DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20231004001　　http://www.yykxjz.cn/

俞海洋, 杜昕昕, 常彦红, 王旭波. 一种利用 Tol2 转座子快速获得牙鲆稳转细胞的方法. 渔业科学进展, 2024, 45(6): 233–240
YU H Y, DU X X, CHANG Y H, WANG X B. A method for obtaining a stable transgenic cell line from Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) using the Tol2 transposon system. Progress in Fishery Sciences, 2024, 45(6): 233–240

一种利用 Tol2 转座子快速获得牙鲆稳转细胞的方法*

俞海洋[1]　杜昕昕[1]　常彦红[1]　王旭波[2①]

(1. 济宁学院生命科学与生物工程学院　山东　曲阜　273155；
2. 宁波大学海洋学院　浙江　宁波　315832)

摘要　脂质体转染是分子生物学中研究基因功能和基因表达调控的常规手段。然而，在海水硬骨鱼细胞中，脂质体转染效率低下且很难通过转染后直接筛选的方式获得稳转细胞。本研究以 pminiTol2 为模板，在末端反向重复序列中间添加了 CMV 启动子、EGFP 荧光蛋白、新霉素抗性基因等功能区域，构建了 CMV-EGFP-pminiTol2 重组载体。CMV-EGFP-pminiTol2 和 pCS-TP 质粒经脂质体包裹共转染至牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)卵巢颗粒细胞后，仅需 2~3 周的新霉素(G418)筛选即可获得稳定转染的细胞。本实验首次探究了利用 Tol2 转座子系统快速筛选获得牙鲆稳转细胞的方法，其研究成果可应用于牙鲆分子生物学研究，并为其他硬骨鱼类稳转细胞构建及筛选提供新思路。

关键词　牙鲆；Tol2 转座子；稳转细胞；脂质体转染

中图分类号 Q331　**文献标识码** A　**文章编号** 2095-9869(2024)06-0233-08

细胞转染是将外源分子如 RNA、DNA 导入细胞的专门技术，现已成为制备转基因生物和基因功能研究的常规手段(柴百惠等, 2018)。细胞转染常用方法有电穿孔法、病毒感染法和脂质体转染法。电穿孔法利用瞬时高脉冲的电压击穿细胞膜，适用范围广，但操作较为繁琐，转染后致死率较高，且所需的细胞和 DNA 量较大，一般很少在鱼类细胞转染的过程中使用(Rambabu *et al*, 2005)。病毒感染法通过病毒携带 DNA 侵染细胞，能够实现细胞系的稳定转染，但适用范围窄，对鱼类细胞转染效率较低，一时间很难筛选到适合鱼类细胞转染的病毒，且成本较高、实验流程复杂(Ruiz *et al*, 2009)。脂质体法的原理是通过带正电的脂质体与细胞膜上带负电的磷酸基团相互作用，形成复合体，引导外源基因导入细胞内。脂质体转染具有适用范围广、转染效率高且操作简单等优点(Jiang *et al*, 2004)。然而，市面上常见的脂质体转染试剂大都以哺乳动物细胞为研究对象设计开发。海水硬骨鱼细胞的细胞膜组分、温度适应范围、需氧量等参数与哺乳动物细胞差距较大(Logue *et al*, 2000; Zabelinskii *et al*, 1995)。因此，利用常见的脂质体转染试剂转染硬骨鱼类细胞的效率相对较低，进而很难获得稳转的牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)细胞。此外，传统瞬时表达载体经脂质体转染进入牙鲆细胞后，随着筛选时间的延长，大部分质粒会随着细胞分裂而逐

* 山东省自然科学基金青年项目(ZR2022QC110)和济宁学院服务黄河国家战略重点专项(2022HHKJ09)共同资助。
俞海洋，副教授，Email: yuhaiyang@jnxy.edu.cn
① 通信作者：王旭波，教授，Email: wangxubo@nbu.edu.cn
收稿日期: 2023-10-04, 收修改稿日期: 2023-10-25

渐丢失，少部分保留质粒的细胞也很难正确地整合到基因组上，这导致很难筛选到稳转细胞系(武标等, 2015)。受限于上述原因，长期以来，牙鲆的基因功能研究一直采用脂质体瞬时转染的方式获得转基因细胞，很难高效制备稳定转染外源基因的牙鲆细胞，这使得研究牙鲆基因的长效调控机制受到极大的限制(司瑜等, 2020)。同时，如何快速高效地制备稳转细胞已成为牙鲆细胞生物和分子生物学研究的难题。

