

[文章编号] 1007-385X(2003)01- 0058- 02

Survivin 反义 RNA 真核表达载体的构建及鉴定

王晓娟¹, 戴国仪², 王国华¹, 朱慧芬¹, 张悦¹, 沈关心¹(1. 华中科技大学同济医学院免疫学系, 武汉 430030; 2. 内蒙古农业大学医院, 呼和浩特 010040)

* 恶性肿瘤无限增殖的主要原因是细胞凋亡调控障碍。Survivin 是新近发现的凋亡抑制蛋白家族(inhibitor of apoptosis protein, IAP)成员^[1], 特异性表达人类多种常见肿瘤中, 而不存在于正常成人组织, 能抑制 caspase 活性而发挥抗凋亡作用^[2]。有研究表明^[3,4], 应用反义策略阻断 survivin 表达可提高肿瘤细胞对化疗药物的敏感性, 诱导凋亡的发生, 已成为肿瘤治疗的新亮点。

本文构建了 survivin 反义 RNA 真核表达载体, 为降低肿瘤细胞 survivin 的表达, 进一步研究肿瘤细胞的凋亡机制提供了实验材料。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

真核表达载体 pcDNA3, 人白血病细胞株 Jurkat、HL-60 等均由本室保存。限制性内切酶 BamH I 和 EcoR I, Taq DNA 聚合酶, T4 DNA 连接酶, 逆转录试剂盒(晶美公司 MBI 产品), RPMI-1640, TRIzol RNA 分离试剂(GIBCO)。

1.2 目的基因 survivin 反义 RNA 的获取

1.2.1 Jurkat 细胞总 RNA 的提取

收集 1×10^6 个靶细胞, 采用 TRIzol RNA 分离试剂提取 RNA。

1.2.2 逆转录 PCR

取 5 μ g 总 RNA, 加入 oligo(dT)₁₈(500 μ g/ml), 按照 cDNA 合成试剂盒说明进行。PCR 扩增: 参考 survivin 基因的 cDNA 序列自行设计, 分别在上、下游引物的 5' 端人为加上 EcoR I 和 BamH I 酶切位点, 利于扩增的目的基因反定向克隆入载体 pcDNA3 中。上游引物: 5'-GAGAGAGAATTCCAAGGAGGAGCCAGACT-3'; 下游引物: 5'-GAGAGAGGATCCGAGAAGCAGCCACTGTTACC-3'。取 1 μ l 逆转录产物作模板进行 PCR 扩增。扩增条件为 96 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 60 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 30 个循环后, 于 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

1.3 pcDNA3 和 survivin 反义 RNA 的酶切片段回收

pcDNA3 和 survivin 反义 RNA 分别用 EcoR I 和

BamH I 双酶切, 37 $^{\circ}$ C 2 h, 采用琼脂糖凝胶回收试剂盒, 按说明书进行。

1.4 survivin 反义 RNA 真核表达载体构建

用限制性内切酶 EcoR I 和 BamH I 消化质粒 pcDNA3 和 survivin 基因的 RT-PCR 产物, 利用琼脂糖凝胶回收目的基因和载体片段, 用 T₄ DNA 连接酶将目的基因片段定向克隆至真核表达载体 pcDNA3 的 BamH I 和 EcoR I 位点之间, 使 survivin 基因片段反向插入此载体中。重组体转化大肠杆菌 DH5 α , 筛选 Amp 抗性克隆, 命名为 pcDNA3-SVVs, 用酶切法鉴定重组质粒。

1.5 survivin 基因的序列分析

将转化后筛选的重组子进行序列分析(由上海博亚公司完成)。

1.6 HL-60 细胞 survivin mRNA 表达的检测

以终浓度为 5 μ mol/L 的 survivin 反义 RNA 真核表达载体作用于 HL-60 细胞 48 h 后, 收集 1×10^6 个细胞, 提取总 RNA 逆转录成 cDNA, 进行 PCR 反应。引物序列为, 上游引物: 5'-CATGGGTGCCCCGACGTT-3'; 下游引物: 5'-TCAATCCATGGCAGCCAGCT-3', 并以 β -actin 为内参照。

2 结果与讨论

2.1 目的基因 survivin 反义 RNA 的获取

提取 Jurkat 细胞的总 RNA, 借助 RT-PCR 的方法扩增 survivin 基因的 cDNA 片段, 电泳结果如图 1 所示, PCR 产物与预期片段大小一致。

2.2 survivin 反义 RNA 真核表达载体的构建

将筛选到的 pcDNA3-SVVs 质粒小量快提后作内切酶谱分析。用限制性内切酶 Hind III 或 BamH I + EcoR I 将 pcDNA3-SVVs 重组质粒线性化或切成 2 条片段, 证明插入片段和载体的大小均正确(图 2)。

