

MAGE-3 原核重组表达载体的构建和表达

裴 瑞¹,赵利萍¹,杨红梅²,陈 洁²,赵国强³

Construction and Expression of MAGE-3 Prokaryotic Recombinant Expression Plasmid

PEI Rui¹, ZHAO Li-ping¹, YANG Hong-mei², CHEN Jie², ZHAO Guo-qiang³

1. Experiment Center of He nan Medical College for Staff and Workers, Zhengzhou 450003, China; 2. Department of Pathophysiology; 3. Department of Microbiology and Immunology, Zhengzhou University, College of Basic Medicine

Abstract: **Objective** To construct prokaryotic recombinant expression plasmid pGEX-4T1-MAGE-3 and analysis of its expression in BL21 E. coli. **Methods** MAGE-3 aim gene was obtained by RT-PCR. The target gene was orientating cloned into pGEM-T Easy and subclone into pGEX-4T1 vector by DNA recombinant technical. Position clones were transformed into BL21. And then they were induced with IPTG, identified by 12 % SDS-PAGE electrophoresis and Western blot. **Results** MAGE-3 fragment (349bp) was amplified and the prokaryotic recombinant expression plasmid pGEX-4T1-MAGE-3 was correctly constructed. DNA sequencing results showed that the sequence of MAGE-3 gene fragment in position clones is the completely same as the sequence of the GenBank public. The 35kD fusion protein was observed in BL21 E. coli and verified that it is the target protein. **Conclusion** Prokaryotic recombinant expression plasmid pGEX-4T1-MAGE-3 was successfully constructed and the fusion protein was expressed by induced. These lay a foundation for providing antigen which will be used as peptide vaccine and specific diagnosis reagent based on MAGE-3 aim gene, and also provide an experimental basis for further research.

Key words: RT-PCR; MAGE-3; Cloning and expression; Recombinant protein; Tumor immunity

摘 要: **目的** 构建原核重组表达载体 pGEX-4T1-MAGE-3 并检测其在大肠杆菌 (E. coli) BL21 中的表达。 **方法** RT-PCR 法制备 MAGE-3 目的基因, 采用 DNA 重组技术将其克隆至 pGEM-T Easy 和亚克隆至 pGEX-4T1 载体, 转化 E. coli BL21 株, 经 IPTG 诱导, 12 % SDS-PAGE 电泳分离和 Western Blot 表达鉴定。 **结果** 扩增出 349bp 的 MAGE-3 目的基因并构建了原核重组表达载体 pGEX-4T1-MAGE-3; 测序结果与 GenBank 收录序列相一致; 在 E. coli BL21 中检测到含该重组表达载体的转化菌表达出分子量约 35kD 的融合蛋白并证实其为目的蛋白。 **结论** 成功构建的原核重组表达载体 pGEX-4T1-MAGE-3 及其所表达的融合蛋白, 为以 MAGE-3 为基础的肽疫苗及特异诊断试剂的研制提供抗原打下了基础, 为后续实验提供了依据。

关键词: 逆转录-聚合酶链反应; 黑色素瘤抗原-3; 克隆表达; 重组蛋白

中图分类号: Q781 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578 (2007) 06-0405-04

0 引言

黑色素瘤抗原-3 (melanoma antigen encoding gene-3, MAGE-3) 在肿瘤组织中由于具有广泛而且高比例特异性表达的特性, 所以, 自其被发现以来就引起了人们极大的兴趣。将 MAGE-3 作为疫苗的免疫疗法是目前研究的热点。研究方向主要集中在 MAGE-3 基因及其编码的蛋白在肿瘤的检测及免疫治疗方面。用逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR)

法从 mRNA 水平可以检测肿瘤抗原的表达。但 mRNA 水平的基因转录并不等于蛋白质水平的表达。而只有肿瘤抗原的表达, 才可诱导细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 对该肿瘤细胞的特异性识别与杀伤。肿瘤抗原与机体免疫应答之间的关系更为密切^[1]。MAGE-3 蛋白抗原在诱发机体抗肿瘤免疫反应及产生特异性杀伤性 T 淋巴细胞方面具有明确的作用^[2]。基于此, 我们以 pGEX-4T1 为高效原核表达载体, 采用 RT-PCR 法从肝癌组织制备出 MAGE-3 目的基因, 成功构建了 pGEX-4T1-MAGE-3 重组质粒并对此进行了蛋白表达和鉴定。为该抗原蛋白作为肽疫苗和检测诊断试剂用于 MAGE-3 抗原阳性肿瘤的防治提供了条件。

