

人补体调节蛋白 DAF、MCP 在哺乳动物细胞中的共表达及协同作用研究

徐莉^{1,2}, 赵宙宙¹, 刘辉¹, 蒋达和¹, 李文鑫¹

1 武汉大学生命科学学院病毒学国家重点实验室, 武汉 430072

2 华中科技大学生命科学与技术学院, 武汉 430074

摘要: 利用双启动子构建含人补体调节蛋白 DAF 和 MCP cDNA 的双顺反子重组表达载体 pcDNA3-DAFMCP-DP, 以磷酸钙沉淀法转染 NIH3T3 细胞, 用 G418 筛选获得 NIH3T3 pcDNA3-DAFMCP-DP 转化细胞。PCR 实验结果显示人补体调节蛋白基因 DAF 和 MCP 整合在转化的异源细胞的染色体上。RT-PCR 和 Western blot 印迹实验分别从 RNA 水平和蛋白质水平证实了人补体调节蛋白分子 DAF 和 MCP 在细胞系中皆获得同步表达。检测连续传代 30 次的 NIH3T3 pcDNA3-DAFMCP-DP 结果表明人 DAF 和 MCP 基因仍稳定整合在细胞基因组中, 并未随着传代而丢失, 为稳定的转双基因细胞系。补体依赖的细胞毒反应表明, pcDNA3-DAFMCP-DP 转染细胞系由于 DAF 和 MCP 的共表达获得较 DAF 或 MCP 单一表达时更强的保护能力, 能更好地抑制人补体依赖的细胞毒作用的发生, 保护宿主细胞免受人补体的攻击。以上结果表明, DAF 和 MCP 双基因重组表达载体实现了人补体调节蛋白基因高效转移和高水平共表达, 为获得表达多种人补体调节蛋白的理想供体提供了有效策略。而且共表达的 DAF 和 MCP 具有协同效应, 能更有效地阻止补体激活造成的细胞损伤, 在克服超急性排斥反应的基因治疗中具有潜在的临床应用价值。

关键词: 人补体调节蛋白, 双基因重组表达载体, 共表达, 协同作用, 超急性排斥反应

Co-expression and Synergic Effect of Human Complement Regulatory Proteins DAF and MCP

Li Xu^{1,2}, Zhouzhou Zhao¹, Hui Liu¹, Dahe Jiang¹, and Wenxin Li¹

1 State Key Lab of Virology, College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China

2 College of Life Science & Technology, Huazhong University of Science & Technology, Wuhan 430074, China

Abstract: Recombinant expression vector pcDNA3-DAFMCP-DP containing human membrane complement regulatory proteins (hCRPs) decay accelerating factor (DAF) and membrane cofactor protein (MCP) cDNA was constructed by using two independent promoters. After transfected into NIH3T3 cells by calcium phosphate-DNA precipitate method, NIH3T3 pcDNA3-DAFMCP-DP transfectants were obtained by G418 selection. Extraneous genes integration was identified by PCR. The co-expression of human DAF and MCP at both mRNA and protein levels was confirmed by using RT-PCR and Western blot analysis. Human DAF and MCP cDNA were integrated into NIH3T3 pcDNA3-DAFMCP-DP genomic DNA after continuous 30 times passages, indicating that NIH3T3 pcDNA3-DAFMCP-DP were stable cell lines. Human C-mediated cytotoxicity assays showed that NIH3T3 cells transfected

Received: May 11, 2007; Accepted: June 4, 2007

Supported by: the National High-Technology Research and Development 863-Program of China (Nos. 2001AA216071 and 2006AA02A306).

Corresponding author: Wenxin Li. Tel: +86-27-68752831; Fax: 86-27-68752146; E-mail: liwxlab@whu.edu.cn

国家高技术研究与发展计划项目 (Nos. 2001AA216071, 2006AA02A306)资助。

stably with pcDNA3-DAF, pcDNA3-MCP, and pcDNA3-DAFMCP-DP were protected from C-mediated damage and co-expressed human DAF and MCP provided more excellent protection against C-mediated attack, which was compared with either DAF or MCP alone. These results suggest that the dicistronic vector could improve the efficiency of multi-gene delivery and benefit the synergic effect of human membrane complement regulatory proteins DAF and MCP.

