

[文章编号] 1003—4684(2020)05-0071-04

表达近红外荧光蛋白的结肠癌细胞系的建立

段海潇,杨俊寒,王 琳,王润杨,张紫怡,邹宗幸,胡 翰,汪 洋,刘滨磊

(湖北工业大学生物工程与食品学院,湖北 武汉 430068)

[摘 要] 通过 PiggyBac 转座子系统,构建能够稳定表达近红外荧光蛋白 iRFP720 的 CT26 鼠结肠癌细胞株,通过嘌呤霉素筛选获得 CT26-iRFP720 单克隆细胞株。流式细胞仪验证表明所得 CT26-iRFP720 细胞株纯度为 98.1%; Western Blot 检测结果表明, iRFP720 基因的引入不会改变细胞 PD-L1 的表达。将构建成功的细胞株植入 BALB/c 小鼠皮下,成功建立 CT26-iRFP720 肿瘤模型,且利用动物活体成像可以观察到 iRFP720 的表达。结果表明稳定,可实时观察的 CT26-iRFP720 结肠癌 BALB/c 小鼠模型成功建立。

[关键词] CT26; iRFP720; 细胞株; 荧光成像

[中图分类号] R153 [文献标识码] A

结直肠癌是人类长期以来难以攻克的恶性肿瘤,对人类的生命安全构成极大的威胁^[1]。结肠癌研究需建立实时观测的动物模型,而荧光蛋白作为标记分子的技术为生物医学基础研究提供了重要手段。与传统的标记分子相比,近红外光域的荧光蛋白(如 iRFP713、iRFP670、iRFP682、iRFP702、iRFP720)特异性更强,示踪背景更弱,且无需底物或辅助因子参与。其中 iRFP720 荧光蛋白使用成本低,激发光谱连续且范围广,荧光较强,稳定性良好,用于荧光成像时在活体动物中穿透能力强,具有检测灵敏度高和操作简便等优点^[2],可以快速检测到稳定表达 iRFP720 的靶细胞。

本研究旨在构建稳定表达 iRFP720 的 CT26 细胞,建立 BALB/c^[3] 小鼠的 CT26-iRFP720 皮下肿瘤模型,并在动物活体成像设备中进行观测^[4]。

1 实验材料

iRFP720 基因由金斯瑞生物合成,插入到质粒 PiggyBac Dual Promoter (pPBDP),构建 pPBDP-iRFP720 作为供体质粒,Super PiggyBac Transposase(pSPBT)作为辅助质粒,上述材料由 System Biosciences 公司获得。CT26 细胞购于北京协和医院细胞资源中心,CT26 细胞和构建成功的 CT26-iRFP720 细胞所用的培养基是 DME/F-12 (HyClone, USA),MEM (HyClone, USA) 用于稀释质粒,胎牛血清购自浙江天杭生物科技股份有限公司。

Lipofectamine 3000 试剂盒(含 Lipofectamine 3000 和 P3000)从 Thermo Fisher Scientific 公司购买; Western Blot IP 细胞裂解液、PMSF、BCA 蛋白定量试剂盒和 SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒购自碧云天生物;硝酸纤维素滤膜购于 Millipore;脱脂乳购于 BD;PD-L1 鼠单克隆抗体和辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗体购自武汉三鹰生物公司;ECL 化学发光显色液购自 Bio-sharp。

2 实验方法

2.1 嘌呤霉素筛选 CT26 细胞并确定致死浓度

CT26 细胞消化后计数,将细胞密度调整至 2×10^5 /mL,每孔 500 μ L 接种于 24 孔板,于 37℃,5% 的 CO₂ 培养箱中培养 24 h,次日将不同浓度的嘌呤霉素加入到 CT26 细胞中,连续 6 d 对细胞状态进行观察记录,其间含嘌呤霉素的培养基每 2 d 更换一次,用移液枪小心吸除死亡的细胞,再加入含嘌呤霉素的细胞培养基,第 4 天通过观察细胞全部死亡对应的嘌呤霉素浓度确定最低致死浓度^[5]。

2.2 细胞转染试验

首先准备需要转染的细胞 CT26,以密度为 2×10^5 /mL 加入 24 孔板,每孔 500 μ L,放入 37℃,5% 的 CO₂ 培养箱中培养 24 h。将质粒 pPBDP-iRFP720 和质粒 pSPBT 以质量比为 5 : 1 混合后,用含 MEM 培养基稀释 P3000 的 A 管再去稀释质粒,将 Lipofectamine3000 用 MEM 培养基稀释后放入

