFP and  $\text{Neo}^r$  genes can support the proliferation and undifferentiation of porcine embryonic stem cells.

## 致謝

本試驗感謝生理組林鈺婷與許詩培小姐協助 STO 細胞與豬胚幹細胞之體外培養與相關試驗，謹致謝忱。

## 參考文獻

- Amano, K., T. Furuno and M. Nakanishi. 2006. Conditioned medium from feeder STO cells increases the attachment of mouse embryonic stem cells. *Biol. Pharm. Bull.* 29: 1747-1750.
- Bar-Nun, S., Y. Shneyour and J. S. Beckmann. 1983. G-418, an elongation inhibitor of 80 S ribosomes. *Biochim. Biophys. Acta.* 741: 123-127.
- Bjorklund, A. and O. Lindvall. 2000. Cell replacement therapies for central nervous system disorders. *Nat. Neurosci.* 3: 537-544.
- Bojanic, I. and B. G. Cepulic. 2006. Umbilical cord blood as a source of stem cells. *Acta. Med. Croatica.* 60: 215-225.
- Cantley, L. G. 2005. Adult stem cells in the repair of the injured renal tubule. *Nat. Clin. Pract. Nephrol.* 1: 22-32.

- Chan, A. W., E. J. Homan, L. U. Ballou, J. C. Burns and D. R. Bremel. 1998. Transgenic cattle produced by reverse-transcribed gene transfer in oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 14028-14033.
- Chen, L. R., H. P. Wang and M. C. Wu. 1991. *In vitro* culture of mammalian embryonic stem cells: II. *In vitro* culture of blastocyst-derived cells in mouse and pigs. *J. Chin. Soc. Anim. Sci.* 20: 326-339.
- Chen, L. R., Y. L. Shiue, L. Bertoline, J. F. Medrano, R. H. BonDurant and G. B. Anderson. 1999. Establishment of pluripotent cell lines from porcine preimplantation embryos. *Theriogenology* 52: 195-212.
- Davidson, B. L., C. S. Stein, J. A. Heth, I. Martins, R. M. Kotin, T. A. Derksen, J. Zabner, A. Ghodsi and J. A. Chiorini. 2000. Recombinant adeno-associated virus type 2, 4, and 5 vectors: transduction of variant cell types and regions in the mammalian central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97: 3428-3432.
- Davies, J. and A. Jimenez. 1980. A new selective agent for eukaryotic cloning vectors. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* (5 Suppl): 1089-1092.
- Evans, M. J. and M. H. Kaufman. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292: 154-156.
- Kotin, R. M., M. Siniscalco, R. J. Samulski, X. D. Zhu, L. Hunter, C. A. Laughlin, S. McLaughlin, N. Muzyczka, M. Rocchi and K. I. Berns. 1990. Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 2211-2215.
- Laslett, A. L., A. A. Filipczyk and M. F. Pera. 2003. Characterization and culture of human embryonic stem cells. *Trends Cardiovasc. Med.* 13: 295-301.
- Lim, J. W. and A. Bodnar. 2002. Proteome analysis of conditioned medium from mouse embryonic fibroblast feeder layers which support the growth of human embryonic stem cells. *Proteomics* 2: 1187-1203.
- Maheshri, N., J. T. Koerber, B. K. Kaspar and D. V. Schaffer. 2006. Directed evolution of adeno-associated virus yields enhanced gene delivery vectors. *Nat. Biotechnol.* 24: 198-204.
- Manno, C. S., A. J. Chew, S. Hutchison, P. J. Larson, R. W. Herzog, V. R. Arruda, S. J. Tai, M. V. Ragni, A. Thompson, M. Ozelo, L. B. Couto, D. G. Leonard, F. A. Johnson, A. McClelland, C. Scallan, E. Skarsgard, A. W. Flake, M. A. Kay, K. A. High and B. Glader. 2003. AAV-mediated factor IX gene transfer to skeletal muscle in patients with severe hemophilia B. *Blood* 101: 2963-2972.
- Martin, G. R. 1981. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78: 7634-7638.
- Martin, G. R. and M. J. Evans. 1975. Differentiation of clonal lines of teratocarcinoma cells: formation of embryoid bodies *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 72: 1441-1445.
- Martin, G. R. L. M. Wiley and I. Damjanov. 1977. The development of cystic embryoid bodies *in vitro* from clonal teratocarcinoma stem cells. *Dev. Biol.* 61: 230-244.
- Moss, R. B., D. Rodman, L. T. Spencer, M. L. Aitken, P. L. Zeitlin, D. Waltz, C. Milla, A. S. Brody, J. P. Clancy, B. Ramsey, N. Hamblett and A. E. Heald. 2004. Repeated adeno-associated virus serotype 2 aerosol-mediated cystic fibrosis transmembrane regulator gene transfer to the lungs of patients with cystic fibrosis: a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. *Chest.* 125: 509-521.
- Nicklin, S. A., H. Buening, K. L. Dishart, M. de Alwis, A. Girod, U. Hacker, A. J. Thrasher, R. R. Ali, M. Hallek and A. H. Baker. 2001. Efficient and selective AAV2-mediated gene transfer directed to human