Keywords: Human complement regulatory proteins, dicistronic expression vector, co-expression, synergistic action, hyperacute rejection

补体激活是一个多途径的过程, C3 的活化是 3 条激活途径的中心环节, 因此有效阻止 C3 的活化成为克服超急性排斥反应, 实现异种器官移植临床应用的关键^[1,2]。

膜辅蛋白(membrane cofactor protein, MCP, CD46)作为一种补体调控蛋白, 具有细胞表面标记和辅助活性, 能通过与 C4b 或 C3b 结合促进 C4b/C3b 裂解酶 I 因子对 C4b 及 C3b 进行裂解灭活^[3]从而中断补体激活途径, 保护宿主细胞免受同源补体的攻击。衰变加速因子(decay accelerating factor, DAF, CD55)则通过与自身细胞膜的 C3 转化酶(C4b2a 及 C3bBb)及 C5 转化酶(C4b2a3b 及 C3bB3b)特异性结合, 从而加速经典和替代途径 C3/C5 转化酶的衰变; 同时 DAF 依赖于它与 C4b 和 C3b 的高亲和力与 C2a 和 Bb 亚基竞争性结合在 C4b 和 C3b 的同一部位, 最终阻止补体两条激活途径 C3 及 C5 转化酶的装配, 从而阻断补体级联反应^[4]。此外, DAF 还可解除 B、D 因子对 MCP 活性的抑制作用, 完成由 MCP 辅助的 I 因子介导的结合型 C3b 的降解作用^[5]。二者都通过不同的方式来抑制 C3 转化酶的形成或使已形成的 C3 转化酶加速分解, 功能互补, 结合可以更有效地抑制 C3/C5 转化酶的活性, 因此联合应用 DAF 和 MCP 在超急性排斥反应的控制、异种器官移植研究领域具有重要意义^[6-8]。

本研究旨在构建高效转移的真核表达载体, 以期同步表达 DAF 和 MCP 分子, 并初步探讨表达的 DAF 和 MCP 在保护宿主细胞、抑制补体活化过程中的协同效应, 在细胞水平证实 DAF 和 MCP 这对组合克服超急性排斥反应的可行性, 为异种器官移植研究提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

重组表达载体 pcDNA3-DAF 和 pcDNA3-MCP

为本室构建及保存, *E.coli* DH5 α 为本室保存, 小鼠成纤维细胞 NIH3T3 来源于中国典型培养物保藏中心(CCTCC, 武汉); 限制性内切酶 *Bgl* II、*Xho* I 及牛小肠碱性去磷酸化酶(CIAP)均购自 TaKaRa 公司; DNA 酶 I(DNase I, RNase free)、Taq 酶、T4 连接酶购自 Promega 公司; 核酸分子量标准 GeneRulerTM 1 kb DNA Ladder 为 MBI 产品; DMEM 培养基、G418 及 RNA 分离试剂 Trizol 购自 Gibco 公司; CD46 鼠源单克隆抗体 E4.3 购自 Antibody Diagnostica Inc. DAF 鼠单克隆抗体 BRIC 216 购自英国 IBGRL; 辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG(H+L)二抗购自武汉凌飞科技技术有限公司; 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 双基因重组真核表达载体 pcDNA3-DAFMCP-DP 的构建