[收稿日期] 2020—02—27

[第一作者] 段海潇(1993—),男,山西晋城人,湖北工业大学硕士研究生,研究方向为生物化工

[通信作者] 刘滨磊(1962—),男,湖北武汉人,湖北工业大学教授,研究方向为生物制药

到B管,A管和B管的终体积为 25 μL 。两管均匀混合后,室温静置 10 min,再将复合物加入到细胞中^[6],于 37 $^{\circ}\text{C}$,5%的 CO_2 条件下培养 72 h 后观察 GFP 的表达情况。如果 GFP 的表达率大于 30%,即可继续进行下游实验,用嘌呤霉素筛选。

2.3 CT26-iRFP 细胞单克隆挑取

嘌呤霉素筛选完成后,将剩余的细胞消化并计数,以 10 倍梯度稀释并调整细胞密度为 $5 \times 10^2/\text{mL}$,接种于 96 孔板,每孔 100 μL ^[7],培养 24 h 待细胞贴壁后观察细胞,记录下仅有单个细胞的孔。

2.4 流式细胞仪检测 CT26-iRFP 细胞纯度

将 CT26 细胞作为对照细胞,筛选出的细胞培养至 6 孔板中,消化后用 100 μL 的 PBS 重悬后上样,用流式细胞仪检测 CT26-iRFP720 中 GFP 的表达率^[8]。

2.5 Western Blot 检测 CT26-iRFP720 细胞上 PD-L1 表达

将 CT26 细胞和 CT26-iRFP720 细胞接种于 T25 细胞培养瓶中,用含 10% FBS 的 DMEM 培养 24 h,加入 IP 裂解液^[9]置冰上裂解细胞 15 min,于 12000 r/min 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 20 min,吸取上清,按照 BCA 说明书定量分析蛋白浓度。配 8% 的 SDS-PAGE 分离胶与浓缩胶,静置 30 min,待胶凝固后即可使用。将 40 μL 的 5 \times 蛋白上样缓冲液加入到 160 μL 蛋白上清中,加热 100 $^{\circ}\text{C}$,10 min,再置于冰盒内,冷却后在上样槽内加入待检蛋白,先用 80 V 电泳至 Marker 有明显分层,接着调整电压至 120 V 电泳^[10],待溴酚蓝移行至分离胶底部时,停止电泳,将 PAGE 胶进行切割后放置于 NC 膜上,用滤纸夹住后进行转膜,其间将配好的 TBST^[11]作为含 5% 脱脂奶粉的封闭液溶剂,转膜结束后于 25 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 1 h,用 TBST 洗膜 3 次,用含 5% BSA 的 TBST 以 1:1000 稀释一抗对膜孵育,4 $^{\circ}\text{C}$,过夜,24 h 后用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 以 1:10000 比例配制二抗后与膜孵育 1 h,其间摇床震荡,TBST 洗膜 3 次,最后加入 ECL 显色液,在化学发光成像系统中拍摄显色结果。

2.6 活体成像系统检测 iRFP720 表达

将 1×10^6 个 CT26-iRFP720 细胞注射入 BALB/c 小鼠皮下^[12],每只小鼠注射 100 μL 细胞,建立肿瘤模型,在第 24 天用动物活体成像系统拍摄。

3 实验结果

3.1 CT26-iRFP720 细胞系构建

如图 1 所示,iRFP720 cDNA 序列全长 951 bp,

将该目的基因插入到 PiggyBac(PB)载体质粒的,通过 CMV 启动子启动转录,Puro 和 GFP 基因通过短肽 T2A 序列链接,连接后的序列由 EF1 α 启动子启动,获得 pPBDP-iRFP720 质粒。

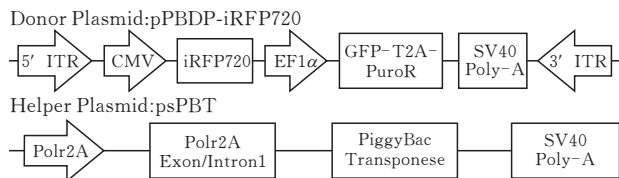


图 1 转座子系统质粒

3.2 质粒转染 CT26 细胞

转座子载体质粒 pPBDP-iRFP720 和辅助质粒 pSPBT 转染 CT26 细胞,可见发绿色荧光的 CT26-iRFP720,说明转染成功。将 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的嘌呤霉素加入转染后的 CT26 细胞,4 d,未转染的 CT26 细胞死亡(图 2),存活发绿色荧光的细胞为 CT26-iRFP 细胞。

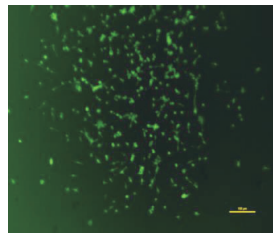


图 2 PBDP-iRFP720 转染 CT26

3.3 CT26-iRFP720 单克隆细胞挑取

收集 CT26-iRFP720 细胞,稀释至 $5 \times 10^2/\text{mL}$ 并接种于 96 孔板,每孔 100 μL ,培养 48 h 可见单克隆细胞。图 3a 为在培养 48 h 后用倒置显微镜分别在白光下和绿光下拍摄的 CT26-iRFP720 单克隆细胞。