2.3 survivin 基因的序列分析

将重组子 pcDNA3-SVVs 进行序列分析, 并与文

[基金项目] 国家自然科学基金资助(39970693)

[通讯作者] 沈关心, E-mail: myjsz@mails.tjmu.edu.cn

献发表的序列(NM001168)相比较,二者完全一致,表明重组子中已含有 survivin 反义基因片段。

图1 survivin 反义核酸 RT-PCR 产物电泳

1: 100 bp marker; 2: Survivin cDNA

图2 pcDNA3-SVVs 的酶切鉴定

1: pcDNA3-SVVs/EcoRI + BamHI; 2: pcDNA3-SVVs/Hind III;
3: pcDNA3/Hind III; 4: Survivin cDNA; 5: λDNA/Hind III

2.4 survivin 反义 RNA 对 survivin mRNA 表达的影响

RT-PCR 产物电泳结果如图 3 所示,转染 pcDNA3-SVVs 后,HL-60 细胞的 PCR 产物电泳带较对照组明显减弱,而不影响 β-actin 的表达,说明我们所构建的 survivin 反义 RNA 真核表达载体的抑制作用具有特异性。

图3 survivin 反义核酸对 survivin mRNA 表达的影响

1: Before transfection with pcDNA3-SVVs; 2: After transfection with pcDNA3-SVVs; 3: After transfection with pcDNA3; 4: DNA marker

反义 RNA 是指与 mRNA 互补的 RNA 分子,自 80 年代被发现后,即引起广泛关注并成为人们研究调控

基因表达的有效工具,为治疗和研究的目的是,利用基因重组技术在适宜启动子和转录终止子之间反向插入一段靶基因,人们开始在体外构建反义 RNA 表达载体,然后转染细胞并使其在细胞中稳定表达反义 RNA。该反义 RNA 具有特异性抑制某个靶基因的表达或封闭某一特定蛋白质功能的特点,其封闭作用强,效应明显、持续,因此该技术已在基础研究与临床治疗中取得辉煌成果。

细胞凋亡障碍与肿瘤发生、发展的关系已引起人们的高度重视。survivin 是 IAP 家族成员之一,能通过 caspase 依赖和 caspase 非依赖 2 条途径来发挥抗凋亡作用^[2]。survivin 在多种肿瘤表达的普遍性^[1],使得应用靶向 survivin 的阻断性免疫治疗或基因治疗促进肿瘤细胞凋亡的抗肿瘤疗法成为可能,而且靶向治疗可选择性增加肿瘤细胞对以凋亡为机制的治疗方法的敏感性,提高肿瘤病人总体生存率,有望成为肿瘤治疗新的里程碑。

本实验选择 pcDNA3 上 2 个酶切位点 BamH I 和 EcoR I,并在 survivin cDNA 2 端人为引入这 2 个位点,同时将目的基因酶切片段反向克隆入 pcDNA3,并经酶切鉴定证明克隆成功。将 survivin 反义核酸转染 HL-60 细胞后可明显抑制 survivin mRNA 的表达,这表明所构建的反义核酸载体抑制作用具有特异性。

我们通过构建 survivin 反义 RNA 真核表达载体,用于转染肿瘤细胞后,进行细胞效应的比较研究,以期利用反义技术进一步确定 survivin 在肿瘤细胞中的作用及生物学意义,探讨 survivin 抗凋亡的机制,也可为肿瘤基因治疗提供一定的理论基础。

[关键词] 白血病; survivin; 反义核酸

[中图分类号] R392.11 [文献标识码] A

[参考文献]

- [1] Ambrosini G, Adida C, Altieri DC, *et al.* A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma[J]. *Nat Med*, 1997, 3: 917-921.
- [2] Shin S, Sung BJ, Cho YS, *et al.* An anti-apoptotic protein human survivin is a direct inhibitor of caspase-3 and caspase-7[J]. *Biochemistry*, 2001, 4: 1117-1123.
- [3] Olie RA, Simoes WP, Baumann B, *et al.* A novel antisense oligonucleotide targeting survivin expression induces apoptosis and sensitizes lung cancer cells to chemotherapy[J]. *Cancer Res*, 2000, 60: 2805-2809.
- [4] Ambrosini G, Adida C, Sirugo G, *et al.* Induction of apoptosis and inhibition of cell proliferation by survivin gene targeting[J]. *J Biol Chem*, 1998, 273: 11177-11182.

[收稿日期] 2002-08-20

[修回日期] 2002-10-20