1.2.1 引物设计和合成

根据 GenBank 已报道的人 MCP、DAF cDNA 和 pcDNA3 序列分别设计所需的引物序列。DAF (DAF-3) 引物序列: 5 端引物序列(DAF-3U): 5'-CGCCTCGAGCGTCCTTGTTCTAACCCG-3', 3 端引物序列(DAF-3D): 5'-ACTGGGCCCCCTGCTCTGTGACATTCC-3' 下划线部分分别为 *Xho* I 和 *Apa* I 酶切位点; MCP 的 5 端引物序列: 5'-CATATGACAGCGTCTTCCGC-3', 3 端引物序列: 5'-CAGCTGCATTTCATGAGAGTG-3' (下划线部分为 *Pvu* II 酶切位点); 扩增含 CMV 启动子、人 MCP cDNA 及 BGH polyA 片段的一对引物 CD-2: 5 端引物为: 5'-CCG-AGATCTGAATCTGCTTAGGGTTAGG-3', 3 端引物为: 5'-GGGAGATCTTAATGCGCCGCTAC-3', 两条引物分别引入一个 *Bgl* II 酶切位点(下划线标出)。引物由上海生工生物有限公司合成。

1.2.2 重组表达载体 pcDNA3-DAFMCP-DP 的构建及鉴定

以 pcDNA3-MCP 载体为模板, 用 CD-2 引物进行 PCR 特异扩增含 CMV 启动子、人 MCP cDNA 及 BGH polyA 的目的片段。扩增条件为: 于 95°C 预变

性 5 min后, 按 95°C 45 s, 62°C 1 min, 72°C 2 min 的程序共循环 30 次, 最后 72°C 延伸 7 min。用 PCR 回收试剂盒纯化该产物, 然后 *Bgl* II 酶切, 将含 CMV 启动子、人 MCP cDNA 及 BGH polyA 的 2448 bp 纯化的片段, 亚克隆至以 *Bgl* II 线性化且去磷酸化的 pcDNA3-DAF 载体, 获得 pcDNA3-DAFMCP 重组子, 转化大肠杆菌 DH5 α , 含氨苄青霉素 LB 平板筛选转化子。以 PCR 方法和 *Bgl* II 单酶切筛选阳性重组子 pcDNA3-DAFMCP, *Xho* I 酶切鉴定目的片段插入方向, 筛选反向插入的重组质粒(*trans*), 测序验证。提取重组质粒备用。

1.3 转染及筛选建立稳定转染细胞株

NIH3T3 细胞在含 10% 小牛血清的 DMEM 中培养。转染前 24 小时, 用胰蛋白酶进行消化以便收获对数期生长的细胞, 以 $1 \times 10^5 \sim 2 \times 10^5$ 细胞/cm² 的密度重新种入 60 mm 组织培养皿中, 在设定 37°C, 5%~7% CO₂ 及一定湿度的培养箱中培养细胞生长至 70% 融合, 参照文献[9]将纯化的各组质粒 DNA 转染细胞, 经 400 μ g/mL 的 G418 连续筛选以得到稳定转染的细胞株。

1.4 PCR 检测外源基因的整合

参照文献[9]提取转染细胞 NIH3T3 pcDNA3-DAFMCP-DP、NIH3T3 pcDNA3 及正常 NIH3T3 的基因组 DNA 并以之为模板, 用 DAF 和 MCP 引物分别进行 PCR 扩增。MCP PCR 反应程序如下: 95°C 预变性 5 min 后, 按 95°C 45 s, 56°C 45 s, 72°C 90 s 的程序循环 30 次后, 最后 72°C 延伸 7 min。DAF PCR 反应程序如下: 95°C 预变性 5 min 后, 按 95°C 45 s, 66°C 60 s, 72°C 120 s 的程序循环 30 次后, 最后 72°C 延伸 7 min。反应结束后, 电泳检测 PCR 产物。

1.5 人 DAF 和 MCP 在 NIH3T3 pcDNA3-DAFMCP-DP 细胞中共表达的检测

分别提取 pcDNA3DAFMCP-DP 和 pcDNA3 转化的 NIH3T3 细胞总 RNA, 37°C DNase I 消化除去总 RNA 中可能的基因组 DNA。以 Oligo dT 为引物进行逆转录, 并取 0.5 μ g 逆转录产物为模板, 分别对人 DAF 和 MCP 按以上 PCR 反应程序进行扩增。

用单去污剂提取液提取 pcDNA3 和 pcDNA3-DAFMCP-DP 转化的 NIH3T3 细胞总蛋白用于 Western blot 印迹, 具体方法参照文献[9]。

