文章编号:1000-5404(2008)17-1641-03

论著

survivin 蛋白的原核高效、可溶性表达及其抗体在恶性肿瘤早期诊断中的应用

吴素香[1],马 骢[2],郭建巍[2],黎卫平[1],孔路科[1],魏 杰[1] ([1]兰州大学医学院病理学教研室,兰州 730000;[2]海军总医院检验科,北京 100037)

摘 要:**目的** 实现重组 *survivin* 在大肠杆菌中的高效、可溶性表达,检测健康人和肿瘤患者血清中 anti-survivin 并探讨其在肿瘤早期诊断中的应用价值。**方法** 重组 PET32a-*survivin* 质粒转化 BL21 感受态细胞,IPTG 诱导表达 8 h 后对表达产物行溶菌酶处理、冻融及超声处理,SDS-PAGE 及 Western blot 鉴定后用镍离子金属螯合层析柱纯化。建立基于重组融合蛋白的 survivin 特异性抗体的检测方法,对 300 份健康血清、144 份肿瘤血清 anti-survivin 进行了检测,并将 anti-survivin 与肝癌、肠癌、胰腺癌、卵巢癌患者中 AFP、CEA、CA199、CA125 等肿瘤标志物进行了联合分析。**结果** 重组 survivin 融合蛋白在 BL21 中获得了高效、可溶性表达,表达量约占菌体总蛋白的 30%。建立了检测 survivin 抗体的间接 ELISA 方法,anti-survivin 在不同的肿瘤血清中均有表达,阳性率各不相同。**结论** 成功的实现了 survivin 蛋白在大肠杆菌中的高效、可溶性表达,结果提示在肿瘤的辅助诊断中,anti-survivin 与现有的肿瘤标志物 CA199、CEA、CA-199 和 CA-125 联合检测,可以互相补充其不足,提高肿瘤的诊断率。

关键词:生存素;生存素抗体;酶联免疫吸附实验;重组融合蛋白
中图法分类号:R341;R446;R730.43 **文献标识码**:A

Value of anti-survivin in early diagnosis of malignant tumors

WU Su-xiang[1], MA Cong[2], GUO Jian-wei[2], LI Wei-ping[1], KONG Lu-ke[1], WEI Jie[1] ([1]Department of Pathology, School of Medicine, Lanzhou University, Lanzhou 730000; [2]Department of Clinical Laboratory, Navy General Hospital, Beijing 100037, China)

Abstract: **Objective** To establish a soluble expression of recombinant survivin in *E. coli*, and evaluate the role of anti-survivin in tumor diagnosis. **Methods** The recombinant survivin was screened by ampicillin resistance, identified by PCR and double digestion of endonucleases. The sequenced DNA of survivin was analyzed by BLAST. The survivin/Trx fusion protein expressed in *E. coli* BL21 (DE3) was induced with IPTG, identified by Western blot and purified with Ni-NTA agarose respectively. The anti-survivin antibodies in serum were detected with an indirect ELISA. By the methods above, 144 serum samples from cancer patients and 300 serum samples from normal subjects were analyzed. Meanwhile, the joint detection of anti-survivin, AFP, CEA, CA199, CA125 in blood sera from cancer patients was detected. **Results** After PCR and double digestion with endonucleases, the survivin gene was inserted into the prokaryotic expression vector PET 32a(+). After DNA sequencing, the constructed expression plasmid was transformed into competent cells *E. coli* BL21 (DE3). Western blot identified that the recombinant survivin/Trx fusion protein was specific against survivin antibody. The purity of the protein was over 96% after purified by Ni-NTA agarose. Anti-survivin was expressed in the sera of different cancer patients, but the positive rate varied. **Conclusion** Prokaryotic expression plasmid PET 32a(+)/survivin was successfully constructed and highly purified survivin/Trx fusion protein was obtained. The detection results of anti-survivin, AFP, CEA, CA199, CA125 in blood serum show in the diagnosis of tumors, the joint detection can overcome the shortfall of each gene and enhance the diagnostic rate.

