论著

文章编号:1000-5404(2006)11-1154-03

MUC1 黏蛋白模拟表位的筛选和原核表达

崔志刚[1],宋 波[1],张立新[2],路浩军[2],李春海[2] ([1]第三军医大学西南医院全军泌尿外科中心,重庆 400038;[2]军事医学科学院附属医院肿瘤分子生物学实验室,北京 100850)

提 要:目的 从噬菌体随机12肽库中筛选出MUC1抗原的模拟表位,构建MUC1模拟表位的原核表达载体。**方法** 通过生物淘洗、基因测序和氨基酸序列比较,筛选出模拟表位,构建重组表达质粒PET-31b(+),用IPTG诱导表达,亲和层析纯化,Western blot鉴定其抗原性。**结果** 筛选到的模拟表位与MUC1单克隆抗体的亲和力较强。成功构建了重组表达质粒,重组蛋白在BL21(DE3)plysS中得到诱导表达,纯化的目的蛋白在SDS-PAGE上呈现特异的单一条带,Western印迹也检测到目的蛋白特异条带。**结论** 筛选到了MUC1的模拟表位,成功表达和纯化了MUC1模拟表位蛋白,为研究其在肿瘤疫苗方面的应用奠定基础。

关键词: MUC1;噬菌体表面展示;模拟表位;克隆;表达

中图法分类号: Q503; Q513.2; Q591.2 **文献标识码**: A

Selection and prokaryotic expression of MUC1 mimic epitope

CUI Zhi-gang[1], SONG Bo[1], ZHANG Li-xin[2], LU Hao-jun[2], LI Chun-hai[2] ([1]Urinary Surgery Research Center, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038; [2]Department of Tumor Molecular Biology, The Affiliated Hospital of Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100580, China)

Abstract: **Objective** To screen MUC1 antigen mimic epitope by phage display peptide library technology and to construct a recombinant plasmid expressing MUC1 antigen mimic epitope. **Methods** MUC1 mimic epitope was screened by Biopanning, DNA sequencing and amino acid sequence comparison. The gene was constructed into PET-31b(+) expression vector and expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3) after transformation and induction by IPTG. The complete protein of the host bacteria was extracted for SDS-PAGE. The recombinant protein was purified by affinity chromatography on a Ni^{2+}-sepharose column and detected by Western blotting. **Results** The selected MUC1 mimic epitope could specifically combine with MUC1 monoclonal antibody. The recombinant expression vector PET-31b(+)-MUC1 was constructed successfully after the fusion protein was induced with IPTG. A specific protein band was shown on SDS-PAGE profile and detected by Western blotting. **Conclusion** An MUC1 mimic epitope was screened out. The epitope fusion protein was successfully expressed for the development of tumor vaccines targeting MUC1.

Key words: MUC1; phage display library; mimic epitope; cloning; expression

寻找和研究新的有效的肿瘤抗原表位已成为肿瘤研究领域的热点之一。近年研究表明MUC1黏蛋白(以下简称MUC1)在多种肿瘤中异常表达并形成肿瘤特异性表位,在肿瘤患者体内具有免疫原性,可以诱导体液免疫与细胞免疫,为肿瘤免疫治疗提供了新机遇[1,2]。本研究首先选用抗MUC1多肽表位的单抗BC2为筛选配基,从噬菌体表面展示的随机12肽库中筛选出MUC1抗原的模拟表位,获得表位基因,构建表达载体并在大肠杆菌中高效表达,为深入探讨MUC1模拟表位表达机制及其在肿瘤疫苗方面的应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 肽库筛选主要试剂

噬菌体随机肽库(Ph. D. -12™肽库)为New England Biolabs试剂盒,所用受体菌为XL1-blue,测序引物5′-CCC TCA TAG TTA GCG TAA CG-3′,由上海申能博彩公司合成。BC2单克隆抗体由澳大利亚奥斯汀研究所邢培祥教授惠赠;正常MUC1抗

基金项目:国家"863"课题(2002AA214111)
Supported by the National "863" Key Research Project of China (2002AA214111)

作者简介:崔志刚(1968-),男,河南省焦作市人,博士研究生,主治医师,主要从事肿瘤疫苗方面的研究。电话:(010)86563938
通讯作者:张立新,电话:(010)66931773