1.6 补体依赖的细胞毒反应

将新鲜的正常人血清梯度稀释, 与 pcDNA3-DAFMCP-DP 转染细胞和对照细胞分别于 37°C 孵育 1 h, 间或振荡, 防止细胞沉积。反应完毕, 用 2% 台盼蓝染色, 检测细胞活力。细胞存活率计算公式如下:

细胞存活率(%) = 活细胞总数/活细胞总数 + 死细胞总数 $\times 100\%$ 。

每个浓度血清梯度重复三孔, 对照组用缓冲液取代人血清。

2 结果

2.1 重组真核表达载体 pcDNA3-DAFMCP-DP 的鉴定

重组表达载体 pcDNA3-DAFMCP-DP 的构建如图 1 所示。用 PCR 方法及 *Bgl* II 酶切鉴定 MCP 基

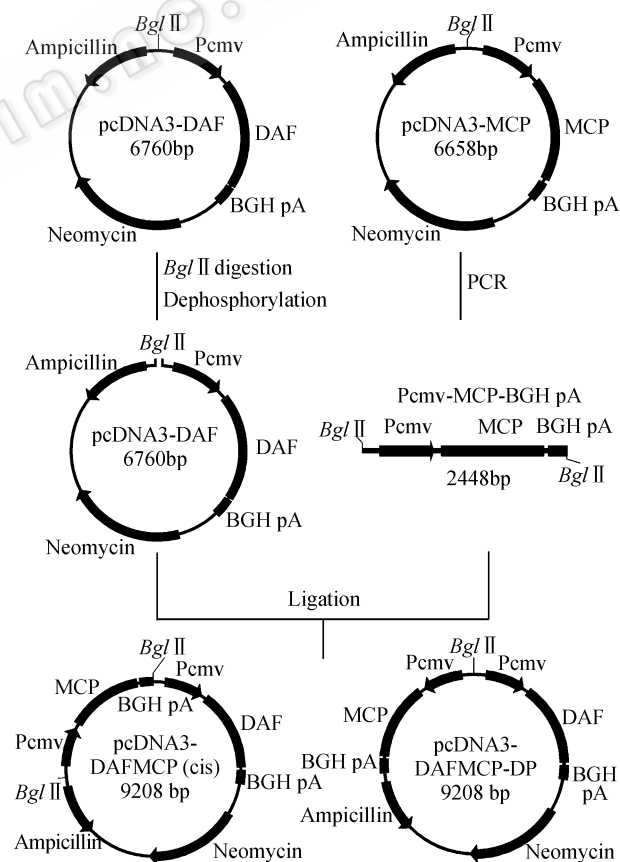


图 1 重组表达载体 pcDNA3-DAFMCP-DP 的构建示意图

Fig. 1 Construction of the expression vector pcDNA3-DAFMCP-DP

因的插入, 挑选阳性克隆, *Xho* I 酶切鉴定含 CMV 启动子、人 MCP cDNA 及 BGHpolyA 的 2448 bp 目的片段的中插入方向。同向插入的重组质粒 pcDNA3-DAFMCP(*cis*)经 *Xho* I 酶切后得到 1214 bp 和 7994 bp 的片段, 反向插入的重组质粒 pcDNA3-DAFMCP(*trans*)经 *Xho* I 酶切后得到 3108 bp 和 6100 bp 的片段, 结果见图 2。序列测定结果证实读框正确, 载体构建成功。将目的片段 MCP 反向插入的载体命名为 pcDNA3-DAFMCP-DP。