Tol2 是在青鳉(*Oryzias latipes*)中发现的自主型天然转座子，是 histone acetyltransferase (hAT)家族成员之一，其末端反向重复序列(terminal inverted repeats, TIRs)和亚末端重复序列(subterminal repeats, SRs)对于成功转座十分重要(汤泽源等, 2011)。基因工程研究中使用 Tol2 转座子系统转化外源基因时，一般通过“识别–剪切–整合”的方式将外源基因整合到宿主基因组中(陶然等, 2014)。整个转座过程可概括为以下 3 个关键步骤：第一步，外源转化的 Tol2 DNA 或 mRNA 翻译形成转座酶；第二步，Tol2 转座酶识别关键序列，形成转座复合体切割供体质粒的特定序列；第三步，转座子与宿主基因组重新整合。目前，Tol2 转座子系统已成功应用于爪蟾(*Xenopus tropicalis*) (Hamlet *et al*, 2006)、鸡(*Gallus gallus*) (Sato *et al*, 2007)、小鼠(*Mus musculus*)(Sumiyama *et al*, 2010)、斑马鱼(*Danio rerio*) (张运生, 2020; Suster *et al*, 2009)、罗非鱼(*Oreochromis niloticus*) (Fujimura *et al*, 2011)、慈鲷鱼(*Astatotilapia burtoni*)(Juntti *et al*, 2013)等生物的转基因实验。此外，利用 Tol2 转座子系统也可以实现外源基因在中国仓鼠(*Cricetulus griseus*)卵巢细胞(CHO) (Yamaguchi *et al*, 2023)、人类(*Homo sapiens*)原代 T 细胞(Huang *et al*, 2010)、鸡原始生殖细胞(MacDonald *et al*, 2012)等细胞系的稳定表达。Tol2 转座子系统是基因工程研究中构建转基因脊椎动物的基本手段，也是细胞工程研究中构建稳转外源基因细胞系的优秀工具。但到目前为止，利用 Tol2 转座子介导海水硬骨鱼类稳转细胞构建的研究尚未见报道。本研究探究利用脂质体转染 Tol2 转座子重组载体的方式迅速获得牙鲆稳定转染细胞的方法。其中，重组 Tol2 转座子载体是在 pminiTol2 质粒(Balciunas *et al*, 2006)的基础上改造而来，保留了 Tol2 转座子的功能，以实现将外源基因高效地插入到牙鲆细胞的基因组 DNA 中；设计增加新霉素抗性筛选标记，用来实现细胞的快速筛选；同时，融合增强绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)表达系统，用于示踪外源基因在细胞的表达和亚定位情况。

1 材料与方法

1.1 材料

实验用牙鲆饲养在山东烟台海阳黄海水产有限公司的循环水系统中，养殖海水取自海阳地区地下水。细胞转染采用 Lipofectamine™ 2000 转染试剂(Thermo Fisher Scientific, 美国)。细胞培养及传代采用 U 形斜颈细胞培养瓶，细胞转染采用 12 孔细胞小室培养板(NEST Biotechnology, 中国)。实验所用 pminiTol2 质粒由 Stephen Ekker 馈赠(Addgene plasmid #31829; http://n2t.net/addgene:31829; RRID: Addgene_31829)。pCS-TP、pEGFP-C1 和 pEGFP-N1 质粒为本实验室保存。实验过程中用到的限制性核酸内切酶、无缝克隆试剂盒、DNA 片段纯化试剂盒均购自于大连宝生物有限公司(TaKaRa)。

1.2 方法

1.2.1 *牙鲆卵巢颗粒细胞的培养* 牙鲆卵巢原代细胞采用组织块直接培养法获得。先将 1.5 年龄健康的雌性牙鲆置于 30 mg/mL MS-222 中麻醉，断椎后迅速取出卵巢。将取出的卵巢组织浸泡于磷酸盐缓冲液(PBS)中 5~10 min (PBS 配方见表 1)，并在生物安全柜中用 3~4 倍体积的 PBS 清洗 5~10 次，其中，PBS 中添加了 2×青霉素–链霉素(Gibco, 美国)。清洗后，将牙鲆卵巢组织浸泡于 DMEM-F12 (BI, Bet-Haemek, 以色列)培养基中，用手术剪剔除覆膜和杂质，并在安瓿瓶中迅速剪成边长约为 0.25 cm 的小块。将剪好的组织块转移至 15 mL 的离心管中，加入适量 DMEM-F12 混匀，800 *g* 离心 1~2 min 后弃上清液，去除组织碎片。取适量组织铺在 T25 细胞培养瓶中，24 ℃培养箱中倒置培养 4~6 h，之后加入 5 mL 的 DMEM-F12 培养基培养，同时添加 10%胎牛血清 FBS、100 μmol/L 非必需氨基酸和 1%青霉素–链霉素(Gibco, 美国)(王宣刚等, 2021)。后续培养的过程中每 4~5 d 更换一次培养基，直至细胞迁出 80%左右后传代培养。细胞操作培养详细规程参考 Yu 等(2020)。

