

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00359

稳定表达人 survivin 基因的 B16 细胞系的建立与鉴定

张亮¹, 李潇潇², 阎瑾琦¹, 王越¹, 肖毅¹, 高昆¹, 于继云^{1*}

1. 军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850

2. 北京积水潭医院检验科, 北京 100035

[摘要] **目的** 构建人 survivin 真核表达载体, 稳定转染入小鼠黑素瘤 B16 细胞, 建立稳定表达人 survivin 的小鼠黑素瘤细胞系。**方法** 采用 PCR 方法扩增出人 survivin 全长基因的 cDNA 编码区序列, 利用 DNA 重组技术将其定向插入到真核表达载体 pIRES-neo 中, 并加入酶切位点和 6×his 标签, 得到重组表达质粒 pIRES-neo-SUR-(his)₆。利用阳离子脂质体介导法将其稳定转染入小鼠黑素瘤 B16 细胞, 经 G418 加压筛选出阳性克隆。利用 RT-PCR、蛋白免疫印迹及免疫荧光等检测方法验证人 survivin 基因在稳定转染 B16 细胞株中的表达。**结果** 经限制性内切酶鉴定及序列分析, pIRES-neo-SUR-(his)₆ 重组体构建正确。RT-PCR 结果表明: 从稳定转染 pIRES-neo-SUR-(his)₆ 的 B16 细胞所抽提的总 RNA 中能够扩增出 survivin 基因(约 530 bp); 蛋白免疫印迹结果表明: 利用特异抗体能够从稳定转染 pIRES-neo-SUR-(his)₆ 的 B16 细胞中检测到 survivin 蛋白条带, 而对照空质粒转染后的细胞则没有相应的条带; 流式细胞仪和激光共聚焦显微镜检测结果显示, 稳定转染 pIRES-neo-SUR-(his)₆ 的 B16 细胞用特异性抗体检测到高效的荧光表达, 其中 5 号单克隆的荧光表达率为 91.38%, 而对照空质粒转染后的细胞则没有相应的荧光表达。**结论** 成功构建了真核表达载体 pIRES-neo-SUR-(his)₆, 建立了稳定转染高效表达人 survivin 的小鼠黑素瘤细胞系。

[关键词] survivin; 稳定转染; 实验性黑素瘤; 基因疫苗; 肿瘤免疫治疗

[中图分类号] R 73-354

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2010)04-0359-05

Establishment and identification of B16 cell line stably expressing human survivin gene

ZHANG Liang¹, LI Xiao-xiao², YAN Jin-qi¹, WANG Yue¹, XIAO Yi¹, GAO Kun¹, YU Ji-yun^{1*}

1. Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China

2. Department of Clinical Laboratory, Beijing Jishuitan Hospital, Beijing 100035, China

[Abstract] **Objective** To construct the eukaryotic expression vector of human survivin gene and stably transfect it into mouse melanoma B16 cell line. **Methods** The full length human survivin cDNA fragment was amplified by PCR and inserted into eukaryotic expression vector pIRES-neo; the restriction enzyme position and 6 his tag were added to obtain recombinant plasmid pIRES-neo-SUR-(his)₆, which was then transfected into B16 cells by Lipofectamine 2000. After screening culture by G418, a stably transfected cell line was established, and the transcription and expression of the human survivin gene were identified by RT-PCR, Western blotting analysis and immunofluorescence assay. **Results** The result of restriction enzyme digestion and the sequence analysis showed that the recombinant of pIRES-neo-SUR-(his)₆ was successfully constructed. RT-PCR results showed survivin gene (about 530 bp) was amplified from the total RNA in the group stably transfected with pIRES-neo-SUR-(his)₆. Western blotting analysis showed the expression of survivin protein in pIRES-neo-SUR-(his)₆ transfection group, but not in the control group. FACS and immunofluorescence assay showed high fluorescence signal in pIRES-neo-SUR-(his)₆ transfection group, with the fluorescence positive rate being 91.38% when No. 5 monoclonal antibody was used; no fluorescence signal was found in the control group(transfected with pIRES-neo). **Conclusion** We have successfully constructed the eukaryotic expression vector of human survivin pIRES-neo-SUR-(his)₆, and established a B16 cell line stably and highly expressing human survivin gene.

