维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2004)06-0734-04

甲胎蛋白与热休克蛋白 70 基因融合载体的构建及表达

兰英华,唐 俐,陈 敏,彭明利,任 红

(重庆医科大学病毒性肝炎研究所,重庆 400010)

【摘 要】目的:构建分泌性小鼠甲胎蛋白(α-Fetoprotein,AFP)与结核杆菌热休克蛋白 70(mycobacterium tuberculosis heat shock protein 70,Mt.HSP70)基因融合载体,并研究其在真核细胞中的表达情况。方法:以 pSecTag2B 为基本单位构建 AFP 及与 HSP70 的融合表达载体,融合基因以 G-S-G-G-S 连接子连接;用脂质体将系列载体导入 COS-7 细胞,48h 后以免疫化学方法检测其表达,抽提总 RNA 作 RT-PCR 测其在转录水平的表达。结果:构建的 AFP 和 HSP70 的单独及融合表达载体导入 COS-7 细胞 48h 后经细胞免疫化学染色为阳性,RT-PCR 可扩增出特异性条带。结论:AFP 和 HSP70 的单独及融合表达载体构建成功,能在真核细胞中表达。

【关键词】甲胎蛋白;热休克蛋白 70;癌,肝细胞;融合

【中国图书分类法分类号】R730.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2003-03-31

Construction and expression of secreted chimeric AFP-HSP70 plasmid in eukaryotic cells

LAN Yinghua, et al

(*Institute for Viral Hepatitis, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To construct secreted chimeric vector of AFP-HSP70 and investigate transient expression of vectors in eukaryotic cells. *Methods*: Vectors were constructed by routine molecular technique. Fusion genes were linked with G-S-G-G-S linker. Vectors were transfected into COS-7 cells by Lipofectamine 2000. Proteins were assayed by immunocytochemistry and RT-PCR for its RNA. *Results*: Proteins expressed in COS-7 were confirmed by immunocytochemistry 48 hours later and RNA was detected by RT-PCR. *Conclusion*: AFP-HSP70 chimeric vector is constructed successfully and could be expressed in eukaryotic cells.

【Key words】α-Fetoprotein; Heat shock protein 70; Hepatocellular, carcinoma; Fusion

甲胎蛋白(α-Fetoprotein,AFP)是哺乳动物胚胎期由肝及卵黄囊合成的胚胎性血清蛋白,在成年期,主要来源于内胚层恶性肿瘤,如肝癌、胃癌和性腺肿瘤等。它作为原发性肝癌(Hepatocellular Carcinoma,HCC)较为敏感而特异的生化指标,在肝癌的普查、早期诊断和疗效判定等方面发挥了重要作用。近年对 AFP 基因结构及功能进一步研究,认为 AFP 是 HCC 的肿瘤相关性抗原(TAA),可以作为抗 HCC 治疗的有效靶向抗原[1,2]。结核杆菌热休克蛋白 70 具有分子佐剂和载体效应,其他学者[3]及我们的研究结果[4,5]均表明 HSP70 可提高与之融合的抗原的免疫原性,辅助抗原的 CTL 识别位点的递呈。本研究将 AFP 与 HSP70 基因融合,检测融合载体在真核细胞中的表达情况,为进一步研究融合 DNA 疫苗的治疗效应打下基础。

作者介绍:兰英华(1975-),女,主治医师,博士,主要研究方向:肝癌的基因免疫治疗。

1 材料和方法

1.1 材料

Hepal-6(小鼠肝癌细胞)由上海第二军医大学肿瘤研究所郭亚军教授惠赠;COS-7 本所保存;培养基 RPMI 1640、胎牛血清(美国 Hyclone 公司);pSecTag2B、JM109 本所保存;RNA、质粒抽提试剂盒(上海华舜公司);M-MLV 逆转录酶(美国 Promega 公司);Pyrobest DNA 聚合酶、限制性内切酶、胶回收试剂盒(日本 Takara 公司);Lipofectamine 2000 转染试剂盒(美国 Invitrogen 公司);羊抗鼠 AFP(美国 Santa Cruz);鼠抗分枝杆菌 HSP70(MBL 公司);DAB 试剂盒(武汉博士德)。