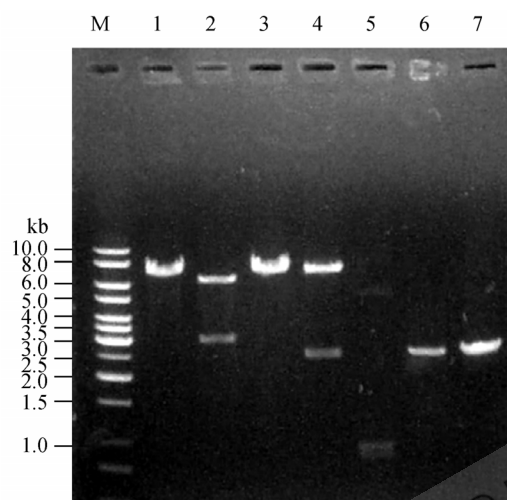


图 2 重组表达载体 pcDNA3-DAFMCP-DP 的 PCR 和酶切鉴定

Fig. 2 Plasmid pcDNA3-DAFMCP-DP was identified by PCR and restriction enzyme

M: 1 Kb DNA Ladder marker; 1: pcDNA3-DAF/*Xho* I; 2: pcDNA3-DAFMCP-DP/*Xho* I; 3: pcDNA3-DAF/*Bgl* II; 4: pcDNA3-DAFMCP-DP/*Bgl* II; 5: pcDNA3-DAF/CD-2 (negative control); 6: pcDNA3-DAFMCP-DP/CD-2; 7: pcDNA3-MCP/CD-2 (positive control)

2.2 人 DAF 和 MCP cDNA 在转化的 NIH3T3 细胞基因组上的稳定整合

为确保人 DAF 和 MCP 在转化细胞基因组水平上的整合, 提取转化细胞的染色体 DNA 并以之为模板进行 PCR 扩增。结果显示: DAF 和 MCP 引物在 NIH3T3 pcDNA3 和 NIH3T3 细胞的基因组中均未扩出 DAF 或 MCP 片段, 而在 pcDNA3-DAFMCP-DP 转染的 NIH3T3 细胞基因组 DNA 中扩增出 1336 bp 的 DAF 和 1233 bp 的 MCP 片段, 与以质粒 pcDNA3-DAFMCP-DP 为模板扩出的条带完全一致(图 3)。在 DNA 水平证实人 DAF 和 MCP cDNA 已整合到 NIH3T3 细胞基因组 DNA 中。PCR 检测连续传代 30 次的 NIH3T3 pcDNA3-DAFMCP-DP 结果表明人 DAF 和 MCP 基因仍稳定整合在细胞基因组中, 并未随着

传代而丢失, 为稳定的转双基因细胞系(图片略)。

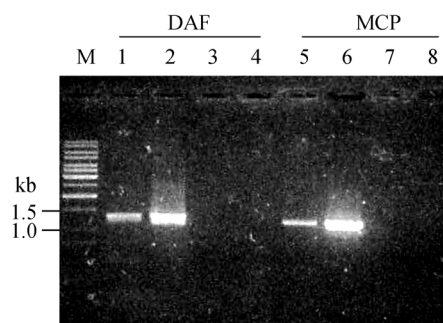


图 3 PCR 鉴定人 DAF 与 MCP cDNA 在转化细胞基因组 DNA 上的整合

Fig. 3 PCR analysis of the integration of DAF and MCP genes on the stable transfected NIH3T3 cells

The primers of the DAF gene were used in lanes 1-4 and the primers of MCP gene were used in lanes 5-8. Templates: Lanes 1, 5: high-molecular-mass DNA of NIH3T3 pcDNA3-DAFMCP-DP; lanes 2, 6: DNA of plasmid pcDNA3-DAFMCP-DP; lanes 3, 7: high-molecular-mass DNA of NIH3T3 pcDNA3 cells; lanes 4, 8: high-molecular-mass DNA of NIH3T3 cells; lanes M: 1 kb DNA ladder marker