- vascular endothelial cells. *Mol. Ther.* 4: 174-181.
- Park, J. H., S. J. Kim, E. J. Oh, S. Y. Moon, S. I. Roh, C. G. Kim and H. S. Yoon. 2003. Establishment and maintenance of human embryonic stem cells on STO, a permanently growing cell line. *Biol. Reprod.* 69: 2007-2014.
- Pfeifer, A., M. Ikawa, Y. Dayn and I. M. Verma. 2002. Transgenesis by lentiviral vectors: lack of gene silencing in mammalian embryonic stem cells and preimplantation embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99: 2140-2145.
- Potten, C. S., J. R. Ellis. 2006. Adult small intestinal stem cells: identification, location, characteristics, and clinical applications. *Ernst. Schering. Res. Found. Workshop.* 60: 81-98.
- Reubinoff, B. E., M. F. Pera, C. Y. Fong, A. Trounson and A. Bongso. 2000. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation *in vitro*. *Nat. Biotechnol.* 18: 399-404.
- Rivera, F. J., W. D. Sierralta, J. J. Minguell and L. Aigner. 2006. Adult hippocampus derived soluble factors induce a neuronal-like phenotype in mesenchymal stem cells. *Neurosci. Lett.* 406: 49-54.
- Robertson, E., A. Bradley, M. Kuehn and M. Evans. 1986. Germ-line transmission of genes introduced into cultured pluripotent cells by retroviral vector. *Nature* 323: 445-448.
- Samulski, R. J., X. Zhu, X. Xiao, J. D. Brook, D. E. Housman, N. Epstein and L. A. Hunter. 1991. Targeted integration of adeno-associated virus (AAV) into human chromosome 19. *EMBO J.* 10: 3941-3950.
- Shamblott, M. J., J. Axelman, J. W. Littlefield, P. D. Blumenthal, G. R. Huggins, Y. Cui, L. Cheng and J. D. Gearhart. 2001. Human embryonic germ cell derivatives express a broad range of developmentally distinct markers and proliferate extensively *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98: 113-118.
- Shamblott, M. J., J. Axelman, S. Wang, E. M. Bugg, J. W. Littlefield, P. J. Donovan, P. D. Blumenthal, G. R. Huggins and J. D. Gearhart. 1998. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 13726-13731.
- Shi, M., C. Q. Xie and G. X. Lu. 2005. Preliminary proteome analysis of mouse embryonic fibroblast conditioned medium. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 30: 11-15.
- Shim, H., A. Gutierrez-Adan, L. R. Chen, R. H. BonDurant, E. Behboodi and G. B. Anderson. 1997. Isolation of pluripotent stem cells from cultured porcine primordial germ cells. *Biol. Reprod.* 57: 1089-1095.
- Smith-Arica, J. R., A. J. Thomson, R. Ansell, J. Chiorini, B. Davidson and J. McWhir. 2003. Infection efficiency of human and mouse embryonic stem cells using adenoviral and adeno-associated viral vectors. *Cloning Stem Cells.* 5: 51-62.
- Talbot, N. C., A. M. Powell and W. M. Garrett. 2002. Spontaneous differentiation of porcine and bovine embryonic stem cells (epiblast) into astrocytes or neurons. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 38: 191-197.
- Thomson, J. A., J. Itskovitz-Eldor, S. S. Shapiro, M. A. Waknitz, J. J. Swiergiel, V. S. Marshall and J. M. Jones. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282: 1145-1147.
- Wolfgang, M. J., S. G. Eisele, M. A. Browne, M. L. Schotzko, M. A. Garthwaite, M. Durning, A. Ramezani, R. G. Hawley, J. A. Thomson and T. G. Golos. 2001. Rhesus monkey placental transgene expression after lentiviral gene transfer into preimplantation embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98: 10728-10732.
- Xie, Q., W. Bu, S. Bhatia, J. Hare, T. Somasundaram, A. Azzi and M. S. Chapman. 2002. The atomic

