

以新霉素抗性基因突变体为筛选标志的真核表达载体的构建

高川^{1*} 朱旭东² 周晓巍² 于芳² 卢柏松² 黄培堂²

¹(北京药物化学研究所,北京 102205)

²(北京生物工程研究所,北京 100071)

摘要 新霉素抗性基因(*neo*)是真核表达载体的常用筛选标志,*neo* 基因编码新霉素磷酸转移酶(NPT II),能催化 G418、卡那霉素等多种氨基糖苷抗生素分子磷酸化而使之失去抗菌活性。通过对真核表达载体的筛选标志基因 *neo* 进行定点突变,以降低 NPTII 的活性,然后用含 *neo* 突变体的真核表达载体 pmDNA 构建荧光素酶表达质粒,稳定转染 CHO-K1 细胞,发现表达荧光素酶的阳性细胞比例达到 95%,其中高表达细胞集落的筛选率明显高于对照组。

关键词 真核表达载体,突变体,筛选标志基因

中图分类号 Q812 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2002)03-0308-05

氨基糖苷磷酸转移酶(Aminoglycoside phosphotransferase)能催化 G418、新霉素、卡那霉素等氨基糖苷抗生素分子的磷酸化作用,使之丧失抗菌活性。新霉素磷酸转移酶 II(Neomycin phosphotransferase II, NPT II)是其中最著名的成员,其编码基因 *neo* 常用作真核表达载体的筛选标志。但是 *neo* 基因活性较高,少量表达就能使细胞通过筛选,结果既增加了筛选工作量,又不利于高表达克隆的获得。对 *neo* 基因在特定位点进行突变,可使其活性下降,转化子抵抗筛选药物 G418 毒性的能力减弱^[1,2],此时,能够存活的是 *neo* 基因和目的基因插入到染色体表达活跃区域的细胞,因而提高高表达阳性克隆的获得率。

Blazquez J 等对 189H→Y、S、L,190G→D,212R→G,262D→N,36V→Met 分别进行了实验,结果是前 4 种突变所能抵抗的药物的最低浓度(Minimal inhibitory concentration, MIC)为野生型的 0.2%~1.5%,36V→M 的 MIC 为野生型的 6.2%^[1];Yenofsky 等将 182E 突变为 D,发现突变子在 G418 浓度为 20 μg/mL 时生长状态不佳,在浓度为 30 μg/mL 时无生长,而非突变基因转化子在任何 G418 浓度时均生长良好^[2]。根据以上报道,鉴于其它的突变使 NPT II 活性丧失太大,细胞的生存能力低下,本项研究仅选取 36V→M 突变位点,进行载体突变体研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株与细胞株 大肠杆菌 JM109、CHO-K1 细胞为本室保存;真核表达载体 pcDNA3.1(+)为 Invitrogen 公司产品;真核表达载体 pGL3-promoter 为 Promega 公司产品。

1.1.2 寡聚核苷酸突变引物 :P1:5' C GCT GAC AGC CGG AAC ATG GCG GCA TCA GAG CA 3';P2:5' TG CTC TGA TGC CGC CAT GTT CCG GCT GTC AGC G 3',其中 T、A 为突变位点,由本所合成。

1.1.3 限制酶 为华美、鼎国生物工程公司产品;修饰酶为美国 Promega 公司、Biolabs 公司产品。

1.1.4 大量质粒提取试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒 为 Promega 公司产品;少量质粒提取试剂盒为上海华舜公司产品。

1.1.5 哺乳动物细胞培养基 DMEM、筛选药物 G418 为美国 GIBCO 公司产品;胎牛血清为中国医学科学院血液研究所产品;阳离子脂质体 LipofectAMINE 为 GIBCO 公司产品;Luciferase Assay System 为 Promega 公司产品。

1.1.6 正电荷尼龙膜 为 Hybond 公司产品;North2SouthR Direct HRP Labeling and Detection System 为 PIERCE 公司产品;CL-X posureTM Film 为 PIERCE 公司产品。