[Key words] survivin; stably transfection; experimental melanoma; gene vaccine; tumor immunotherapy

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(4): 359-363]

[收稿日期] 2009-12-14

[接受日期] 2010-01-29

[基金项目] 国家自然科学基金(30772002), 国家高技术研究发展计划("863"计划, 2007AA02Z451). Supported by National Natural Science Foundation of China (30772002) and National High-Tech R&D Program of China ("863" Program, 2007AA02Z451).

[作者简介] 张亮, 博士生. E-mail: zhangliangrpg@126.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 010-66932316, E-mail: yujiyun@126.com

Survivin是由Ambrosini等^[1]在1997年发现并鉴定的一种凋亡抑制基因,是凋亡抑制蛋白(inhibitors of apoptosis proteins, IAPs)家族成员之一,也是目前肿瘤研究领域最为瞩目的研究热点之一^[2]。绝大多数正常分化成熟的细胞中几乎检测不到survivin的表达,但在CD34⁺骨髓干细胞、上皮基底细胞、胸腺细胞、宫颈上皮基底细胞等快速分裂的正常细胞中可检测到有低表达的survivin,而在多数肿瘤组织中则可检测到高表达的survivin,尤其是在结肠癌、肺癌、乳腺癌和黑素瘤中^[3]。肿瘤组织和正常组织中survivin的表达差异使其成为肿瘤诊断和治疗研究的新靶点。以survivin为靶抗原的抗肿瘤疫苗的研究和开发,已经成为目前肿瘤生物治疗新的焦点^[4-6];利用survivin作为靶点抗原的基因疫苗也显示了良好的应用前景^[7]。

因此,本研究采用PCR方法扩增出人survivin全长基因的cDNA编码序列,利用DNA重组技术将其定向插入到真核表达载体pIRES-neo中,利用阳离子脂质体转染和G418筛选技术,尝试建立稳定表达人survivin的小鼠黑素瘤细胞系,为后续研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 主要材料及试剂 pIRES-neo载体购自Clontech公司;感受态大肠杆菌*E. coli* DH5 α 和小鼠黑素瘤B16细胞为本室保存。高保真PyrobestTM DNA聚合酶、T₄ DNA连接酶为TaKaRa公司产品;DNA限制性内切酶*Nhe* I、*Bam*H I购自New England Biolabs公司。PCR产物纯化试剂盒、片段胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒均购自北京三博远志科技有限公司。转染试剂Lipofectamine 2000为Invitrogen公司产品;RPMI 1640培养液为Gibco产品;新生牛血清购自杭州四季青责任有限公司;G418购自Amresco公司;DEPC购自上海生工生物工程技术服务有限公司;TRIzol购自Promega公司;RT-PCR试剂盒(ReverTra Ace- α -)购自Toyobo公司;6 \times his的鼠源性单抗,FITC标记的山羊抗小鼠和HRP标记的山羊抗小鼠的IgG均购自北京中杉金桥技术有限公司;细胞打孔液购自BD公司;蛋白免疫印迹超敏发光液(super ECL plus)购自北京普利莱基因技术有限公司。

1.2 人survivin基因的扩增 根据GenBank登录的人survivin基因序列(NM 001012271)设计引物。以我室前期构建保存的含有survivin全基因序列的载体为模板扩增基因。上游引物:5'-CTC AGC TAG CCA CCA TGG GTG CCC CGA CGT TG-3'

(GC% = 65.62),下游引物:5'-CGC GGA TCC TCA ATG GTG ATG GTG ATG-3' (GC% = 55.56),其中分别在上游和下游引物的5'端加入了*Nhe* I和*Bam*H I酶切位点,并且在起始密码子前添加了Kozak序列,引物由Invitrogen公司合成。

