论 著 文章编号:0253-3626(2008)11-1330-04

pEGFP-N1-Fcy::Fur重组质粒的构建及其在卵巢癌细胞中的表达

伍 霞,钟 玲,池余刚,蒋兴伟,王 勇
(重庆医科大学附属第二医院妇产科,重庆 400010)

【摘要】目的:构建携带融合型自杀基因Fcy::Fur的荧光真核表达质粒pEGFP-N1- Fcy::Fur,并观察其在卵巢癌细胞中的表达。方法:应用基因重组技术,将pORF-Fcy::Fur中的Fcy::Fur目的基因亚克隆到荧光真核表达载体pEGFP-N1,以酶切1和测序鉴定重组质粒的正确性。应用脂质体介导的转染技术将该质粒导入SKOV3细胞,24 h后观察绿色荧光蛋白(Green fluorescent protein, GFP)瞬时表达情况,用Western blot方法检测Fcy::Fur表达。结果:酶切和测序鉴定证实插入片段正确。细胞转染24 h后,荧光显微镜下观察到GFP表达,60%转染细胞发出绿色荧光。Western-blot检测到Fcy::Fur表达。结论:成功构建pEGFP-N1- Fcy::Fur荧光真核表达质粒,并可在卵巢癌细胞中有效表达,为卵巢癌基因治疗提供实验基础。

【关键词】自杀基因;Fcy::Fur;绿色荧光蛋白;基因转染;真核表达载体
【中图分类号】Q782;R322.6;R737.31 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-12-26

Construction of pEGFP-N1-Fcy::Fur recombinant plasmid and observation of its expression in ovarian cancer cells

WU Xia, et al
(*Department of Obstetrics and Gynecology, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*:To construct a EGFP (Enhanced green fluorescent protein)-labled euk-aryotic expression plasmid of Fcy::Fur suicide gene and to detect its expression in SKOV3 cell line. *Methods*:With the technology of gene re-arrangement,Fcy::Fur gene in pORF-Fcy:Fur plasmid was subcloned into pEGFP-N1 vector, with its correctness evaluated by the means of r-estriction enzyme analysis and sequencing.It was transfected into SKOV3 cells with lipofectin,the transient expression of GFP was observed under fluorescence microscope after 24 hours and detected by Western blot. *Results*:Correct construction of pEGFP-N1-Fcy::Fur was identified by methods of restriction enzyme analysis and nucleotide sequence determination.A total of 60% transfe-cted cells emitted out green fluorescence under fluorescent microscope after 24 h after transfecti-on. Fcy::Fur gene expressed by the transfected cells were testified by Western blot. *Conclusion*:The recombinant eukaryotic expression vectors have been constructed successfully and effective-ly expressed in ovarian cancer cells,which may provide an experimental basis for gene therapy of ovarian cancer.

【Key words】 Suicide gene;Fcy:Fur;Green fluorescent protein;Gene transfection;Eukaryotic expression plasmid

近年来肿瘤的基因治疗研究已取得显著进展,自杀基因疗法是肿瘤基因治疗中最有研究前景的方法之一。胞嘧啶脱氨酶(Cytosine deaminase,CD)基因/5-氟胞嘧啶(5-FC)系统是目前研究最多的自杀基因系统。融合型自杀基因Fcy::Fur融合了酵母菌CD(yCD)和尿嘧啶磷酸核糖转移酶(Uracil phosphoribosyltransferase,UPRT)基因,yCD使5-FC转化为5-氟尿嘧啶(5-FU)的能力比大肠杆菌CD(bCD)高20倍以上[1],UPRT可使5-FU转化为抗肿瘤的主要形式:5-氟脱氧尿嘧啶核苷酸(FdUMP)。增强型绿色荧光蛋白(Enhanced green fluorescent protein,EGFP)是绿色荧光蛋白GFP的一种突变体,能在异源组织中表达并产生荧光,已作为报告基因广泛运用于生物学研究领域。本实验构建了携带EGFP的Fcy::Fur真核表达质粒,并在卵巢癌SKOV3细胞系表达,可望用于抗肿瘤研究。