表 1 海水硬骨鱼 PBS 缓冲液配方

Tab.1 The formulation of marine teleost phosphate buffer saline (PBS)

成分 Components	等级 Grade	重量 Weight/(g/1 000 mL)
NaCl	AR	13.50
KCl	AR	0.60
$CaCl_2$	AR	0.25
$NaHCO_3$	AR	0.02
$MgCl_2$	AR	0.35

1.2.2　CMV-EGFP-pminiTol2 重组载体的构建

CMV-EGFP-pminiTol2 重组载体的构建是以 pminiTol2 质粒为模板，通过同源重组插入 CMV Enhancer-CMV Promoter-EGFP-MCS-SV40 poly(A) signal 和 SV40 Promoter-NeoR/KanR 序列获得。CMV-EGFP-pminiTol2 重组载体的构建思路见图 1，具体操作步骤如下：(1)用 BglⅡ限制内切酶切割 pminiTol2 载体，在 Tol2 ITR(L)和 Tol2 ITR(R)转座元件之间线性化 pminiTol2 质粒。(2)利用 DNA 高保真酶(PFU DNA Polymerase)，通过 PCR 方式将 pEGFP-C1 质粒的多克隆位点(MCS)突变成只含有 *Xho* Ⅰ和 *Xma* Ⅰ酶切位点的序列。PCR 突变引物为 Primer-del。(3)以突变后的 pEGFP-C1 质粒为模板，通过 DNA 高保真酶分别扩增得到 SV40 Promoter-NeoR/KanR 区段和 CMV Enhancer-CMV Promoter-EGFP-MCS-SV40 poly(A) signal 区段，并在该扩增引物两端添加 18 bp 同源序列用于无缝克隆构建载体。PCR 扩增引物为 SV40-NK-FW、SV40-NK-RV、CMV-EGFP-FW 和 CMV-EGFP-RV。(4)利用 DNA 片段纯化试剂盒纯化上一步骤 PCR 扩增得到的 DNA 片段。利用无缝克隆试剂盒，将线性化的 pminiTol2 载体、SV40 Promoter-NeoR/KanR 区段和 CMV Enhancer-CMV Promoter-EGFP-MCS-SV40 poly(A) signal 区段连接成一个完整的载体。(5)把构建好的载体转化至大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5α，经过菌落 PCR 和 Sanger 测序验证序列的正确性。CMV-EGFP-pminiTol2 重组载体构建过程中的 PCR 引物序列详见表 2。

1.2.3　细胞转染及稳转细胞的筛选　牙鲆卵巢颗粒细胞的转染采用 Lipofectamine™ 2000 转染试剂在 12 孔细胞小室培养板中进行，实验设计见表 3。具体操作步骤如下：(1)将生长状态良好的牙鲆卵巢颗粒细胞用胰酶消化后传代至 12 孔板，待其生长至 90%~95%融合，转染前一天更换不含抗生素和血清的 DMEM-F12 培养基。(2)用 50 μL DMEM-F12 培养基分别稀释实验组和对照组的质粒 DNA (2 000 ng/孔)，用 50 μL DMEM-F12 培养基稀释 Lipofectamine™ 2000 转染试剂(2 μL/孔)，室温孵育 5 min。(3)将步骤 2 中稀释的质粒和转染试剂轻轻混匀，室温放置 20 min，然后加入至 12 孔细胞小室培养板中，每孔 100 μL。(4)转染 5 h 后更换 DMEM-F12 培养基，同时添加 10% FBS、1%非必需氨基酸、1%青霉素–链霉素双抗。(5)转染 24 h 后加入 800 μg/mL 的 G418 筛选，筛选时长 2~3 周，期间每 2~3 天换一次培养液。筛选 2 周后再稳定培养 2~3 周，期间不加 G418 筛选。(6)在倒置荧光显微镜中观察细胞的 EGFP 绿色荧光，确认细胞的转染效率。

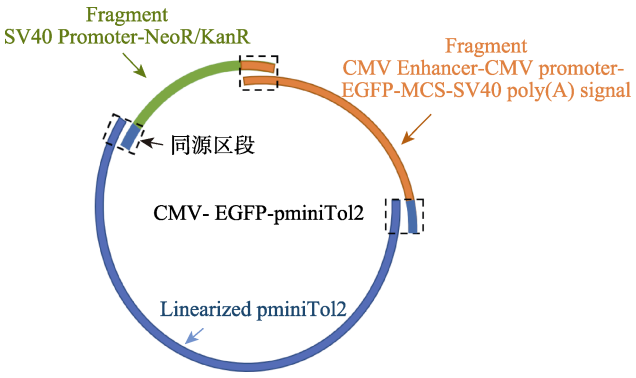

图 1　CMV-EGFP-pminiTol2 重组载体的构建思路
Fig.1　Construction of CMV-EGFP-pminiTol2 recombinant vector