收稿日期: 2005-12-30; 修回日期: 2007-03-09

基金项目: 河南职工医学院重点科研项目 (2004-2)

作者单位: 1. 450052 郑州, 河南职工医学院实验中心; 2. 河南职工医学院病理生理学教研室; 3. 郑州大学医学院微生物与免疫学教研室

作者简介: 裴瑞 (1963-), 女, 硕士在读, 高级实验师, 主要从事肿瘤免疫及生物治疗方面的研究

1 材料与方法

1.1 实验材料

肝癌组织标本取自河南省肿瘤医院。-80℃保存。pGEM-T Easy 克隆载体购自 Promega 公司; pGEX-4T-1 原核表达载体为 Pharmacia 公司产品。大肠杆菌 JM109、大肠杆菌 BL21 (DE3) 由郑州大学基础医学院微生物实验室保存。RNA 提取试剂盒为 Qiagen 公司产品; DNA 小量纯化试剂盒购自大连宝生物公司; 限制性内切酶 BamH1、EcoR1、Xho1、禽源性反转录酶 (AMV)、dNTP、TaqDNA 聚合酶、T4DNA 连接酶、X-gal (5-溴-4-氯-3-吲哚-D-半乳糖苷)、IPTG (异丙基硫代-D-半乳糖苷) 为 Promega 公司产品; Marker DL2000、琼脂糖购于上海生物工程公司; 兔抗 MAGE-3 多克隆抗血清 (一抗): 为 Santa Cruz 公司产品; 碱性磷酸酶标记的抗兔 IgG 免疫球蛋白 (二抗): 购自北京中山生物技术公司; NC 膜 (硝酸纤维素膜): 购于北京益利精细化学品有限公司; PVDF Western blot membrane: 为 Bio-Rad 公司产品; Protein Marker 为 TaKaRa 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 MAGE-3 目的基因的制备 采用 RT-PCR 法, 按照 Qiagen RNA 提取试剂盒操作规程, 提取总 RNA。取其 5μl 作为模板, 在 AMV 催化下, 常规方法反转录出 MAGE-3 cDNA。PCR 扩增所需引物是根据原核表达载体 pGEX-4T-1 和 MAGE-3 基因序列 NM-005362, 用 DNASTar 软件设计, 由上海生物工程公司合成。

上游引物: P1: 5'-CAGGATCCATGCCCTCT-TGAGCAGAGGAGTC3' (210-231)

下游引物: P2: 5'-CCGAATTCCCTACT-GAGTGCTGCTTGG3' (542-524)

上述字母下划线处为 BamH1、EcoR1 的酶切位点。此两位点分别与 pGEX-4T-1 上相应的多克隆位点相吻合。PCR 反应条件: 94℃ 预变性 5min, 94℃ 变性 60s, 55℃ 退火 60s, 72℃ 延伸 120s, 35 个反应循环, 最后一个循环 72℃ 延伸 300s。取 PCR 产物 5μl 于 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳, DNA Marker2000 为标准判断扩增片段。取 PCR 产物 8μl, 通过 Xho1 进行酶切, 电泳鉴定。

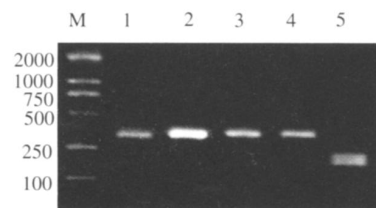
1.2.2 目的基因与 pGEM-T Easy 及 pGEX-4T-1 的重组 大量扩增 PCR 产物并以 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离。参照 Vitagene DNA 凝胶回收试剂盒操作规程加以回收并与 pGEM-T Easy 载体连接。转化感受态 E. coli JM109。据氨苄青霉素抗性 (Amp^r)、蓝白筛选实验, 以 T7/SP6 为克隆鉴定引