作者介绍:伍 霞(1983-),女,硕士,
研究方向:妇科肿瘤的基因治疗。
通讯作者:钟 玲,女,教授,E-mail:zhong9ling@hotmail.com。
基金项目:重庆市卫生局课题(05-2-002)。

1 材料与方法

1.1 材料

质粒pORF5-Fcy::Fur购自invivogen公司；pEGFP-N1质粒和人卵巢癌细胞株SKOV3由本实验室提供；脂质体转染剂Lipofectin购自上海invitrogen公司；DNA marker购自天根生化科技有限公司；限制性内切酶*Hind*Ⅲ、*Bgl*Ⅱ、T4NDA连接酶和RT-PCR试剂盒购自大连宝生物公司；总RNA提取试剂盒、小量质粒提取试剂盒和琼脂糖凝胶回收试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司；兔抗GFP单克隆抗体和兔抗人tublin单克隆抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司；PCR引物及内参（β-actin）引物由上海生物工程有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 引物设计与PCR扩增 根据Fcy::Fur融合基因和质粒pEGFP-N1上的多克隆酶切位点，利用Primer 5.0设计一对引物，两条引物5'端分别添加了*Hind*Ⅲ和*Bgl*Ⅱ酶切位点，预计扩增长度为1.1 kbp，引物序列如下：上游引物：5'-GAAGATC-TATGGTCACAGGAGGCAT-3'，下游引物：5'-CCCAAGCTTGA-CACAGTAGTATCTGTC-3'。内参（β-actin）上游引物：5'-GAC-TACCTCAT GAAGATC-3'，下游引物：5'-GATCCACATTTGCTG-GAA-3'，预计扩增长度为512 kbp。使用PCR试剂盒对pORF5-Fcy::Fur质粒上的Fcy::Fur基因片段进行PCR扩增。反应条件：94℃预变性2 min后，94℃变性45 s，58℃退火45 s，72℃延伸90 s，进行35个循环。

1.2.2 pEGFP-N1-Fcy::Fur重组质粒的构建与鉴定 PCR产物和载体pEGFP-N1均经*Hind*Ⅲ和*Bgl*Ⅱ双酶切后回收。用T4 DNA连接酶连接上述两个酶切产物。将连接产物转化到大肠杆菌Top10感受态细胞中，卡那抗性筛选重组质粒pEGFP-N1-Fcy::Fur。酶切鉴定成功后，菌液送至重庆医科大学感染病研究实验室测序分析。

1.2.3 重组质粒转染SKOV3细胞 在24孔板中接种SKOV3细胞（每毫升1×10^5个细胞），37℃，5%CO_2的培养箱中培养24 h，待细胞长至50%～60%时，分别用重组质粒pEGFP-N1-Fcy::Fur和空质粒pEGFP-N1进行转染，并设阴性对照（仅有培养基，不加质粒DNA）。具体操作按脂质体Lipofectin说明书进行。

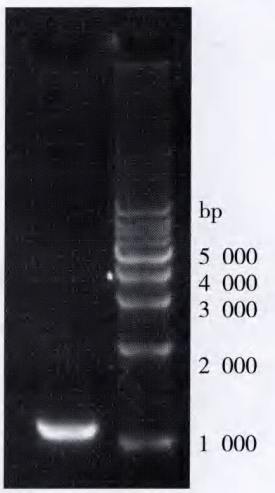
1.2.4 荧光显微镜观察绿色荧光蛋白表达 转染24 h后，荧光显微镜观察，488 nm紫外激发光下观察细胞绿色荧光蛋白产生情况，并计算转染率。