1.1.7 Luminometer 荧光光度计(型号 TD-20/20)为 TURNER DESIGNS 公司制造。

1.2 方法

1.2.1 通过 PCR 实现 *neo* 基因 36V→M 突变(GTG →ATG)^[4-6]:50 μ L 的 PCR 反应体系中含:Tris-HCl 10mmol/L 模板 pcDNA3.1(+) 10ng ,dNTP 0.2mmol/L ,MgCl₂ 1.5mmol/L ,引物 P1、P2 各 50ng ,以上反应液混合均匀后 ,95 $^{\circ}$ C 5min ,再加入 Taq plus DNA 聚合酶 1.5U。循环反应参数 :94 $^{\circ}$ C 30s ,55 $^{\circ}$ C 30s ,72 $^{\circ}$ C 10min ,共 16 个循环 ,反应完成后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7min。DpnI 酶切 PCR 产物后 ,转化 JM109 细胞。

1.2.2 DNA 的操作:质粒 DNA 的提取、DNA 纯化(PEG 法)、酶切、转化等操作按照文献^[7]有关章节及试剂盒产品操作说明进行。

1.2.3 阳离子脂质体 LipofectAMINE 介导转染细胞^[8]按 GIBCO 公司产品操作指导进行。

1.2.4 细胞培养^[9-11]:CHO-K1 细胞用 DMEM 培养基(含 10% 胎牛血清、100 μ g/mL 氨苄青霉素、100u/mL 链霉素、2mmol/L 谷氨酰胺、0.1mmol/L 脯氨酸)培养 2~3d 传代 1 次。

1.2.5 转染后细胞的选择培养:永久表达的细胞 ,在转染后 48h 1:10 传代 ,换选择培养基(DMEM 中补

加 600 μ g/mL 的 G418) ,每 2~3d 换液 1 次 ,1 周左右转染成功的细胞长出克隆。15d 后长出肉眼可见的克隆 ,挑细胞集落至 24 孔板 ,继续用选择培养基培养至细胞长满孔后。转入底面积为(3 \times 5) cm^2 细胞培养瓶 ,继续扩大培养至细胞长满瓶底。

1.2.6 luc 基因表达活性测定:当细胞长满细胞瓶底时(约 10⁶ 个细胞) ,收集培养细胞 ,用 Luciferase Assay System 提供的细胞裂解液 500 μ L 裂解细胞 ,放置 5min 后离心 ,收集上清。收获的上清用 Luminometer 荧光光度计测定荧光相对值。

1.2.7 转染细胞细胞集落基因组中目的基因拷贝数的测定:参照文献^[3]中第 2 章 2.9B.2 方法在尼龙膜上点样 ,按 PIERCE 公司提供的 North2SouthR Direct HRP labeling and Detection system 产品说明进行探针的制备和 DNA 斑点杂交。