2.3 人 DAF 和 MCP 在 pcDNA3-DAFMCP-DP 转染细胞中的共表达

RT-PCR 检测显示人 DAF 和 MCP 在稳定转染细胞株 NIH3T3 pcDNA3-DAFMCP-DP 的 mRNA 水平上得到有效共表达(图 4)。

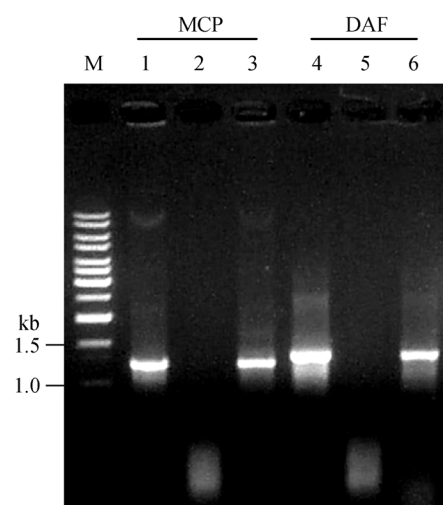


图 4 RT-PCR 鉴定人 DAF 和 MCP 在 NIH3T3 pcDNA3-DAFMCP-DP 细胞中 mRNA 水平上的共表达
Fig. 4 RT-PCR analysis of MCP and DAF genes reveals the co-expression in stably transfected NIH3T3 cells

The primers for the MCP gene were used in lanes 1-3 and the primers for DAF gene was used in lanes 4-6. Templates: 1, 4: DNA of the plasmid pcDNA3-DAFMCP-DP as positive controls; 2, 5: cDNA of NIH3T3 pcDNA3 transfectants; 3, 6: cDNA of NIH3T3 pcDNA3-DAFMCP-DP transfectants; M: 1 kb DNA ladder marker

Western blot 印迹结果显示(图 5), NIH3T3 pcDNA3-DAFMCP-DP 转染细胞总蛋白样品检测到入 DAF 和 MCP 的特异条带, 其中人 DAF 的相对大小约 70 kD, 人 MCP 蛋白质主要表现出 68 kD 的上带和较弱的 45 kD 的下带, 与文献报道一致^[3,4], 而 NIH3T3 pcDNA3 对照组全蛋白无特异性条带。这表明人补体调节蛋白 DAF 和 MCP 在 pcDNA3-DAFMCP-DP 转化的 NIH3T3 细胞中以独立的形式得到同步表达。

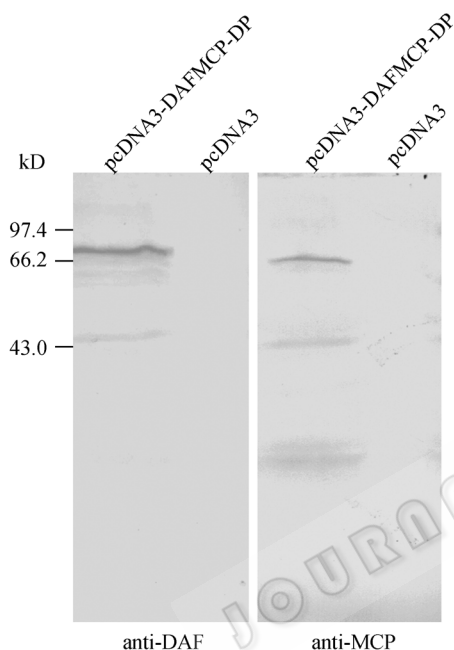


图 5 Western 印迹检测人补体调节蛋白 DAF 和 MCP 在转化细胞 NIH3T3 pcDNA3-DAFMCP-DP 中的共表达

Fig. 5 Western blot analysis confirms the co-expression of DAF and MCP in NIH3T3 pcDNA3-DAFMCP-DP transfectants

Extracts of NIH3T3 pcDNA3-DAFMCP-DP and pcDNA3 transfectants were electrophoresed by SDS-PAGE on a 10% gel and blotted onto nitrocellulose membrane. Blots were probed with monoclonal anti-DAF or anti-MCP antibodies and horseradish peroxidase (HRP)-linked secondary antibody