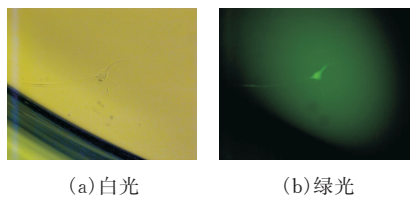


图 3 不同光线拍摄的 CT26-iRFP720 单克隆挑取图

3.4 流式细胞仪检测 CT26-iRFP720 单克隆细胞

CT26 细胞作为对照组和 CT26-iRFP720 细胞作为实验组,经流式细胞仪检测两组细胞 GFP 的表达(图 4),显示 CT26-iRFP720 中 GFP 表达率达到 98.1%。

3.5 Western Blot 检测 CT26-iRFP720 细胞 PD-L1 的表达

收集 CT26 和 CT26-iRFP720 细胞,分别提取蛋白后进行 Western Blot 检测。图 5 显示 CT26 和 CT26-iRFP720 两组细胞中的目的蛋白 PD-L1 均有

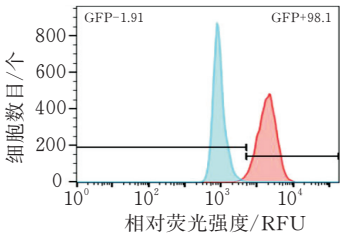


图 4 流式细胞仪检测 CT26-iRFP720 单克隆细胞纯度较高表达,改造后的稳转细胞系 CT26-iRFP720 的 PD-L1 表达量与 CT26 无明显差异。

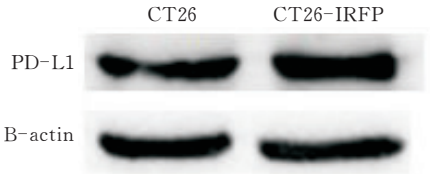


图 5 Western Blot 检测 CT26-iRFP720 细胞 PD-L1 表达

3.6 BALB/c 模型建立

为了证明 CT26-iRFP 细胞系能够在小鼠体内表达 iRFP720,在小鼠右侧背部植入 CT26-iRFP720 细胞(图 6)。在第 24 天时,用活体成像系统观察到植瘤部位有明显的肿瘤生长,且 iRFP720 表达显著。

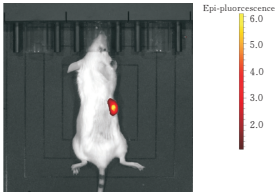


图 6 动物活体成像拍摄 CT26-iRFP720 图

4 结论

本研究应用脂质体转染法将质粒 pPBDP-iRFP720-GFP 和 pSPBT 转入 CT26 细胞中,用嘌呤霉素作为筛选试剂,通过显微镜观察荧光及流式细胞仪检测,获得 GFP 高纯度表达的 CT26-iRFP720 单克隆细胞株,经 Western Blot 检测,CT26 和 CT26-iRFP720 中 PD-L1 的表达表达无明显差异。在动物实验中,将构建成功的 CT26-iRFP720 细胞于 BALB/c 小鼠背部右侧皮下植瘤,活体成像检测到较强的 iRFP720 信号,说明已构建成功的

CT26-iRFP720 细胞株在动物体内成功表达,因此,CT26-iRFP720 细胞株既可以用于体外试验,也可以开展动物体内研究。

[参 考 文 献]

[1] Wang C Z, Yuan C S. Potential role of ginseng in the treatment of colorectal cancer[J].The American Journal of Chinese Medicine, 2008,36(6):1019-1028.

[2] Shcherbakova D M, Verkhusha V V. Near-infrared fluorescent proteins for multicolor[J]. Nature Methods,2013,10(8):751-754.

[3] Tangpricha V, Spina C M, Chen T C, et al. Vitamin d deficiency enhances the growth of MC-26 colon cancer xenografts in balb/c mice[J]. Journal of Nutrition, 2005,135(10):2350.

[4] Honigman A, Zeira E, Ohana P, et al. Imaging transgene expression in live animals[J]. Molecular Therapy,2001,4(3):239-249.

[5] 喻琴,张赞,毕杨,等. 构建稳定表达 RFP 及嘌呤霉素抗性的 K562 细胞株[J].医学分子生物学杂志,2011,8(4):304-308.

[6] 石海鹏. shRNA 抑制 maspin 表达对胃癌细胞 SGC-7901 侵袭能力的影响[D].重庆:重庆医科大学,2009.

[7] 毛成毅,杜娟,马瑜,等.人 PD-L1 真核表达载体的构建及结肠癌细胞稳定表达单克隆株的筛选和鉴定[J].现代肿瘤医学,2018,26(6):843-847.