表 2　实验中用到的引物序列
Tab.2　Primer sequences used in this study

引物 Primers	引物序列 Sequence (5′~3′)
Primer-del	ATCAGTTATCTAGATCCGGTCCGCTCGAGCGGCCCGGGGGGCTTGTACAGCTCGTCCATGC
SV40-NK-FW	GCTCTAGATGGCCAGATCCTGAGGCGGAAAGAACCA
SV40-NK-RV	GTTTAATTTAAATAGATCTCAGAAGAACTCGTCAAGAAGG
CMV-EGFP-FW	CAAGTCCGGACTCAGATCTCGAGCTCAAGCTTCGAATTC
CMV-EGFP-RV	GATCTGGCCATCTAGAGCCGCGTTAAGATACATTGATGAGTTT

表 3　细胞转染及稳转筛选实验设计
Tab.3　Experimental design of cell transfection and stable transfection screening

分组 Groups	转染质粒 Transfection plasmids	细胞 Cell	筛选时长 Screening duration
实验组 Experimental group	CMV-EGFP-pminiTol2 + pCS-TP	牙鲆卵巢颗粒细胞	2~3 周
对照组 Control group	pEGFP-C1, pEGFP-N1	牙鲆卵巢颗粒细胞	2~3 周

2 结果与分析

2.1 牙鲆卵巢颗粒细胞和 CMV-EGFP-pminiTol2 重组质粒的获得

由于卵母细胞是终端分化细胞，大部分卵母细胞会在细胞培养过程中逐渐死亡(朱丹丹等，2019)。因此，本研究最终培养获得的细胞大部分是牙鲆卵巢颗粒细胞。牙鲆卵巢颗粒细胞在培养初期 1~3 代时细胞生长较慢，且在细胞中会出现大量的小空泡室(图 2)。分析可能原因是环境变化导致细胞内质网的应激反应。经 10 代传代培养后生长稳定，细胞结构清晰，细胞呈梭形或菱形。构建好的 CMV-EGFP-pminiTol2 质粒载体经 Sanger 测序序列准确无误，质粒图谱信息见图 3。经过改造后 CMV-EGFP-pminiTol2 质粒更

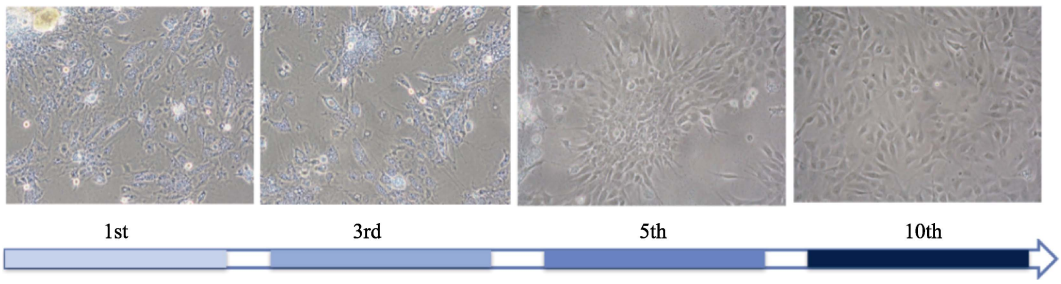

图 2 牙鲆卵巢颗粒细胞第 1、3、5 和 10 代原代细胞

Fig.2 Primary flounder ovary granulosa cell lines of the 1st, 3rd, 5th and 10th generations