2 结果

2.1 pmDNA_{luc} + 的构建

2.1.1 基因定点突变后突变体序列分析:随机挑取 6 个单菌落培养、提取质粒、测序 ,得到 2 个突变体 ,图 1 为部分测序结果 ,表明它的确是所需要的突变体 pmDNA ,突变位点用方框标出。

```

GGA GGC TTT TTT GGA GGC CTA GGC TTT TGC AAA AAG CTC CCG GGA GCT TGT
ATA TCC ATT TTC GGA TCT GAT CAA GAG ACA GGA TGA GGA TCG TTT CGC ATG
Met
ATT GAA CAA GAT GGA TTG CAC GCA GGT TCT CCG GCC GCT TGG GTG GAG AGG
Ile Glu Gln Asp Gly Leu His Ala Gly Ser Pro Ala Ala Trp Val Glu Arg
CTA TTC GGC TAT GAC TGG GCA CAA CAG ACA ATC GGC TGC TCT GAT GCC GCC
Leu Phe Gly Tyr Asp Trp Ala Gln Gln Thr Ile Gly Cys Ser Asp Ala Ala
ATG TTC CGG CTG TCA GCG CAG GGG CGC CCG GTT CTT TTT GTC AAG ACC GAC
Met Phe Arg Leu Ser Ala Gln Gly Arg Pro Val Leu Phe Val Lys Thr Asp
CTG TCC GGT GCC CTG AAT GAA CTG CAG GAC GAG GCA GCG CGG CTA TCG TGG
Leu Ser Gly Ala Leu Asn Glu Leu Gln Asp Glu Ala Ala Arg Leu Ser Trp
CTG GCC ACG ACG GGC GTT CCT TGC GCA GCT GTG CTC GAC GTT GTC ACT GAA
Leu Ala Thr Thr Gly Val Pro Cys Ala Ala Val Leu Asp Val Val Thr Glu
GCG GGA AGG GAC TGG CTG CTA TTG GGC GAA GTG CCG GGG CAG GAT CTC CTG
Ala Gly Arg Asp Trp Leu Leu Leu Gly Glu Val Pro Gly Gln Asp Leu Leu
TCA TCT CAC CTT GCT CCT GCC GAG AAA GTA TCC ATC ATG GCT GAT GCA ATG
Ser Ser His Leu Ala Pro Ala Glu Lys Val Ser Ile Met Ala Asp Ala Met
CGG CGG CTG CAT ACG CTT GAT CCG GCT ACC TGC CCA TTC GAC CAC CAA GCG
Arg Arg Leu His Thr Leu Asp Pro Ala Thr Cys Pro Phe Asp His Gln Ala
AAA CAT CGC ATC GAG CAA CCC TTT NNC CAA TGA AAC CCG TCT TTT NAA TTN
Lys His Arg Ile Glu Gln Pro Phe Xaa.....
GAA TAT TTG AAN AAA AAA...

```

图 1 pcDNA3.1(+) 突变体的测序结果(部分)

Fig.1 Part nucleotide and deduced amino acid sequences of mutated *neo* gene

2.1.2 真核表达载体 pmDNA_{luc} + 的构建:真核表

达载体 pmDNA_{luc} + 的构建策略如图 2 所示 ,同时 ,
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

在 pcDNA3.1(+)的多克隆位点中插入 luc+ 基因作为对照表达载体 pcDNA_{luc+}, 筛选两种表达载体的阳性克隆。

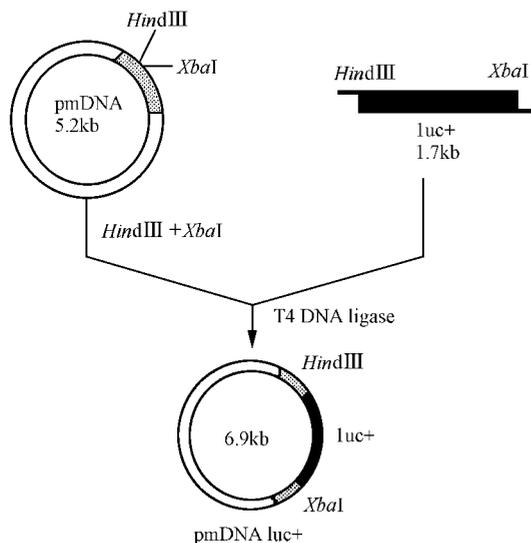


图 2 真核表达载体 pmDNA_{luc+} 的构建策略

Fig.2 Construction of eukaryotic expression vector pmDNA_{luc+}

2.2 pmDNA_{luc+} 在 CHO-K1 细胞中的表达

2.2.1 pmDNA_{luc+} 和 pcDNA_{luc+} 转染 CHO-K1 细胞

的细胞集落表达 :在用选择培养基筛选永久表达的细胞集落时 ,同时用选择培养基培养未经转染的 CHO-K1 细胞作为阴性对照。约 20 ~ 30d 后 ,未经转染的 CHO-K1 细胞全部死亡 ,而转染细胞则长出细胞集落。

随机挑取细胞集落 ,扩大培养至长满培养瓶时 ,在 Luminometer 荧光光度计灵敏度为 49.8 时 ,测其表达荧光相对值 ,表 1 为 2 种质粒转染细胞的总体结果。

