文章编号:1000-5404(2005)08-0691-03

论著

野生型及突变型 *survivin* 基因重组逆转录病毒的构建及表达研究

杨晓亚[1],宋建勋[2],白 云[1] (第三军医大学基础医学部:[1]分子遗传学教研室,[2]全军免疫学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 构建含绿色荧光蛋白和野生型及第 34 位氨基酸突变型 *survivin* 基因的双顺反子逆转录病毒载体,并进行真核细胞表达。**方法** 用 PCR 的方法由含 *survivin* 基因的真核表达载体扩增所需目的片段,然后将该片段插入逆转录病毒载体 pMIG。酶切鉴定重组子,脂质体介导下转染包装细胞 Phoenix E,病毒上清感染 NIH3T3 细胞,RT-PCR 检测外源基因 mRNA 的表达、流式细胞仪检测 GFP 的表达从而确认外源基因的转录。**结果** 经琼脂糖凝胶电泳鉴定,目的片段成功的连接到 pMIG 载体上。载体转染 NIH3T3 细胞,RT-PCR 显示目的片段 mRNA 能够表达,流式细胞仪检测 GFP 获良好的表达。**结论** 成功构建了人 *survivin* 基因野生型及突变型逆转录病毒,并在 NIH3T3 细胞进行了表达,为下一步的研究工作提供了有效的分子工具,并且为将来能在体内应用抑制 *survivin* 基因表达的肿瘤治疗奠定基础。

关键词: *survivin* 基因;野生型;突变型;逆转录病毒载体
中图法分类号: R373; R394-33; R394.3 **文献标识码**: A

Construction and expression of wildtype and T34A mutant survivin retrovirus

YANG Xiao-ya[1], SONG Jian-xun[2], BAI Yun[1] ([1]Department of Molecular Genetics, [2]Institute of Immunology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To construct the bicistronic retroviral vectors containing GFP gene and human survivin gene(wildtype and T34A mutant). **Methods** Survivin fragments were amplified from eukaryotic expression vectors by PCR, then cloned into pMIG retroviral vectors. The constructed recombinant was identified by double digestion with restriction enzymes. The constructed retroviral vectors was transfected into Phoenix E package cells under mediation of liposome. The expression of mRNA was examined by RT-PCR and the transcription of gene was determined by FACS analysis of GFP. **Results** The target fragments were successfully bound to pMIG vector. After the vectors were transfected into NIH3T3 cells, the expression of mRNA was confirmed by RT-PCR and the expression of GFP was confirmed by FACS analysis. **Conclusion** Human survivin gene wildtype and T34A mutant retroviral vectors have been constructed successfully, which can provide strong molecular tools for further studies and a novel approach for selective cancer gene therapy.

Key words: *survivin* gene; wildtype; mutant; retroviral vector

SURVIVIN 是一个分子量为 16.5×10^3 的凋亡抑制蛋白(inhibiting apoptosis proteins, IAP),又名凋亡抑制蛋白 4(API4)和 TIAP,其在体内的主要功能是抑制细胞凋亡,另外还可以调节 G_2/M 期的细胞周期,促进细胞分裂[1,2]。SURVIVIN 前体蛋白需要在 P34cdc2 激酶作用下,磷酸化第 34 位的苏氨酸(Thr34)才能发挥作用。

SURVIVIN 蛋白几乎在所有肿瘤中均有分布,以 SURVIVIN 蛋白为靶点的拮抗分子纷纷研究出来,T34A 是其中最具代表性的,此突变体破坏了 SURVIVIN 蛋白与 P34cdc2 激酶的作用位点,使蛋白失去正常功能。本实验利用 *survivin* 基因及其突变基因片段构建含有绿色荧光蛋白的逆转录病毒载体,为下一步的研究工作提供了有效的分子工具,并且为将来能在体内应用抑制 *survivin* 基因表达的肿瘤治疗奠定基础,为开辟抗肿瘤治疗的新途径和寻找新的抗肿瘤药物提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

DH5α 细菌由本室保存;含野生及突变型 *survivin* 基因的真核表达载体由 Li Fengzhi 教授(Yale University School of Medicine)惠赠。Phoenix E 包装细胞系由 Nolan G 教授(Stanford University)惠赠。NIH3T3 细胞由本室保存。