1.3 人survivin真核表达载体的构建 将上述PCR产物和pIRES-neo载体质粒分别用限制性内切酶*Nhe* I和*Bam*H I酶切后,琼脂糖凝胶电泳分离、胶回收纯化,经T₄ DNA连接酶连接后转化入*E. coli* DH5 α 感受态大肠杆菌,氨苄青霉素培养皿筛选,挑取阳性克隆进行双酶切和PCR鉴定,阳性克隆质粒经测序分析后证实并命名为pIRES-neo-SUR-(his)₆。

1.4 稳定转染人survivin的B16细胞系的建立 首先确定G418筛选浓度:按照每孔100个细胞的密度将B16细胞接种到96孔板中培养,将G418按照0、200、400、600、800、1 000、1 200 mg/L的浓度梯度加入到孔中,每个浓度设3个复孔,观察10~14 d,使细胞全部死亡的最低G418浓度(1 000 mg/L),即作为转染后的筛选浓度。将正常生长的B16细胞接种到6孔板中,24 h后待其汇合度达到70%~80%时,使用Lipofectamine 2000进行转染;37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱中培养,转染后6 h更换含有10%新生牛血清的RPMI 1640培养液继续培养;24 h后按照1:3的比例将细胞传代至新的6孔板中培养;传代后24 h,待细胞贴壁后即更换含有1 000 mg/L G418的筛选培养液*Nhe* I、*Bam*H I进行筛选。

1.5 稳定转染细胞的单克隆化 加压筛选过程中,每隔2 d更换1次培养液,加压47 d后显微镜下可见细胞大量死亡,持续加压至细胞不再死亡,且以团簇的形式生长时即可认为是阳性细胞,继续加压至阳性克隆铺满6孔板,消化至培养瓶中扩大培养,待到阳性细胞长满培养瓶即获得混合克隆。随后按照有限稀释法进行单克隆化操作:预先对96孔板除第1排之外的所有孔加入100 μ l培养液,接着将混合克隆稀释至1 \times 10⁶个/L,按200 μ l/孔接种于96孔板的第1排,从中吸取100 μ l细胞液接种于第2排,混匀后,从第2排中吸取100 μ l接种于第3排,直到第8排,最后1排均丢弃100 μ l细胞液,待细胞贴壁生长后,倒置显微镜下观察,标记只含有1个细胞的培养孔,每天记录细胞生长情况,10~15 d后,即可挑选单克隆细胞株。

1.6 RT-PCR检测survivin转录水平的表达 收集对数生长期的单克隆细胞,采用TRIzol法提取总RNA。反转录20 μ l体系中加入变性后的总RNA 12 μ l,5 \times RT Buffer 4 μ l,dNTP mixture 2 μ l,

RNAase inhibitor 1 μ l, Rever Tra Ace 1 μ l 混匀,以上步骤均在冰上进行。反转录条件为:30 $^{\circ}$ C 10 min, 42 $^{\circ}$ C 60 min, 99 $^{\circ}$ C 5 min, 4 $^{\circ}$ C 5 min。接着进行 PCR 反应,在 50 μ l 反应体系中加入 cDNA 模板 1 μ l, Ex Taq PCR Buffer 5 μ l, dNTP 4 μ l, 上下游引物各 1 μ l, Ex Taq 酶 0.5 μ l, 加水补足至 50 μ l, 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 50 s, 58 $^{\circ}$ C 50 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min 扩增 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 7 min。将 PCR 产物进行凝胶电泳分析。

1.7 蛋白免疫印迹检测 survivin 翻译水平的表达 收集对数生长期的单克隆细胞, 100 μ l 三蒸水重悬后, 加入 3 \times 蛋白处理液 50 μ l, 沸水中煮 810 min 裂解细胞, 离心后取上清进行 SDS-PAGE 电泳(恒压 80 V, 2 h), 电转移至 PVDF 膜上(恒流 180 mA, 2 h), 50 g/L 脱脂奶粉室温振荡 2 h 封闭, 与 1:1 000 稀释的鼠抗 His 抗体 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜; PBST 洗膜 3 次, 然后与 1:5 000 稀释的 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 室温孵育 2 h, PBST 洗膜 3 次, ECL 显色检测目的蛋白。