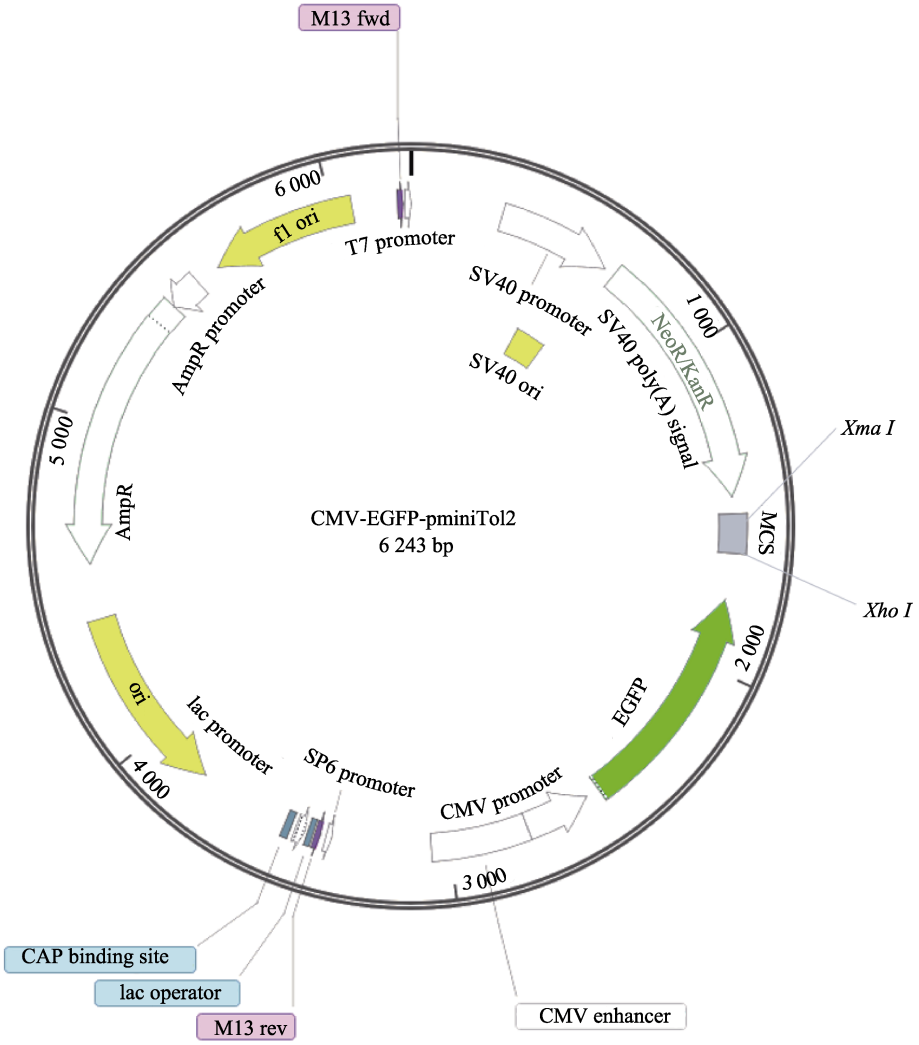

图 3 CMV-EGFP-pminiTol2 质粒图谱信息

Fig.3 CMV-EGFP-pminiTol2 plasmid map information

加适合牙鲆细胞的稳转筛选，主要体现在以下 4 个方面：(1) CMV-EGFP-pminiTol2 质粒上携带自主性的转座子元件，结合编码合成转座酶的质粒 pCS-TP 共转染能够显著提高牙鲆鱼细胞整合外源基因的能力。(2) CMV-EGFP-pminiTol2 质粒上携带 EGFP 绿色荧光蛋白，可通过荧光显微镜直接观察细胞转染及筛选的效果，还可以与目标基因形成融合表达蛋白示踪基因的表达位置。(3) CMV-EGFP-pminiTol2 质粒上还携带新霉素抗性筛选标记，可以通过 G418 快速筛选转染成功的细胞。(4) CMV-EGFP-pminiTol2 质粒上 MCS 区域经位点突变仅保留 *Xho* Ⅰ和 *Xma* Ⅰ酶切位点，且 *Xho* Ⅰ和 *Xma* Ⅰ酶切位点在整个质粒上是唯一的，可通过这 2 个位点线性化质粒，然后利用同源重组酶以无缝克隆的方式插入外源基因。

2.2　稳转 EGFP 绿色荧光细胞的快速筛选效果

选取第 20 代牙鲆卵巢颗粒细胞用于细胞转染实验。CMV-EGFP-pminiTol2 和 pCS-TP 质粒经脂质体包裹后共转染至牙鲆卵巢颗粒细胞，利用 G418 筛选 2~3 周，恢复培养 2~3 周，激光共聚焦显微镜观察转染效果。结果显示，实验组中 CMV-EGFP-pminiTol2 质粒转染组经 G418 筛选后全部的细胞都能成功表达 EGFP 绿色荧光蛋白，而对照组中 pEGFP-C1 和 pEGFP-N1 质粒转染组经 G418 筛选后仅有少部分的细胞(≤ 10%)能持续表达 EGFP 绿色荧光蛋白(图 4)。结果表明，相较于传统真核表达载体 pEGFP-C1 和 pEGFP-N1，本实验改造得到的 CMV-EGFP-pminiTol2 载体更适合牙鲆稳转细胞的制备，具有筛选时间短、外源基因表达稳定、操作简单、成本较低等优势。因此，研究人员可以在 CMV-EGFP-pminiTol2 载体上插入目标基因，以脂质体转化的方式构建牙鲆稳转细胞，用于探究基因功能、亚细胞定位、长效调控等科学问题。还可以以 CMV-EGFP-pminiTol2 载体为蓝本，针对不同鱼类细胞特点进行特异改造，使之更适用于基因功能分析。例如，将 CMV-EGFP-pminiTol2 载体中的 CMV 启动子更换为某些细胞的特异的启动子序列，则会使转基因功能探究更加趋近基因调控的本质。

