文章编号:1000-5404(2008)08-0717-04

论著

慢性粒细胞白血病 bcr/abl 的糖基化磷脂酰肌醇锚定修饰及在 COS-7 细胞膜上的表达

陶 崑[1],王 东[2],曾建明[2],黄世峰[2],陈新敏[2],黄宗干[3],冯文莉[2] (重庆医科大学:[1]基础医学院免疫学教研室,[2]临床血液学教研室,临床检验诊断学省部共建教育部重点实验室,[3]附属第一医院血液科,重庆 400016)

摘 要:目的 构建与糖基化磷脂酰肌醇(glycosyl phosphatidyl inositol,GPI)锚定序列相连的 bcr/abl 真核表达质粒,并检测其在 COS-7 细胞中基因和膜蛋白的表达。**方法** 以编码慢性粒细胞白血病 bcr/abl 融合蛋白全长序列的 migP210 质粒为模板,通过 PCR 扩增获得 654 bp 的 bcr/abl 融合基因片段,双酶切后定向插入真核表达载体 pBudCE4.1 中,经鉴定获得重组质粒 pBB。同时用 RT-PCR 扩增人外周血淋巴细胞 CD24 分子中的 GPI 获得约 243 bp 的锚定序列,双酶切后克隆入 pBB 质粒中与 bcr/abl 基因下游羧基端相连,获得重组质粒 pBBG。在多聚阳离子介导下将 pBBG 质粒转染 COS-7 细胞,采用 RT-PCR 和 Western blot 检测 bcr/abl 融合基因和蛋白的表达。**结果** 经酶切和测序鉴定证实,由 GPI 锚定连接的 bcr/abl 融合基因插入片段正确;RT-PCR 检测到转染细胞中有 bcr/abl 融合基因,Western blot 检测到转染细胞膜上有 bcr/abl 融合蛋白的表达。**结论** 成功构建由 GPI 锚定修饰的 bcr/abl 重组质粒 pBBG,并能在 COS-7 细胞膜上表达出 bcr/abl 融合蛋白。

关键词: bcr/abl 融合基因;GPI;真核表达;慢性粒细胞白血病
中图法分类号: R394-33;R394.3;R733.72 **文献标识码:** A

Construction of GPI-anchored bcr/abl and its expression on COS-7 cells membrane

TAO Kun[1], WANG Dong[2], ZENG Jian-ming[2], HUANG Shi-feng[2], CHEN Xin-min[2], HUANG Zong-gan[3], FENG Wen-li[2] ([1]Department of Immunology, Faculty of Basic Medical Sciences, [2]Department of Clinical Hematology, Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnosis of Ministry of Education, Faculty of Laboratory Medicine, [3]Department of Hematology, The First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To construct a recombinant eukaryotic expression plasmid of glycosylphosphatidyl inositol (GPI)-anchored bcr/abl and explore its expression at mRNA and protein level. **Methods** The gene fragment encoding bcr/abl was amplified by PCR using the plasmid containing the cDNA sequence of P210 as template and then inserted into a eukaryotic expression vector pBudCE4.1. The constructed recombinant plasmid pBudCE4.1-bcr/abl was identified by restriction analysis and DNA sequencing. Lymphocytes were isolated from human peripheral blood and their total RNA was extracted. The gene fragment encoding GPI was amplified by RT-PCR using the obtained RNA as template and was inserted into the constructed recombinant plasmid pBudCE4.1-bcr/abl in order to anchor GPI and bcr/abl. The constructed recombinant plasmid pBudCE4.1-bcr/abl-GPI was transfected into COS-7 cells, and the expressions of objective fragment were detected by RT-PCR and Western blotting. **Results** The results of restriction analysis, PCR and DNA sequencing proved that GPI-anchored bcr/abl fusion fragment was correctly inserted into vector pBudCE4.1. The expression of bcr/abl fusion gene and fusion protein were identified in transfected COS-7 cells and on their membrane. **Conclusion** The recombinant plasmid pBudCE4.1-bcr/abl-GPI was successfully constructed and expressed on the membrane of COS-7 cells, which found a basis of cell immunity with GPI-anchored bcr/abl fusion gene.