1.8 免疫荧光检测细胞内 survivin 的表达 收集对数生长期的单克隆细胞, PBS 洗 3 次, 加入 500 μ l 打孔液(1:10 稀释), 混匀后室温打孔 10 min。打孔结束后, 加入含 20 ml/L 血清的 PBS 终止反应, 离心去除上清; 加入按 1:50 稀释的鼠抗 His 100 μ l, 混匀后室温孵育 40 min, 期间每隔 10 min 即轻柔震荡细胞, 孵育结束后 PBS 洗 3 次; 加入按 1:50 稀释的 FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG 100 μ l, 混匀后室温孵育 40 min, 期间每隔 10 min 轻柔震荡细胞; 孵育结束后, PBS 洗 3 次, 加入 500 μ l PBS 重悬细胞, 进行流式细胞术检测, 激光共聚焦显微镜下观察表达情况并拍照。

2 结果

2.1 人 survivin 真核表达载体的构建及鉴定 将 PCR 扩增后的 survivin 片段(图 1)进行纯化后与 pIRES-neo 载体进行连接, 并进行 PCR 及酶切鉴定, 结果显示重组真核表达载体 pIRES-neo-SUR-(his)₆ 经过 BamH I 和 Nhe I 双酶切后呈现约 538 bp 和 5 300 bp 两条条带, 与目的基因片段 survivin 和载体片段 pIRES-neo 的大小一致; 利用特异性引物也扩增出了大小约为 538 bp 的目的基因条带(图 2)。测序结果与预期的人 survivin 基因序列完全相同, 表明该重组质粒构建成功。

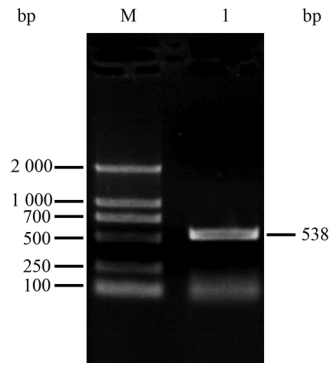


图 1 人 survivin 全长基因的 PCR 扩增

Fig 1 Amplification of human survivin gene by PCR

M: DNA marker(DL 2000); 1: The 538 bp fragment of survivin

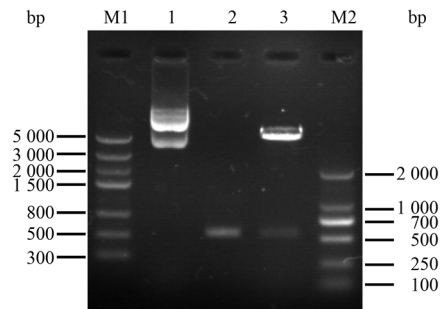


图 2 真核表达质粒 pIRES-neo-SUR-(his)₆ 的 PCR 及双酶切鉴定

Fig 2 Restriction enzyme digestion and PCR

analysis of pIRES-neo-SUR-(his)₆.

M1: DNA marker(DL 5000); 1: pIRES-neo-SUR-(his)₆ plasmid; 2: The fragment amplified by PCR; 3: The products from pIRES-neo-SUR-(his)₆ digested by *Nhe* I and *Bam*H I; M2: DNA marker(DL 2000)

2.2 单克隆 B16 细胞 survivin 转录水平的表达 RT-PCR 分析结果(图 3)表明: 利用特异抗体能够从稳定转染 pIRES-neo-SUR-(his)₆ 的 B16 细胞所抽提的总 RNA 中扩增出 survivin 基因(约 530 bp), 说明 survivin 基因在稳定转染的 B16 细胞转录水平上得到了表达。