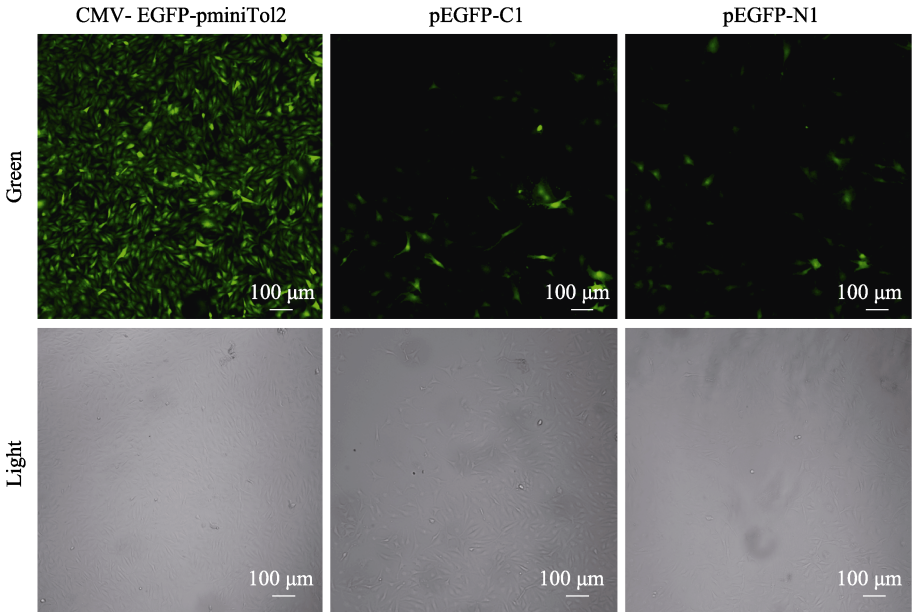

图 4　筛选后 CMV-EGFP-pminiTol2 转染牙鲆卵巢颗粒细胞效果

Fig.4　Effects of CMV-EGFP-pminiTol2 transfected ovarian granulosa cells of flounder after screening

3　结论

本研究设计构建了 CMV-EGFP-pminiTol2 重组载体，并通过脂质体转染后筛选的方式迅速获得了稳定转染的牙鲆卵巢颗粒细胞。相较于传统的真核细胞表达载体，本研究提供了一种能够在牙鲆细胞中高效整合并稳定表达的载体 CMV-EGFP-pminiTol2。并且，CMV-EGFP-pminiTol2 载体的转化仅需借助脂质体转染，操作简单、成本较低，在一次牙鲆细胞转染中实现了基因转化和稳定表达两个功效，极大地提高了制备牙鲆稳转细胞的效率。本研究旨在提供牙鲆稳转细胞构建及筛选的新思路，并为其他硬骨鱼类细胞的构建及稳转细胞的筛选提供参考。

参 考 文 献

BALCIUNAS D, WANGENSTEEN K J, WILBER A, *et al*. Harnessing a high cargo-capacity transposon for genetic applications in vertebrates. PLoS Genetics, 2006, 2(11): e169

CHAI B H, SHENG X Z, TANG X Q, *et al*. Improvement and optimization of liposome-mediated tramsfection of madin-darby canine kidney cells. Periodical of Ocean University of China (Natural Science), 2018, 48(S2): 9–16 [柴百惠, 绳秀珍, 唐小千, 等. 脂质体介导转染犬肾上皮细胞的方法改进与优化. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2018, 48(S2): 9–16]

FUJIMURA K, KOCHER T D. Tol2-mediated transgenesis in tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture, 2011, 319(3/4): 342–346

HAMLET M R J, YERGEAU D A, KULIYEV E, *et al*. Tol2 transposon-mediated transgenesis in *Xenopus tropicalis*. Genesis, 2006, 44(9): 438–445

HUANG X, GUO H, TAMMANA S, *et al*. Gene transfer efficiency and genome-wide integration profiling of sleeping beauty, Tol2, and piggyBac transposons in human primary T cells. Molecular Therapy, 2010, 18(10): 1803–1813

