维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2004)03-0266-03

凋亡抑制因子 survivin 基因的克隆及在真核细胞中的表达

闫 歌[1], 蒲 丹[1], 唐 霓[1], 张秉强[1], 高小玲[1], 宋文鑫[1], 何通川[2], 黄爱龙[1]

(1. 重庆医科大学病毒性肝炎研究所, 重庆 400010;
2. Molecular Oncology Laboratory, The University of Chicago Medical Center, Chicago, IL 60637, USA)

【摘 要】目的:克隆 Survivin 编码序列并在真核细胞中表达。方法:RT-PCR 扩增 Survivin 编码序列,建立与绿色荧光蛋白(GFP)共表达的融合重组质粒,转染哺乳动物细胞,利用 GFP 绿色荧光和 Western Blot 检测 Survivin 蛋白的表达。结果:RT-PCR 扩增出 421bp 的 Survivin 编码序列,构建融合重组质粒 pEGFP-C1-Survivin,利用 GFP 荧光和 Western Blot 证实 Survivin 蛋白的表达。结论:成功克隆 Survivin 基因并在真核细胞中表达。

【关键词】Survivin;绿色荧光蛋白;真核细胞;表达
【中国图书分类法分类号】R730.54 【文献标识码】A 【收稿日期】2003-10-15

Cloning and expression of survivin gene in eukaryotic cells

YAN Ge, et al

(*Institute for Viral Hepatitis, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To clone and express survivin gene in mammalian cells. *Methods*: Coding sequence of survivin gene was amplified from $HepG_2$ cell mRNA by RT-PCR and then cloned into eukaryotic vector pEGFP-C1. The vector with survivin gene was transfected into $HepG_2$ and SMMC-7721. The expression of survivin was detected by GFP and Western blot. *Results*: The recombinant plasmid pEGFP-C1-survivin was successfully constructed and expressed in $HepG_2$ and SMMC-7721. *Conclusion*: The result shows expression of the anti-apoptosis gene survivin in mammalian cells.

【Key words】Survivin; Green fluorescent protein; Eukaryotic cell; Expression

Survivin 是近年来发现的新的抗凋亡因子,它是凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis proteins, IAPs)家族成员之一。由于 Survivin 仅在肿瘤细胞和转化细胞中表达,而在正常成人细胞中不表达,因此受到广泛关注[1]。Survivin 基因的特点使人们意识到可通过抑制抗凋亡因子而特异性的诱导肿瘤细胞的凋亡,而不影响正常细胞[2]。本研究利用 RT-PCR 技术克隆了 $HepG_2$ 中的 Survivin 编码序列,与绿色荧光蛋白(GFP)构建重组载体,并在真核细胞中进行融合表达。

1 材料和方法

1.1 试剂和材料

pEGFP-C1 由美国芝加哥大学医学中心何通川博士惠赠,哺乳动物细胞选用了肝癌细胞株 $HepG_2$、SMMC-7721,由本研究所保存。Total RNA Kits、OneStep PT-PCR Kit 试剂盒均购自 QIAGEN 公司,限制性内切酶购自 TaKaRa、Promega 公司。

1.2 细胞培养

$HepG_2$ 常规培养于含 10% 的小牛血清,100μ/ml 青霉素,100μ/ml 的链霉素的 RPMI-1640 培养液中,培养条件为 37℃,CO_2 浓度为 5%,根据细胞生长情况,每 2~3 天用 0.25% 的胰酶消化,进行传代培养。

1.3 总 RNA 的提取

细胞常规培养,待细胞铺满培养瓶后,用 0.25% 的胰酶消化 $HepG_2$ 细胞,800rpm/min 离心,收集细胞,提取总 RNA,操作按 QIAGEN 公司 Total RNA Kits 说明书,提取的总 RNA 用 DEPC 处理的水洗脱。