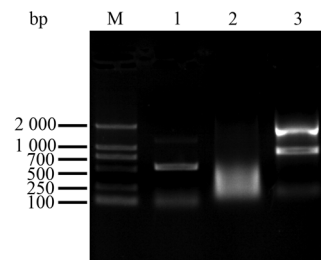


图 3 RT-PCR 分析稳定转染 pIRES-neo-SUR-(his)₆ 的 B16 细胞 survivin 基因的表达

Fig 3 RT-PCR analysis of survivin gene in B16 cell line stably transfected with pIRES-neo-SUR-(his)₆

M: DNA marker(DL 2000); 1: The fragment of survivin by RT-PCR; 2: cDNA of B16-pIRES-neo-SUR-(his)₆; 3: Total RNA of B16-pIRES-neo-SUR-(his)₆

2.3 单克隆 B16 细胞中 survivin 蛋白的表达 蛋白免疫印迹检测结果(图 4)显示,稳定转染 pIRES-neo-SUR-(his)₆ 的 B16 细胞能够检测到 survivin 的蛋白条带,而对照空质粒转染后的细胞则没有相应的条带(以 GAPDH 作为检测内参),表明 survivin 蛋白在稳定转染 pIRES-neo-SUR-(his)₆ 的 B16 细胞中得到了表达。

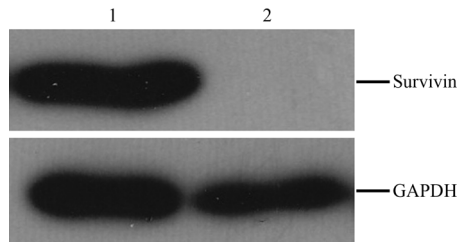


图 4 稳定转染 pIRES-neo-SUR-(his)₆ 的 B16 细胞 survivin 蛋白免疫印迹分析结果

Fig 4 Western blotting analysis of survivin protein expression in B16 cell line stably transfected with pIRES-neo-SUR-(his)₆

1: The experiment group transfected with pIRES-neo-SUR-(his)₆;
2: The control group transfected with pIRES-neo

2.4 单克隆 B16 细胞的免疫荧光检测 流式细胞术(图 5)和激光共聚焦显微镜(图 6)检测结果显示,稳定转染 pIRES-neo-SUR-(his)₆ 的 B16 细胞用特异性抗体检测到高效的荧光表达(阳性表达率 77.90% 91.38%),其中 5 号单克隆的荧光表达率为 91.38%,而对照空质粒转染后的细胞则没有相应的荧光表达。

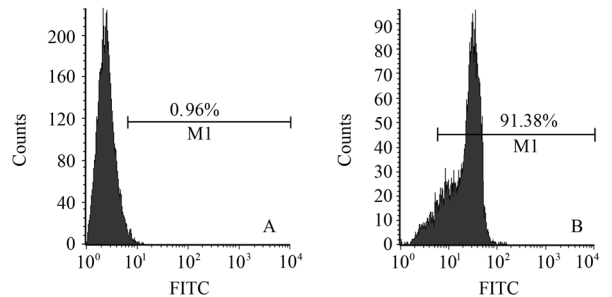


图 5 稳定转染 pIRES-neo-SUR-(his)₆ 的 B16 细胞的流式细胞术分析

Fig 5 FACS analysis of B16 cell line stably transfected with pIRES-neo-SUR-(his)₆

A: The control group transfected with pIRES-neo; B: The experiment group transfected with pIRES-neo-SUR-(his)₆