收稿日期:2005-12-20;修回日期:2006-03-21

原由军事医学科学院附属医院肿瘤分子生物实验室制备[3]。

1.2　质粒与菌株

$DH_{5\alpha}$感受态细胞、表达宿主菌 BLR(DE3)plysS、质粒 PET-31b(+)为 Novagen 公司。

1.3　分子生物学试剂

T_4DNA 连接酶、*Taq* 酶购自 TaKaRa 公司，限制性内切酶 *Alw*N Ⅰ为 NEB 公司。辣根过氧化物酶(HRP)酶标羊抗鼠 IgG 购自北京中山公司，模拟表位基因和克隆 PCR 上下游引物 PET-KSI 及 PET-T7 由北京三博远志生物技术有限公司合成，重组质粒上目的基因的序列测定由北京奥科生物技术有限公司完成。

1.4　噬菌体肽库的筛选、克隆活性及 DNA 序列测定

用酶联板法进行筛选，进行 ELISA 分析克隆活性，模板 DNA 送公司测序。

1.5　MUC1 模拟表位基因和 PET 表达载体的制备

合成目的基因片段，每条链 5′端磷酸化，编码链 3′端加上 ATG 粘末端，互补链 3′端加上 CAT 粘末端，选用 *E. coli* 大肠杆菌偏好密码子(基因岛网站提供 www. genedao. com)。目的基因片段直接退火，2 条互补链连接成双链目的 DNA 片段，且 3′端暴露黏性末端，然后进行自连。表达载体选用 PET-31b(+)载体，首先酶切，然后 5′端去磷酸化(按试剂盒说明)。

1.6　PET 原核表达载体的构建

用最大重复序列目的片段与 PET-31b(+)载体连接，然后将连接产物转化 $DH_{5\alpha}$感受态细胞，随机挑取菌斑进行菌落 PCR，上游引物 PET-KSI 为 GCAAGGTGGTGAGCATCC，下游引物 PET-T7 为 GCTAGTTATTGCTCAGCGG，反应条件为 94 ℃变性 2 min，94 ℃ 30 s、62 ℃ 30 s、72 ℃ 1 min，共 25 个循环，最后 72 ℃延伸 5 min。3% 琼脂糖凝胶电泳鉴定，选用插入最大片段的重组质粒进一步转化高效表达菌 BLR(DE3) plysS，最后保存阳性重组菌并送公司测序。

1.7　MUC1 模拟表位的诱导表达

取经鉴定的重组菌 37 ℃培养过夜，按 1∶10 稀释后 37 ℃，250 r/min，震荡至 $D(600)$值约为 0.6 时，加入 IPTG 至终浓度 0.1 mmol/L，37 ℃诱导 0、2、3、4、5、6 h，分别取 1 ml 菌液离心加入 50 μl 2 × Loading Buffer 100 ℃变性 5 min，行 15% SDS-PAGE，观察有无目的蛋白的表达。

1.8　Western 印迹

SDS-PAGE 电泳后的凝胶，经电转仪将蛋白质转印到硝酸纤维素膜上，一抗为 BC2 单克隆抗体，二抗为辣根过氧化酶标记的羊抗鼠 IgG，显色检测。

1.9　蛋白纯化

MUC1 模拟表位蛋白在原核细胞的主要表达形式是包涵体，常规超声破菌，得到目的蛋白的包涵体，Ni^{2+}亲和层析柱进行纯化，SDS-PAGE 电泳观察蛋白纯化情况。

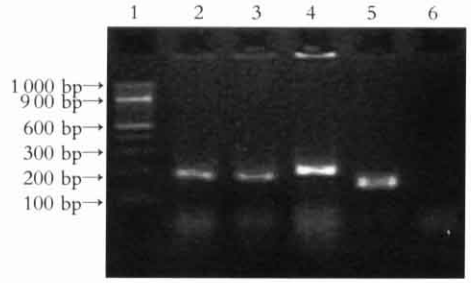
2　结果

2.1　阳性噬菌体克隆活性分析

筛选出的 13、14 号噬菌体克隆能较大程度地特异性抑制抗原抗体结合，具有较高的抑制率，均在 50% 以上[4]。

2.2　MUC1 模拟表位的原核表达载体构建和鉴定

目的基因片段自连后凝胶电泳鉴定，最大连上 3 个重复序列。克隆 PCR 结果如图 1 所示，上下游引物之间扩增出空质粒长度为 158 bp，目的片段长度为 39 bp，第 4 泳道克隆片段长度大于 200 bp，说明至少有 2 个目的片段插入质粒载体。测序结果表明：插入 2 个目的基因，与原序列完全一致。选用此重组质粒进一步转化高效表达菌 BLR(DE3)plysS。