1.2.5 Western blot检测Fcy::Fur蛋白表达 收集各组细胞总蛋白，将蛋白煮沸5 min使其变性，取处理后的蛋白样品进行聚丙烯凝胶电泳并电转移至硝酸纤维素膜上，5%脱脂奶粉室温封闭1 h，与兔抗人GFP单克隆抗体和兔抗人tublin单克隆抗体4℃孵育过夜，TBST洗膜，鼠抗兔单克隆抗体室温孵育1 h，DAB显色，至显色清晰后，立即置于蒸馏水中终止显色，扫描保存并分析。

2 结 果

2.1 Fcy::Fur基因的扩增产物

以质粒pORF5-Fcy::Fur为模板，利用引物进行PCR扩增，取5 μl扩增产物行0.8琼脂糖凝胶电泳，得到1.1 kbp大小的目的基因Fcy::Fur（图1）。

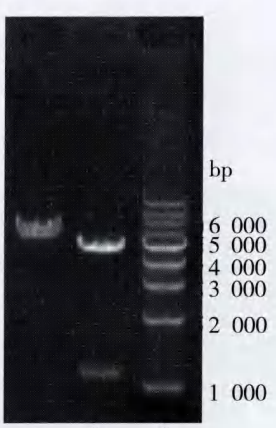


1. Fcy::Fur基因扩增产物1.1 kbp；
2. Marker(1kb DNA Ladder)

图1 Fcy::Fur基因扩增产物电泳图

2.2 重组质粒的酶切分析

重组质粒分别行*Hind*Ⅲ单酶切和*Hind*Ⅲ及*Bgl*Ⅱ双酶切，酶切产物行0.8%琼脂糖凝胶电泳分析，单酶切得到5.8 kbp大小的DNA片段，双酶切得到1.1 kbp大小的目的片段和4.7 kbp大小的载体，所得片段大小与预期相符（图2）。



1. 重组质粒单酶切产物 5.8 kbp；2. 重组质粒双酶切产物；
3. Marker(1kb DNA Ladder)

图2 重组质粒酶切鉴定电泳图

2.3 测序鉴定结果

将重组质粒送至重庆医科大学感染病研究实验室测序，证实重组质粒和载体两个连接点处序列正确，无移码改变，且通过目的基因全长双向测序，证实目的基因与invivogen公司提供的序列完全一致（图3）。

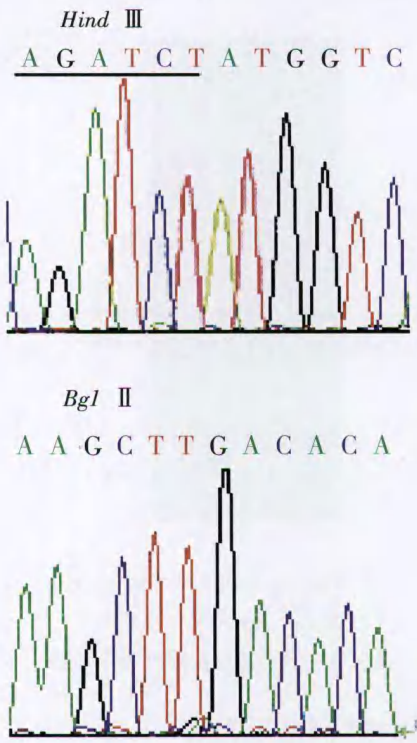
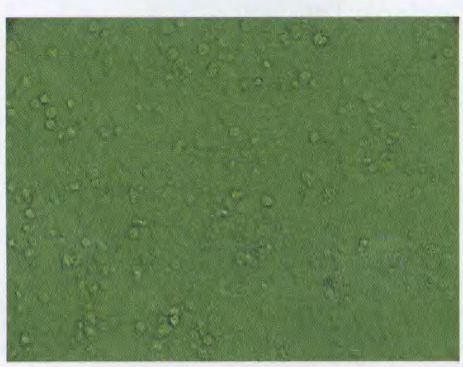