1.2 主要试剂

限制性内切酶 *Eco*R Ⅰ、*Bam*H Ⅰ、*Hind* Ⅲ、*Bgl* Ⅱ, *Xho* Ⅰ 购

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30200253)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30200253)
作者简介:杨晓亚(1979-),女,河北省石家庄市人,硕士研究生,主要从事 T 细胞功能方面的研究。电话:(023)68753670
通讯作者:白 云,电话:(023)68752224,E-mail:geneby@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2004-09-02;修回日期:2004-11-23

自 NEB 公司,T4DNA 连接酶购自 Invitrogen 公司;质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒、DOTAP 转染试剂盒、Tripure 试剂均购自 Roche 公司,Polybrene(聚凝胺)试剂购自 Sigma 公司,RT-PCR 试剂购自 Promega 公司。

1.3 逆转录病毒载体的构建及鉴定

1.3.1 pMIG 载体 pMIG 载体含 GFP 序列以利于检测表达蛋白,另外含 IRES 序列,故目的蛋白和 GFP 蛋白是由同一个双顺反子 mRNA 翻译而来。PMIG 载体具有较好的稳定性、高表达性及易检测性,pMIG 载体结构为:



1.3.2 PCR 扩增 *survivin* 基因片段 设计一对引物加入新的酶切位点,5′端加入 *Bgl* Ⅱ,3′端加入 *Xho* Ⅰ,引物序列:上游引物为 5′-TAG ATC TCT ATG GGT GCC C-3′,下游引物为5′-CGC-TCG AGC TAG TTA GGT A-3′。以含两种目的基因的真核表达载体分别作为模板进行 PCR 反应,反应参数为:94 ℃预变性 10 min,94 ℃变性 30 s,56 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 30 s,3 步组成 35 个循环,最后 72 ℃延伸 10 min。PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.3.3 pMIG 载体的双酶切、纯化 将 pMIG 载体用 *Bgl* Ⅱ, *Xho* Ⅰ双酶切,可以切除约 6 bp 的小片断。酶切产物经 0.8% 琼脂糖电泳分离,而后按凝胶回收试剂盒说明对大片段进行回收、纯化。回收产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定纯度。

1.3.4 DNA 重组连接 取目的片段 6 μl,酶切回收后 pMIG 载体 0.5 μl,去离子水 1.5 μl 混合,在 45 ℃条件下 5 min 解链,迅速冰浴至 0 ℃ 2 ~ 3 min,而后加入 T4DNA 连接酶 1 μl,T4 DNA 连接酶缓冲液 1 μl,在 16 ℃条件下连接 16 h。

1.3.5 重组质粒的细菌转化扩增 $CaCl_2$ 法常规制备 DH5α 细菌感受态,取 5 μl 重组质粒转化感受态,扩增后试剂盒抽提大量质粒,为下一步实验做好准备。

1.3.6 重组质粒的酶切鉴定 重组质粒用 *Bgl* Ⅱ, *Xho* Ⅰ酶切后,进行琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.4 病毒包装及检测

1.4.1 病毒包装 按照 DOTAP 脂质体说明书将逆转录病毒载体转染入 Phoenix E 包装细胞,3 d 后收集病毒上清,用含 8 μg/ml polybrene 的病毒上清感染 NIH3T3 细胞,以空载体 pMIG 作为对照,第 2 天重新感染 1 次,从第 3 天开始检测。

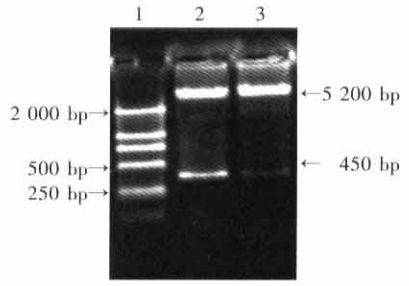
1.4.2 RT-PCR 检测目的基因表达 收集感染后的 NIH3T3 细胞,按照 Tripure 试剂说明书抽提总 RNA,进行反转录。所得 cDNA 取 2.5 μl 进行 PCR,引物序列:上游引物:5′-GCA TGG GTG CCCCGA CGT TG-3′,下游引物:5′-GCT CCG GCCAGA GGC CTC AA-3′。PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。未转染 NIH3T3 细胞作为对照。

1.4.3 流式细胞仪检测 GFP 表达 收集病毒上清感染后的 NIH3T3 细胞,PBS 洗 3 次后流式细胞仪检测绿色荧光蛋白表达情况,未转染 NIH3T3 细胞作为对照。

