

人癌胚抗原与新城疫病毒 HN 基因共表达载体的构建及表达

魏 林 戴建新 孙树汉

(第二军医大学医学遗传学教研室 上海 200433)

关键词 癌胚抗原 新城疫病毒 HN 基因 共表达质粒

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)05-0641-04

注射肿瘤疫苗,诱发机体产生特异性抗肿瘤免疫,是肿瘤生物治疗及手术后预防肿瘤复发、转移的重要手段之一。肿瘤核酸疫苗较重组蛋白或多肽疫苗来说,具有无可比拟的优点,它可同时诱导体液免疫和细胞免疫,后者在肿瘤免疫中起关键作用。传统的肿瘤疫苗是经各种方法灭活后的自体瘤苗,它虽可以诱导细胞免疫,但仍存在着灭活不彻底,导致人为瘤细胞种植的潜在危险,况且从操作性方面也较为繁琐、复杂。

肿瘤抗原往往抗原性较弱,尤其是相关抗原,在某些正常组织中也有微量的表达,这容易使机体免疫系统对它产生免疫耐受,因此在激发肿瘤特异性免疫过程中,为免疫系统提供适当的佐剂是非常必要的。IFN、TNF、IL-2 等细胞因子都是常用的生物佐剂。微生物蛋白在结构上与人体蛋白有较大的差异,能诱发人体产生强烈的免疫反应,也可以成为一种理想的佐剂,单一的细胞因子只能作用于免疫调节的某一环节,而微生物抗原却可以诱导机体产生多种细胞因子,从而全方位地调节免疫系统^[1]。本实验首先构建了癌胚抗原(CEA)的真核表达质粒,并将新城疫病毒 HN 基因引入,构建了共表达 HN 与 CEA 的重组质粒,希望 HN 能加强 CEA 所诱发的特异性抗肿瘤免疫反应。

1 材料与方 法

1.1 材料

大肠杆菌 DH5、Top-10 本室保存。COS-7 细胞,购自中科院细胞所。大肠癌组织取自临床检测 CEA 阳性病人手术切除大肠癌组织。pGEM-T easy 载体购自 Promega 公司,载体 pcDNA3、pGNF 为本室保存。pcDNA3-HN 质粒为本室构建。限制酶、T4DNA 连接酶、TaqDNA 聚合酶、反转录酶、牛小肠碱性磷酸酶以及 Klenow 酶为 Promage、Takara 及 Boehringer 公司产品。DMEM 培养基、小牛血清均为 GIBCO 公司产品。组织 RNA 抽提试剂盒、胶回收试剂盒,为华舜公司产品。CEA 抗原检测 ELISA 试剂盒为华美公司产品。其它试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 大肠癌组织的 RNA 提取:临床手术切除大肠癌组织,立即置液氮中,称取 50 mg,研磨后按试剂盒手册操作。

1.2.2 RT-PCR 及基因重组:PCR 引物由中科院植物生理研究所合成。引物序列为:P1:5'-GC AAG CTT AGA GAC CAT GGA GTC TCC CTC G-3' P2:5'-CTCT AGA GCT ATA TCA GAG CAA CC-3'。基因重组按常规操作。

