

## 前列腺干细胞抗原(PSCA)的表达及其特异结合肽的筛选

侯利华 杜 勇 张晓鹏 安小平 陈 薇\*

(军事医学科学院微生物流行病学研究所, 北京 100071)

**摘 要** 通过反转录-PCR 从人前列腺癌细胞中克隆了前列腺干细胞抗原(PSCA)基因, 在大肠杆菌中利用 pQE30 载体对截断型 PSCA 基因进行了可溶性表达。蛋白纯化后, 利用噬菌体随机展示 12 肽库筛选了 PSCA 蛋白的特异结合肽, 通过与 EGFP 蛋白的耦联表达验证了结合肽的特异性。此特异结合肽的获得, 为进一步研究针对 PSCA 的前列腺癌靶向免疫治疗奠定了基础。

**关键词** 前列腺干细胞抗原(PSCA), 结合肽, 表达

**中图分类号** Q81 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2004)05-0694-05

前列腺癌是欧美国家中最常见的恶性肿瘤, 近年来, 在我国的发病率也呈上升趋势。虽然在前列腺癌的诊断和治疗方面已取得很大进展, 但仍需选择更好的鉴别潜伏期和进展期的前列腺癌的新标志, 以及能用于免疫靶向治疗的前列腺癌特异性抗原。

前列腺干细胞抗原(Prostate Stem Cell Antigen, PSCA)是 1998 年 Reiter 等<sup>[1]</sup>在人前列腺癌动物模型中发现的, 因为与干细胞抗原 2(Stem Cell Antigen-2, SCA-2)有 30% 同源而被命名。PSCA 是表达在前列腺上皮细胞表面的一种含有 123 个氨基酸的蛋白质, 通过 GPI(葡萄糖磷脂酰肌醇)共价锚定在细胞膜上, 而不形成分泌形式。PSCA 在正常人前列腺基底细胞有微弱表达, 在恶变组织中有高表达, 尤其是在激素非依赖前列腺癌及转移灶中有高表达<sup>[2]</sup>, 因此在前列腺癌领域备受重视。

本研究从人前列腺癌细胞 DU145 中克隆出 PSCA 基因, 并在 *E. coli* 中进行了可溶表达。以此蛋白为靶标, 从噬菌体随机展示 12 肽库中筛选其特异结合肽, 经与荧光蛋白相耦联, 证明该肽能与 PSCA 特异结合, 能与细胞表面含有 PSCA 分子的 DU145 细胞结合, 为今后研究针对前列腺癌细胞 PSCA 的特异导向治疗及检测方法奠定了基础。

### 1 材料与方法

#### 1.1 主要材料

人前列腺癌 DU145 细胞购自中国医学科学院基础医学研究所细胞中心; pQE 质粒及 *E. coli* M15

菌株购自 QIAGEN 公司; 噬菌体随机展示 12 肽库购自 New England Biolabs 公司; 常用限制性内切酶、连接酶、Taq 酶和 AMV 反转录酶购自 TaKaRa 公司; 抗-PSCA 单克隆抗体购自 Chemicon 公司; HRP 标记的抗 M13 噬菌体单抗购自 Amersham Pharmacia 公司。

#### 1.2 PSCA 基因的克隆

将 DU145 细胞培养到  $1 \times 10^7$ , 加入 1 mL TRIzol (Invitrogen)试剂, 按照说明书要求提取 mRNA, 溶于 DEPC-水中。

合成两条扩增 PSCA 基因的引物, 上游引物为 PSCA1: 5' CCC AAG CTT TCC ACC ATG AAG GCT GTG CTG CTT GCC 3'; 下游引物为 PSCA4: 5' CCC AAG CTT TAG CTG GCC GGG TCC CCA GAG 3'。以 PSCA4 为引物, 使用 AMV 反转录酶, 合成 cDNA。反应体系为: 模板 RNA 1  $\mu$ g, AMV 反转录酶 (5 u/ $\mu$ L) 2  $\mu$ L, 缓冲液 4  $\mu$ L, dNTP 混合物 (每种 10 mmol/L) 2  $\mu$ L, RNase 抑制剂 20 u, PSCA4 引物 (10  $\mu$ mol/L) 1  $\mu$ L, 加水补足总体积 20  $\mu$ L。42 $^{\circ}$ C 水浴 1 h 后, 在冰水中冷却 2 min, 以此 cDNA 为模板, 以 PSCA1 与 PSCA4 为引物, 扩增 PSCA 基因。PCR 反应条件为 94 $^{\circ}$ C 3 min; 94 $^{\circ}$ C 15 s, 55 $^{\circ}$ C 20 s, 72 $^{\circ}$ C 20 s, 共 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。1% 琼脂糖凝胶电泳检测。PCR 产物与 T-vector 相连, 测序。

#### 1.3 截断型 PSCA 基因的表达

为了适于在原核系统中的表达, 截取 PSCA 基因的一部分进行表达。上游引物为 PSCA2: 5' CCC AAG CTT CAG GTG AGC AAC GAG GAC TGC 3', 下游

引物为 PSCA3: 5' CCC AAG CTT A CAG GGC ATG GGC CCC GCT GGC 3'。扩增基因命名为 tPSCA。以限制酶 *Hind*Ⅲ 酶切 PCR 产物,同时以该酶切 pQE30 载体,去磷酸化,将二者相连,命名为 pQE-tPSCA 质粒,转化 *E. coli* M15。