2.2.2 转染细胞的表达水平 :突变体表达载体和对照载体转染细胞筛选的高表达集落(在灵敏度为 49.8 时 ,表达的荧光相对值大于 9999)分别为 3 株和 2 株 ,将以上 5 个高表达的细胞在多次转代后分两组 :一组用选择培养基培养 ,另一组则去掉选择压力 ,用完全培养基培养 ;待两者长满细胞瓶后(约 8×10^5 个细胞)收获细胞 ,在灵敏度为 39.9 时测 LUC 荧光相对值 ,同时用荧光素酶标准品作标准曲线 ,见图 3。在标准曲线上读出其对应的表达量 Y 值($\text{ng}/\mu\text{L}$)并同时计算出表达的 LUC 总量($= 500\mu\text{L} \times Y$) ($\text{ng}/8 \times 10^5$ 细胞)结果列于表 2。

表 1 2 种质粒转染细胞阳性集落比较

Table 1 Comparison of two positive transfected cell colonies

Plasmid vector	Colony number	Total expression colonies	Low-expression colonies (1 ~ 500)	Mid-expression colonies (500 ~ 2000)	High-expression colonies (> 2000)	Ratio of high-expression colonies/ %	Screening ratio / %	Mean LUC value
pcDNA _{luc}	50	32	9	15	8	25	64	1197
pmDNA _{luc}	59	56	8	22	26	46.6	95	2403

Direction :Colony whose expression activity is lower than 1 is regarded as without expression activity

表 2 灵敏度为 39.9 时几个高表达的细胞集落表达数据

Table 2 Data of higher expressed colonies in sensitivity 39.9

Sample	LUC activity(X)	Expression(Y)	Gross($\text{ng}/8 \times 10^5$ cells)	LUC value(pg/cell)
pcDNA _{luc} (without drug)	1013	0.0135	6.75	8.44×10^{-3}
pcDNA _{luc} 3	804.8	0.0105	5.25	6.56×10^{-3}
pcDNA _{luc} 4 (without drug)	1969	0.0271	13.55	1.69×10^{-3}
pcDNA _{luc} 4	2307	0.0319	15.95	1.99×10^{-3}
	> 9999			
pmDNA _{luc} 18 (without drug)	after 4-fold dilution	4×0.0826	165.2	2.07×10^{-2}
	5858			
	> 9999			
pmDNA _{luc} 18	after 4-fold dilution	4×0.0623	124.6	1.55×10^{-2}
	4435			

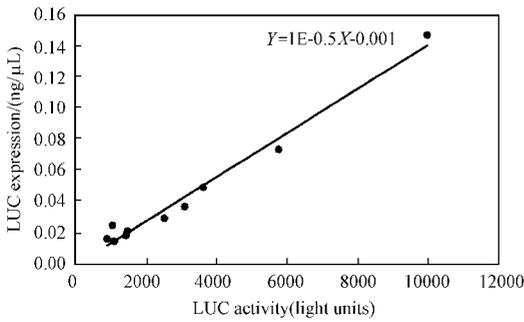


图 3 表达量标准曲线

Fig. 3 Standard curve of LUC expression

2.2.3 细胞集落基因组中目的基因拷贝数的测定：用 luc^+ 基因作为探针,变性的质粒 $pmDNA_{luc^+}$ 为标准品,提取的细胞集落基因组经变性处理作为样品,在带正电荷的尼龙膜上与探针杂交,形成 DNA 斑点印记,显色结果见图 4。

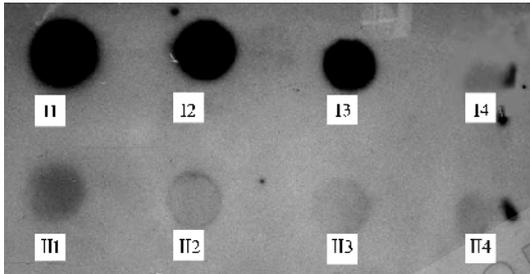


图 4 DNA 斑点杂交结果

Fig. 4 Result of DNA dot blot

I 1、I 2、I 3、I 4 are standard DNA with addition of 10ng、1 ng、0.1 ng、0.01ng the other II 1、II 2、II 3 are $pmDNA_{luc^+}$ transfected cell colonies 3 #、18 #、26 #, II 4 are $pcDNA_{luc^+}$ transfected cell colony 3 # respectively

