

一个用于转染细胞分选的双顺反子载体的构建及其应用*

曲笑霞 秦立蓬 岳文 高艳红 李艳华 袁红丰
王韞芳 刘大庆 闫舫 施双双 裴雪涛**

(军事医学科学院输血研究所, 干细胞研究室, 北京 100850)

摘要 为简化转染细胞的分选过程, 构建了一个含有细胞表面标志 CD34 基因的双顺反子载体 p3.1-IRES-CD34. 利用来源于脑心肌炎病毒 (EMCV) 的内部核糖体进入位点 (IRES), 实现目的基因与 CD34 基因的共同表达. 将绿色荧光蛋白 (EGFP) 作为目的基因插入载体的多克隆位点, 然后转染 NIH-3T3 细胞, 通过免疫磁珠分选 (MACS) 方法来分选细胞. 结果表明: 对于转染细胞, 均可实现快速分选 (瞬时转染细胞约 48 h, 稳定转染 10~15 天), 并且获得较高纯度 (95%以上) 的表达目的基因细胞.

关键词 载体, 转染细胞, 分选, CD34

学科分类号 Q78

将外源基因导入哺乳动物细胞并获得表达外源基因的细胞系, 在生物学及基础医学研究中有着广泛的应用. 传统的方法是利用载体携带的抗生素抗性基因, 通过一定浓度的选择性培养基进行一段时间的加压培养, 然后挑取单克隆扩大培养, 经过鉴定获得所要的细胞系. 由于目的基因和抗生素抗性基因分别由不同的启动子启动, 往往不能实现共同表达, 所以采用传统的方法获得表达目的基因的细胞系, 工作量大, 所需时间也长.

近来, 利用来源于脑心肌炎病毒 (encephalomyocarditis virus, EMCV) 的内部核糖体进入位点 (internal ribosome entry site, IRES) 序列^[1,2], 陆续出现了一些双顺反子载体, 使得目的基因和抗性基因或标记基因可以获得共同表达. 与传统的共转染方法或双启动子载体相比, 它们改进或简化了获得表达目的基因细胞系的繁琐过程. 但是这些双顺反子载体也有一些不足之处. 总的说来, 将抗生素抗性基因连入 IRES 3'端构建的双顺反子载体^[3-5], 虽然克服了共转染或双启动子载体不能实现目的基因与抗性基因共表达的问题, 但是通过抗生素进行转染细胞的筛选, 一方面对于瞬时表达的细胞和悬浮细胞无能为力, 另一方面, 选择性培养基中抗性药物浓度的高低, 对转染细胞的筛选结果也有较大的影响.

另外, 也有一些双顺反子载体, 通过 IRES 序列连接一个细胞标记基因 (marker gene), 转染细胞可

通过免疫磁珠分选 (magnetic cell sorting, MACS)^[6,7] 或通过流式细胞分选仪 (fluorescence-activated cell sorting, FACS)^[8] 进行分选. 例如载体 pIRES2-EGFP, 转染的细胞表达 EGFP, 可以通过 FACS 进行分选. 但由于 FACS 分选受到仪器条件的限制, 难以获得广泛应用. 载体 pIRES-CD4t 将细胞表面标记基因 CD4 连接入 IRES 3'端, 使转染细胞表面表达 CD4, 通过 MACS 系统来进行分选^[9]. 但是这个载体对于转染效率较低的细胞, 需要通过多步 MACS 分选才能达到较高的纯度.

有研究表明 CD34 基因是一个可以用于细胞分选的标记基因^[9]. 在临床及基础研究中, 由于其方便、快速、高效等特点, 利用免疫磁珠分选系统来分选 CD34⁺ 细胞有着广泛的应用. 为了实现对含有目的基因的转染细胞快速、有效的分选, 我们将人 CD34 基因的一种人工截短体形式 (deleted variant of CD34, dCD34) 连接入 IRES 3'端, 构建了一个双顺反子载体——p3.1-IRES-CD34, 并且验证了它可以有效地用于转染细胞的分选.

*国家高技术“863”计划资助项目(2002AA205050 和 2003AA205160), 国家重点基础研究发展规划项目(973)(2001CB509906)和北京市科委自然科学基金资助项目(H020220010190).