1.2.3 电穿孔转染质粒:按常规方法操作,穿孔条件为:电容 960 电压 250V,时间 15.3 min。同时设空载体 pcDNA3 穿孔对照。

1.2.4 表达产物的检测:CEA 表达产物采用 ELISA 方法,按试剂盒说明操作。HN 检测采用血凝实验及血凝抑制实验,按常规方法操作。

1.2.5 测序:由 Takara 公司完成。

2 结果

2.1 CEA cDNA 的获取及重组表达质粒 pcDNA3-CEA 的构建

RNA 来源于临床手术标本,以 oligdT 为反转录引物,两条 PCR 引物分别包含了 CEA 编码序列的起始密码及终止密码,并在 5'-端分别引入 HindIII 及 XbaI 两个酶切位点。PCR 循环条件为 94℃ 1 min 54℃ 1 min 72℃ 2 min,每个循环后自动延伸 10s,共 35 个循环。扩增产物见图 1。回收 2.1kb 大小片段,纯化后与 pGEM-T easy 载体连接并测序,共 4 个反应完成了全序列测定。所测序列与 Genbank 登录序列比较,完全一致。以 HindIII、XbaI 双酶切 pGEM-CEA 获得 CEA cDNA 片段,与相同 2 个酶处理过的 pcDNA3 载体连接,转化、筛选、酶切鉴定,获得 pcDNA3-CEA 真核表达质粒(图 2)。

2.2 HN 重组质粒 pGEF-HN 的构建

NDV HN 基因来自本室构建的重组质粒 pGEM-HN,利用 PCR 引物设计时引入的 5'端酶切位点 BamHI 及载体上的 3'端位点 NotI 将 HN cDNA 切出,连接到 pGEF 的相同酶切位点上,酶切鉴定获得 pGEF-HN。

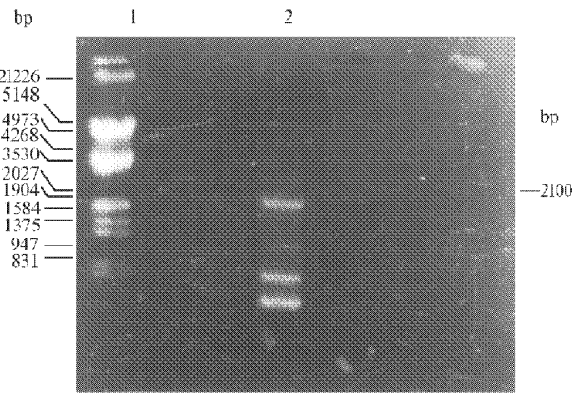


图1 RT-PCR产物琼脂糖电泳
1. λ DNA *Hind* III + *Eco* RI marker
2. RT-PCR products

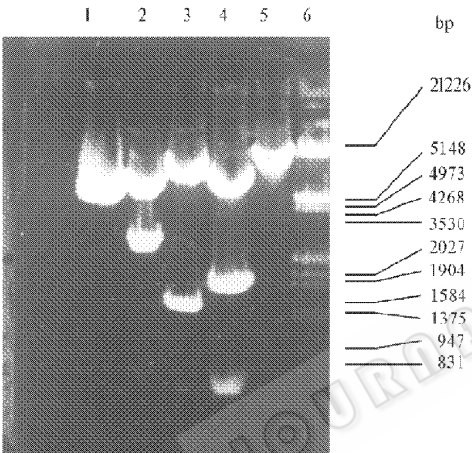


图2 pcDNA3-CEA酶切分析图
1. pcDNA3-CEA
2. pcDNA-CEA/*Hind* III + *Xba* I
3. pcDNA-CEA/*Bam* H I
4. pcDNA-CEA/*Nae* I
5. pcDNA-CEA/*Nru* I
6. λ DNA *Hind* III + *Eco* RI marker

2.3 CEA与HN共表达重组质粒 pcDNA3-CEA/HN 的构建
利用 pGEF 质粒含有,而目的基因没有的单酶切位点 *Apa* L、*Afl* II 以及 *Stu* I ,获得 Pcmv-HN-polyA 的完整表达单元,约 2.5 kb 大小,回收并以 Klenow 片段补平片段两端。用 *Nru* I 处理 pcDNA3-CEA,此位点位于 CMV 启动子的 5' 端,获得平端线性化质粒,经 CIP 处理后与 Pcmv-HN-polyA 连接,转化至 Top-10 菌,筛选克隆、酶切及 PCR 鉴定,获得 CEA、HN 双表达质粒(图 3、4)。质粒构建图如下(图 5):