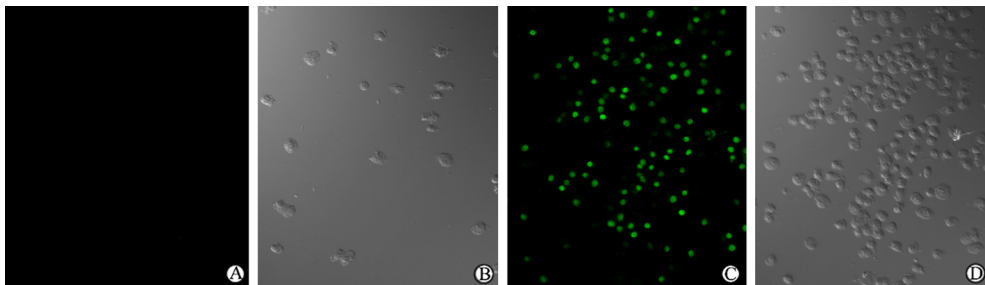


图 6 稳定转染 pIRES-neo-SUR-(his)₆ 的 B16 细胞免疫荧光检测

Fig 6 Result of immunofluorescence assay in B16 cell line stably transfected with pIRES-neo-SUR-(his)₆

A,B: The control group transfected with pIRES-neo; C,D: The experiment group transfected pIRES-neo-SUR-(his)₆; A,C: Fluorescence image; B,D: Bright field image. Original magnification: ×20

3 讨论

作为肿瘤特异免疫疗法的靶抗原需具备以下特点:首先,在正常重要的组织和器官中不表达或低表达;其次,应该是肿瘤细胞生存和增殖中的重要分子;最后是在肿瘤细胞中有高发生率及大量地表达^[8]。而 survivin 则具备以上 3 个条件。因此, survivin 被广泛认为是肿瘤相关抗原(TAA),也使得以 survivin 为靶抗原的抗肿瘤疫苗的研究和开发成为近年来肿瘤生物治疗新的热点。我室目前正在研究的以 survivin 为目标抗原的基因疫苗功能实验正在进行中,为了更好地评价该基因疫苗的抗肿瘤效果,早日将其应用于临床研究,必须建立能够高效、稳定

表达 survivin 基因的细胞模型和动物模型。

为了实现人 survivin 基因在小鼠黑素瘤 B16 细胞中的高效表达,本研究利用 pIRES-neo 载体中 neo 基因作为抗性标志物进行筛选。与通常所用到的筛选载体不同的是, pIRES-neo 载体中的 IRES (内部核糖体进入位点)序列的优点在于将其与多个非相关基因连接在一起,可同时转录成 1 条单链 RNA,但翻译又是各自独立的,这样就可以保证用 IRES 序列连接的非相关基因各自独立表达;同时,同样的表达单元也增加了整合到细胞基因组中的概率^[9]。本研究在 pIRES-neo 载体的 IRES 序列上游连入了 survivin 基因,而该序列下游则是用于抗性筛选的 neo 基因,二者共表达,所以抗 G418 的克隆也应该

是表达 survivin 的阳性克隆。最后,本研究通过筛选所得转染细胞株混合克隆,约 32.26% 的细胞能够表达 survivin,对其进行进一步的单克隆化筛选,最终获得了 5 株 B16-pIRES-neo-SUR-(his)₆ 的单克隆细胞株,通过检测,外源基因阳性表达率为 77.90%~91.38%,达到了预期的实验目的。

将目的抗原基因克隆入真核表达载体,转染到宿主细胞中作为靶细胞,进一步研究以该基因为靶抗原的疫苗功能,是基因疫苗学常用的一种有效方法。经过瞬时转染的细胞虽然能够表达目的基因,但随着时间的延长,未能整合到细胞基因组中的外源基因会因细胞分裂等因素而逐渐丢失,只有极少数外源基因能够整合到宿主细胞基因组中,但这些细胞也是不稳定的,时间一长,那些没有能够整合外源基因的细胞将大量增殖,从而淹没那些为数较少的转基因细胞,因此不适合进行疫苗功能研究。本研究通过阳离子脂质体介导的稳定转染及 G418 加压筛选获得的高效表达 survivin 基因的 B16 细胞株则有效地解决了上述问题。该细胞系的建立为该基因疫苗进一步的功能研究提供了可用的细胞模型,奠定了切实可靠的实验基础。

[参考文献]

[1] Ambrosini G, Adida C, Altieri D C. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma [J]. Nat

Med,1997,3:917-921.