2 结果

2.1 含 *survivin* 片段真核表达载体的酶切鉴定

野生型 *survivin* 基因(450 bp)位于载体的 *Eco*R Ⅰ、*Bam*H Ⅰ酶切位点之间,T34A 突变型 *survivin* 基因(450 bp)位于 *Hind* Ⅲ、*Eco*R Ⅰ多克隆位点。将两载体分别用相应的酶切以后,各形成 5 200 bp 和 450 bp 两条带,见图 1。



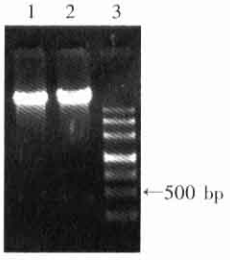
1: DL2000 marker; 2: Survivin (widetype)/*Eco*R Ⅰ + *Bam*H Ⅰ; 3: Survivin (T34A)/*Eco*R Ⅰ + *Hind* Ⅲ

图 1 含 Survivin 片段真核表达载体的酶切鉴定

Fig 1 Identification of eukaryotic expression vectors with restriction enzymes digestion

2.2 重组质粒的酶切鉴定

重组质粒用 *Bgl* Ⅱ, *Xho* Ⅰ酶切后释放出大约 450 bp 的片段,提示目的片段成功插入载体中,见图 2。



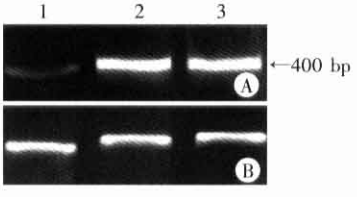
1: pMIG-survivin-wt/*Bgl* Ⅱ + *Xho* Ⅰ; 2: pMIG-survivin-T34A/*Bgl* Ⅱ + *Xho* Ⅰ; 3: DNA Marker Ⅲ

图 2 重组质粒的酶切鉴定

Fig 2 Identification of recombinant plasmid with double restriction enzymes digestion

2.3 RT-PCR 结果

转染后细胞的总 RNA,经特异 *survivin* 引物 RT-PCR 扩增后,可见大小约 400 bp 的特异性扩增产物。与未转染细胞比较,条带明显变亮,见图 3,显示目的片段 mRNA 成功表达。



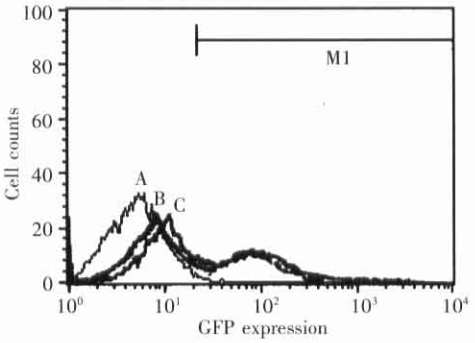
A: Survivin; B: β-actin; 1: Untransfected cells; 2: Cells transfected with wt-survivin-pMIG; 3: Cells transfected with T34A-survivin-pMIG

图 3 转染后细胞 RT-PCR 扩增 survivin 凝胶电泳结果

Fig 3 RT-PCR analysis of survivin expression in the transfected cells

2.4　流式细胞仪检测 GFP 的表达

收集病毒上清感染后的 NIH3T3 细胞，PBS 洗 3 次后流式细胞仪检测绿色荧光蛋白表达情况。与未转染的 3T3 细胞相比，荧光强度明显增加，GFP 阳性细胞可达 30%，见图 4，显示转染后的细胞成功表达 GFP 蛋白。



A: Control; B: pMIG-survivin vector; C: pMIG-T34A-survivin vector

图 4　转染后流式细胞仪检测 GFP 结果

Fig 4　FACS analysis of GFP expression in the transfected cells

3　讨论

Survivin 基因是由 Ambrosini 等[3]用效应细胞蛋白酶受体-1(effector cell protease receptor-1, EPR-1)cDNA 作探针从人类基因组文库中通过杂交筛选获得的。与其它凋亡抑制蛋白(IAP)相比，survivin 在结构和表达上都有其自身的特点，是迄今发现的最强的凋亡抑制因子[4]。SURVIVIN 第 34 位苏氨酸的磷酸化对维持 *survivin* 的凋亡抑制功能非常重要[5]，以丙氨酸取代后的突变体(T34A)竞争性抑制内源性 *survivin* 的磷酸化，以一种优势抑制(dominant negative)的方式作为野生型 SURVIVIN 蛋白的拮抗分子发挥作用[6]。*survivin* 特异性表达于人类各种肿瘤组织，正常组织表达量很少或不表达[7]。靶向 *survivin* 的抗肿瘤治疗能促进肿瘤细胞的凋亡并抑制其增殖，而正常组织不受影响[8]。