1.4 转录 PCR 扩增目的基因

根据 GenBank 中 Survivin 编码序列,设计合成 Survivin 基因的扩增引物,其中包括上游 Sal Ⅰ,下游 BamH Ⅰ 酶切位点(下划线标示)。

Primer Forward:

作者介绍:闫 歌(1965-),男,副研究员,主要研究方向:肿瘤的基因治疗。

基金项目:国家自然基金资助(30371599),国家杰出青年基金(B 类)资助(30228026)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

5'－ATAGTCGACATGGGTGCCCCGACGTTG－3';

Primer Reverse:

5'－CTCGGATCCTCAATCATGGCAGCCAG－3'

热循环条件为:反转录:50℃ 30min HotStarTaq 酶激活:95℃ 15min,然后 PCR 循环:94℃ 变性 45s,60℃ 45s,72℃ 1min。计 30 个循环;72℃ 延伸 10min。PCR 结束后,进行 1%琼脂糖电泳检查。

1.5 建立 survivin 的真核表达载体

将 RT－PCR 产物用 Sal Ⅰ和 *BamH* Ⅰ双酶切,再用 DNA 纯化试剂盒纯化,与 Sal Ⅰ和 *BamH* Ⅰ双酶切的 pEGFP－C1 载体,在 T4 连接酶的作用下连接,转化大肠杆菌 DH5α,Kan 抗性筛选,琼脂糖电泳酶切鉴定,并进行序列分析。重组质粒命名为 pEGFP－C1－Survivin。

1.6 肿瘤细胞转染

利用 invitrogen 转染试剂盒,首先将肝癌细胞株 $HepG_2$ 和 SMMC－7721 接种到 24 孔板上,用常规培养方法培养,待细胞生长到占培养瓶底约 70%～80%,培养液换为无双抗含血清的 RPMI－1640 培养液中培养过夜。次日按说明书要求加入 pEGFP－C1－Survivin 质粒,对照加入等量的 pEGFP－C1。24h、48h 观察 GFP 的表达情况。

1.7 Survivin 基因表达及检测

1.7.1 GFP 表达的检测

由于 Survivin 克隆到 pEGFP－C1 上,它与 GFP 表达为融合蛋白,因此,可应用免疫荧光检测 GFP 的表达而间接判定 Survivin 基因的表达。

1.7.2 Western blot 检测 Survivin 蛋白的表达

分别收集 5×10^6 转染 pEGFP－C1、pEGFP－C1－survivin 48h 的 $HepG_2$ 和 SMMC－7721 细胞,用 12%十二烷基磺酸钠—聚丙烯酰胺(SDS—PAGE)凝聚电泳,然后转 NC 膜,室温封闭 1h,加入一抗 1∶3000 兔抗人 GFP,4℃ 结合过夜,洗膜 4 次,加入 1∶10000 二抗羊抗兔 IgG/HRP 室温 1h,洗膜 4 次,用化学发光试剂反应 5min,X 片暗室曝光,常规显影定影。

2 结 果

2.1 RT－PCR 扩增 Survivin 编码基因

RT－PCR 后 1%脂糖电泳结果显示,在 421bp 左右有一条明显的 DNA 带,与 Survivin 的编码基因大小一致,无非特异性电泳带。

2.2 重组质粒 pEGFP－C1－Survivin 的构建及序列分析

图 2 显示 Survivin 基因克隆到 pEGFP－C1 后,用 Hind Ⅲ和 Xho Ⅰ酶切出 500bp 左右的 DNA 片段,与设计的 DNA 大小吻合;其序列测定结果表明克隆的 Survivin 基因与 GenBank 中 Survivin 基因的序列完全一致。证明 Survivin 基因已成功克隆入 pEGFP－C1 载体,重组质粒命名为 pEGFP－C1－Survivin。