- [2] 罗颖,徐西华. Survivin 多肽疫苗治疗血液系统恶性肿瘤的研究进展[J]. 重庆医科大学学报,2007,32:1118-1120.
- [3] 杜冠辉,谭金凤,吴淑金,李强. Survivin 与肿瘤的关系[J]. 医学综述,2008,14:658-660.
- [4] Tsuruma T,Iwayama Y,Ohmura T,Katsurumaki T,Hata F,Furuhata T,et al. Clinical and immunological evaluation of anti-apoptosis protein, survivin-derived peptide vaccine in phase I clinical study for patients with advanced or recurrent breast cancer[J]. J Transl Med,2008,6:24.
- [5] Idenoue S,Hirohashi Y,Torigoe T,Sato Y,Tamura Y,Hariu H,et al. A potent immunogenic general cancer vaccine that targets survivin,an inhibitor of apoptosis proteins[J]. Clin Cancer Res,2005,11:1474-1482.
- [6] Otto K,Andersen M H,Eggert A,Keikavoussi P,Pedersen L,Rath C,et al. Lack of toxicity of therapy-induced T cell responses against the universal tumour antigen survivin[J]. Vaccine,2005,23:884-889.
- [7] Xiang R,Mizutani N,Luo Y,Chiodoni C,Zhou H,Mizutani M,et al. A DNA vaccine targeting survivin combines apoptosis with suppression of angiogenesis in lung tumor eradication[J]. Cancer Res,2005,65:553-561.
- [8] Kitamura H,Torigoe T,Honma I,Asanuma H,Nakazawa E,Shimozawa K,et al. Expression and antigenicity of survivin,an inhibitor of apoptosis family member, in bladder cancer: implications for specific immunotherapy[J]. Urology,2006,67:955-959.
- [9] 谢庆军,王晓彤,陆应麟. pcDNA3 与 pIRES1. neo 筛选克隆效率的比较[J]. 生物技术通讯,2002,13:115-117.

[本文编辑] 贾泽军

· 消 息 ·

《军医大学学报》(英文版)征稿启事

《军医大学学报(英文版)》(*Journal of Medical Colleges of PLA*)是由第二、三、四军医大学及南方医科大学(原第一军医大学)共同主办、国内外公开发行人(CN31-1002/R,ISSN 1000-1948)的高级医药学综合性英文学术刊物,1986年6月创刊。本刊主要报道基础医学、临床医学、预防医学、军事医学、药理学和中国医学等领域的最新科研成果、新理论、新技术和新方法。辟有专家论坛(述评)、基础研究、临床研究、综述、经验交流、短篇报道、个案报告等栏目。

本刊为中国英文版科技论文统计源期刊,并被纳入中国期刊网、万方数据库和中文科技期刊数据库等国内所有重要检索系统,已被美国《化学文摘》(CA)、俄罗斯《文摘杂志》(VINITI Abstract Journal)和波兰《哥白尼索引》(IC)等检索系统收录,期刊全文已进入爱思唯尔(Elservier)科技出版集团所属的 ScienceDirect 全文数据库(<http://www.elsevier.com/locate/jmcpla>)。

为了弘扬科研创新精神,推动医学事业发展,促进海内外学术交流,本刊面向全国和海外作者征稿。

来稿要求:来稿请附中文的文题、作者姓名、单位名称及较详细的中文摘要和 3~8 个关键词,参考文献放在文末。来稿务必写清个人通讯地址及联系电话,编辑部在接到稿件 30 日内通知作者稿件是否被采用。

刊发周期:由全国相关学科领域的知名专家和权威人士进行审稿,对审稿通过的论文 26 个月内安排刊出。国家、省部级基金资助和重点攻关项目稿件优先发表。

收费标准:审稿费 100 元/篇,不收取版面费(彩版费除外)。

投稿邮箱:jydxxb@yahoo.com.cn

本刊地址:上海市翔殷路 800 号,邮编:200433;联系电话:021-81870783(81870787,81870788)转 824 分机