1.2 AFP 系列载体的构建

1.2.1 AFP 基因的获取和克隆

维普资讯 http://www.cqvip.com

AFP 上游引物 AFP1 5' - GCGGTACCCAAGCAGCC ATG AAGTGGA - 3' 含启动子 ATG 和 Kpn Ⅰ 酶切位点 GGTACC；下游引物 AFP2 5' - GCGAATTCTGTT TAA ACGCCCAAAGCATC - 3' 含终止密码 TAA 和 EcoR Ⅰ 酶切位点 GAATTC。收集培养的 Hepa1 - 6 细胞 2×10^6，参照试剂盒说明抽提总 RNA，用 M - MLV 逆转录酶和 AFP 下游引物合成第一链 cDNA，94℃ 5min 灭活逆转录酶；取 cDNA2.0μL 用 Pyrobest DNA 聚合酶进行 PCR 扩增，参数为：94℃ 40s，59℃ 60s，68℃ 3min20s，10 个循环；94℃ 40s，63℃ 60s，68℃ 3min20s，25 循环；68℃ 7min。琼脂糖电泳验证，回收目的基因，与 pSecTag$_2$B 都以 Kpn Ⅰ 和 EcoR Ⅰ 双酶切，回收后连接，转化，筛选，酶切鉴定。

1.2.2 HSP70 基因获取和克隆 从质粒 pCI - HSP70 上扩增，pCI - HSP70 由梁增伟博士构建[4]，HSP70 上游引物 HSP1 5' - GGTTCAGGAGGATCC ATG GCTCGTGCG-GTCGGGATC - 3' 含 G - S - G - G - S 线形氨基酸接头 GGTTCAGGAGGATCC 和启动子 ATG，HSP70 下游引物 HSP2 含酶切位点 5' - GAACTCGAGTCCGCTTT TGA TTTCCG - 3' 含终止密码 TGA 和 Xho Ⅰ 酶切位点 CTCGA-G。PCR 扩增，琼脂糖电泳验证，回收目的基因，*BamH* Ⅰ 和 Xho Ⅰ 酶切回收；pSecTag$_2$B 以 *BamH* Ⅰ 和 Xho Ⅰ 双酶切，回收后连接，转化，筛选，酶切鉴定。

1.2.3 AFP - HSP70 融合质粒的构建 AFP 下游引物 AFP35' - ATCACGAGTTTTGGAAATCA - 3' 不含终止密码、平端，并且 5' 末端含有 EcoR Ⅴ 酶切位点的一半的序列，可与经 EcoR Ⅴ 酶切后的载体重新形成 EcoR Ⅴ 酶切位点，以做与 HSP70 基因融合用。以 AFP1 和 AFP3 从 AFP cDNA 扩增所需片段，以 Kpn Ⅰ 酶切后克隆入的 pSecTag$_2$B Kpn Ⅰ 和 EcoR Ⅴ 酶切位点之间，构建成 pSecTag$_2$B - AFP(无)，再以 EcoR Ⅴ、Xho Ⅰ 酶切后，与 HSP70 用 Xho Ⅰ 酶切后产物连接，转化，筛选，酶切鉴定。

1.2.4 重组质粒经测序鉴定 上海生工公司完成。

1.3 重组质粒转染细胞

将对数生长期 COS - 7 细胞以 5×10^5/孔接种于 24 孔板，用无抗生素的含 10% 胎牛血清的培养基培养 1d，用无血清 RPMI 1640 轻轻洗涤细胞，参照 Lipofectamine 2000 转染试剂盒说明转染重组质粒，6h 后加入完全培养基，设空白细胞和转染空载体各 2 孔作为对照，pSecTag$_2$B - AFP - HSP70 转染 2 孔。

1.4 RT - PCR 检测 AFP 和 HSP70 在转录水平的表达

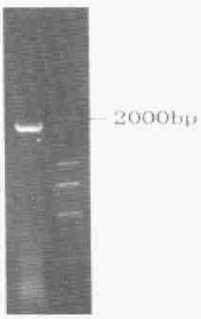
细胞接种于 6 孔板转染，48h 后，按试剂盒说明抽提总 RNA，用 M - MLV 逆转录酶和 AFP 或 HSP70 下游引物合成第一链 cDNA，94℃ 5min 灭活逆转录酶；取 cDNA 10.0μl 用 Taq 聚合酶进行 PCR 扩增，同时以抽提的 RNA10.0μl 作为模板直接进行 PCR 扩增，以排除 RNA 抽提中质粒的污染。

