文章编号:1000-5404(2009)07-0589-03

论著

利用重叠 PCR 实现乙肝表面抗原 CTL 表位的替换

王文敬[1],黎诚耀[1],李明松[2] (南方医科大学:[1]生物技术学院输血医学系,[2]南方医院消化科,广州 510515)

摘 要:目的 以磷酸酰肌醇蛋白聚糖-3 蛋白(glypican-3,GPC3)的 CTL 表位 EYILSLEEL 替换 HBsAg 中内源性 CTL 表位 LLD,构建用于预防和治疗乙肝的 DNA 疫苗。**方法** 以重组表面抗原基因 pcHBsAg 质粒为模板,应用重叠延伸 PCR 扩增出含 EYILSLEEL 表位的 HBsAg 基因 HBsAg/GPC3,将其插入 pBSSK + 载体中,构建出 pBSSK/GPC3 载体。利用 DNA 重组技术将其定向插入真核表达载体 pcDNA3.1 + 中,将真核表达载体经 PCR、酶切和测序鉴定,构建表达 CTL 表位 EYILSLEEL 的 DNA 疫苗。**结果** 酶切和测序的结果显示序列无错配,获得了完整表达 EYILSLEEL 表位的真核质粒 pcDNA3-HBsAg/GPC3。**结论** 成功将 EYILSLEEL 表位替换 HBsAg 的内源性 CTL 表位,构建了 pcDNA3-HBsAg/GPC3 真核表达质粒。

关键词: 表位替换;磷酸酰肌醇蛋白聚糖-3 蛋白;细胞毒 T 淋巴细胞表位;重叠延伸 PCR
中图法分类号: R392-33; R392.11; R512.62 **文献标识码:** A

Replacing CTL epitope of recombinant HBsAg by SOEing PCR

WANG Wen-jing[1], LI Cheng-yao[1], LI Ming-song[2] ([1]Faculty of Blood Transfusion, School of Biotechnology, [2]Department of Gastroenterology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

Abstract: Objective To replace the endogenous CTL epitope LLD in HBsAg with EYILSLEEL of glypican (GPC3) in order to prepare a GPC3-HBsAg multiple peptides vaccine for HBV infection. **Methods** The HBsAg/GPC3 DNA was amplified by gene splicing by overlap extension (SOEing) PCR from pcHBsAg plasmid and then inserted into pBSSK + vector to construct a pBSSK/GPC3 vector. The vector was then identified by PCR, double digesting and sequencing. The fragment encoding GPC3 CTL epitope EYILSLEEL was obtained by double digesting the plasmid pBSSK/GPC3 and then inserted into pcDNA3.1 + vector. **Results** Sequencing and restrict endonulease digestion indicated that eukaryotic expression vector pcDNA-HBsAg/GPC3 was constructed successfully. **Conclusion** The endogenous CTL epitope LLD of HBsAg is replaced by the EYILSLEEL, and an eukaryotic expression vector pcDNA-HBsAg/GPC3 is constructed.

Key words: epitope shift; glypican-3; CTL epitope; SOEing PCR

重叠区扩增基因拼接法(gene splicing by overlap extension, SOEing)是基于普通 PCR 技术衍生出的一种基因融合和定点突变的有效方法。由于引物只需要与模板有效结合,尤其是 5′端序列不必与模板完全配对,因此扩增引物的 5′端可以添加 1 种甚至是 2 种酶切位点,以便于后期克隆。SOEing 法正是利用这一特点,向 2 个独立基因掺入 1 段新的序列以达到 2 个基因出现 1 个重叠区的目的,3′端的结合使基因融合或定点突变得以实现[1,2]。