** 通讯联系人.

Tel: 010-66932203, Fax: 010-68164807

E-mail: peixt@nic.bmi.ac.cn

收稿日期: 2005-04-07, 接受日期: 2005-05-27

1 材料与方法

1.1 材料

CD34 cDNA 由本实验室谢小燕和李锦惠赠. 质粒 pcDNA3.1(+), pIRES2-EGFP 及 NIH-3T3 细胞由本室保存. pGEM-T-easy 载体、小量质粒提取试剂盒购自 Promega 公司; 各种限制性内切酶、连接酶购自大连宝生物公司. 转染试剂 Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司; 磁性细胞分离仪和 CD34⁺细胞分离试剂盒购自 Miltenyi 公司; 细胞培养基 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 和胎牛血清为 Gibco 公司产品; PE 结合抗人 CD34 抗体 (phycoerythrin-conjugated anti-human CD34 antibodies) 及 PE 结合抗小鼠 IgG1 为 BD Pharmingen 公司产品.

1.2 方法

1.2.1 载体 p3.1-IRES-CD34 的构建.

采用 PCR 反应扩增得到 dCD34 cDNA, 所用引物为 CD34 正向引物 (5' CGC CCA TGG TGC TGG TCC GCA GGG GC 3'), CD34 反向引物 (5' CGC GCA TGC TCT AGA TTA GCG GCG ATT CAT CAG GAA 3'). 其中 CD34 正向引物中包含一个 *Nco* I 酶切位点, CD34 反向引物中包含了 *Sph* I 和 *Xba* I 两个酶切位点. 将 PCR 产物经 *Nco* I、*Sph* I 双酶切后电泳回收, 连接入 pGEM-T-easy 载体的相应酶切位点. 挑选多个经鉴定正确插入的克隆送博亚公司进行序列测定.

用 *Sal* I、*Nco* I 双酶切载体 pIRES2-EGFP 得到 IRES 片段 (613 bp), 连接入 pGEM-T-easy-CD34 载体中. 然后用 *Sal* I、*Xba* I 双酶切得到 IRES-CD34 片段, 连入 pcDNA3.1(+) 的 *Xho* I、*Xba* I 酶切位点即得到载体 p3.1-IRES-CD34.

1.2.2 双顺反子载体 p3.1-IRES-CD34-EGFP 的构建. 为了验证载体 p3.1-IRES-CD34 在转染细胞分选中的作用, 我们选择了绿色荧光蛋白 (enhanced green fluorescent protein, EGFP) 基因为目的基因, 并将其插入载体 pcDNA3.1-IRES-CD34 的多克隆位点, 得到了双顺反子载体 pcDNA3.1-IRES-CD34-EGFP. 具体方法为: 利用 PCR 克隆技术从载体 pIRES2-EGFP 扩增得到 EGFP (引物为正向引物: 5' GCT AGC CCA CAA CCA TGG TGA GCA 3', 反向引物: 5' CGC TTT ACT TGT ACA GCT CGT C 3'). 将 PCR 产物连入 pGEM-T-easy 载体, 经 *Nhe* I、*Not* I 双酶切后得到 EGFP 片段, 连入

pcDNA3.1-IRES-CD34 的多克隆位点.

1.2.3 细胞培养与转染. NIH-3T3 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 置 37℃, 5% CO₂ 饱和湿度的孵箱中培养. 于转染前一天接种细胞, 细胞密度达到 60%~90% 汇合时, 采用脂质体转染法将 pcDNA3.1-IRES-CD34-EGFP 转染入 NIH-3T3 细胞. 转染方法按试剂盒说明书进行.

1.2.4 免疫磁珠方法 (MACS) 分选转染细胞.

采用 CD34 细胞分离试剂盒, 参照试剂盒中说明书的方法稍作改变. 具体方法为: 转染细胞用 0.05% 胰酶 (含 0.02% EDTA) 消化后收集, 1 200 r/min 离心 5 min, 弃上清. 加入缓冲液 (不含血清的 DMEM 培养基) 洗一遍, 1 200 r/min 离心 5 min, 弃上清. 加入 300 μl DMEM 重悬细胞. 加入 100 μl 非特异性阻断抗体 FcR 封闭剂, 混匀. 然后加入 100 μl 磁珠偶联的 CD34 单克隆抗体, 混匀, 置 4℃ 孵育 30 min. 1 200 r/min 离心 5 min, 弃上清, 加入 1 ml DMEM 重悬备用.

将分离柱置于磁场中, 用脱气的 DMEM 冲洗分离柱, 500 μl×4 次. 将标记的转染细胞悬液缓慢加入分离柱, 将流出的未结合的细胞收集作为阴性细胞. 加入 500 μl 脱气的 DMEM 洗涤分离柱, 洗 4 次. 然后将分离柱移出磁场, 加 1 ml DMEM 加压洗脱, 收集细胞作为阳性细胞.