1：DNA 标准；2－5：PET-31b(+)/MUC1 重组质粒；6：阴性对照

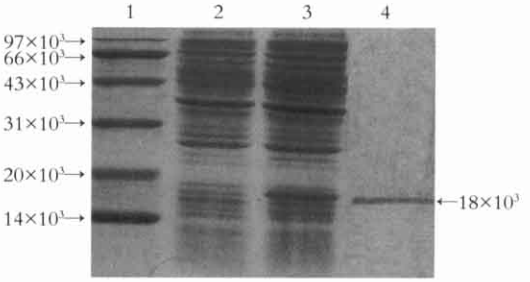
图 1　PET-31b(+)/MUC1 重组质粒的克隆 PCR 鉴定

2.3　MUC1 模拟表位蛋白的诱导表达

经诱导 2、3、4、5、6 h 后发现，在 0.5 mmol/L IPTG 30 ℃、诱导 4 h，蛋白在包涵体内可得理想表达，表达蛋白的分子量与理论值(18×10^3)相符。

2.4　MUC1 模拟表位表达产物的纯化

用 Ni^{2+}亲和层析柱对目的蛋白进行纯化，结果见图 2。



1：蛋白标准；2：阴性对照；3：未纯化蛋白；4：纯化蛋白

图 2　MUC1 模拟表位蛋白的纯化

2.5　MUC1 模拟表位蛋白鉴定

经 Western blot 检测，MUC1 模拟表位显色条带与 SDS-PAGE 电泳图纯化蛋白位置相对应，证明所表达蛋白的特异性，具有良好的抗原性。

3　讨论

MUC1 为多形态的一种高糖基化、高分子量的跨膜糖蛋白，广泛分布于人呼吸道和泌尿生殖道的上皮细胞。其结构由核心肽和糖链组成，核心肽由胞外段、跨膜段和胞内段组成。胞外段决定着 MUC1 特异性的空间结构和免疫原性，含有 20 ~ 125 个连续重复序列，

抗原表位主要集中在这一区域，许多单克隆抗体同MUC1反应就是在这些位点上进行。此序列内包含的肽表位不仅能被抗体识别，也可以MHC限制性和非MHC限制性方式活化CTL，从而特异性杀伤表达MUC1的肿瘤细胞。但是，这种肽表位在正常情况下被占大多数的糖链成分所掩盖，不能被机体免疫系统识别。在上皮细胞恶性转化过程中，MUC1发生质与量的改变，而且伴随一系列结构和功能改变，暴露出肽表位及新的碳水化合物表位。由于MUC1在肿瘤细胞上异常表达，使之具有区别于正常MUC1的肿瘤特异性抗原，因而成为肿瘤生物学治疗的理想靶分子[1,2]。因此，可设计MUC1核心肽的表位或模拟表位作为肿瘤疫苗来诱发针对肿瘤细胞的特异性体液和细胞免疫应答。虽然肿瘤MUC1的多肽表位正常时被糖链覆盖，不易引起免疫应答，但MUC1毕竟是一种自身抗原，在用MUC1多肽进行免疫治疗时，并不能完全排除产生自身免疫的可能性。模拟表位肿瘤疫苗的优点在于：①作为一种异源分子，免疫原性强，易诱导产生特异性细胞和体液免疫应答。②安全性好：可减少诱发自身免疫性疾病的危险。目前已有报道模拟抗原用于人体临床试验，患者表现出较好耐受性。③易制备：通过噬菌体随机肽库技术用纯化的单克隆抗体可以很容易从随机肽库中筛选出与之结合的模拟表位。本疫苗也可通过选择合适的佐剂或细胞因子（如IL-2）联合应用来强化特异性细胞免疫应答，所诱导的体液免疫应答也能对微小转移病灶中肿瘤细胞起到较好的杀伤作用[5,6]。