2.4 共表达质粒在真核细胞的表达及检测
质粒 pcDNA3-CEA, pGEF-HN, pcDNA3-CEA/HN 各 40 μ g,电穿孔转入 COS-7 细胞(浓度 1 \times 10⁷/mL),以

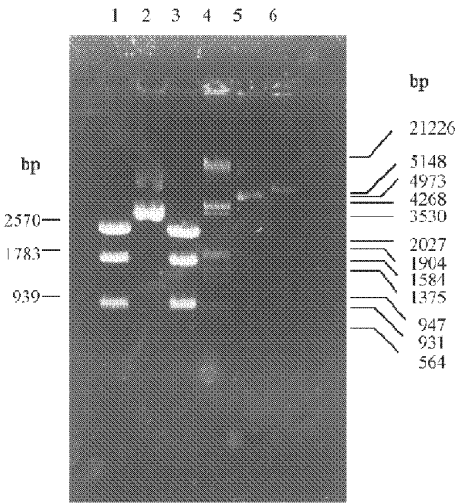


图3 pcDNA3-CEA/HN 构建酶切图
1.3. pcDNA-CEA/*Afl* II + *Apa* L + *Stu* I
2. pcDNA-CEA
4. λ DNA *Hind* III + *Eco* RI marker
5. pGEF-HN
6. pGEF-HN/*Nru* I

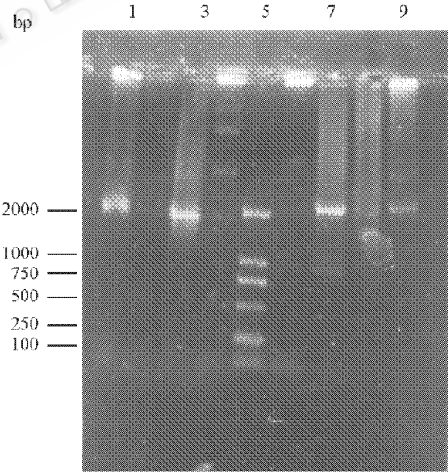


图4 pcDNA3-CEA/HN PCR 鉴定图
1. PCR products with pGEF - HN as template
3、7. PCR products with pcDNA3 - CEA/HN as template
5. 2 000kb ladder marker
9. PCR products with pcDNA3-CEA as template

pcDNA3-HN 为阳性对照质粒,空载体 pcDNA3 为阴性对照。穿孔条件为电容 960 μ F,电压 250V。72 h 收获细胞上清,分别以 ELISA、血凝实验检测 CEA 及 HN 的表达量,并以 CEA 蛋白及 NDV 为阳性对照。结果显示 pcDNA3-CEA,pcDNA3-CEA/HN 有 CEA 表达,表达量约为 5 ng/mL。PGEF-HN 及 pcDNA3-CEA/HN 有 HN 表达,表达量为 1 32 血凝单位(图 6)。