乙肝表面抗原(HBsAg)疫苗无需免疫佐剂即能诱导出高效而特异的细胞免疫和体液免疫。HBsAg 具有减毒活病毒疫苗的免疫原性,而本身不能复制,所以无感染性。探索以特异性的外源基因插入,或以外源 CTL 表位替代 HBsAg 上特异性的内源 CTL 表位,在体内诱导出高效而特异的针对肿瘤的细胞免疫,目前正成为全球研究的热点。本研究利用 HBsAg 这种新型载体,实现 CTL 表位替换,构建针对肝癌(HCC)等肿瘤病原体的 DNA 疫苗,使其成为一种安全、有效的生物治疗 HCC 的工具,为研制潜在的肝癌治疗性多肽疫苗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

pcHBsAg 和 pBSSK + 质粒由澳大利亚 Bob 教授惠赠,DH5α 菌种为本实验室保存,pcDNA3.1 + 真核表达载体购自 Invitrogen 公司。PCR 反应体系(Elongase、dNTP 等)和限制性

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973 计划)(2007CB512901);广东省自然科学基金(06105111);广东省科技攻关计划(0700016)
Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Projects, 2007CB512901), the National Natural Science Foundation of Guangdong Province (06105111), and the Tackling Project of Sci & Tech Research of Guangdong Province (0700016)
作者简介:王文敬,女,黑龙江省密山市人,博士,讲师,主要从事分子免疫学方面的研究。E-mail:wenjingking@163.com
通信作者:李明松, E-mail:lims661216@yahoo.com.cn
收稿日期:2009-01-14;修回日期:2009-02-25

内切酶 *Not* Ⅰ、*Sal* Ⅰ、*Eco*R Ⅰ、*Bam*H Ⅰ及 T_4 DNA 连接酶购自 NEB 公司,引物由 Invitrogen 公司合成。

1.2 CTL 表位替换原理

改进的乙肝表面抗原重组质粒(pcHBsAg)包含 VLQ、IPQ、FLG、LLD、SIL 等 CTL 表位。

1.3 引物

以 pcHBsAg 中 LLD 表位为 CTL 表位替换的目标,设计 1 对引入 *Eco*R Ⅰ、*Bam*H Ⅰ酶切位点的引物,并且 5′和 3′端均包括 EYILSLEEL 表位序列。替换序列 5′引物上游(WJF):TACATCCATGAGCCTGGAGGAGCTGGTGTGCCCCCTGATCCCCGGCAGC,替换序列 3′引物下游(WJR):CTCCTCCGAGGCTCAGGATGTACTCCACCAGCAGGAAGATCAGGCACAGC;pcHBsAg 5′引物上游(SAGWF):GGATCCAACCATGGAGAACATCACCAGCGGCTTC,pcHBsAg 3′引物下游(SAGWR):GAATTCTGCAGATGTACACCCACAGGCAGAAGAAG。

1.4 SOEing PCR 扩增

PCR 反应体系:ddH_2O 21 μl,5 × PCR Buffer 8 μl,dNTPs (10 mmol/L) 1 μl,模板 DNA 1 μl(100 ng),引物 1(10 μmol/L) 4 μl,引物 2 (10 μmol/L) 4 μl,Elongase 1 μl,反应总体积 40 μl。反应条件:94 ℃ 5 s 预变性,94 ℃ 10 s,55 ℃ 20 s 循环扩增 25 次,72 ℃ 30 s 延长。

1.4.1 扩增含 EYILSLEEL 表位的基因片段 以构建好的 pcHBsAg 质粒 DNA 为模板,分别用引物对 SAGWF/WJR 和 WJF/SAGWR 进行 2 个 PCR 反应,分别得到片段 PCR1 和 PCR2。

1.4.2 扩增含 EYILSLEEL 表位的 HBsAg 全基因片段 用第 1 步得到的片段 PCR1 和 PCR2 作为模板,以引物对SAGWF/SAGWR 进行 PCR 反应,反应条件同上,得到 PCR 产物即为替换 pcHBsAg 的 CTL 表位 LLD,表达 EYILSLEEL 表位的 HBsAg/GPC3 基因片段。基因拼接示意见图 1。