物进行三次 PCR 扩增鉴定。PCR 扩增条件: 94℃ 预变性 3min, 94℃ 变性 55s, 55℃ 复性 55s, 72℃ 延伸 1min, 扩增 35 个循环。最后一个循环 72℃ 延伸 300s。抽取每种扩增产物 5μl 电泳鉴定。将原核表达载体 pGEX-4T-1 转化感受态 E. coli JM109, 培养扩增转化菌。参照 Vitagen 日常型质粒 DNA 小量纯化试剂盒操作规程分别提取、纯化 pGEM-T-MAGE-3 重组质粒和 pGEX-4T-1 载体, 用 BamH1、EcoR1 分别酶切, 得到 MAGE-3 目的片段和具有粘端的 pGEX-4T-1 载体。按照 Vitagene DNA 凝胶回收试剂盒操作规程分别回收目的片段及双粘 pGEX-4T-1 载体并将两者连接, 转化感受态 E. coli BL21, 据卡那霉素抗性 (Kan^r), 以 T1/T2 为特异性引物进行 PCR 扩增鉴定, 条件同上。抽取每种样品及酶切产物各 5μl, 于 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳。将初步鉴定正确的阳性克隆平板寄送上海生物工程公司进行 DNA 双向测序, 并对测序结果用 DNASIS、OMIGA 软件与 GenBank 上公布的 MAGE-3 相应的基因片段进行同源性比较。

1.2.3 目的基因的原核表达及鉴定 将转化有 pGEX-4T-1-MAGE-3 的 E. coli BL21 在 1mmol IPTG 诱导下分别培养 1、2.5、4、6h。然后将未经 IPTG 诱导的及经不同时间诱导的各样品进行 12% SDS-PAGE 电泳分离, 电转移至 NC 膜上, 再经转印, 封闭后, 以兔抗 MAGE-3 多克隆抗体 (1:1000 稀释) 为一抗, 碱性磷酸酶标记的抗兔 IgG 免疫球蛋白 (1:300 稀释) 为二抗, 鉴定原核重组融合蛋白中目的基因片段的表达。

2 结果

2.1 目的基因扩增、鉴定 经 RT-PCR 扩增得到 349bp 的 MAGE-3 目的基因。由于在 MAGE-3 基因 386 位有 Xho1 酶切位点, 扩增产物经 Xho1 酶切应该得到 185bp 和 164bp 两个片段, 实际扩增及酶切结果与理论预测完全一致, 见图 1。

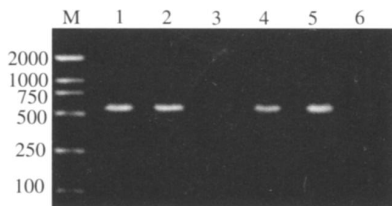


M: Marker DL 2000; 1~4: RT-PCR 扩增产物 (349bp); 5: Xho1 酶切扩增产物后的片段

图1 MAGE-3 目的基因 RT-PCR 扩增及扩增产物酶切鉴定图谱

2.2 重组质粒筛选、鉴定 以 T7/SP6 为克隆鉴定

引物,随机挑选白色菌落进行 PCR 扩增,并电泳鉴定,得到约 525bp 的片段。以 T1/ T2 为亚克隆鉴定引物,随机挑选转化菌落进行 PCR 扩增,鉴定得到 4 个阳性克隆:p GEX-4 T-1-MA GE-3。实际结果与预期一致,见图 2。

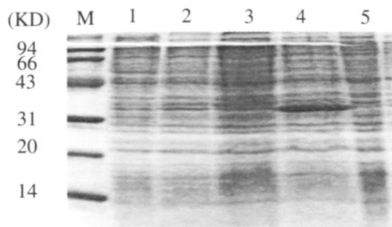


M:Marker DL2000; 1、2、4、5:p GEX-4 T-1-MA GE-3 扩增产物; 3、6:p GEX-4 T-1 扩增产物

图 2 MA GE-3 目的基因在 pGEX4T1-MA GE-3 上的亚克隆及鉴定

2.3 重组质粒序列分析 DNA 测序证实,含重组质粒 p GEM- T-MA GE-3 和 p GEX-4 T-1-MA GE-3 的阳性克隆内插入的 MA GE-3 目的片段的碱基组成与 GenBank 公布的 MA GE-3 NM 005362 基因相应序列完全一致。