1.2.5 细胞计数. 在 MACS 分选前后, 均对细胞进行计数. 在光镜下采用血球计数板计算细胞总数, 取 3 次计数平均值; 在荧光显微镜下对 3 个不同视野的细胞分别计数细胞总数及发出绿色荧光的细胞数, 计算绿色细胞的百分率, 取其平均值. MACS 分选回收率的计算方法如下: 分选回收率(%) = 分选后阳性细胞中表达绿色荧光的细胞总数 / 分选前表达绿色荧光的细胞总数 × 100%.

1.2.6 流式细胞仪检测 CD34 的表达. 收集经免疫磁珠方法分选的细胞, 加入 PBS 重悬, 1 200 r/min 离心 5 min, 弃上清. 加入 400 μl PBS 重悬, 加入 PE 标记的抗人 CD34 抗体 (20 μl 每 10⁶ 个细胞), 室温避光反应 20 min. 将 NIH-3T3 细胞用 PE 结合抗小鼠 IgG1 标记作为对照. 经 PBS 洗涤 2 次, 重悬于 500 μl PBS. 以 FACScan 流式细胞仪测定分析.

2 结 果

2.1 载体 p3.1-IRES-CD34 的构建及鉴定

插入 pGEM-T-easy 载体中的 CD34 基因经测序证实序列正确. 将 IRES-CD34 片段连入

pcDNA3.1(+)载体, 构建了含有 IRES 及 CD34 基因的载体 p3.1-IRES-CD34 (图 1). 挑取克隆经 PCR 鉴定. 提取 PCR 鉴定为阳性的菌液质粒, 进行双酶切鉴定. 经 *EcoR* I、*Xba* I 双酶切可切出目的片段 (图 2).

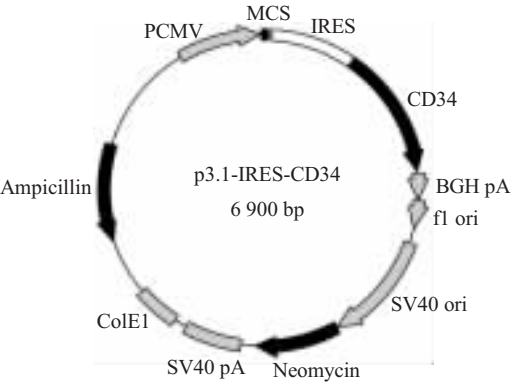


Fig.1 The map of p3.1-IRES-CD34 bicistronic vector

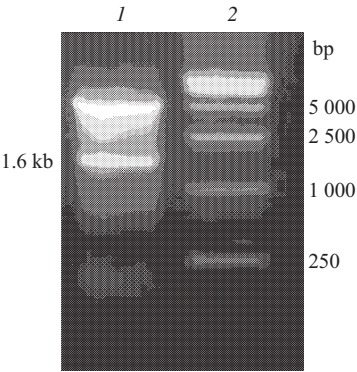


Fig.2 Identification of recombinant vector p3.1-IRES-CD34

1: the digested fragment by *EcoR* I and *Xba* I ; 2: DL 15000 DNA marker.

2.2 载体 p3.1-IRES-CD34-EGFP 的构建及鉴定

EGFP 基因经 PCR 扩增后经测序证实序列正确. 将 EGFP 基因插入载体 p3.1-IRES-CD34 的多克隆位点. PCR 鉴定、双酶切鉴定及测序鉴定结果均表明目的基因已正确插入(图 3).

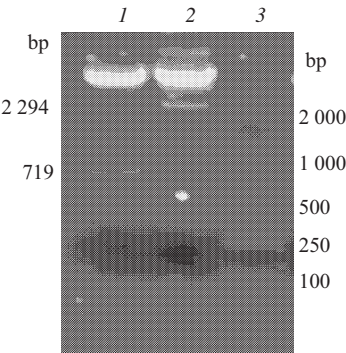


Fig.3 Identification of recombinant vector p3.1-IRES-CD34-EGFP

1: the digested fragment by *Nhe* I and *Not* I ; 2: the digested fragment by *Nhe* I and *Xba* I ; 3: DL 2000 DNA marker.