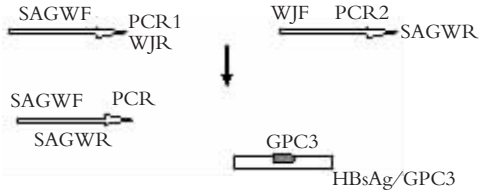


图 1 HBsAg/GPC3 基因拼接示意图

1.5 将 HBsAg/GPC3 基因克隆至 pBSSK + 载体

将 HBsAg/GPC3 基因用酚/氯仿法抽提 1 次,用乙醇/醋酸钠沉淀。纯化的 DNA 用 T_4 连接酶,按常规方法连至 pBSSK + 载体。具体操作参照 pBSSK + Vector 说明书。转化 DH5α 感受态细胞,蓝白斑筛选,挑取单克隆培养,抽提质粒,进行 PCR 鉴定,*Eco*R Ⅰ、*Bam*H Ⅰ双酶切鉴定。鉴定正确的克隆 pBSSK/GPC3 用 Plasmid midi 法抽提质粒后送测序。

1.6 构建 HBsAg/GPC3 基因的表达载体

将含有 EYILSLEEL 表位序列的 pBSSK/GPC3 载体和 pcDNA3.1 +载体分别用 *Not* Ⅰ + *Sal* Ⅰ双酶切,2% 琼脂糖凝胶电泳回收目的片段,用 T_4 连接酶连接,转化 DH5α 感受态细胞,用 50 ng/L 的氨卞抗性培养板筛选。挑取克隆,抽提得到 pcDNA3.1-HBsAg/GPC3 质粒,进行 PCR 和酶切鉴定。

2 结果

2.1 PCR 扩增

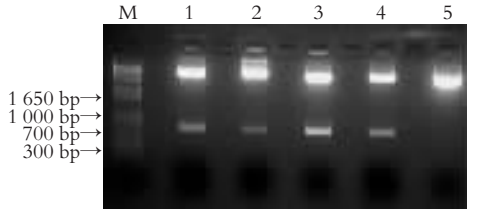
以 pcHBsAg 质粒为模板,按 1.4 方法混合不同片段并退火延伸的产物作为模板,PCR 扩增出含 EYILSLEEL 表位序列的重组 HBsAg/GPC3 基因(约为 680 bp)。

2.2 酶切、测序

将 pBSSK/GPC3 载体转化 DH5α,挑克隆抽质粒,以其为模板 PCR 扩增出 680 bp 的目的片段;用 *Eco*R Ⅰ、*Bam*H Ⅰ对 pBSSK/GPC3 质粒进行双酶切鉴定,证明序列插入正确。将酶切鉴定正确的质粒测序,结果显示 HBsAg 基因中 LLD 表位序列位置已被 EYILSLEEL 序列替换,且原序列中无错配碱基。

2.3 构建真核表达载体

用 *Not* Ⅰ + *Sal* Ⅰ双酶切 pcDNA3.1 + 载体以及 pBSSK/GPC3 质粒,得到的 HBsAg/GPC3 基因片段插入 pcDNA3.1 + 载体片段。连接物转化 DH5α 感受态细胞,挑取单克隆培养,抽提质粒 *Eco*R Ⅰ 酶切鉴定,目的片段约 700 bp,证明真核表达载体构建成功(图 2)。