1.5 免疫细胞化学检测转染细胞中 AFP 和 HSP70 表达情况

转染 48h 后，用 PBS 洗涤 3 次，以羊抗鼠 AFP 或鼠抗分枝杆菌 HSP70 为一抗，按免疫细胞化学检测试剂盒说明操作，其中未转染细胞组和空载体转染组也用 AFP 和 HSP70 抗体检测，以排除细胞本身可能表达这两种蛋白的因素。转染 pSecTag$_2$B - AFP - HSP70 的两孔细胞分别以 AFP 和 HSP70 抗体为一抗作免疫组化，以检测融合后 AFP 和 HSP70 的表达。

2 结 果

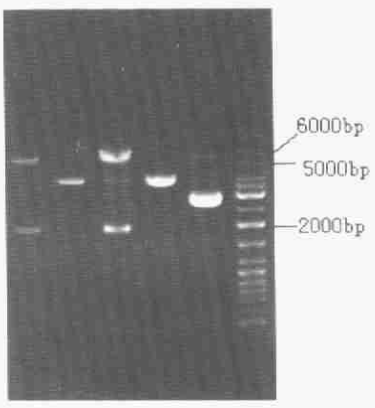
从细胞中用 RT - PCR 法扩增 AFP 基因，以 Hepa1 - 6 细胞总 RNA 为模板，RT - PCR 扩增出约 1.8kb 大小的条带(图 1)。



A B

图 1 AFP 编码基因的扩增

A. AFP gene from Hepa1 - 6 total RNA by RT - PCR B. Marker



A B C D E M

图 2 重组质粒 pSecTag$_2$B - AFP 的酶切鉴定

A: pSecTag$_2$B - AFP②(*Hind* Ⅲ、Xho Ⅰ) B: pSecTag$_2$B - AFP② C: pSecTag$_2$B - AFP①(*Hind* Ⅲ、Xho Ⅰ) D: pSecTag$_2$B - AFP① E: pSecTag$_2$B M: Marker

重组质粒 pSecTag$_2$B - AFP 以 *Hind* Ⅲ、Xho Ⅰ

维普资讯 http://www.cqvip.com

双酶切可切下近 2kb 和 5－6kb 的两条带，分别与 pSecTag$_2$B 及 AFP 大小相符(图 2)。

重组质粒 pSecTag$_2$B－HSP70 以 BamH Ⅰ和 Xho Ⅰ双酶切可切下近 2kb 和 5－6kb 大小的两条带，分别与 pSecTag$_2$B 及 HSP70 大小相符(图 3)。

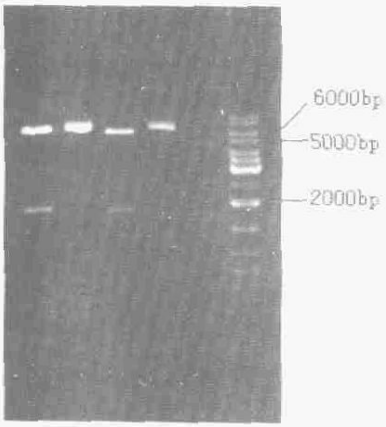


图 3 重组质粒 pSecTag$_2$B－HSP70 的酶切鉴定

A:pSecTag$_2$B－HSP70②(BamH Ⅰ Xho Ⅰ) B:pSecTag$_2$B－HSP70② C:pSecTag$_2$B－HSP70①(*BamH* Ⅰ Xho Ⅰ) D:pSecTag$_2$B－HSP70① F:pSecTag$_2$B M:Marker