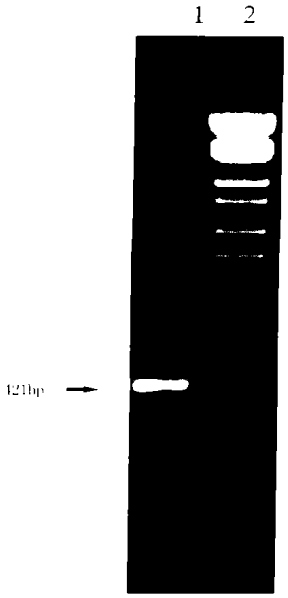


图 1 RT－PCR 扩增 survivin 编码基因电泳图

1. 扩增产物;2. MARKER

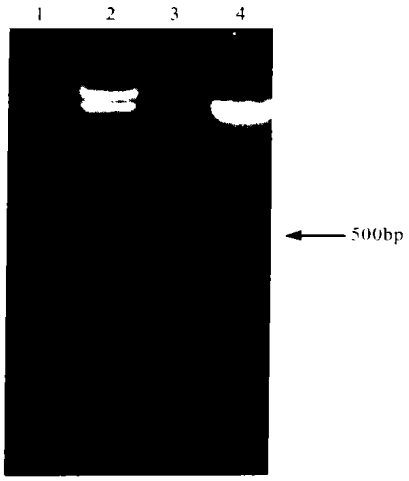


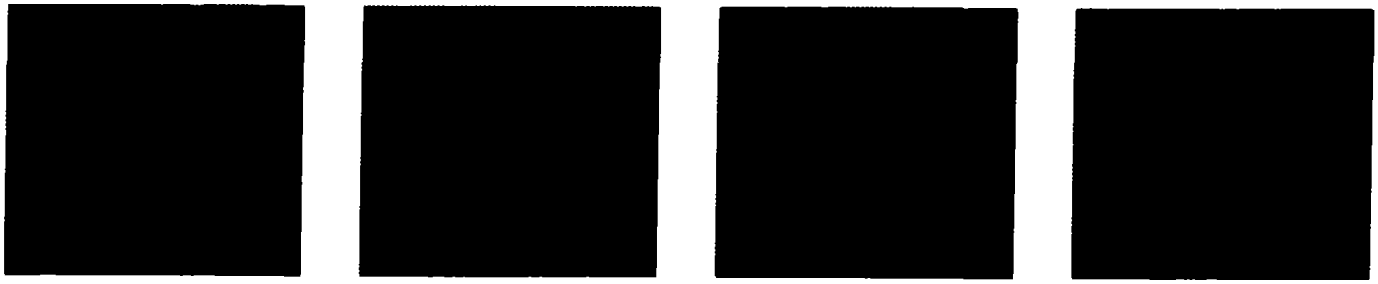
图 2 pEGFP－C1－survivin 质粒的筛选

1. pEGFP－C1 质粒 *Hind* Ⅲ和 Xho Ⅰ双酶切;2. MARKER;3. MARKER;4. pEGFP－C1－survivin 质粒 *Hind* Ⅲ和 Xho Ⅰ双酶切

2.3 检测哺乳动物细胞中 GFP 荧光的表达

转染 pEGFP－C1 和 pEGFP－C1－Survivin 质粒 24h、48h(见图 3,仅列出 48h 结果图),在荧光显微镜下观察肿瘤细胞 $HepG_2$ 和 SMMC－7721 均有绿色荧光蛋白的表达。镜下观察两种转染细胞呈现绿色荧光的细胞数相比无明显变化,而转染 pEGFP－C1－Survivin 细胞的绿色荧光强度略低于转染 pEGFP－C1 的细胞,可能是 Survivin 蛋白的表达对

维普资讯 http://www.cqvip.com



A B C D

图 3 质粒 pEGFP－C1、pEGFP－C1－Survivin 转染 $HepG_2$、SMMC—7721 后 48hGFP 的表达

A. 质粒 pEGFP－C1 转染 $HepG_2$ B. 质粒 pEGFP－C1－Survivin 转染 $HepG_2$ C. 质粒 pEGFP－C 转染 SMMC—7721 D. 质粒 pEGFP－C1－Survivin 转染 SMMC—7721