M:标准;1 ~ 4:pcDNA3.1-HBsAg/GPC3;5:阴性对照

图 2 *Not* Ⅰ + *Sal* Ⅰ双酶切鉴定结果

3 讨论

澳大利亚研究人员发现[3-5],在保留 HBsAg 有效的包装蛋白表位基础上,在 HBsAg 基因开放性阅读框架(ORF)上定位突变掉内源性 CTL 表位,并建立核酸内切酶酶切位点,构建的重组质粒 pcDNA3.1-HBsAg(简写 pcHBsAg)允许插入 1 个或多个外源表位,在部分保留 HBsAg 生物学和免疫学特性的基础上,能保证外源表位有免疫活性。GPC3 属于糖基磷脂酰肌醇-锚定细胞表面硫酸乙酰肝素蛋白多糖家族。作为胚胎抗原,GPC3 表达于 80% 以上的肝癌细胞上,虽然胎肝和胎盘也表达 GPC3,但正常成人肝细胞及其他肝脏组织和良性肝病组织均不表达 GPC3。此外,GPC3 还特异性的表达于肝母细胞瘤(hepatoblastoma)和黑色素瘤细胞,但在其他肿瘤中(包括肝腺瘤)则未见表达[6,7]。因此,GPC3 可作为一新的肿瘤标志物用于原发性肝细胞肝癌的临床诊断。Sung 等[8]已研究证实 GPC3 蛋白中包含 2 种具有不同 HLA 限制性的 CTL 表位。Nakatsura 等[9,10]研究发现 GPC3 在小鼠体内可诱导出 GPC3 特异性的抗肿瘤免疫,但 GPC3 不会在小鼠体内导致自身免疫疾病的发生。同时发现,具有 GPC3 特

异性的杀伤性 T 细胞(CTL)可以向表达 GPC3 的肿瘤组织发生定向迁移,而不引起自身免疫性的破坏。因此,将 GPC3 的 CTL 表位替换 HBsAg 的内源性 CTL 表位,为具有抗肿瘤作用的多功能乙肝多肽疫苗的研制提供了有效的手段,将在治疗 HCC、肝母细胞瘤及黑素瘤中起重要作用。而且,以 GPC3 为靶向的多功能乙肝疫苗也可能作为预防手术治疗后 HCC、肝母细胞瘤及黑素瘤复发,以及肝炎、肝硬化等可能发生 HCC 高危人群的一种有效的治疗手段。

SOEing PCR 的引物设计是 CTL 表位替换成功与否的关键因素。本研究优化了 SOEing PCR 反应条件,并筛选得到了一系列针对 HBsAg 不同内源性 CTL 表位的引物对。将 GPC3 的 1 个 CTL 表位 EYILSLEEL 成功引入 pcHBsAg 构建 HBsAg/GPC3 载体,为下一步实现 GPC3 不同表位的替换,以及构建替换 pcHBsAg 不同 CTL 表位的单拷贝,甚至多拷贝的 DNA 疫苗研究奠定了实验基础。

参考文献:

[1] 谭　虎,杨天德,粟永萍,等. 修饰 GLP2 分泌性表达载体的构建及促增殖活性测定的实验研究[J]. 第三军医大学学报,2007,29(17):1650 - 1653.

[2] 卓勤强,刘　昕,钱春荣,等. 带有不同亚型 HPVL1 基因片段的哺乳动物细胞克隆的建立[J]. 第三军医大学学报,2006,28(5):469 - 471.

[3] Chen D, Gould A, Mather M, *et al*. HBsAg-vectored DNA vaccines elicit concomitant protective responses to multiple CTL epitopes relevant in human disease[EB/OL]. Nature Precedings, [2009-01-10]. http://precedings. nature. com/documents/1910/version/1.

[4] Haigh O, Guo H, Edgtton K, *et al*. Multiple copies of a tumor epitope in a recombinant hepatitis B surface antigen (HBsAg) vaccine enhance CTL responses, but not tumor protection[J]. Virology, 2007, 368(2): 363 - 375.

[5] Woo W P, Doan T, Herd K A, *et al*. Hepatitis B surface antigen vector delivers protective cytotoxic T-lymphocyte responses to disease-relevant foreign epitopes[J]. J Virol, 2006, 80(8):3975 - 3984.

[6] Peters M G, Farias E, Colombo L, *et al*. Inhibition of invasion and metastasis by glypican-3 in a syngeneic breast cancer model [J]. Breast Cancer Res Treat, 2003, 80(2):221 - 232.

[7] Xiang Y Y, Ladeda W, Filmus J. Glypican-3 expression is silenced in human breast cancer [J]. Oncogene, 2001, 20(50):7408 - 7412.

[8] Sung Y K, Hwang S Y, Farooq M, *et al*. Growth promotion of HepG2 hepatoma cells by antisense-mediated knockdown of glypican-3 is independent of insulin-like growth factor 2 signaling [J]. Exp Mol Med, 2003, 35(4):257 - 262.