Key words: survivin; anti-survivin; ELISA; recombination fusion protein

凋亡是一个生理性的程序性细胞死亡过程,凋亡过程的紊乱,与肿瘤的发生有直接的关系。近年来,凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis proteins, IAP)家族成员在肿瘤发生、发展过程中的作用已受到了越来越多学者的广泛关注。survivin 是近年来发现的 IAP 家

作者简介:吴素香,女,河南省鹤壁市人,硕士,医师,主要从事肿瘤病理方面的研究。现在河南省漯河市中心医院病理科。E-mail:abcdewsx@126.com
通信作者:郭建巍,电话:(010)66958164,E-mail:jwkuo@sohu.com
收稿日期:2007-12-21;修回日期:2008-01-28

族新成员，由于其独特的蛋白和基因结构以及与EPR-1（effector cell protease receptor-1）的特殊关系、在肿瘤组织中的高选择性分布以及抗凋亡机制，已成为肿瘤研究的热点和前沿[1]。为了进一步探讨 survivin 在恶性肿瘤诊断、治疗及预后判断中的价值，我们实现了 survivin 在原核表达载体中的高效、可溶性表达，并对部分肿瘤患者血清进行了检测。

1 材料与方法

1.1 材料

重组质粒 PET32a-*survivin* 和 BL21 菌株均为本实验室保存，*Bam*H Ⅰ和 *Hind* Ⅲ、RNase Inhibitor 均购自 MBI 公司；羊抗兔二抗、兔抗人 survivin 的多克隆抗体、羊抗人 IgG（Santa Cruz 公司）；镍离子金属螯合层析柱（北京本元正阳基因有限公司）；增强型 HRP-DAB 底物显色试剂盒（北京天为时代科技有限公司）。其他试剂均为国产分析。研究对象均来自 2006 年 8 月至 2007 年 5 月兰州军区总医院检验科送检标本：肿瘤患者共 144 例，男性 76 例，女性 68 例，平均 46.5 岁，肝癌患者 37 例，胃癌患者 26 例，肠癌患者 23 例，胰腺癌患者 24 例，卵巢癌患者 34 例，所有患者均经病理学证实；正常对照组为体检健康者，共 300 例，男性 152 例，女性 148 例，平均 41.5 岁。空腹采集静脉血 3 ml，按常规方法分离血清，－80℃保存备用。血清 AFP、CEA、CA199、CA125 定量测定选用日本 ABBOT 公司 AXSYM system 测定法。

1.2 方法

1.2.1 重组质粒 pET32a（＋）-*survivin* 的鉴定、诱导表达及 survivin 蛋白的鉴定　将本实验室保存的 pET32a（＋）-survivin 转化到 BL21 感受态细胞，提取质粒做 *Bam*H Ⅰ和 *Hind* Ⅲ双酶切。将含 pET32a（＋）-*survivin* 基因的阳性克隆接种含 Amp 的 LB 培养液中，37 ℃度振荡培养过夜。次日按 1∶50 转接，至波长为 0.4 左右，12℃经 IPTG（终浓度 1 mmol/L）8 h 后进行 SDS-PAGE 电泳及 Western blot 鉴定。

1.2.2 融合蛋白的高效表达、纯化和临床标本的 ELISA 检测　将 1 000 ml 诱导后的菌液离心沉淀后进行溶菌酶反复冻融及超生破碎，用镍离子金属螯合层析柱常规法纯化后行 SDS-PAGE 电泳；用本实验室建立的 ELISA 方法[2] 检测肿瘤血清 anti-survivin，并与血清 AFP、CEA、CA199、CA125 作对比分析。

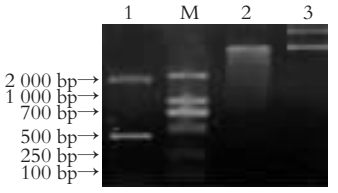
1.3 统计学处理

采用 SPSS 11.0 统计软件进行 χ^2 检验，出现小值频率时，采用 Fisher 精确概率法。

2 结果

2.1 重组质粒 pET32a（＋）-survivin 的鉴定

1.0 g/L 琼脂糖电泳显示重组质粒的酶切鉴定结果（图1），双酶切条带显示大小约 450 bp 的插入片段，与 *survivin* 基因相对分子质量大小一致。重组质粒测序后经 BLAST 比对与 GenBank 中所报 *survivin* 基因相一致，证实了重组质粒中 *survivin* 基因的正确性。