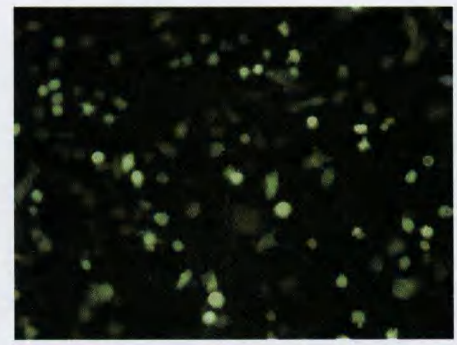
图3 重组质粒测序鉴定图

2.4 绿色荧光蛋白表达情况

转染24 h后，在荧光显微镜下观察，转染成功的SKOV3细胞有GFP表达，发出特异性的绿色荧光。分别记录每个转染细胞培养孔四周和中央5个视野内明视野和暗视野所观察到的细胞数，按转染率=暗视野所见发强绿色荧光的细胞数/明视野所见细胞总数×100%，计算转染率为60%（图4）。



A. 明视野观察（×200）

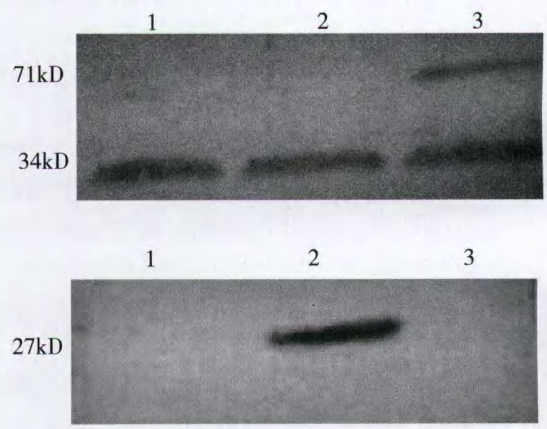


B. 同一视野暗视野观察（×200）

图4 SKOV3转染pEGFP-N1-Fcy::Fur24 h后荧光显微镜观察结果

2.5 Western blot检测Fcy::Fur蛋白表达

在线软件预测该绿色荧光蛋白分子量约为27 kD，融合蛋白分子量约为71 kD，重组质粒转染组在71 kD左右见一特异性条带，在27 kD位置没有条带，空质粒转染组在27 kD见一特异性条带，在71 kD位置没有条带，未转染组在27 kD和71 kD均未见条带，三者在34 kD位置均见内参条带，说明导入基因在蛋白水平得到表达（图5）。



1. 空白对照组；2. pEGFP-N1组；
3. pEGFP-N1-Fcy::Fur组

图5 Western blot 检测重组质粒中的Fcy::Fur表达

3 讨 论

在肿瘤的基因治疗研究中，自杀基因治疗已经显示出显著的优越性和临床应用前景。CD/5-FC系统是目前研究最多的自杀基因系统。CD能使无毒性的5-FC转化为具有抗癌作用的5-FU，既能降低5-FU对正常组织的细胞毒性作用，又能提高其抗肿瘤效率[2]。

本实验所采用的融合型基因Fcy::Fur由功能密

切相关的CD基因和UPRT基因融合而成。它具有比传统CD基因更大的优势。首先,Fcy::Fur中CD基因来自酵母菌。yCD比bCD具有更高的酶活性,其使5-FC转化为5-FU的Km值仅为bCD的1/22,而最大转化率是bCD的3.5～6.0倍[1]。细胞及动物实验均已证实yCD的抗肿瘤作用明显高于bCD[3]。此外,5-FU发挥抗肿瘤作用要依靠其代谢活性产物:三磷酸氟尿嘧啶(FUTP)和5-氟脱氧尿嘧啶核苷酸(FdUMP)。前者结合到RNA上,干扰RNA功能,后者通过抑制胸苷酸合成酶而阻止DNA的合成,是抗肿瘤的主要机制。Fcy::Fur中UPRT基因编码的UPRT可将5-FU直接转化为FdUMP而发挥抗肿瘤作用。联合应用yCD-UPRT还能显著提高肿瘤细胞对5-FC的敏感性[4]。F Graepler等研究发现[3],Fcy::Fur不仅能增强5-FC对转染细胞的直接杀伤作用,还能增强"旁观者效应",从而明显抑制大鼠肿瘤组织生长。