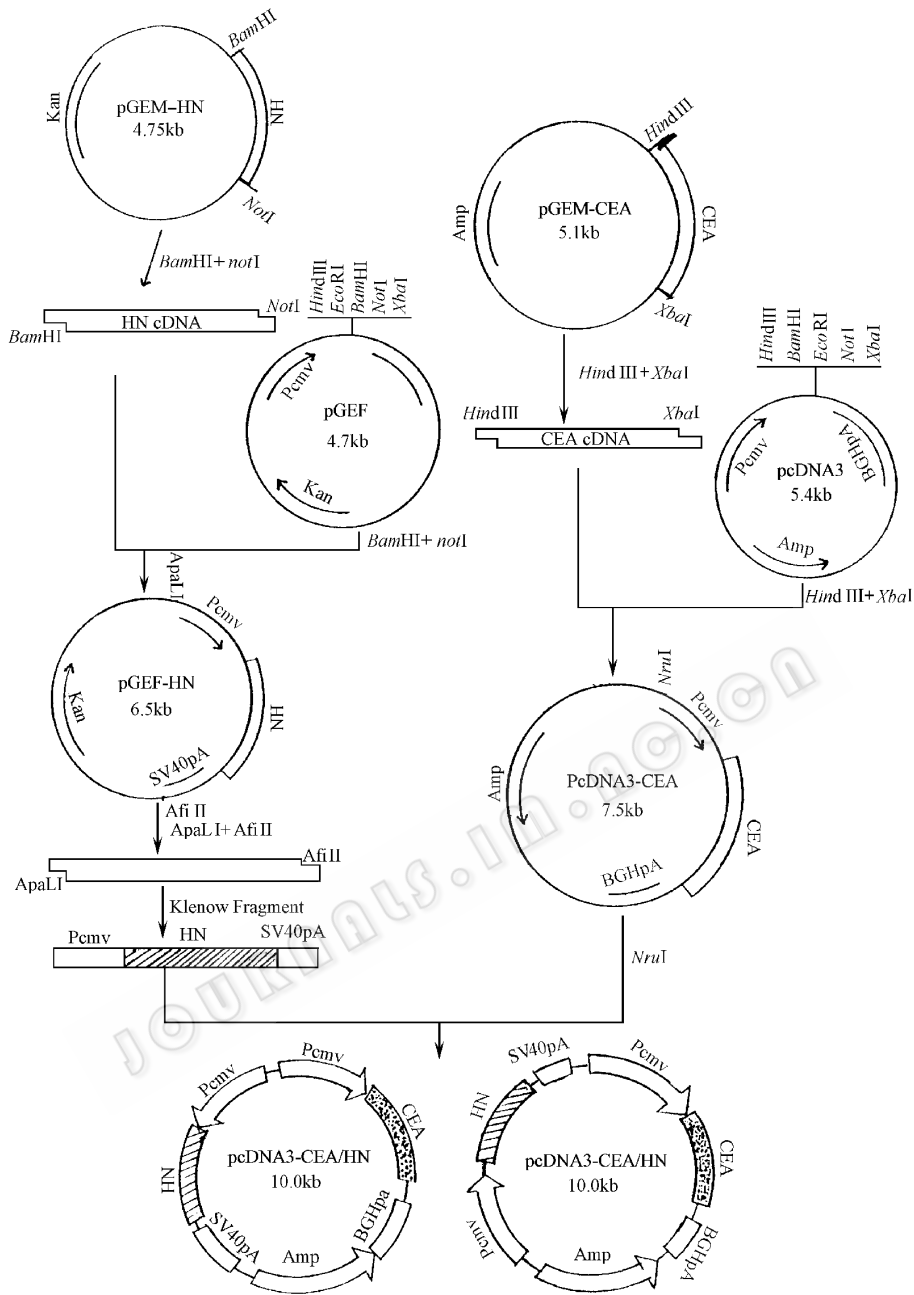


图 5 pcDNA3-CEA/HN 质粒构建图

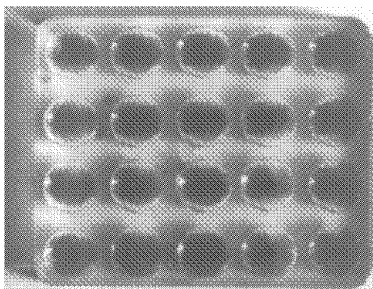


图 6 血凝实验检测质粒 HN 的表达

3 讨 论

癌胚抗原是许多腺癌,包括大肠癌、乳腺癌、非小细胞肺癌表达的一种相关抗原,尤其大肠癌,几乎 100% 都表达 CEA。CEA 蛋白属于免疫蛋白超基因家族,它参与细胞间的识别与反应,而且还是一种粘附因子,可促进肿瘤细胞与正常细胞的结合,在肿瘤细胞的转移中起重要的作用。CEA 既可自细胞分泌,也可结合在细胞膜上,因此在肿瘤的诊断及治疗上都有重要的意义。从 1985 年开始,即陆续有报道,CEA 可诱发特异性的抗肿瘤免疫,是肿瘤治疗理想的靶抗