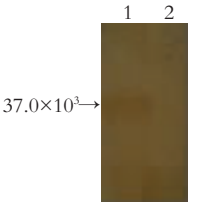


M：DNA 标准（DL 2000）；1：PET32/survivin 表达载体的 *Bam*H Ⅰ/*Hind* Ⅲ双酶切；2：PET32/survivin 表达载体的 *Hind* Ⅲ单酶切；3：PET32/survivin 重组质粒

图1 重组质粒酶切鉴定

2.2 重组蛋白在大肠杆菌中的高效表达

插入表达载体的大肠杆菌 BL21，经 IPTG 诱导后获得了 *survivin* 的高效、可溶性表达。目的蛋白约占菌体总蛋白量的 30%，SDS-PAGE 电泳显示，未诱导的重组载体在大肠杆菌中无明显蛋白表达，经诱导后表达的目的蛋白相对分子质量为 37×10^3，与预测融合蛋白表达的大小相符。利用兔抗人 survivin 的多克隆抗体对大肠杆菌表达产物进行 Western blot 分析，在 37.0×10^3 survivin 重组蛋白分子量处可见到特异性抗原、抗体反应条带（图2）。

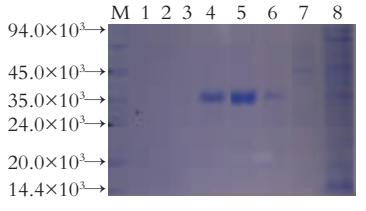


1：重组蛋白；2：阴性对照

图2 Western 印迹分析

2.3 金属螯合亲和层析方法纯化融合蛋白

纯化后蛋白 SDS-PAGE 电泳结果分析表明，平衡缓冲液已洗去了绝大部分的杂蛋白，50、100 及 200 mmol/L 咪唑溶液均洗脱出目的蛋白，只在 100 mmol/L 咪唑浓度洗脱下出现峰值，纯度很高，经灰度分析蛋白纯度达 96% 以上，蛋白浓度为 1.5 mg/ml，1 000 ml 菌液获得了 30 mg 目的蛋白（图3）。



1：蛋白标准；2－8：分别为 500、300、200、100、50、20、10 mmol/L 咪唑浓度下收集液

图3 重组蛋白的亲和纯化

2.4 标本血清 ELISA 检测结果

anti-survivin 在肿瘤血清中 47.92%，但在健康人血清中阳性率仅为 0.03%，二者比较，差异显著（$P<0.01$），具有统计学

意义。肝癌、肠癌、胃癌、胰腺癌、卵巢癌血清中 anti-survivin 的阳性率分别为 45.94%（17/37）、56.52%（13/23）、45.13%（12/26）、50.00%（12/24）、44.12%（15/34）。肝癌患者血清 anti-survivin 与 CA199（18.92%，7/37）比较，差异显著（P = 0.013）；肝癌患者血清中 anti-survivin 与 AFP（59.46%，22/37）和 CEA（37.04%，10/37）比较，差异不显著（P 值分别 0.091 和 0.244），说明肝癌血清 anti-survivin 与 CEA、CA199 检测结果无明显的差异（P > 0.05），anti-survivin 可以作为肝癌诊断的辅助指标。肠癌患者血清中 anti-survivin 与 CEA（47.83%，11/23）和 CA199（43.48%，10/23）比较，差异不显著（P 值分别为 0.376 和 0.555），说明肠癌的诊断中，anti-survivin 与 CA199 和 CEA 具有相同的诊断价值；胃癌患者血清中 anti-survivin 与 CEA（38.46%，10/26）和 CA199（61.54%，16/26）比较，差异不显著（P 值分别为 0.575 和 0.266），同样也说明在胃癌的诊断中，anti-survivin 与 CA199 和 CEA 具有相同的诊断价值；胰腺癌患者血清中 anti-survivin 与 CA199（100%，24/24）比较，差异不显著（P = 0.021）；卵巢癌患者血清中 anti-survivin 与 CA125（73.53%，25/34）比较，差异不显著（P = 0.014），说明在胰腺癌和卵巢癌的诊断中 anti-survivin 效果不及 CA199 和 CA125。

3　讨论

survivin 是 Altieri 等在 1997 年发现的活性很强的凋亡抑制蛋白，主要通过直接或间接抑制 Caspase-3、Caspase-7、Caspase-9 的活性来阻断细胞的凋亡过程。survivin 蛋白可广泛表达于人的胚胎组织和人类各种常见肿瘤组织，而在成人终末分化组织（除胸腺、生殖腺外）中罕见表达。