JIANG M, DENG L, CHEN G. High Ca^{2+}-phosphate transfection efficiency enables single neuron gene analysis. Gene Therapy, 2004, 11(17): 1303–1311

JUNTTI S A, HU C K, FERNALD R D. Tol2-mediated generation of a transgenic haplochromine cichlid, *Astatotilapia burtoni*. PLoS One, 2013, 8(10): e77647

LOGUE J A, DE VRIES A L, FODOR E, *et al*. Lipid compositional correlates of temperature-adaptive interspecific differences in membrane physical structure. Journal of Experimental Biology, 2000, 203(14): 2105–2115

MACDONALD J, TAYLOR L, SHERMAN A, *et al*. Efficient genetic modification and germ-line transmission of primordial germ cells using piggyBac and Tol2 transposons. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(23): E1466–E1472

RAMBABU K M, RAO S H N, RAO N M. Efficient expression of transgenes in adult zebrafish by electroporation. BMC Biotechnology, 2005, 5: 1–6

RUIZ S, SCHYTH B D, ENCINAS P, *et al*. New tools to study RNA interference to fish viruses: Fish cell lines permanently expressing siRNAs targeting the viral polymerase of viral hemorrhagic septicemia virus. Antiviral Research, 2009, 82(3): 148–156

SATO Y, KASAI T, NAKAGAWA S, *et al*. Stable integration and conditional expression of electroporated transgenes in chicken embryos. Developmental Biology, 2007, 305(2): 616–624

SI Y, WANG X G, WANG M Y, *et al*. Expression analysis and functional characterization of JNK2 in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(4): 12–22 [司瑜, 王宣刚, 王梦娅, 等. 牙鲆 JNK2 基因的表达分析及免疫功能探究. 渔业科学进展, 2020, 41(4): 12–22]

SUMIYAMA K, KAWAKAMI K, YAGITA K. A simple and highly efficient transgenesis method in mice with the Tol2 transposon system and cytoplasmic microinjection. Genomics, 2010, 95(5): 306–311

SUSTER M L, KIKUTA H, URASAKI A, *et al*. Transgenesis in zebrafish with the tol2 transposon system. Methods of Molecular Biology, 2009, 561: 41–63

TANG Z Y, XUE L Y. Application of Tol2 transposon system in transgenes. Biotechnology Bulletin, 2011(10): 43–48 [汤泽源, 薛良义. Tol2 转座子系统在转基因动物中的应用. 生物技术通报, 2011(10): 43–48]

TAO R, CHANG Y M, LI S G, *et al*. Characteristics and application of Tol2 transposon in transgenic fish. Chinese Journal of Fisheries, 2014, 27(1): 60–64 [陶然, 常玉梅, 李世国, 等. Tol2 转座子的特性及其在转基因鱼类中的应用. 水产学杂志, 2014, 27(1): 60–64]

WANG X G, KONG X F, WANG X T, *et al*. Isolation, culture, and characterization of macrophages from the head kidney of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(5): 55–61 [王宣刚, 孔祥福, 王欣桐, 等. 牙鲆头肾巨噬细胞的分离培养与鉴定. 渔业科学进展, 2021, 42(5): 55–61]

WU B, XU L L, WANG Y, *et al*. Establishment of a stable SW620 cell strain expressing prohibitin 2 protein. Jiangsu Medicine Journal, 2015, 41(20): 2373–2376 [武标, 徐丽丽, 王妍, 等. 稳定表达 Prohibitin 2 蛋白 SW620 细胞株的建立. 江苏医药, 2015, 41(20): 2373–2376]

YAMAGUCHI K, OGAWA R, TSUKAHARA M, *et al*. Efficient production of recombinant proteins in suspension CHO cells culture using the Tol2 transposon system coupled with cycloheximide resistance selection. Scientific Reports, 2023, 13(1): 7628

YU H, WANG Y, WANG M, *et al*. Growth differentiation factor 9 (gdf9) and bone morphogenetic protein 15 (bmp15) are potential intraovarian regulators of steroidogenesis in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). General and Comparative Endocrinology, 2020, 297: 113547

ZABELINSKII S A, BROVTSYNA N B, CHEBOTAREVA M A, *et al*. Comparative investigation of lipid and fatty acid composition of fish gills and mammalian lungs: A model of the membrane lipid component areas. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 1995, 111(1): 127–140

ZHANG Y S. A method for establishing pure lines of transgenic fish mediated by Tol2 transposon. Hunan Province: CN111218478A, 2020-06-02 [张运生. 一种 Tol2 转座子介导的转基因鱼纯系建立方法. 湖南省: CN111218478A,