2.4 pcDNA3-DAFMCP-DP 转染细胞能有效抑制补体依赖的细胞毒反应

梯度稀释新鲜的正常人血清, 分别作用于 pcDNA3 转化的 NIH3T3 细胞、pcDNA3-MCP 转化的 NIH3T3 细胞、pcDNA3-DAF 转化的 NIH3T3 细胞和 pcDNA3-DAFMCP-DP 转化的 NIH3T3 细胞, 除对照 NIH3T3 pcDNA3 细胞发生补体依赖的细胞毒反应, 另三种转化细胞均能有效抑制细胞毒反应

的发生, 细胞存活率并不因血清浓度的增加而明显下降, 如图 6 所示。当血清浓度为 100% 时, NIH/3T3 pcDNA3-MCP、NIH/3T3 pcDNA3-DAF 和 NIH/3T3 pcDNA3-DAFMCP-DP 相对于 NIH/3T3 pcDNA3 对照细胞分别表现出 31%、36% 和 60% 的抑制率。MTT 法也得到相似的结果。以上结果说明转化细胞所表达的补体调节蛋白 DAF 和 MCP 具有同源限制作用, 能够保护转化细胞使之免受人补体的溶破作用, 而且 DAF 和 MCP 双基因的共同作用能提供更全面的协同保护作用, 能更有效地阻止补体激活造成的细胞损伤。

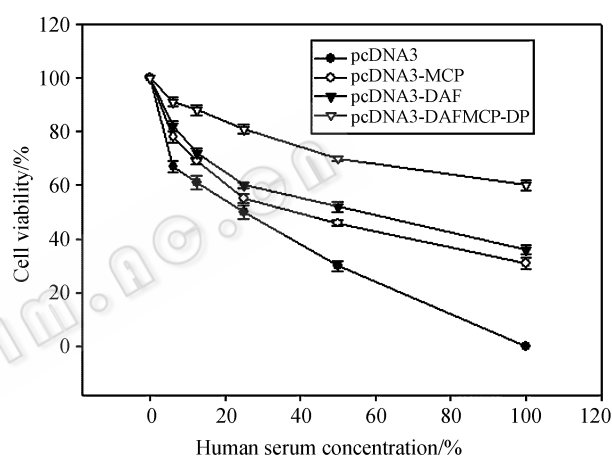


图 6 共表达的人 DAF 和 MCP 有效保护宿主细胞, 抑制人补体激活的细胞毒反应发生

Fig. 6 Co-expression of human DAF and MCP fully protects NIH3T3 cells from C-mediated damage

3 讨论

联合应用多种不同的补体调节蛋白, 利用补体分子不同的作用机理, 实现全面地抑制补体的激活, 是目前用于克服超急性排斥反应的主要方案之一^[7,8,10]。

为了获得既有 I 因子的辅因子活性, 又有衰变加速活性的分子。Iwata^[11]等构建了膜结合形式的 MCP-DAF 嵌合体并且将其成功表达于 CHO 细胞上; Miyagawa 等^[12]在体外转染的猪内皮细胞上完成了同样的实验, 这些研究表明 MCP-DAF 嵌合体的双功能性和补体抑制活性。Higgins 等^[7]构建了一种可溶性的 MCP-DAF 嵌合体 (CAB-2), 并证明它拥有 I 因子的辅因子活性和衰变加速活性, 可作为补体激活

阻断剂。CAB-2 嵌合体在老鼠体内的半衰期约为 8 小时, 适合于人类的基因治疗。然而, CAB-2 由于它的这些不同于原来两种天然构型的融合分子有可能产生新的表位抗原, 可能激发免疫应答反应, 其潜在的免疫源性将在一定程度上限制它们在人的基因治疗中的应用。通过转单基因动物交配、共转染或显微共注射多种质粒获得转多种不同人补体调节蛋白基因动物(细胞)是目前常用方法^[8,11,13], 但是存在筛选周期长, 投入大, 成本高的局限性。