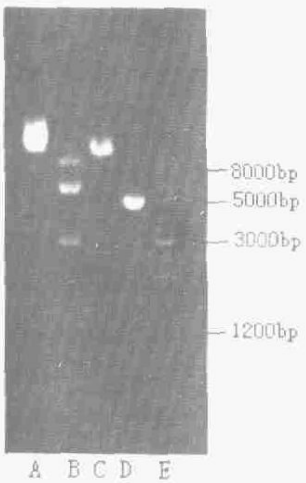


图 4 重组质粒 pSecTag$_2$B－AFP－HSP70 的酶切鉴定

A:pSecTag$_2$B－AFP－HSP B:pSecTag$_2$B－AFP－HSP(*Hind* Ⅲ、Xho Ⅰ) C:pSecTag$_2$B－AFP－HSP(Apa Ⅰ) D:pSecTag$_2$B E:Marker

重组质粒 pSecTag$_2$B－AFP－HSP70 以 Apa Ⅰ单酶切后示条带约 10kb，以 *Hind* Ⅲ、Xho Ⅰ双酶切可得到 3000bp、6000bp、10kb 的三条带，其中 10kb 为不完全酶切残余的质粒 DNA，其余条带符合预期结果(图 4)。

上述重组质粒经测序鉴定，无突变，完全符合 Genbank 相应序列。

RT－PCR 检测 AFP 和 HSP70 在转录水平的表达。以含 AFP 基因的质粒转染细胞后可扩增出符合 AFP 大小的特异性条带，以含 HSP70 基因的质粒转染细胞后可扩增出符合 HSP70 大小的特异性条带，而以 RNA 为模板作 PCR 均不能扩出条带，表明 RNA 抽提中没有 DNA 的污染，说明 AFP 和/或 HSP70 在转录水平有表达(图 5)。

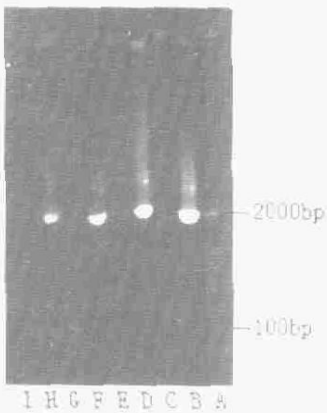


图 5 转染质粒在转录水平的表达

A. DNA molecular Marker B. pSecTag$_2$B－AFP(RT－PCR) C. pSecTag$_2$B－AFP(PCR with RNA as template) D. pSecTag$_2$B－HSP(RT－PCR) E. pSecTag$_2$B－HSP(PCR with RNA as template) F. pSecTag$_2$B－AFP－HSP(RT－PCR,AFP) G. pSecTag$_2$B－AFP－HSP(PCR with RNA as template,AFP) H. pSecTag$_2$B－AFP－HSP(RT－PCR,HSP) I. pSecTag$_2$B－AFP－HSP(PCR with RNA as template,HSP)

重组质粒在 COS－7 细胞中的表达。以前述质粒转染 COS－7 细胞后，48h 做细胞免疫化学，可见未转染细胞和 pSecTag$_2$B 转染细胞胞浆中无黄棕色颗粒出现，而 pSecTag$_2$B－AFP、pSecTag$_2$B－HSP70、pSecTag$_2$B－AFP－HSP70 转染细胞中有黄棕色阳性颗粒，并且 pSecTag$_2$B－AFP－HSP70 转染细胞用抗 AFP 和抗 HSP70 两种抗体染色均为阳性(图 6)，说明融合后两种基因均能在真核细胞中表达。

3 讨 论

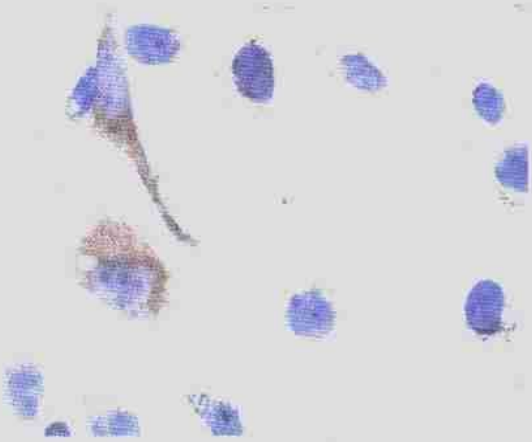
原发性肝癌(Hepatocellular carcinoma，HCC)是危害人类健康的常见恶性肿瘤之一，我国是 HBV 感染率较高的国家，也是 HCC 高发区，肝癌死亡率仅次于胃癌，全国每年至少有 12 万人被肝癌夺去生命，我国肝癌死亡人数已占全球肝癌死亡总人数的 44%，目前的治疗方法主要有冷冻外科疗法、经皮酒