Key words: bcr/abl fusion gene; glycosyl-phosphatidylinositol; eukaryotic expression; chronic myelogenous leukemia

---

基金项目:国家自然科学基金(30670901)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30670901)
作者简介:陶 崑,女,江苏省南京市人,博士研究生,副教授,主要从事白血病基因治疗方面的研究。电话:(023)68485813,E-mail:taokun68@sina.com
通信作者:冯文莉,电话:(023)68485938,E-mail:fengwlcqmu@sina.com
收稿日期:2007-08-15;**修回日期:**2007-09-25

慢性粒细胞白血病(chronic myelogenous leukemia, CML)的细胞遗传学特征是具有 Ph 染色体,即 t(9;22)(q34.1;q11.2),构成 bcr/abl 融合基因并表达具有强烈酪氨酸激酶活性的 bcr/abl 融合蛋白(p210),后者使造血干细胞异常转化而导致 CML 发生。p210 融合蛋白属于肿瘤特异性抗原,其抗原性由 bcr/abl 基因的融合区域决定[1]。然而,bcr/abl 融合蛋白是 CML 细胞的胞内蛋白,它是否能持续诱导出特异性细胞免疫并成为效应细胞毒 T 淋巴细胞(CTL)的靶向分子,关键在于该融合蛋白能否被有效递呈到 CML 细胞膜表面。人外周血淋巴细胞 CD24 分子中含有一种特定的糖基化磷脂酰肌醇(glycosyl phosphatidyl inositol, GPI)锚定基序,它能通过其 GPI 结构将重组蛋白锚定于细胞膜上[2,3]。为探讨 GPI 序列是否能与 bcr/abl 融合基因锚定连接并在细胞膜上表达出 bcr/abl 融合蛋白,我们将 GPI 序列与 bcr/abl 融合基因的下游羧基端相连构成一个锚定的 cDNA 分子,并转染至真核表达系统中鉴定,旨在为后续的基因免疫诱导肿瘤特异性免疫应答、体外制备靶细胞奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞、菌株及质粒 真核表达载体 pBudCE4.1 购自 Invitrogen 公司;含有编码 CML bcr/abl 融合蛋白全长序列(b3a2 型)的 migP210 质粒为本室保存;COS-7 细胞由本校感染性疾病分子生物学实验室赠送。

1.1.2 主要试剂 限制性内切酶、cDNA 逆转录试剂盒、快速连接试剂盒、PrimeSTAR 酶及其他 PCR 试剂均购自 TaKaRa 公司;RNA 提取试剂、琼脂糖等购自上海生工生物工程公司;质粒纯化抽提、胶回收、PCR 产物纯化试剂盒购自上海华舜生物公司;RPMI1640 和胎牛血清购自杭州四季青生物技术公司;DAB 显色试剂盒和辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗鼠 IgG 购自 Santa Cruz 生物技术有限公司;NC 膜购自北方同正生物技术发展公司;膜蛋白提取试剂盒为南京凯基生物技术有限公司产品;转染试剂 jetpEI™为 POLYplus transfection 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 pBudCE4.1-bcr/abl 重组质粒的构建[4] 根据 GenBank 登录的 Granulysin 编码序列(NM_005157),设计引物,扩增 bcr/abl (b3a2)融合位点周围的序列,约 654 bp。上游引物 P1:5′-GCAAGCTTACCATGGACATCCGTGG-3′;下游引物 P2:5′-GTCGACCTTGCCATCAGAAGC-3′。引物由上海生工生物工程公司合成。以含有编码 bcr/abl 融合蛋白 P210 全长序列的 migP210 质粒为模板,进行 PCR 扩增。反应体系为:模板 1.5 μl,5×缓冲液 6 μl,dNTP 2.4 μl,P1、P2 各 2 μl,PrimeSTAR 酶 0.3 μl,灭菌去离子水 15.8 μl,共 30 μl。扩增条件:94 ℃ 5 min;98 ℃ 10 s,55 ℃ 10 s,72 ℃ 55 s,共 32 个循环;72 ℃ 5 min。PCR 产物用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测。*Hind* Ⅲ/*Sal* Ⅰ双酶切 PCR 产物和空载体 pBudCE4.1,并回收片段。然后将 bcr/abl 基因片段定向克隆入 pBudCE4.1 中,构建重组质粒 pBudCE4.1-bcr/abl,命名为 pBB。将 pBB 重组质粒转化感受态大肠杆菌 DH5α,再用含 40 μg/ml Zeocin 抗生素的低盐 LB 培养基进行筛选。抽提 pBB 质粒进行 PCR 及酶切鉴定,并送 TaKaRa 生物技术公司测序。