以恒定的比例表达不同目的基因, 为多基因的共同作用提供有利的条件且缩短筛选时间的多顺反子表达载体在联合基因治疗已有相关报道^[14]。但利用重组表达载体同步、独立表达天然构型的不同人补体调节蛋白的相关报道少见。本研究中, 我们构建了启动子头-尾相接(*trans*)的重组载体, 克服了因启动子抑制引起的基因表达下调, 实现了具生物活性的人补体调节蛋白 DAF 和 MCP 的高效共表达, 而且, 双基因保护能力明显优于单基因, 具有一定的协同效应, 能更有效地保护宿主细胞免受人补体的攻击。研究结果预示该载体为实现多种人补体调节蛋白的高效转移, 进一步探讨人补体调节蛋白间的协同作用, 生产适于器官移植的供体猪, 加快异种器官移植的临床实验进程, 改善器官短缺的现状提供了有效的手段。

REFERENCES

- [1] Makrides SC. Therapeutic inhibition of the complement system. *Pharmacol Rev*, 1998, **50**: 59–87.
- [2] Mollnes TE, Fiane AE. Role of complement in xenotransplantation. *Allergy*, 2002, **72**: 75–78.
- [3] Seya T, Turner JR, Atkinson JP. Purification and characterization of a membrane protein (gp45-70) that is cofactor for cleavage of C3b and C4b. *J Exp Med*, 1986, **163**: 837–855.
- [4] Medof ME, Kinoshita T, Nussenzweig V. Inhibition of complement activation on the surface of cells after incorporation of decay accelerating factor (DAF) into their membranes. *J Exp Med*, 1984, **160**: 1558–1578.
- [5] Brodbeck WG, Kuttner-Kondo L, Mold C, and Medof ME. Structure/function studies of human decay accelerating factor. *Immunology*, 2000, **101**: 104–111.
- [6] Huang J, Gou DM, Zhen CY, Jiang DH, Mao X, Li WX, Chen S, and Cai CC. Protection of xenogeneic cells from human complement-mediated lysis by the expression of human DAF, CD59 and MCP. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2001, **31**: 203–209.
- [7] Higgins PJ, Ko JL, Lobell R, Sardonini C, Alessi MK, and Yeh CG. A soluble chimeric complement inhibitory protein that possesses both decay-accelerating and factor I cofactor activities. *J Immunol*, 1997, **158**: 2872–2881.
- [8] Nagahama M, Shiraishi M, Oshiro T, Taira K, Sugawa H, Nozato E, Nomura H, Nagamine M, and Muto Y. Adenovirus-mediated gene transfer of triple human complement regulating proteins (DAF, MCP and CD59) in the xenogeneic porcine-to-human transplantation model. *Transpl Int*, 2002, **15**: 205–219.
- [9] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd eds, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [10] Xu L, Wu WL, Zhao ZZ, Shao HJ, Liu WH, Liu H and Li WX. Cooperation between human DAF and CD59 in protecting cells from human complement-mediated lysis. *J Biochem Mol Biol*, 2006, **39**(6): 743–748.
- [11] Iwata K, Seya T, Ariga H, and Nagasawa S. Expression of a hybrid complement regulatory protein, membrane cofactor protein decay accelerating factor on Chinese Hamster Ovary. *J Immunol*, 1994, **152**: 3436–3444.
- [12] Miyagawa S, Shirakura R, Izutani H, Matsumiya G, Nakata S, Matsuda H, Iwata K, Nagasawa S, Terado A, Matsumoto M, and Seya T. Effect of transfectant molecules, MCP, DAF and MCP/DAF hybrid on xenogeneic vascular endothelium. *Transplant Proc*, 1994, **26**: 1253–1254.
- [13] Menoret S, Plat M, Blancho G, Martinat-Butte F, Bernard P, Karam G, Tesson L, Renaudin K, Guillouet P, Weill B, Chereau C, Houdebine LM, Soullillou JP, Terqui M, and Anegon I. Characterization of human CD55 and CD59 transgenic pigs and kidney xenotransplantation in the pig-to-baboon combination. *Transplantation*, 2004, **77**: 1468–1471.
- [14] Overell RW, Weisser KE, Cosman D. Stably transmitted triple-promoter retroviral vectors and their use in transfection of primary mammalian cells. *Mol Cell Biol*, 1988, **8**(4): 1803–1808.