目的基因拷贝数计算公式为：

$$copynum = \frac{Q \times 0.1 \times 3 \times 10^9}{5200 \times N}$$

N :样品加入量(ng); Q :样品点与标准 0.1 ng 点的色泽比。其中,质粒 $pmDNA_{luc^+}$ 约为 5200 bp,仓鼠基因组约为 3×10^9 bp,结果见表 3。

表 3 样点加样量、色比及计算的拷贝数表

Table 3 Result assay of DNA dot blot

Sample dot	II 1	II 2	II 3	II 4
Sample(ng)	27600	13650	30000	26800
Color ratio(Q)	0.64	0.56	0.41	0.56
Copy number	1.338	2.367	0.788	1.206

计算得知, $pmDNA_{luc^+}$ 转染细胞集落基因组中目的基因拷贝数只为 1~2。

3 讨论

荧光素酶基因(Luciferase gene 即 luc^+)是目前常用的报道基因之一,因其所编码的酶活性测定简单、快捷、灵敏度高,且其活性不受细胞内其它酶的干扰而受到广泛的欢迎。本实验采用了以 luc^+ 基因作为目的基因的表达系统,通过对其表达水平的测定,考察所构建的真核表达载体的表达效果。

两种质粒转染后的细胞集落表达结果表明,以 neo 基因突变体为筛选标志的真核表达载体的筛选率和表达的平均荧光相对值均高于非突变体转染细胞,尤其是高表达细胞克隆的筛选率比对照有明显提高,突变体表达载体转染细胞高表达的集落(荧光相对值大于 2000)占表达细胞集落的 46%,而 $pcDNA_{luc^+}$ 转染细胞只为 25%,其筛选到的细胞集落的最高表达活性是 $pcDNA_{luc^+}$ 转染细胞细胞集落的 25 倍。目的基因拷贝数测定结果说明目的基因没有扩增,细胞集落表达活性所表现出来的差异在于插入位点活跃程度的不同,通过载体 $pmDNA_{luc^+}$ 上突变的 neo 基因的筛选作用,能够筛选到目的基因处于染色体高度活跃区,即高效表达的细胞集落。

经多次传代后所有筛选的细胞集落分别在有或无选择压力的条件下培养,它们的 luc 基因表达活性差别不大,说明由质粒携带的目的基因已经稳定地整合到细胞的基因组中,能随细胞基因组稳定地遗传。

由于 neo 基因突变体的抗性降低,只有那些高效表达 neo 基因的细胞,才能抵抗药物的毒性,因此 neo 突变体真核表达载体的筛选力度增大,能有效地筛选到高表达的细胞株。本文所构建的以 neo 基因突变体为筛选标志的真核表达载体的筛选水平达到了我们预期的目标,是一种优于商品来源 $pcDNA3.1(+)$ 的表达载体。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Blazquez J, Davies J, Morenno F. Mutation in the $aphA-2$ gene of transposon Tn5 mapping within the regions highly conserved in aminoglycoside-phosphotransferases strongly reduce aminoglycoside resistance. *Mol Microbiology*, 1991, 6(6):1511~1518
- [2] Richard L Yenofsky, Miriam F, John W Pelloqw. A mutant neomycin phosphotransferase II gene reduces the resistance of transformants to antibiotic selection pressure. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87: 3435~3439
- [3] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory*

- [4] ZHANG L X (张龙翔), ZHANG T K (张庭芳), LI L Y (李令媛). Laboratory methods and techniques of Biochemistry(生化实验方法和 技术), 2nd ed. Beijing: Higher Education Press, 1997, pp. 342 ~ 345
- [5] Taylor J W, Eckstein F. The rapid generation of oligonucleotide mutations at high frequency using phosphorothioate-modified DNA. *Nucleic Acids Res*, 1985, **13**: 8765 ~ 8785
- [6] McClelland M, Nelson M, Raschke E *et al.* Effect of site-specific modification on restriction endonucleases and DNA modification methyltransferases. *Nucl Acids Res*, 1994, **22**: 3640 ~ 3659
- [7] Frederick M, Ausubel, Smith J A, *et al.* Short protocols in molecular biology; 3rd ed. John Wiley & Sons, Inc., 1995: 287 ~ 288
- [8] Felgner P L, Gadek T R, Holm M *et al.* A highly efficient lipid-mediated DNA transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, **84**: 7413 ~ 7417
- [9] Bibbington C R, Hentschel C C C. The use of vectors base on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells. DNA cloning Volume III, D. Glover(ED) 1987: 173 ~ 187, Academic Press, NK Academic Press Inc
- [10] ER X (鄂征). Tissue culture technology (组织培养技术), Beijing: People Hygienic Press, 1986
- [11] Huang P T (黄培堂) *et al.* Cells: a laboratory manual(细胞实验指南), Beijing: Science press, 2000