[8] 刘锡娟,丁慧荣,田志华,等. FACS Aria 流式细胞仪无菌操作分选高纯度细胞亚群[J].安徽医科大学学报,2014,49(12):1811-1815.

[9] 王琴. 钙离子载体 A23187 对脐血来源 EPC 作用及应用蛋白质芯片检测蛋白质表达差异的研究[D].北京:中国协和医科大学,2010.

[10] Bi X W, Wang H, Zhang W W, et al. PD-L1 is upregulated by EBV-driven LMP1 through NF-κB pathway and correlates with poor prognosis in natural killer/T-cell lymphoma[J]. Journal of Hematology & Oncology, 2016, 9(1):109.

[11] 谢鑫. 超声微泡负载自杀基因 HSV1-TK 联合前药更昔洛韦对前列腺癌细胞抑制效应的研究[D].重庆:重庆医科大学,2012.

[12] 陆洋. MiR-200a 对人胰腺癌干细胞上皮—间质转化(EMT)及体外生物学行为影响的实验研究[D].苏州:苏州大学,2014.

Construction of Colorectal Cancer Model with the Stable Expression of iRFP720

DUAN Haixiao,YANG Junhan,WANG Lin,WANG Runyang, ZHANG Ziyi, ZOU Zongxing, HU Han,WANG Yang ,LIU Binlei

(School of Biological Engin. and Food Science , Hubei Univ. , of Tech .Wuhan 430068, China)

Abstract: To construct a CT26 iRFP720 cell line with stable expression of near infrared fluorescent protein

iRFP720 and resistance, CT26 iRFP720 monoclonal cell line was obtained by puromycin selection. The purity of CT26 iRFP720 monoclonal cell line was 98.2% by flow cytometry detection. At the same time, western blot showed that the introduction of iRFP 720 gene did not change the expression of PD L1. CT26 iRFP720 tumor model was successfully established by implanting subcutaneously the constructed cell line into the right flank of BALB/c mice, and the expression of iRFP720 could be observed by in vivo Fluorescence imaging. The results showed that a stable and real time observed model of CT26 iRFP720 colon cancer in BALB/c mice was successfully established.

Keywords: CT26; iRFP720; cell lines; Fluorescence imaging

[责任编辑：张 众]

(上接第 30 页)

Research and Optimization of Conventional Sintering Process of Zinc Oxide Varistor Ceramics

YIN Yu¹, CHEN Xin¹, LIU Lingyun¹, LIU Jianjun²

(1Solar Energy Efficient Use of Hubei Province Collaborative Innovation Center, Hubei Univ. of Tech., Wuhan 430068,China;

2 Xiangyang Sansan Electric Co., Ltd, Zaoyang 441200, China)

Abstract: Zinc oxide varistor ceramics are widely used in the manufacturing of arresters, surge absorbers and other devices for their excellent electrical properties. The work is aimed to determine the optimal process for the conventional sintering of zinc oxide varistor ceramics. In this paper, the orthogonal experiment method was employed. The effects of four factors, such as heating rate, sintering temperature, holding time and cooling rate, on the electrical properties and density of zinc oxide varistor ceramics were considered by orthogonal experiment. After demonstration, optimal sintering process and primary and secondary order of influencing factors of ZnO varistor ceramics were sintering temperature 1150℃, holding time 4 h and cooling rate 60℃/h, heating rate 30℃/h. Through the verification experiment, the indexes of the ZnO varistor ceramics fired by the process conditions are better than those of the samples, which verifies the reliability of the conclusions of this paper.

Keywords: zinc oxide varistor ceramics; conventional sintering process; orthogonal experiment; optimal process conditions

[责任编辑：张岩芳]

(上接第 64 页)

Research on Improved Inception-Resnet v2 Image Classification Algorithm

SHU Jun¹, LI Zhenya²

(School of Electrical and Electronic Engin., Hubei Univ. of Tech., Wuhan 430070, China)

Abstract: According to the requirements of industrial production, different levels of products need to be classified. The Inception-ResNet v2 algorithm model has a relatively low classification accuracy and a slow detection speed, which cannot meet the needs of industrial field real-time detection and classification. This study proposed an improved algorithm based on Inception-ResNet v2 for these problems. This method used the dense series method in the network's Inception-ResNet v2 structure to strengthen the feature transfer of the original image and extract more surface features. It also improved the convolution method of the network, using deep separable convolutions, while reducing features. The number of graphs was used to reduce the computation of the network and thereby improvd the training speed of the overall network. The experimental results show that the accuracy of the improved GoogLeNet algorithm is increased by 7%, and the operation amount is reduced by 19%.

Keywords: industrial pictures; Inception-ResNet v2; deeply separable convolution

[责任编辑：张岩芳]