[9] Nakatsura T, Komori H, Kubo T, *et al*. Mouse homologue of a novel human oncofetal antigen, glypican-3, evokes T-cell-mediated tumor rejection without autoimmune reactions in mice [J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(24):8630 - 8640.

[10] Motomura Y, Senju S, Nakatsura T, *et al*. Embryonic stem cell-derived dendritic cells expressing glypican-3, a recently identified oncofetal antigen, induce protective immunity against highly metastatic mouse melanoma, B16-F10 [J]. Cancer Res, 2006, 66(4): 2414 - 2422.

(编辑　王小寒)

(上接 588 页)

3　讨论

GEM 是一种新型脱氧胞苷类似物,其代谢产物二磷酸及三磷酸双氟脱氧胞嘧啶核苷在细胞内参入 DNA,主要作用于 G_1/S 期,还能抑制核苷酸还原酶,导致细胞内脱氧核苷三磷酸酯减少,而抑制脱氧胞嘧啶脱氨酶,减少细胞内代谢物降解,有自我增效作用。DDP 与 GEM 有协同作用:GEM 促使 DNA 合成前体耗竭,并导致 DNA 修复障碍,促使 DDP 在 DNA 内浓度积聚,增强 DDP 抗肿瘤作用;DDP 增强 GEM 所致断裂 DNA 双链的复性[1];GEM 单药有效率为 20%,与 DDP 合用有效率为 42% ~58%[2]。

本组应用 GP 方案治疗局部晚期 NSCLC,有效率为 53.3%,与文献[3-6]报道相似。其中Ⅲ~Ⅳ度白细胞减少发生率为 30.0%,Ⅲ~Ⅳ度血小板减少发生率为 10.0%,此外恶心呕吐、贫血发生率亦较高。随着剂量的加大和化疗周期的延长,出现该毒性的患者就越多,程度也越重。经临床综合处理后,患者血象恢复良好,提示骨髓抑制为剂量限制性毒性,无蓄积性毒性。本组病例无明显心、肝、肾功能损害。联用粒细胞集落刺激因子(G-CSF)可以预防和治疗白细胞减少,使患者的安全性和耐受性进一步提高。

综上所述,GP 方案治疗局部晚期 NSCLC 有较高的有效率,不良反应主要为可耐受的骨髓抑制、消化道反应,可作为晚期 NSCLC 的一线治疗方案,值得临床推广。本方案治疗过程中重度骨髓抑制的发生率较高,尚须调整用药剂量,必要时,应联用 G-CSF。对于复治的晚期 NSCLC 疗效尚须进一步研究。本方案的远期疗效还需继续随访观察。

关键词: 吉西他滨;顺铂;肺肿瘤/化学疗法;非小细胞肺癌
中图法分类号: R734.2　　**文献标识码:** B

参考文献:

[1] 孙　燕. 内科肿瘤学[M]. 北京:人民卫生出版社,2001: 662.

[2] 周建明,谭清和,龚振夏,等. 长春瑞宾不同输注法加顺铂治疗晚期非小细胞肺癌的临床研究[J]. 实用肿瘤杂志,2003,18(1):59 - 61.

[3] 刘永利,高德杰,王晓燕. GP 方案治疗晚期非小细胞肺癌临床观察[J]. 中国肿瘤临床与康复,2005,12(5):459 - 460.

[4] 卞伟钢. 吉西他滨联合顺铂治疗晚期肺癌 30 例临床观察[J]. 实用临床医药杂志,2006,10(3):95 - 96.

[5] 马耀先,赵宏亮. 吉西他滨联合顺铂治疗晚期非小细胞肺癌 28 例[J]. 郑州大学学报:医学版,43(3):608 - 609.

[6] 姚成才,林丛尧,安公明. 吉西他滨联合铂类治疗 64 例晚期非小细胞肺癌临床疗效研究[J]. 现代肿瘤医学,2007,15(11):1600 - 1602.

(编辑　栾　嘉)