1.2.2 pBudCE4.1-bcr/abl-GPI 重组质粒的构建[4] 根据 GenBank 登录的 Granulysin 编码序列(X_69397),设计并合成引物,扩增人外周血淋巴细胞 CD24 分子中的 GPI,获得 243 bp 的锚定序列。上游引物 P3:5′-GTCGACATGGGCAGAGCAAT-3′;下游引物 P4:5′-GGATCCTTAAGAGTAGAGATGCAGAA-3′。抽取人外周血5 ml,Ficoll 液分离出淋巴细胞,提取总 RNA 进行逆转录(反应体系为:RNA 样品 1 μl,$MgCl_2$ 2 μl,10×RT buffer 1 μl,RNase Free ddH_2O 3.75 μl,dNTP 1 μl,RNA 抑制剂 0.25 μl,AMV 逆转录酶 0.5 μl,Random 9 mers 0.5 μl,共 10 μl;反应条件为:30 ℃ 10 min;42 ℃ 30 min,99 ℃ 5 min,5 ℃ 5 min,1 个循环),并以逆转录产物为模板,P3、P4 为引物进行 PCR 扩增(反应体系为:10×PCR buffer 5 μl,ddH_2O 30.75 μl,P3、P4 各 2 μl,TaKaRa Ex *Taq* 酶 0.25 μl,cDNA 模板 10 μl,共 50 μl。扩增条件为:94 ℃ 5 min;98 ℃ 10 s,57 ℃ 10 s,72 ℃ 40 s,共 32 个循环;72 ℃ 5 min)。扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。*Sal* Ⅰ/*Bam*H Ⅰ双酶切 RT-PCR 产物和重组质粒 pBB,回收目的 DNA 片段和质粒 pBB,经连接、转化及 Zeocin 抗生素筛选,得到重组质粒,并通过 PCR 及酶切、测序鉴定后,命名为 pBBG。

1.2.3 抗血清的制备与收集 pBBG 重组质粒免疫 BALB/c 小鼠,接种时 pBBG 质粒(100 μg)与 0.75% 的布比卡因以 1∶4(体积分数)混合,多点注射小鼠后大腿肌肉,每隔 10 d 注射 1 次,共计 3 次。末次免疫后 30 d,摘取小鼠眼球,收集血液、分离血清,-20 ℃保存备用。

1.2.4 细胞转染 将真核表达细胞 COS-7 接种于含 100 ml/L 胎牛血清的 RPMI1640 培养基中,待生长至 80% 汇合后,用重组质粒 pBB、pBBG 进行转染,并以空载体 pBudCE4.1 转染细胞作为对照。转染试剂为多聚阳离子转染试剂 jet-pEI™,具体方法参照试剂说明书进行。

1.2.5 RT-PCR 检测转染细胞的基因表达 转染后 24 h 收集实验孔、对照孔细胞,提取总 RNA 进行逆转录,并以各自的 cDNA 为模板,分别以 bcr/abl、GPI 的特异引物按照上述条件进行 PCR 扩增。

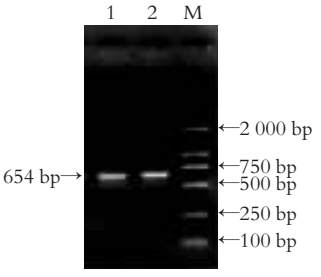
1.2.6 Western blot 检测转染细胞膜蛋白表达 转染后 72 h 收集各组细胞,采用凯基生物膜蛋白提取试剂盒选择性地分离提取膜蛋白,然后以 0.5 mg/L 的浓缩胶和 1.2 mg/L 的分离胶进行 SDS-PAGE 电泳。硝酸纤维素膜(NC 膜)于 15 V 半干式电转印仪中转印 8 min 后,放入 Tris 缓冲液(TBS)中漂洗,封闭过夜。然后加入免疫小鼠特异性抗血清(1∶125)4 ℃结合 8 h,