本实验选用带有 His 标签融合蛋白表达载体 PET-32a（+），其含 TrxA 基因，编码 109 个氨基酸的硫氧还蛋白，相对分子质量为 21.675×10^3，trx 在大肠杆菌细胞质中可溶性很高，具有固有的热稳定性，它会改变大肠杆菌胞质的氧化还原环境，参与了包括蛋白质二硫键的还原，硫酸盐的代谢等许多功能[3]，外源蛋白与硫氧还蛋白的融合表达有利于提高表达产物的稳定性，利用 NI^{2+}-NTA 树脂就可以很方便地将外源蛋白从细菌蛋白中分离并纯化。

用重组质粒 PET32-survivin 转化 BL21 表达菌后，通过对多个重组子克隆的筛选，选择出表达目的蛋白最高的克隆，同时应用不同的 IPTG 浓度及不同的时间诱导分析克隆子的表达量，发现 IPTG 浓度对 survivin 重组融合蛋白诱导表达影响不明显，用 0.25 mmol/L 的 IPTG 即可诱导重组融合蛋白的表达；通过不同诱导时间分析，发现细菌在 25 ℃的条件下，经过 3 h 就有目的蛋白表达，表达时间在 6 ~ 10 h 时，其蛋白表达处于稳定状态。

外源蛋白质在大肠杆菌中的高水平表达，常会形成相差显微镜下可见的细胞质颗粒或包涵体。有研究表明，选择融合表达系统以及适当控制生长条件可利于促进蛋白质的折叠而减少包涵体的形成[4]。低温时细菌生长缓慢溶氧水平高，不易导致缺氧状态，而且保持细胞内的氧化状态可以促进蛋白质二硫键的正确形成，本实验中我们选择了较低的诱导温度，获得了良好的效果。同时，较低的 IPTG 浓度也有利于降低胞内局部的蛋白质浓度，由于原核生物的转录与翻译是同时进行的，因此缓慢转录将使得翻译蛋白质有足够的条件正确折叠。因此，本实验采用低浓度 IPTG 及低温度诱导，使 survivin 融合蛋白得以稳定表达。

国外已将 survivin 用于肿瘤分子诊断。除了本实验室的一些前期研究工作外，国内未见对于肿瘤患者血清中 anti-survivin 抗体检测的报道。本研究通过对 300 份健康血清、144 份肿瘤血清中 anti-survivin 的检测、并将 anti-survivin 与肝癌、肠癌、胰腺癌、卵巢癌患者中 AFP、CEA、CA199、CA125 等肿瘤标志物进行了联合分析。结果提示肿瘤患者血清中 anti-survivin 阳性率高于正常人。在肝癌诊断中 anti-survivin 与 AFP 和 CEA 具有相同的诊断价值，优于 CA199；在胃癌和肠癌的诊断中，anti-survivin 与 CA199 和 CEA 具有相同的诊断价值；虽然在胰腺癌和卵巢癌中 anti-survivin 没有 CA-199 和 CA-125 特异性强，但检出率也分别达到了 50% 和 44.1%。本研究为 survivin 作为肿瘤标志物的深入研究和肿瘤早期诊断奠定了重要基础。同时也提示 anti-survivin 与其他肿瘤标志物联合检测，对肿瘤患者的治疗、预后判断、高危人群的筛选及肿瘤的早期诊断具有重要的指导意义。

参考文献：

[1] Harfouche R, Hassessian H M, Guo Y, *et al*. Mechanisms which mediate the antiapoptotic effects of angiopoietin-1 on endothelial cells[J]. Microvasc Res, 2002, 64(1): 135 - 147.

[2] 王小平，秦力维，郭建巍，等. 消化系统肿瘤新标志抗 survivin 抗体的临床应用[J]. 第四军医大学学报，2007，28(19)：1808 - 1810.

[3] LaVallie E R, Lu Z, Diblasio-Smith E A, *et al*. Thioredoxin as a fusion partner for production of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli* [J]. Methods Enzymol, 2000, 326: 322 - 340.

[4] Amann E, Brosius J, Ptashne M. Vectors bearing a hybrid trp-lac promoter useful for regulated expression of cloned genes in *Escherichia coli* [J]. Gene, 1983, 25(2 - 3): 167 - 178.

（编辑　王小寒）