目前噬菌体展示技术日益成熟，其广泛应用于抗原表位的筛选和鉴定以及小分子多肽疫苗的研究[7]。有研究证实噬菌体展示的肿瘤相关抗原决定簇在肿瘤免疫治疗中可作为一种有效的疫苗[8]。本研究首先采用特异性识别MUC1核心肽的单抗BC2作为筛选配基，从噬菌体随机12肽库中筛选到抗原表位，然后通过其多肽序列和天然抗原表位的氨基酸序列进行同源性比较，发现13号克隆的氨基酸序列与MUC1核心序列最不具有同源性，可能为其模拟表位。进一步用ELISA和竞争ELISA实验证实此克隆能模拟MUC1多肽表位与BC2Ab特异结合，是MUC1的模拟表位。

本实验所用的pET-31b（+）表达载体是专为多肽在大肠杆菌的诱导表达而设计，插入基因上游有KSI基因，下游有组氨酸六聚体以便于亲和纯化，具有单酶切位点*AlwN* Ⅰ，编码序列可以通过蛋氨酸残基相互连接，形成多个重复序列，经IPTG诱导后，T7 RNA聚合酶大量表达，该酶选择性地作用于控制外源基因表达的T7启动子，从而使几乎所有的细胞资源被用来表达目的基因，从而提高产量，所用的Ni-柱亲和纯化系统特异性较高，可以获得高纯度的蛋白。本实验所纯化的MUC1模拟表位融合蛋白具有较好的抗原活性和较高的纯度，可进一步免疫动物，获得高效价的多克隆抗体，也可用于检测肿瘤患者血中MUC1抗体的出现概率，有助于选择该抗原制备的肿瘤疫苗的最佳使用候选者，证实MUC1模拟表位抗原用于肿瘤诊断和治疗的意义[9,10]。PET-31b（+）高效表达载体理论上最多可插入6个自连目的基因，本研究测序结果表明重组质粒中插入2个重复目的片段，诱导表达获得的融合蛋白分子量相对较小，有待以后进一步提高实验技术，以期获得较大分子量融合蛋白，提高其免疫原性。MUC1模拟表位融合蛋白的获得为进一步研究MUC1模拟表位表达机制及其在肿瘤免疫治疗方面的应用奠定了重要基础。

参考文献：

[1] TAYLOR-PAPADIMITRIOU J, BURCHELL J, MILES D W, *et al*. MUC1 and Cancer[J]. Biochim Biophy Acta, 1999, 1455(2-3): 301-313.

[2] BRAYMAN M, THATHIAH A, CARSON D D, *et al*. MUC1: a multifunctional cell surface component of reproductive tissue epithelia[J]. Reprod Biol Endocrinol, 2004, 2: 4.

[3] 张立新，李春海，陆雅芬，等. 血清MUC1粘蛋白IRMA及其初步临床应用[J]. 中华核医学杂志，1997，17(4)：211-213.

[4] 崔志刚，宋 波，张立新，等. MUC1黏蛋白模拟表位的筛选和鉴定[J]. 免疫学杂志，2006，22(2)：210-212.

[5] LEROY X, COPIN M C, DEVISME L, *et al*. Expression of human mucin genes in normal kidney and renal cell carcinoma[J]. Histopathology, 2002, 40(5): 450-457.

[6] RAHN J J, DABBAGH L, PASDAR M, *et al*. The importance of MUC1 cellular localization in patients with breast carcinoma: an immunohistologic study of 71 patients and review of the literature[J]. Cancer, 2001, 91(11): 1973-1982.

[7] ROMAGNOLI G, POLONI F, FLEGO M, *et al*. Epitope mapping of the monoclonal antibody MM12.10 to external MDR1 P-glycoprotein domain by synthetic peptide scanning and phage display technologies [J]. Biol Chem, 1999, 380(5): 553-559.

[8] WU Y, WAN Y, BIAN J, *et al*. Phage display particles expressing tumor-specific antigens induce preventive and therapeutic anti-tumor immunity in murine p815 model[J]. Int J Cancer, 2002, 98(5): 748-753.

[9] IMAI M, HWANG H Y, NORRIS J S, *et al*. The effect of dexamethasone on human mucin 1 expression and antibody-dependent complement sensitivity in a prostate cancer cell line *in vitro* and *in vivo*[J]. Immunology, 2004, 111(3): 291-297.

[10] 杨清浩，王祥卫，金 燕，等. 噬菌体随机肽库筛选MUC1抗原模拟表位[J]. 第三军医大学学报，2005，27(13)：1332-1334.

（编辑 龙 亮）