经漂洗后,与二抗 HRP 标记的羊抗鼠 IgG(1∶400) 37 ℃结合 1 h,TBS 洗 3 次,二氨基联苯胺(DAB)显色 5 min 后终止反应。同时设定内参,内参采用 α-微管蛋白,转膜时间为 20 V、25 min。其一抗为抗 α-微管蛋白的单抗,二抗为 HRP 标记的羊抗鼠 IgG。

2　结果

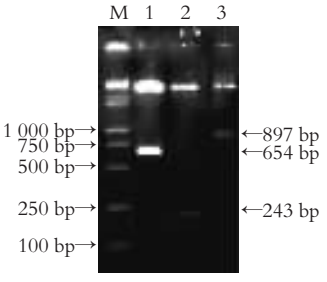
2.1　pBB 重组质粒的构建与鉴定

以 migP210 质粒为模板,P1、P2 为引物进行 PCR 扩增,得到含 bcr/abl 融合基因的目的条带 654 bp。见图 1。用 *Hind*Ⅲ和 *Sal*Ⅰ双酶切 pBB,可切下 654 bp 的片段,见图 2。pBB 测序结果经与 GenBank 上的编码序列比对后,显示此克隆的碱基序列正确。



M:DNA 标准(DL 2000);1,2:bcr/abl 融合基因片段

图 1　PCR 扩增 bcr/abl 融合基因片段



M: DNA 标准(D503A); 1: pBB 经 *Hind*Ⅲ/*Sal*Ⅰ酶切的片段; 2: pBBG经 *Sal*Ⅰ/*Bam*HⅠ酶切的片段; 3: pBBG 经 *Hind*Ⅲ/*Bam*HⅠ酶切的片段

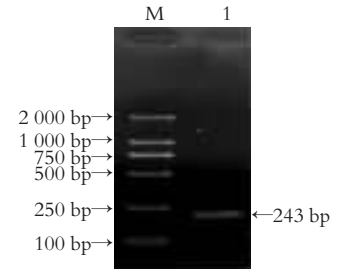
图 2　pBB、pBBG 酶切鉴定电泳图

2.2　pBBG 重组质粒的构建与鉴定

RT-PCR 扩增人外周血淋巴细胞 CD24 分子,获得 243 bp 的 GPI 锚定序列,见图 3。经 *Sal*Ⅰ/*Bam*HⅠ双酶切重组质粒 pBBG,可切下 243 bp 的目的条带,测序结果表明基因未发生突变,其序列与 GenBank 报道相符。同时,我们还将 pBBG 质粒用 *Hind*Ⅲ/*Bam*HⅠ双酶切,得到 897 bp 的片段,说明在 pBBG 质粒中,经 *Sal*Ⅰ酶切位点连接,GPI 锚定序列已与 bcr/abl 融合基因片段下游羧基端相连,实现了我们的锚定要求。见图 2。

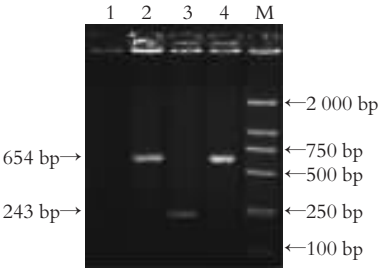
2.3　RT-PCR 检测转染细胞的基因表达

转染细胞 24 h 后提取总 RNA,通过 RT-PCR 检测, pBB 质粒转染组扩增出 654 bp 的片段,pBBG 质粒组也扩出 654 bp 和 243 bp 的目的条带,而 pBudCE4.1 空质粒转染组未扩出相应条带,见图 4。