2020-06-02]
ZHU D D, JIANG S G, HUANG J H, *et al*. Optimization of tissue and primary cell culture of tiger shrimp *Penaeus monodon*. Fisheries Science, 2019, 38(2): 163–172 [朱丹丹, 江世贵, 黄建华, 等. 斑节对虾性腺组织、细胞的原代培养条件优化. 水产科学, 2019, 38(2): 163–172]

(编辑　冯小花)

A Method for Obtaining a Stable Transgenic Cell Line from Japanese Flounder (*Paralichthys olivaceus*) Using the Tol2 Transposon System

YU Haiyang[1], DU Xinxin[1], CHANG Yanhong[1], WANG Xubo[2①]

(1. *School of Life Science and Bioengineering, Jining University, Jining*　273155, *China;*
2. *School of Marine Science, Ningbo University, Ningbo*　315832, *China*)

Abstract　Cell transfection is a specialized technique for introducing exogenous molecules, such as RNA and DNA, into cells and has become a prevalent method in gene functionality studies. The most frequently employed cell transfection methods include electroporation, viral infection, and liposome transfection. Liposome transfection is a prevalent technique in molecular biology for studying gene function and regulation. Liposome transfection has the advantages of wide applicability, superior efficiency, and simple operation. However, most liposome transfection reagents on the market are designed based on mammalian cells. Cell membrane composition, temperature adaptation range, and oxygen demand in teleost cells differ substantially from those in mammalian cells. Accordingly, the efficiency of liposome transfection in teleost cells is limited, and obtaining stable transfected cells directly through screening is challenging. Therefore, after the transfection of conventional transient expression vectors into teleost cells via liposomes, most of the plasmid copies tend to vanish due to cell proliferation after the duration of screening. Furthermore, the insignificant number of cells retaining plasmids makes it difficult to correctly integrate plasmids into the genome sequence, which hinders screening for stable cell lines. In this study, we investigated a method of rapidly obtaining stable transfected cells of Japanese flounder by transfecting the Tol2 transposon recombinant vector with liposomes. The CMV-EGFP-pminiTol2 vector was modified from the pminiTol2 plasmid, sustaining the functionality of the Tol2 transposable element to facilitate the highly efficient insertion of target genes into genomic DNA. The CMV-EGFP-pminiTol2 plasmid was highly suitable for stable transformation screening in Japanese flounder cells. This advantageous trait was mainly attributed to the following four aspects: (1) The CMV-EGFP-pminiTol2 plasmid carries autonomous transposon elements that can significantly enhance the integration ability of target genes. (2) The CMV-EGFP-pminiTol2 plasmid carries EGFP, allowing researchers to visualize transfection and screening effects directly via fluorescence microscopy. (3) The CMV-EGFP-pminiTol2 plasmid incorporates a neomycin resistance selection marker, which can be used to quickly and successfully screen transfected cells after G418 screening. (4) The multiple cloning site (MCS) region of the CMV-EGFP-pminiTol2 plasmid is mutated to retain two unique cleavage sites (*Xho*I and *Xma*I); plasmids can be linearized through these two sites, allowing the target gene to be inserted

① Corresponding author: WANG Xubo, Email: wangxubo@nbu.edu.cn

using homologous recombinase cloning. CMV-EGFP-pminiTol2 and pCS-TP plasmids were co-transfected into flounder cells via liposome encapsulation, and stable transfected cells were obtained through neomycin (800 μg/mL) screening for 2–3 weeks. After 2 weeks of screening, cells were stably cultured for 2–3 weeks without G418 screening. Finally, the EGFP fluorescence of the cells was observed using an inverted fluorescence microscope to confirm the transfection efficiency of the cells. The results revealed that the CMV-EGFP-pminiTol2 plasmid-transfected experimental group successfully expressed EGFP in all cells after G418 selection. In the pEGFP-C1- or pEGFP-N1-transfected control group, only a minor fraction of cells (≤10%) sustained EGFP expression after G418 screening. The CMV-EGFP-pminiTol2 vector is therefore suitable for the preparation of stable transgenic cells in Japanese flounder, offering numerous advantages, including reduced screening time, stable exogenous gene expression, simplified operations, and relatively low cost. Consequently, researchers can insert their desired target genes into the CMV-EGFP-pminiTol2 vector to construct stable transformed cells for investigations such as functional analysis and assessments of subcellular localization and long-term regulation. This study describes a novel approach to rapidly screening stably transformed flounder cells using the Tol2 transposon system. The results can be applied to molecular biology research in flounder and provide novel insights for constructing and screening stable transformations in teleost cells.

Key words Japanese flounder; Tol2 transposon; Stable transformation cell; Liposome transfection