基因治疗的关键是如何高效地将外源基因导入靶细胞内并使其稳定表达。因此,选择载体至关重要。本实验采用pEGFP-N1真核荧光表达载体,与其他真核表达载体相比,其优势在于其3'端连接有EGFP基因。EGFP基因容易与目的基因融合,对目的基因的结构功能没有影响[5]。EGFP在紫外光激发下形成鲜明的绿色荧光,通过荧光显微镜即可直接观察,从而间接反映与其相融合的目的基因的表达情况[6],能简单直观地计算出转染效率,便于筛选稳定表达目的基因的细胞株。此外,EGFP对宿主细胞无毒性[7],其表达荧光稳定,几乎不受种属限制,也没有细胞种类和位置的限制,便于在活体内观察,是理想的长期表达示踪剂[8]。

SKOV3卵巢癌细胞系来源于人卵巢浆液性乳头状腺癌,具有侵袭性强,转移率高,预后差的特点[9],目前急待探寻新的治疗方法。肿瘤的基因治疗有望为卵巢癌的治疗提供新思路。本实验利用基因克隆技术构建了pEGFP-N1-Fcy::Fur荧光真核表达质粒,可望用于将融合型自杀基因Fcy::Fur靶向性导入卵巢癌细胞,从而避免化疗药物对全身其他器官的毒副作用,可用于进一步动物实验,为卵巢癌等恶性肿瘤的基因治疗研究奠定了很好的实验基础。

参 考 文 献

[1] Zhang M,Li S,Nyati M K,et al. Regional delivery and selective expression of a high-activity yeast cytosine deaminase in an intrahepatic colon cancer model[J]. Cancer Res,2003,63(3):658-663.

[2] Akbulut H,Tang Y C,Maynard J,et at. Vector targeting makes 5-fluorouracil chemotherapy less toxic and more effective in animal models of epithelial neoplasms[J]. Clin Cancer Res,2004,10(22):7738-7746.

[3] Graepler F,Lemken M L,Wybranietz W A,et al. Bifunctional chimeric superCD suicide gene-YCD:YUPRT fusion is highly effective in a rat hepatoma model[J]. World J Gastroenterol,2005,11(44):6910-6919.

[4] Fogar P,Navaglia F,Basso D,et al. Suicide gene therapy with the yeast fusion gene cytosine deaminase/uracil phosphoribosyltransferase is not enough for pancreatic cancer[J]. Pancreas,2007,35(3):224-231.

[5] Wen T,Evans B G,Jing Y,et al. Enhanced green fluorescent protein is a nearly ideal long-term expression tracer for hematopoietic stem cells,whereas dsred-express fluorescent protein is not[J]. Stem Cells,2007,25(3):670-678.

[6] Yoichi U,Hiroaki F,Ryota S,et al. Transgenic expression of enhanced green fluorescent protein enables direct visualization for physiological studies of vasopressin neurons and isolated nerve terminals of the rat[J]. Endocrinology,2005,146(1):406-413.

[7] Vitriol,Uetrecht E A,Shen A C,et al. Enhanced EGFP-chromophore-assisted laser inactivation using deficient cells rescued with functional EGFP-fusion proteins[J]. Cell Biology,2007,104(16):6702-6707.

[8] Tamberg N,Lulla V,Fragkoudis R,et al. Insertion of EGFP into the replicase gene of Semliki Forest virus results in a novel,genetically stable marker virus[J]. J Gen Virol,2007,88:1225-1230.

[9] 姬立芹,赵纯全,干晓琴.VEGF-C反义寡核苷酸对卵巢癌细胞SKOV3的粘附、侵袭能力的影响[J]. 重庆医科大学学报,2007,32(6):610-614.

(责任编辑:关蕴良)