2.3 瞬时转染细胞的分选

载体 pcDNA31-IRES-CD34-EGFP 转染 NIH-3T3 细胞. 转染 24 h 后收集转染细胞进行 MACS 分选. 在荧光显微镜下观察, 经过 MACS 分选, 收集到的阳性细胞中表达绿色荧光蛋白的细胞百分率明显提高, 有超过 95%的细胞均表达绿色荧光, 而流出分选柱的阴性细胞中发绿色荧光的细胞约占 3% (图 4, 表 1). 同时我们发现, 在阴性细胞中, 绿色细胞的荧光强度普遍较弱, 这提示我们有一部分表达较弱的细胞可经 MACS 分选而被去除.

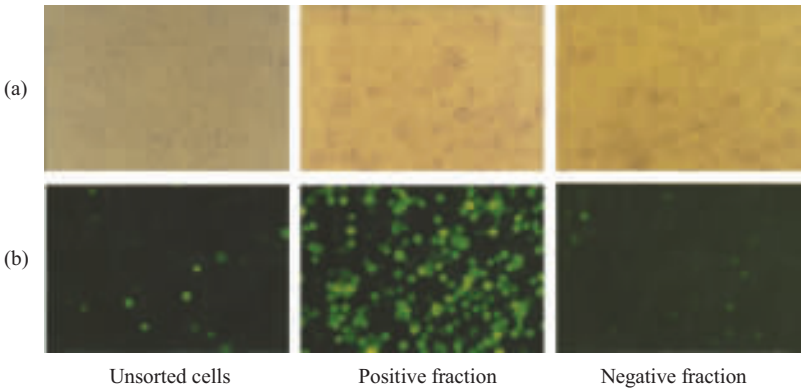


Fig.4 The micrographs of p3.1-IRES-CD34-EGFP transfected NIH-3T3 cells before and after sorting by MACS

(a) The light micrographs, $\times 250$, (b) The fluorescence micrographs (the same eyeshot with the light micrographs), $\times 250$.

2.4 MACS 分选回收率

将几次分选的细胞进行计数, 并且计算出分选的收率为 15%~30% (表 1).

2.5 流式细胞仪检测结果

经流式细胞仪测定, 转染细胞经 MACS 分选

后, 阳性细胞中表达 CD34 (PE 阳性) 的细胞百分率有较大幅度的提高, 从分选前的 1.65% 提高到了分选后的 87.84% (图 5).

Table 1 Selection of transfected NIH-3T3 cells by MACS

	Unselected cells		Positive fraction		Negative fraction	
	Number of total cells	Green cells /%	Number of total cells	Green cells /%	Green cells /%	Recovery/%
1	1×10^7	10	2×10^5	97	3	19.4
2	4×10^6	8	7×10^4	95	1	20.8
3	1.3×10^7	21	8×10^5	99	2.5	29.0
4	1.8×10^6	12	5×10^4	97	2	22.5
5	5.6×10^6	6	6×10^4	96	3	17.1

The number of total cells and green cells under fluorescent microscopy were counted before and after MACS. And the percentage of the recovered cells was counted.

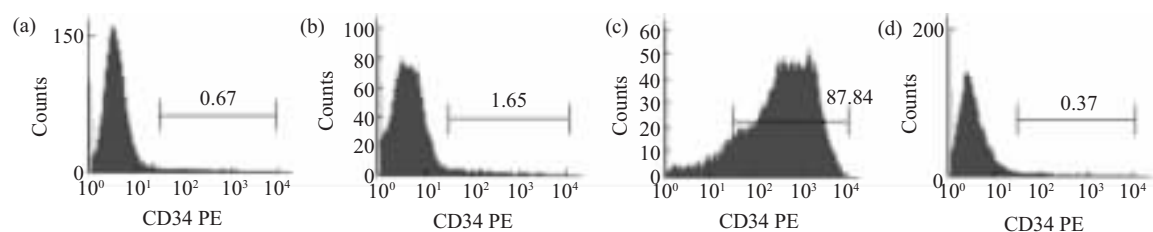


Fig.5 The CD34-positive cells before and after MACS were examined by flow cytometry

(a) Control. (b) Unsorted cells. (c) Positive fraction. (d) Negative fraction.

2.6 转染效率较低的稳定转染细胞的分选

在用 MACS 分选细胞时, 如果其中待分选的含特定表面标志的细胞含量太低 (例如低于 1%), 则经过一次 MACS 分选只能少量地提高其纯度, 这时需要进行多次 MACS 分选才能获得较纯的细胞. 对于转染效率较低的转染细胞的分选, 为了能够只经过一次免疫磁珠分选即能够得到较纯的目的细胞, 我们采用了如下方案.