维普资讯 http://www.cqvip.com

精注射、动脉栓塞、化疗等，但是目前还没有没有哪种治疗能有效地改善已不能切除的肝癌病人的预后。近年来大量研究表明 DNA 免疫可克服免疫耐受，诱发特异性 CTL 反应。



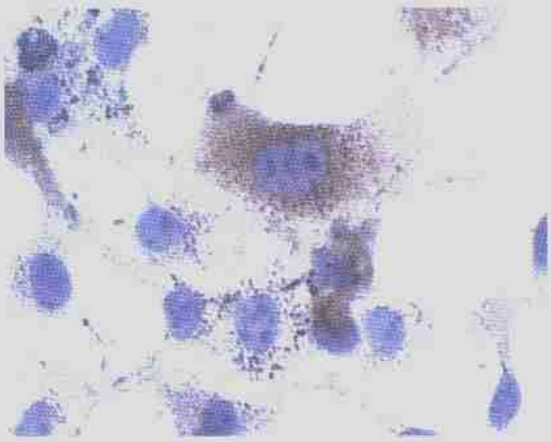
pSecTag2B－AFP(40×10)



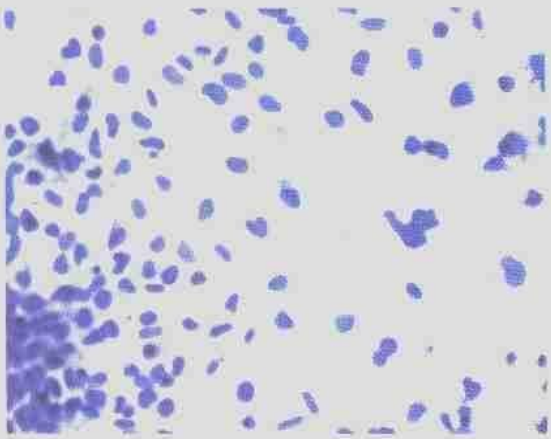
pSecTag2B－HSP70(40×10)



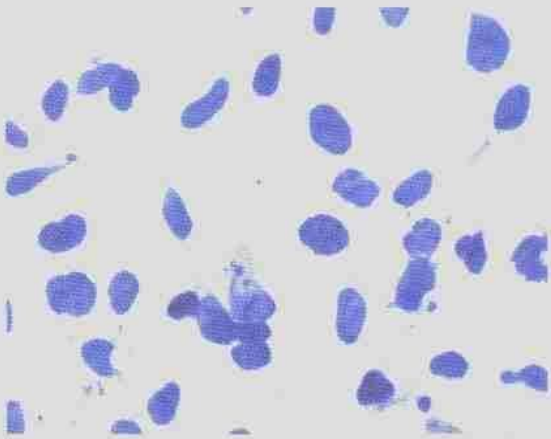
pSecTag2B－AFP－HSP70(抗 AFP)(40×10)



pSecTag2B－AFP－HSP70(抗 HSP)(40×10)



pSecTag2B(20×10)



未转染细胞(40×10)

图 6　转染细胞免疫细胞化学

本研究中采取两段基因融合，用 HCC 高表达的抗原 AFP 基因与有分子载体和佐剂功能的 HSP70 基因融合，以编码 G　S　G　G　S 五肽的基因作为连接子，该种连接子具有可及构像的广泛性，有利于运动，利于 AFP 和 HSP70 折叠成天然三维结构，以适合各自的受体结合点。

pSecTag2 系列载体含有小鼠免疫球蛋白 κ 轻链 V－J2－C 区的信号肽序列，能将表达蛋白分泌到胞外，分泌性蛋白往往能增强抗体滴度的产生和 CD4＋依赖的细胞应答。而在 DNA 免疫中，以肌肉注射的形式进行免疫后，机体能产生体液和很强的细

(下转第 741 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

基因的表达,从而引起细胞周期的改变。这些基因包括:p16、p15、p21、14-3-3-α、BRCA1 和 Rb 等[8~12]。但具体的作用途径和调节方式仍有待于进一步的研究,从而为恶性肿瘤的治疗开辟新途径。

参 考 文 献

[1] 来茂德.消化道疾病.见:杨光华,武忠弼,主编.中华外科病理学(上卷)[M].北京:人民卫生出版社,2002:655.