本实验构建了一个更有应用价值的载体，从而能够更深入的研究 *survivin* 的功能，为在临床上早日应用针对 *survivin* 的抗肿瘤基因治疗打下基础。选用的载体 pMIG 是由 MSCV2.2 载体优化而来的逆转录病毒载体，它将绿色荧光蛋白(GFP)与核糖体结合位点(IRES)相连，再将此连接体克隆到 MSCV 2.2 载体的 *Eco*RⅠ和 *Sal*Ⅰ位点，代替原载体上的新霉素抗性基因(*neo* 基因)[9]。选用 pMIG 载体主要考虑两方面因素：①pMIG 含绿色荧光蛋白。*survivin* 为胞内表达的分子，它不同于胞膜蛋白，可以用针对靶蛋白的抗体用免疫组化或是流式细胞仪方便而直观的检测到，胞浆蛋白的检测受到细胞膜的通透性，抗体穿膜的效率等很多因素的限制很难取得预期的实验结果，而含绿色荧光蛋白报告基因载体的应用则会使这些问题迎刃而解。②逆转录病毒载体介导的基因重组具有高效转移，高整合，高表达和宿主细胞范围广的优点，其感染分裂的靶细胞的效率可达 100%。对于将基因稳定而有效的转移到不容易被转染的靶细胞，逆转录病毒载体是很有用的。如对大多数原代细胞来说，体外很难长期培养，并且转染和筛选都较为困难，这就需要高效率的基因载体。在这类研究上逆转录病毒载体具有普通真核表达载体无法比拟的优势。故选用此载体作为我们的研究工具，具有很大的实用价值。

我们在本实验中自行设计一对引物，分别引入了 *Bgl*Ⅱ、*Xho*Ⅰ酶切位点，并添加了保护碱基，可扩增包括目的片段的全部序列，使目的片段正确插入载体，经酶切和序列分析证实重组质粒构建正确，无缺失、插入及移码等突变。载体转染 NIH3T3 细胞，RT-PCR 显示目的片段能够整合入细胞基因组，流式细胞仪检测 GFP 获良好的表达，充分反映 SURVIVIN 蛋白也能成功表达。综上所述，我们成功的构建了 *survivin* 基因以及突变体 *survivin*-T34A 的逆转录病毒载体，并在 NIH3T3 细胞成功表达，为下一步的研究工作提供了有效的分子工具，并且为将来能在体内应用针对 *survivin* 基因的肿瘤治疗打下基础，具有重要的实用意义。

参考文献：

[1] Hoffman W H, Biade S, Zilfou J T, *et al*. Transcriptional repression of the anti-apoptotic survivin gene by wild type p53[J]. J Biol Chem, 2002, 277(5): 3247 - 3257.

[2] Zhang T, Otevrel T, Gao Z, *et al*. Evidence that APC regulates survivin expression: a possible mechanism contributing to the stem cell origin of colon cancer[J]. Cancer Res, 2001, 61(24): 8664 - 8667.

[3] Ambrosini G, Adida C, Altieri D C. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma[J]. Nat Med, 1997, 3(8): 917 - 921.

[4] Altieri D C, Marchisio P C. Survivin apoptosis: an interloper between cell death and cell proliferation in cancer[J]. Lab Invest, 1999, 79(11): 1327 - 1333.

[5] O'Connor D S, Grossman D, Plescia J, *et al*. Regulation of apoptosis at cell division by p34cdc2 phosphorylation of survivin[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97 (24): 13103 - 13107.

[6] Verdecia M A, Huang H, Dutil E, *et al*. Structure of the human anti-apoptotic protein survivin reveals adimeric arrangement[J]. Nat Struct Biol, 2000, 7(7): 602 - 608.

[7] Ghattas I R, Sanes J R, Majors J E. The encephalomyocarditis virus internal ribosome entry site allows efficient coexpression of two genes from a recombinant provirus in cultured cells and in embryos[J]. Mol Cell Biol, 1991, 11(12): 5848 - 5859.

[8] Grossman D, Kim P J, Schechner J S, *et al*. Inhibition of melanoma tumor growth *in vivo* by survivin targeting[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98(2): 635 - 640.

[9] Hawley R G, Lieu F H, Fong A Z, *et al* Versatile retroviral vectors for potential use in gene therapy[J]. Gene Ther, 1994, 1(2): 136 - 138.

(编辑　汪勤俭)