为了得到转染效率较低的细胞, 在用脂质体转染 NIH-3T3 细胞时, 减少了 DNA 的用量 ($2 \mu\text{g}$ 每 25 cm^2 培养瓶) 并缩短了 DNA- 脂质体与细胞作用的时间 (2 h). 经 48 h 培养后, 将培养基换为含有 200 mg/L G418 的 DMEM+10% 血清的选择性培养基. 2~3 天后可观察到有大量的细胞死亡, 然后扩大培养 10~15 天. 在荧光显微镜下可以观察到表达绿色荧光蛋白的细胞比例已从最初的大约 0.5% 提

高到了 10%~20%. 然后经 MACS 分选, 在荧光显微镜下可观察到, 经分选得到的细胞中发绿色荧光的细胞可提高到 >95%. 我们又将分选出的阳性细胞继续培养 60 天, 可以观察到, 仍有 >95% 的细胞发出绿色荧光.

3 讨 论

我们提供了一个可以用于转染细胞分选的双顺反子载体, 利用这个载体, 可以方便地实现转染细胞的分选. 通过实验证明, 转染细胞经一次 MACS 分选后, 阳性细胞的纯度即可实现较大的提高.

CD34 主要表达于造血干 (祖) 细胞 (hematopoietic stem/progenitor cell, HSC/HPC) 上, 是一种重要的细胞表面标记. 此载体中作为细胞表面标志的基因, 我们采用了 CD34 的人工截短体 (deleted CD34, dCD34) 形式, 而没有用全长

CD34 (full-length CD34, flCD34) 或天然截短体 CD34(truncated CD34, tCD34)^[9]. 有研究表明, 全长 CD34 含有完整的胞内域部分, 参与了细胞的信号转导, 从而可能会对转染细胞有所影响^[9,10]. 而 dCD34 一方面完全缺失胞内域部分, 对细胞的影响小, 另一方面 dCD34 在细胞表面的表达水平低于 flCD34 和 tCD34^[9]. 这样经 MACS 分选后, 可以排除掉一部分表达较低的细胞. 这也可能是造成分选回收率不高的一个原因.

来源于 EMCV 的 IRES 又被称为不依赖帽的翻译增强子 (cap-independent translation enhancer, CITE). 在上游启动子的控制下, 该序列可以和与之相连的基因同时转录成一条单链 mRNA. 在翻译过程中, IRES 可以直接招募核糖体, 以不依赖帽的方式启动其下游基因的翻译, 这样转录产物在翻译时核糖体能同时进入并起始翻译 IRES 上游及下游的两个转录子, 从而在同一转录本上翻译出不同的蛋白质. 以 IRES 连接的基因, 虽然转录时 mRNA 是等量的, 但是其翻译过程却是各自独立的, 这样就可保证用 IRES 序列连接的非相关基因各自独立的表达^[11]. 但是, 以 IRES 启动的翻译效率较帽依赖的翻译效率低, 有研究表明, IRES 启动的下游基因的表达量在许多情况下仅为其上游基因的 20%~50%^[2]. 将 CD34 基因连入 IRES 下游, 可以在实现 MACS 有效分选的同时, 使目的基因有较高水平的表达.

对于稳定转染细胞的分选, 如果转染效率较高, 可以直接用普通培养基扩大培养 10~15 天后, 进行 MACS 分选. 对于那些转染效率较低的细胞, 由于载体 p3.1-IRES-CD34 还包含一个新霉素 (neomycin) 基因, 因此可以通过含有较低浓度 G418 的选择性培养基进行培养, 以杀死一部分未转染的细胞, 使得表达目的基因的细胞比例升高, 以利于提高免疫磁珠分选的分选效率. 这里, G418 只是一种辅助的手段, 对于其浓度的要求并不严格, 只需采用较低的浓度即可 (例如 200 mg/L).

由于通常研究所用的大部分细胞均不表达 CD34, 所以, 载体 p3.1-IRES-CD34 可以应用于大部分的细胞系及原代培养的细胞. 当然, 对于 CD34⁺的细胞系则不能采用这种方法. 另外, 通过

免疫磁珠分选得到的细胞为一个表达目的基因的细胞群, 目的基因在细胞中可能有不同的整合位点, 这对于多数研究是非常有利的. 但是, 如果研究需要非常纯的表达目的基因的细胞系, 则还需采用传统的挑取单克隆进行扩大培养鉴定的方法.