2.4 重组质粒中融合蛋白的诱导表达 经 IPTG 诱导和 12 %SDS-PA GE 电泳,转化有 p GEX-4 T-1-MA GE-3 的 E. coli BL21 诱导产物在相对分子量为 35kD 处出现一条特异蛋白带,其分子量与预期相同,诱导 4h 产物最多,见图 3。



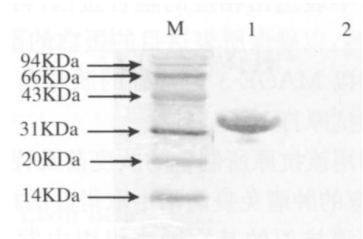
M:Protein Marker; 1、2、3、5: 未诱导样品电泳结果; 4:IPTG 诱导 4h 的表达产物(重组 MA GE-3 融合蛋白,约 35 kD)电泳结果

图 3 12 %SDS-PA GE 电泳结果

2.5 融合蛋白的 Western-Blot 鉴定 融合蛋白与一抗(兔抗 MA GE-3 多抗血清),二抗(碱性磷酸酶标记的抗兔 IgG 免疫球蛋白)结合后经酶底物显色,进行 Western-blot 分析。可见诱导含 p GEX-4 T-1-MA GE-3 的 E. coli BL21 上出现 35 kD 特异带,而未诱导的含 p GEX-4 T-1-MA GE-3 的 E. coli BL21 在相应位置未见该条带,见图 4。

3 讨论

肿瘤特异性免疫防治的前提和关键是肿瘤抗原。现已被鉴定的肿瘤抗原约有 1600 多种^[3]。而



M:Protein Marker; 1:含 p GEX-4 T-1-MA GE-3 的 E. coli BL21 诱导 4h;2:未诱导的含 p GEX-4 T-1-MA GE-3 的 E. coli BL21

图 4 融合蛋白的 Western-blot 分析结果

MA GE-3 是最早被发现和报道的肿瘤抗原——MA GE 抗原家族的一典型代表,它广泛且高比例的特异性表达于不同类型的多种肿瘤组织中,而在除睾丸和胎盘以外的正常组织却均不表达^[4-6]。它在众多被发现的肿瘤抗原中是免疫原性最强和能被免疫细胞识别的肽表位最多的抗原之一。它可以诱导机体产生特异性的 CTL 细胞,还具有提高肿瘤免疫原性的作用^[7],因而在肿瘤免疫防治方面具有重要的潜在价值^[8]。例如:可以它为基础进行具有广谱性的预防接种,而这对于那些通过基因和家族史被认为是肿瘤的高发人群来说非常重要^[9]。再如:以它为基础制备的疫苗可激活表达该抗原,但发病早期浓度却较低的肿瘤患者的免疫细胞,从而可避免免疫逃逸的发生。还有,可将 MA GE-3 基因作为检测肿瘤是否有微转移的一种肿瘤标志物,通过 RT-PCR 对此进行检测,而这将为指导临床治疗、监测疗效、判断预后提供重要参考资料^[10]。另外,以 MA GE-3 基因为基础构建的载体所表达出的相应蛋白,可用于检测那些体内会自发产生抗 MA GE-3 抗体的肿瘤患者,而这对于肿瘤的早诊、早治有重要意义。

肽疫苗具有诱导免疫反应的针对性强、易制备、安全、且副作用少等特点,因而吸引了众多国内外学者的注意。他们利用 MA GE-3 抗原制备的肽疫苗进行了大量的体内外实验^[11-15],并取得了令人欣喜的成果。然而该类疫苗的总效果仍不尽如人意。例如:有效率不够、抗原性有待提高、体内诱导活性较弱等等。对此,本研究采取了相应措施加以改进。首先,通过软件分析,选择了 MA GE-3 基因中抗原表位较丰富、编码产物易被 MHC 分子识别且有利于抗原提呈、能有效激活 CTLs 的这样一段片段作为目的基因;其次,选择了灵敏且特异性较强的 RT-PCR 方法;第三,选择了能稳定、高效表达且所表达的目的蛋白易被分离、鉴定、纯化的 p GEX-4 T-1 作为原核表达载体来构建了原核重组表达质粒 p GEX-4 T-1-MA GE-3,并在 IPTG 的诱导下,在相