GFP 表达影响造成的。

2.4 Western Blot 检测 Survivin 蛋白的表达

由于 Survivin 蛋白分子量为 16.5kDa，GFP 为 27kDa，融合蛋白的大小约 44kDa，Western Blot 结果显示，转染 pEGFP－C1－Survivin 载体的 HepG2 和 SMMC－7721 细胞在 44kDa 处有一明显的杂交带，而转染 pEGFP－C1 的细胞仅有 27kDa GFP 蛋白带，因此证明 Survivin 基因在哺乳动物细胞中的表达（仅列出转染 HepG2 细胞的 Western Blot 结果）。

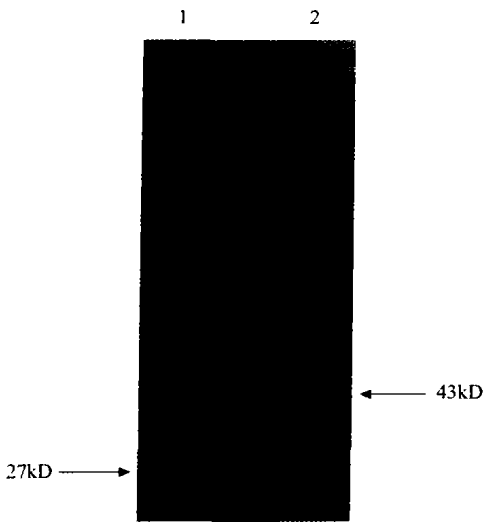


图 4 Western blot 检测 survivin 的结果

1. pEGFP－C1 2. pEGFP－C1－Survivin

3 讨 论

细胞凋亡抑制因子（inhibitor of apoptosis，IAP）家族是一类分布广泛的抗凋亡蛋白，存在于病毒、酵母和哺乳动物细胞中，具有高度保守性，能抑制细胞的凋亡。1997 年 Ambrosin 等[1]筛选克隆出 Survivin 基因，研究表明 Survivin 基因全长 14.7kb，编码产生一个由 142 个氨基酸组成的分子量为 16.5kDa 的胞浆蛋白，它是 IAPs 中分子量最小的。Survivin 基因与其它抗凋亡基因不同是它的表达具有高度特异性，在未分化的成人组织中不表达（胸腺除外），而在人类大多数的肿瘤组织和转化细胞中有较高表达，而且其表达与肿瘤的恶性程度及病人的预后密切有关[3]，因此 Survivin 基因与肿瘤有密切的关系。Survivin 基因已成为肿瘤研究的新热点[4,5]。

本研究利用 RT－PCR 技术克隆了 Survivin 编码基因，并与 GFP 表达为融合蛋白，利用 GFP 在荧光显微镜下呈绿色荧光的特点，能更方便的检测 Survivin 蛋白的表达，为今后利用 RNA 干扰（RNAi）技术抑制 Survivin 基因表达，介导肿瘤细胞凋亡的研究打下基础。

参 考 文 献

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

[2] Mesri M, Wall NR, Li J, et al. Cancer gene therapy using a survivin mutant adenovims[J]. J Clin Invest, 2001;108:981－990.

[3] Kawasaki H, Altier DC, Lu CD, et al. Inhibition of apoptosis by survivin predicts shorter survival rates in colorectal cancer[J]. Cancer Res. 1998;58:5071－5074.

[4] Grossman D, Kim P J, Schechner JS, et al. Inhibition of melanoma tumor growth in vivo by survivin targeting[J]. PNAS, 2001;98:635－640.

[5] Takai N, Miyazaki T, Nishida M, et al. Expression of survivin is associated with malignant potential in epithelial ovarian carcinoma[J]. Int J Mol Med, 2002;10:211－216.