structure of adeno-associated virus (AAV-2), a vector for human gene therapy. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 99: 10405-10410.

Yang, Y., F. A. Nunes, K. Berencsi, E. E. Furth, E. Gonczol and J. M. Wilson. 1994. Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91: 4407-4411.

# **Transfection of mouse embryonic fibroblast cell line with GFP and neomycin resistant genes by adeno-associated viral vector type 2 <sup>(1)</sup>**

Jenn-Rong Yang <sup>(2)</sup>, Chia-Hsin Liao <sup>(3)</sup>, Yow-Ling Shiue <sup>(4)</sup> and Lih-Ren Chen <sup>(2) (5)</sup>

Received : Sept. 15, 2006 ; Accepted : Dec. 2, 2006

## **Abstract**

The purpose of this study was to establish a mouse embryonic fibroblast cell line carrying green fluorescent protein (GFP) and neomycin resistant (Neo<sup>r</sup>) genes. Murine embryonic fibroblasts from STO cell line were transfected with adeno-associated viral vector type 2 (AAV2) followed by being cultured in G418 selection medium. The results showed that the optimal concentration of G418 selection was 400  $\mu$ g/ml and its mortality was  $41.8 \pm 11.6\%$  after 7 d of selection. The transfection rate of STO cells transfected with AAV2 was  $50.9 \pm 17.1\%$ , as determined by GFP expression. Following the selection with G418-containing medium (400  $\mu$ g/ml) and flowcytometry sorting, the proportion of GFP-expressing STO cells was promoted to  $70.2 \pm 12.0\%$  and  $93.6 \pm 2.8\%$ , respectively. The transfected STO/GFP<sup>+</sup> cell line could support the maintenance of undifferentiated porcine embryonic stem cells. This STO/GFP<sup>+</sup> cell line which carried Neo<sup>r</sup> gene might provide for a valuable source of feeder layer for the cultivation and selection of transgenic ES cells, which were transfected with Neo<sup>r</sup> gene as a selection marker.

Key words: adeno-associated viral vector type 2, green fluorescent protein, neomycin resistant gene, mouse embryonic fibroblasts.

---

(1) Contribution No.1349 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan. R. O. C.

(2) Physiology Division, COA-LRI, Hsinhua, Tainan, Taiwan. R. O. C.

(3) Neuro-Medical Scientific Center, Buddhist Tzu Chi General Hospital, Hualien, Taiwan. R. O. C.

(4) Institute of Biomedical Science, National Sun Yat-sen University, Kaohsiung, Taiwan. R. O. C.

(5) Corresponding Author, E-mail: lrchen@mail.tlri.gov.tw