M:DNA 标准(DL 2000); 1:GPI 锚定片段

图 3　RT-PCR 扩增 GPI 锚定序列

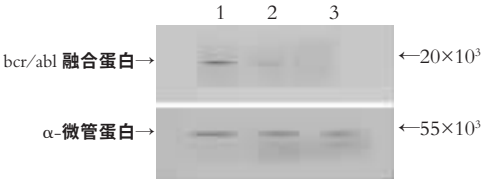


M:DNA 标准(DL 2000); 1:pBudCE4.1 空载体; 2:pBB; 3,4:pBBG

图 4　RT-PCR 检测转染细胞的基因表达

2.4　Western blot 检测转染细胞膜蛋白表达

转染细胞 72 h 后提取细胞膜蛋白,经 Western blot 检测显示:pBBG 质粒转染组细胞膜上有明显的相对分子质量为 20×10^3 的 bcr/abl 融合蛋白表达,而 pBB 质粒转染组细胞膜上 bcr/abl 融合蛋白表达较弱,pBudCE4.1 空载体组则未表达;3 组转染细胞膜上均有 55×10^3 的内参 α-微管蛋白表达,见图 5。



1:pBBG; 2:pBB; 3:pBudCE4.1 空载体

图 5　Western blot 检测转染细胞膜蛋白表达

3　讨论

由于 CML 有明确特异的致病基因,因此目前绝大多数研究都是针对 bcr/abl 融合基因及其蛋白的靶点治疗展开:如反义 RNA、反义 DNA、反义核酶、RNA 干涉技术和 bcr/abl 蛋白激酶抑制剂 STI571 等。但由于 CML 通常会发生继发性遗传学改变,如染色体复制或缺失、克隆演化等,导致临床上 CML 由慢性期发展为急变期,增加对目前各种治疗方法的抗性,即便是 STI571,对急变期 CML 细胞的抑制作用也明显减弱[5]。鉴于此,仅仅阻断 bcr/abl 基因及其蛋白无法达到根治 CML 的目的,故探索基于其他机制的治疗方

法有重要的现实意义。

CML 特异性免疫治疗研究正日益受到人们的重视,CTL 在其中发挥着重要作用[6,7]。T 淋巴细胞不能识别可溶性天然抗原,而只能识别经过加工并与 MHC-Ⅰ类分子结合递呈到细胞表面的抗原。然而,P210 融合蛋白为胞内蛋白,其免疫原性主要在胞内,虽然极少数 bcr/abl 融合多肽含有与 MHC-Ⅰ类分子结合的氨基酸序列,但仅与其中 HLA-A3、A11、B7 有较好的亲和力[8],不能持续呈递于细胞膜上而刺激免疫系统产生持久、有效的抗白血病免疫反应;同时,体外 CTL 水平检测也需要具有能在细胞膜上表达肿瘤抗原表位的特异性靶细胞作为实验工具,因此,如何诱导 bcr/abl 融合蛋白由细胞内转到细胞膜上表达十分重要。

GPI 锚定蛋白是一类通过其羧基末端的 GPI 结构锚定于真核细胞膜表面的蛋白[2],细胞中存在多种锚定蛋白,如 CD16B、CD24、CD48、CD52、DAF 等。它们与传统的跨膜型表面蛋白不同,没有跨膜区和胞内部分,不跨越细胞膜脂质双层,只通过其羧基末端的 GPI 结构锚定于细胞膜上而具备更强的膜移动能力,在免疫识别、补体调节、跨膜信号转导及诱导细胞产生应答等方面起着重要作用[2,3]。当 GPI 锚结构缺失或改变时,通过其微域转导的信号也相应丢失,蛋白便不能连接到细胞膜上,从而影响生物体的功能而致病[9],可见 GPI 锚结构在 GPI 锚定蛋白中是非常重要的。有研究表明,GPI 锚定信号肽在与目的基因连接构成嵌合性 cDNA 并装到合适的真核表达载体后,可转染至真核细胞膜上表达,并能筛选出高表达的锚定蛋白细胞株[10]。

COS-7 细胞是起源于非洲绿猴并经 SV40 病毒基因转化的肾成纤维细胞系,其主要特点为能组成型地表达 SV40 大 T 抗原,使得复制起始位置带有 SV40 的转染质粒能以很高的拷贝数进行复制[11]。而我们选用的真核表达载体 pBudCE4.1,刚好复制起始部位带有 SV40 启动子,同时其 5′-端还含有 CMV 早期启动子和增强子,并具有双 poly 尾巴,因此,可将克隆至其中的基因通过转染 COS-7 细胞得到较高表达。