总之, 利用载体 p3.1-IRES-CD34, 无论对于瞬时转染和稳定转染的细胞, 均可以实现快速、高效的分选.

参考文献

- 1 Ngoi S M, Chien A C, Lee C G. Exploiting internal ribosome entry sites in gene therapy vector design. *Curr Gene Ther*, 2004, **4**(1): 15~31
- 2 Mizuuchi H, Xu Z, Ishii-Watabe A, *et al.* IRES-dependent second gene expression is significantly lower than cap-dependent first gene expression in a bicistronic vector. *Molecular Therapy*, 2000, **1**(4): 376~382
- 3 Gurtu V, Yan G, Zhang G. IRES bicistronic expression vectors for efficient creation of stable mammalian cell lines. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, **229** (1): 295~298
- 4 Kobayashi M, Yamauchi Y, Tanaka A, *et al.* Improved dicistronic mRNA expression vectors for efficient selection of transfectants highly expressing foreign genes. *BioTechniques*, 1996, **21** (3): 398~402
- 5 Rees S, Coote J, Stables J, *et al.* Bicistronic vector for the creation of stable mammalian cell lines that predisposes all antibiotic-resistant cells to express recombinant protein. *BioTechniques*, 1996, **20** (1): 102~110
- 6 Mosser D D, Caron A W, Bourget L, *et al.* Use of a dicistronic expression cassette encoding the green fluorescence protein for the screening and selection of cells expressing inducible gene products. *BioTechniques*, 1997, **22** (1): 150~161
- 7 Klucher K M, Gerlach M J, Daley G Q. A novel method to isolate cells with conditional gene expression using fluorescence activated cell sorting (FACS). *Nucleic Acids Res*, 1997, **25** (23): 4858~4860
- 8 Gains P, Wojchowshi D M. pIRES-CD4t, a dicistronic expression vector for MACS- or FACS-based selection of transfected cells. *BioTechniques*, 1999, **26** (4): 683~688
- 9 Fehse B, Richters A, Putimtseva-Scharf K, *et al.* CD34 splice variant: an attractive marker for selection of gene-modified cells. *Mol Ther*, 2000, **1** (5): 448~456
- 10 Krause D S, Fackler M J, Civin C I, *et al.* CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood*, 1996, **87** (1): 1~13
- 11 曹慧青, 丁金凤. 多基因共表达载体的构建策略. 国外医学分子生物学分册, 2002, **24** (1): 1~4
Cao H Q, Ding J F. Foreign Medical Sciences Section of Molecular Biology, 2002, **24** (1): 1~4

A Bicistronic Expression Vector for The Selection of Transfected Cells*

QU Xiao-Xia, QIN Li-Peng, YUE Wen, GAO Yan-Hong, LI Yan-Hua, YUAN Hong-Feng,

WANG Yun-Fang, LIU Da-Qing, YAN Fang, SHI Shuang-Shuang, PEI Xue-Tao**

(Laboratory of Stem Cell Biology, Beijing Institute of Transfusion Medicine, Military Medical Academy of Science, Beijing 100850, China)

Abstract A bicistronic expression vector, p3.1-IRES-CD34, has been constructed to facilitate the selection and screening of transfected cells by magnetic cell sorting (MACS). In this vector, an engineered variant of CD34, deleted CD34 (dCD34), was chosen as the marker gene and the internal ribosome entry site (IRES) from encephalomyocarditis virus (EMCV) was employed to allow simultaneous expression of the inserted 5'-end heterologous gene and the CD34 marker gene. To test the utility of the vector, the enhanced green fluorescent protein (EGFP) gene was inserted into the multiple cloning site (MCS) of the vector. Transfected cells were selected by magnetic cell sorting (MACS). The results demonstrated that the transfected cells can be enriched to high purity (>95%). The vector p3.1-IRES-CD34 would provide a rapid (2~3 days for transient transfected cells and 10 ~ 15 days for stable transfected cells) and efficient method for the selection of transfected cells.

Key words vector, transfected cells, selection, CD34

*This work was supported by grants from State 863 High Technology R&D Project of China (2002AA205050 and 2003AA205160), Special Funds for Major State Basis Research of China (2001CB509906) and The Funds for Nature Science Research of Beijing (H020220010190).

**Corresponding author . Tel: 86-10-66932203, Fax: 86-10-68164807, E-mail: peixt@nic.bmi.ac.cn

Received: April 7, 2005 Accepted: May 27, 2005