应的转化菌中表达出相应的融合蛋白,再经 Western-blot 检测,以确保所表达目的蛋白的准确无误。从而为研制以 MAGE-3 为基础的肽疫苗及特异诊断试剂提供抗原打下了基础。

相信利用该抗原所制备的肽疫苗及特异诊断试剂,能在相应的肿瘤免疫防治中取得好的疗效,也期望能在共享该抗原的其它肿瘤组织中发挥防治作用。

参考文献:

- [1] Takaki T, Hiraki A, Uenaka A, et al. Variable expression on lung cancer cell line of HLA-A2 binding MAGE-3 peptide recognized by cytotoxic T lymphocytes[J]. Int J Oncol, 1998, 12 (5): 1103-1109.
- [2] Lonchay C, Vander Bruggen P, Connerotte T, et al. Correlation between tumor regression and T cell responses in melanoma patients vaccinated with a MAGE antigen[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101 (Suppl 2): 14631-14638.
- [3] Romero P, Dunbar PP, Valmori D, et al. EX vivo staining of metastatic lymph nodes by class I major histocompatibility complex tetramers reveals high numbers of antigen-experienced tumor-specific cytolytic T lymphocytes[J]. J Exp Med, 1998, 188 (9): 1641-1650.
- [4] De Plaen E, Arden K, Traversari C, et al. Structure, chromosomal localization, and the expression of 12 genes of the MAGE family[J]. Immunogenetics, 1994, 40 (5): 360-369.
- [5] 蔡胜利, 陈红松, 王瑜, 等. 黑色素瘤抗原-1 基因在肝细胞中的表达[J]. 中华医学杂志, 1999, 79 (9): 668-672.
- [6] Inoue H, Mori M, Li J, et al. Human esophageal carcinomas frequently express the tumor-rejection antigens of MAGE genes[J]. Int J Cancer, 1995, 63 (4): 523-526.
- [7] 刘杏娥, 孙晓东, 吴金民. MAGE-3DNA 疫苗的构建及其免疫效果的观察[J]. 生物工程学报, 2004, 20 (2): 165-169.
- [8] Zendman AJ, Ruiter DJ, van Muijen CN. Cancer/testis associated genes: Identification, expression profile, and putative function[J]. J Cell Physiol, 2003, 194 (3): 272-288.
- [9] Schultze JL, Vonderheide RH. From cancer genomics to cancer immunotherapy: toward second-generation tumor antigens[J]. Trends Immunol, 2001, 22 (9): 516-523.
- [10] 杜艳, 戴建国, 吴平平, 等. 食管癌患者外周血中多种肿瘤标志物的监测及意义[J]. 中华医学研究杂志, 2005, 5 (4): 289-291.
- [11] Oiso M, Eura M, Katsura F, et al. A newly identified MAGE-3-derived epitope recognized by HLA-A24-restricted cytotoxic T lymphocytes[J]. Int J Cancer, 1999, 81 (3): 387-394.
- [12] Schultz ES, Zhang Y, Knowles R, et al. A MAGE-3 peptide recognized on HLA-B35 and HLA-A1 by cytolytic T lymphocytes[J]. Tissue Antigens, 2001, 57 (2): 103-109.
- [13] Tanzarella S, Russo V, Lionello I, et al. Identification of a promiscuous T-cell epitope encoded by multiple members of the MAGE family[J]. Cancer Res, 1999, 59 (11): 2668-2674.
- [14] Marchand M, Van Baren N, Boon T, et al. Tumor regressions observed in patients with metastatic melanoma treated with an antigenic peptide encoded by gene MAGE-3 and presented by HLA-A1[J]. Int J Cancer, 1999, 80 (2): 219-230.
- [15] Gajewski TF, Fallarino F, Ashikari A, et al. Immunization of HLA-A2+ melanoma patients with MAGE-3 or Melan A peptide-pulsed autologous peripheral blood mononuclear cells plus recombinant human interleukin 12[J]. Clin Cancer Res, 2001, 7 (3): 895-901.

[编辑:贺文;校对:马福元]