原相继有重组 CEA 疫苗⁽²⁾、抗独特型抗体疫苗⁽³⁾以及核苷酸疫苗⁽⁴⁾产生。近年已进入或完成 I 期临床试验。

特异性细胞免疫的活化至少需要三个信号:特异性抗原信号、刺激信号(如 B7 分子)以及增殖信号(如细胞因子)。由此派生出生物佐剂的概念。有研究表明,注射编码生物佐剂的质粒比直接注射生物佐剂作用更显著⁽⁵⁾,这可能是由于肌细胞摄取质粒 DNA 后持续表达的生物佐剂分子,能较长时间地吸引抗原提呈细胞,促进其对抗原的摄取。而生物佐剂与特异抗原的共表达质粒的作用又优于同时注射两种质粒⁽⁶⁾,这提示生物佐剂增强特异抗原免疫应答依赖于两种蛋白在同一种细胞的表达。

本实验构建的共表达质粒,其启动子均为能在真核细胞高效表达的 CMV 启动子。依赖来源载体的单酶切位点,获得含有外源 HN 基因、启动子及加尾信号的完整的表达单元,与 pcDNA3-CEA 质粒在其启动子的 5' 端进行连接,通过酶切、PCR 得到鉴定。穿孔导入 COS-7 细胞,ELISA 及血凝实验检测,证明此质粒能同时表达 HN 及 CEA 蛋白,并且表达量与单表达质粒一致。我们以前的实验证明,表达新城疫病毒 HN 蛋白的质粒能增强荷瘤小鼠的特异性抗肿瘤细胞免疫⁽⁷⁾,它能否加强由肿瘤核苷酸疫苗所诱发的特异性抗肿瘤免疫,我们构建的共表达质粒,为这方面的工作奠定了基础。并有助于 HN 质粒抗肿瘤机制的深入研究及应用。

参 考 文 献

- [1] Hock H ,Dorsch M ,Kunzendorf U *et al.* *Cancer Res* ,1993 ,**53**(4) :714~716
- [2] Kantor J ,Irvine K ,Abrams S *et al.* *J Natl Cancer Inst* ,1992 ,**84**(14) :1084~1091
- [3] Foon K A ,Chakraborty M ,John W J *et al.* *J Clin Invest* ,1995 ,**96**(1) :334~342
- [4] Conry R M ,LoBuglio A F ,Kantor J *et al.* *Cancer Res* ,1994 ,**54**(5) :1164~1168
- [5] Chow Y H ,Huang W L ,Chi W K *et al.* *J Virol* ,1997 ,**71**(1) :169~178
- [6] Conry R M ,Widera G ,LoBuglio A F *et al.* *Gene Ther* ,1996 ,**3**(1) :67~74
- [7] 魏 林 ,戴建新 ,孙树汉 .第二军医大学学报 ,2000 ,**21**(6) :10~13

Construction and Expression of Coexpression Plasmid of Carcinoembryonic Antigen and Newcastle Disease virus HN Gene

WEI Lin DAI Jian-Xin SUN Shu-Han

(Department of Medical Genetics ,Department of Basic medicine ,Second Military Medical University ,Shanghai 200433)

Abstract The eukaryotic expression plasmid (pcDNA3-CEA) containing with the gene coding for the Carcinoembryonic antigen (CEA) had been gotten with RT-PCR and gene recombination techniques. Using enzymolysis ,ligation and other techniques ,an eukaryotic coexpression plasmid (pcDNA3-CEA/HN) containing two expression unites of CEA and Newcastle disease virus HN gene that may have the function of immunoenhancement had been constructed. The plasmid will lay a foundation for further researching CEA nucleotide vaccine adjuvant and their effect of special antitumor immune.

Key words Carcinoembryonic antigen ,newcastle disease virus HN gene ,coexpression plasmid