[2] Esteller M. Relevance of DNA methylation in the management of cancer[J]. Lancet Oncol,2003;4(6):351-358.

[3]陈道荣,王丕龙,黄爱龙.DNMT1 靶向 RNA 干扰重组体的构建及序列分析[J].重庆医科大学学报,2004;29(3):8-11.

[4] Fire A,Xu S,Montgomery MK,et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans[J]. Nature,1998;391(6669):806-811.

[5] Elbashir SM,Harborth J,Lendeckel W,et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells[J]. Nature,2001;411(6836):494-498.

[6] Sui G,Soohoo C,Affar el B,et al. A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2002;99(8):5515-5520.

[7] Szyf M. The role of DNA methyltransferase 1 in growth control. Front[J]. Biosci,2001;6:D599-609.

[8] Bachman KE,Park BH,Rhee I,et al. Histone modifications and silencing prior to DNA methylation of a tumor suppressor gene[J]. Cancer Cell,2003;3(1):89-95.

[9] Tessema M,Langer F,Dingemann J,et al. Aberrant methylation and impaired expression of the p15 (INK4b) cell cycle regulatory gene in chronic myelomonocytic leukemia (CMML)[J]. Leukemia,2003;17(5):910-918.

[10] Zhu WG,Srinivasan K,Dai Z,et al. Methylation of adjacent CpG sites affects Spl/Sp3 binding and activity in the p21 (Cipl) promoter[J]. Mol Cell Biol,2003;23(12):4056-4065.

[11] Magdinier F,Billard LM,Wittmann G,et al. Regional methylation of the 5' end CpG island of BRCA 1 is associated with reduced gene expression in human somatic cells[J]. FASEB J,2000;14(11):1585-1594.

[12] Kimura H,Nakamura T,Ogawa T,et al. Transcription of mouse DNA methyltransferase 1 (Dnmt1) is regulated by both E2F-Rb-HDAC-dependent and -independent pathways[J]. Nucleic Acids Res,2003;31(12):3101-3113.

(上接第 737 页)胞免疫应答,但是免疫的机制并不清楚,分泌性抗原与胞内表达抗原对于免疫应答的种类和强度是否也遵循免疫的普遍规律呢? AFP 为分泌性蛋白,本研究中所用 AFP 基因包括了信号肽序列,pSecTag$_2$B-AFP 加上了小鼠免疫球蛋白 κ 轻链 V-J2-C 区的信号肽序列,其表达的分泌性 AFP 高于其他载体。我们拟选用跟人 AFP 分泌规律相近似的小鼠为实验动物对象,研究含 AFP 基因的 DNA 疫苗能否克服免疫耐受,激发针对 AFP 的特异性体液和细胞免疫,对于 HCC 的治疗有补充作用。

参 考 文 献

[1] Vollmer CM,Eilber J,Butterfield L,et al. α-Fetoprotein-specific genetic immunotherapy for hepatocellular carcinoma [J]. Cancer Res,1999;59(13):3064-3067.

[2] Hanke P,Serwe M,Dombrowski F,et al. DNA vaccination with AFP-encoding plasmid DNA prevents growth of subcutaneous ADP-expressing tumors and does not interfere with liver regeneration in mice[J]. Cancer Gene Therapy,2002;9(4):346-355.

[3] Chen CH,Wang TL,Hung CF,et al. Enhancement of DNA vaccine potency by linkage of antigen gene to an HSP70 gene[J]. Cancer Res,2000;60(4):1035-1042.

[4] 梁增伟,兰英华,李用国,等. HBsAg 真核表达质粒及其诱导的小鼠特异性免疫应答[J]. 中华肝脏病杂志,2002;10(2):106-108.

[5] 梁增伟,兰英华,任 红,等. HBsAg 与结核杆菌热休克蛋白 70 融合质粒在真核细胞中的表达[J]. 中华肝脏病杂志,2002;10(4):248-252.