本研究中,我们以编码慢粒白血病 bcr/abl 融合蛋白全长序列(b3a2 型)的 migP210 质粒为模板,经 PCR 扩增,获得 654 bp 的 bcr/ab 融合基因片段,p210 的抗原性即限定在该融合片段内,这段氨基酸序列在正常细胞中不存在,因此该序列可作为慢粒的特异性抗原[12]。同时,通过 RT-PCR 我们又将人外周血淋巴细胞表面 CD24 分子中的 GPI 锚定序列扩增出来,以期利用 GPI 锚的特定功能将 bcr/abl 融合蛋白由胞内转至胞膜表达。实验显示,扩增出的 243 bp 的 GPI 锚定序列经 *Sal* Ⅰ酶切位点连接,确实能与 pBB 质粒中的 bcr/abl 融合下游羧基端锚定而构建成重组质粒 pBBG。我们将 pBBG 载体转染 COS-7 细胞,经 RT-PCR 和 Western blot 方法鉴定,转染细胞中确有 bcr/abl 融合基因,细胞膜上有 bcr/abl 融合蛋白的表达,且蛋白表达水平较未用 GPI 连接的 pBB 质粒有明显差异,说明 GPI 的锚定修饰作用能够实现 bcr/abl 融合蛋白的膜上表达。

GPI 锚定修饰的慢性粒细胞白血病 bcr/abl 真核表达载体的成功构建,为我们进一步研究 bcr/abl 基因疫苗激发小鼠特异性细胞免疫并体外制备 CTL 靶细胞奠定了实验基础。

参考文献:

[1] 姜扬文, 钱 莉, 刘 伟, 等. 稳定表达 bcr-abl 融合基因片段的鼠 SP2/0 细胞系的建立[J]. 中国实验血液学杂志, 2005, 13(4): 601-604.

[2] Ikezawa H. Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins[J]. Biol Pharm Bull, 2002, 25(4): 409-417.

[3] Sangiorgio V, Pitto M, Palestini P, *et al*. GPI-anchored proteins and lipid rafts[J]. Ital J Biochem, 2004, 53(2): 98-111.

[4] 萨姆布鲁克丁, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂, 译. 第3版. 北京: 科学出版社, 2002: 68-71.

[5] Hochhaus A, Kreil S, Corbin A S, *et al*. Molecular and chromosomal mechanisms of resistance to imatinib (STI571) therapy[J]. Leukemia, 2002, 16(11): 2190-2196.

[6] Schwartz J, Pinilla-Ibarz J, Yuan R R, *et al*. Novel targeted and immunotherapeutic strategies in chronic myeloid leukemia[J]. Semin Hematol, 2003, 40(1): 87-96.

[7] Cathcart K, Pinilla-Ibarz J, Korontsvit T, *et al*. A multivalent bcr-abl fusion peptide vaccination trial in patients with chronic myeloid leukemia[J]. Blood, 2004, 103(3): 1037-1042.

[8] Bocchia M, Wentworth P A, Southwood S, *et al*. Specific binding of leukemia oncogene fusion protein peptides to HLA class I molecules [J]. Blood, 1995, 85(10): 2680-2684.

[9] 熊茂林. GPI 锚的结构、功能及 GPI 锚定 B7 分子在肿瘤免疫治疗中的应用[J]. 国外医学免疫学分册, 2003, 26(5): 230-233.

[10] 于继云, 沈倍奋. 细胞表面工程与肿瘤疫苗[J]. 免疫学杂志, 2003, 19(6): 478-479, 481.

[11] 高 嵩, 郝 兵, 侯治富. 重组 CD200 基因在 COS-7 细胞中的瞬时表达[J]. 中华医学研究杂志, 2006, 6(12): 1342-1343.

[12] Deininger M W, Goldman J M, Melo J V. The molecular biology of chronic myeloid leukemia[J]. Blood, 2000, 96(10): 3343-3356.

(编辑 薛国文)