Construction of Eukaryotic Expression Vector Using Neomycin-resistance Gene Mutant as Selectable Marker

GAO Chuan^{1*} ZHU Xu-Dong² ZHOU Xiao-Wei² YU Fang² LU Bai-Song² HUANG Pei-Tang²

¹(Institute of Pharmaceutical Chemistry, Beijing 102205, China) ²(Institute of Biotechnology, Beijing 100071, China)

Abstract Neomycin-resistance gene is widely used as a selectable marker in eukaryotic expression vector. It codes neomycin phosphotransferase II (NPT II) which confers resistance to various aminoglycoside antibiotic such as G418 and kanamycine. In this work, by site-directed mutagenesis the *neo* gene mutant was obtained. The expression vector pmDNA using the *neo* gene mutant as selectable marker has been constructed. After inserting interest luciferase gene, the expression plasmid pmDNA_{luc} + was stably transfected CHO-K1 cells. As a result, the expression positive ratio reaches to approximate 95% and the ratio of high expression colonies is apparently higher than the controls.

Key words eukaryotic expression vector, mutant, selectable marker gene

Received: 11-01-2001

* Corresponding author. Tel: 86-10-66758323; E-mail: g.ch.chuan@263.net

成年人骨髓干细胞研究

关于“胚胎干细胞”研究及其发展的伦理之争一直没有停止,特别是“胚胎干细胞克隆”的研究,因为它涉及的面更为广泛而敏感,争议也更为激烈。为避免这些,使研究工作得以健康稳步地发展,非胚胎干细胞的研究及其应用也不亚于胚胎干细胞而显现出它的生命力。美国明尼苏达大学研究人员发现成年人体内(如骨髓)有与胚胎细胞一样分化潜能很强的干细胞,并认为它有可能分化成任何类型的组织,其分化能力之强可与胚胎干细胞相媲美,他们把这类成体干细胞称之为“多能成体祖细胞”。所谓多能是指该“祖细胞”能分化成心肌、大脑、肝脏、皮肤和各类神经细胞等,表现其分化的多能性。基于一切肌体细胞源于胚胎干细胞的原理,它是否有如同胚胎干细胞的全能性呢?目前这还是未知因素,但既然有类似于胚胎干细胞的功能,在医疗方面则有可能替代胚胎干细胞,研究开发它应是大有可为的,这将是“再生治疗医学”的热点之一。

其实,成年体细胞的干细胞研究在国内外均有之,如在成年人皮肤、肌肉、骨髓、胰腺、脂肪组织中均存在着具有分化为其他组织细胞的干细胞,与之不同的是,此成体干细胞的分化潜能有似胚胎干细胞那样具有分化的多能性的一方面,有其重要实用价值,而是否具有胚胎干细胞的另一方面,即表现其全能性尚未知。如果也存在的话,再加上克隆技术的应用,则又会涉及伦理之争,因此,避开为最优选择。人类成体干细胞研究的目标是明确的,即服务于人类医疗保健。明尼苏达大学研究人员发现的“多能性祖细胞”是基于此目标的。他们第一次通过研究实践发现,取自成年实验鼠和成年人体干细胞在培养液中培养似能无限期地生长,与胚胎干细胞极其相似,其中一部分细胞在生长2年之后,其特性依然保持完好,无任何衰老迹象。这表明此干细胞的强大生命力。从此也可以看出,源于非胚胎干细胞的成体干细胞及其应用将展现出光明的前景。