将阳性克隆测序确认序列无误后,对其进行诱导表达。诱导条件为当菌生长到 OD 值为 0.6 时,加入终浓度为 1mmol/L IPTG,37℃ 继续培养 5h,以 18% 的 SDS-PAGE 检测其有无表达。当确定目的蛋白以可溶形式存在后,纯化使用 Ni-NTA 基质,操作步骤按照 QIAgen QIAexpressionist 操作手册进行。

对表达的重组 tPSCA 进行免疫学鉴定,使用抗-PSCA 单克隆抗体,Western blot 程序参见分子克隆第二版<sup>[3]</sup>。

#### 1.4 tPSCA 特异结合肽的筛选

将纯化后的 tPSCA 重组蛋白稀释到 100μg/mL,每孔 150μL 包被微孔,30g/L BSA 封闭。将 10μL 肽库原液加入到 100μL TBS[50mmol/L Tris-Cl(pH7.5),150mmol/L NaCl]中稀释,然后加入到微孔中,室温缓慢摇荡 1h。TBST 洗涤 10 次。每孔加入 100μL 0.2mol/L 甘氨酸-盐酸缓冲液(pH2.2),室温放置 10min,洗脱结合噬菌体。加入 20μL 2mol/L Tris 中和洗脱液。测定洗脱液中的噬菌体浓度,并对洗脱液中的噬菌体进行扩增,沉淀后,进行第二轮淘洗。用同样的方法进行 3 轮淘洗后,挑取 20 个噬斑,制备原种。ELISA 鉴定阳性克隆。

#### 1.5 特异结合肽与 DU145 细胞的结合

取培养好的前列腺癌细胞 DU145,离心后,溶于 PBS 中,反复冻融 3 次,将该溶液与包被液 1:1 稀释,包被酶联板,挑取上述的阳性克隆与之反应,鉴定含有特异结合肽的噬菌体与表面含有 PSCA 蛋白的 DU145 细胞之间的反应,该试验以 CHO 细胞、人黑色素瘤细胞 A375 作为阴性对照。

#### 1.6 特异导向肽与荧光蛋白的融合

将特异导向肽与增强型荧光蛋白(EGFP)表达,以确定该肽的特异导向性。为了基因融合,共合成 4 条引物,分别为:引物 P1 位于噬菌体表达 12 肽上游的信号肽位置,序列为 5' CAG AAT TCT AAG AAG GAG ATA TAC ATA TGA AAA AAT TAT TAT CAC A 3';引物 P2 位于 12 肽下游的连接子部位,含有 GGGs 连接子与 EGFP 蛋白的 N 端,序列为 5' TTG CTC ACC ATC GAA CCT CCA CC 3';P3 引物与 P2 引物反向互补,序列为 5' GGT GGA GGT TCG ATG GTG AGC AA 3';P4 引物位于 EGFP 蛋白的 C 端,另加有 6 个 HIS 序列,以便于纯化,序列为 5' GCT AAG CTT

AGT GAT GGT GAT GGT GAT GCT TCT ACA GCT CGT CCA 3'。

获得该融合基因后,插入到 pQE30 载体中进行表达。获得的重组蛋白命名为 11-EGFP,诱导、纯化方式如上。

#### 1.7 11-EGFP 蛋白与 tPSCA 蛋白的结合

利用 ELISA 和竞争抑制试验验证 11-EGFP 与 tPSCA 的结合。

在 ELISA 中,包被 11-EGFP 蛋白于酶联板,封闭后,加入 tPSCA 蛋白,然后加入抗-PSCA 单抗,之后再加入羊抗鼠 HRP 二抗,每步之间加入 PBST 洗涤,显色。同时以 EGFP 蛋白作为阴性对照。

在竞争抑制试验中,包被纯化的 tPSCA 蛋白,终浓度为 20μg/mL,封闭后,加入对倍稀释的阳性噬菌体上清,同时加入一系列稀释度的 11-EGFP 蛋白,分别为 100μg/mL、50μg/mL、20μg/mL、10μg/mL、5μg/mL、0,37℃ 反应 1h;倾去噬菌体,PBST 洗板后加入 HRP 标记的羊抗 M13 抗体,37℃ 孵育 1h;显色。同时以 100μg/mL EGFP 蛋白作为对照。

#### 1.8 11-EGFP 蛋白与 DU145 细胞的结合

使用流式细胞仪鉴定 11-EGFP 蛋白与 DU145 细胞的结合。将 11-EGFP 蛋白与 DU145 细胞共孵育,同时将 EGFP 蛋白与 DU145 细胞共孵育,洗涤之后,使用流式细胞仪鉴定这两个荧光蛋白与 DU145 细胞的结合。

## 2 结果

#### 2.1 PSCA 基因的克隆

从 DU145 细胞获取的总 mRNA 中,经过 cDNA 合成、PCR 扩增,克隆到了全长为 372bp 的 PSCA 基因,经过与 GenBank 数据库中人 PSCA 序列比较,发现核苷酸序列完全相同,证实我们所克隆的基因确为人 PSCA 基因,见图 1A。

#### 2.2 PSCA 基因的表达

利用 DNASTar 软件分析 PSCA 蛋白的性质,在其 N 端有一疏水性的信号肽,C 末端也为强疏水序列。为了便于其在原核系统中的表达,将 N 端与 C 端的疏水部分去掉,截取该蛋白的氨基酸 29~100 进行表达,共 72 个氨基酸。载体的构建及鉴定见图 1B。

tPSCA 蛋白的表达见图 2。在 SDS-PAGE 电泳中,经 IPTG 诱导后,在 14kD 分子量处出现明显的带,同时在 28kD 分子量处,也有新蛋白的明显增加,正好为新增小蛋白分子量的 2 倍,预计为双体结构。该蛋白内部确实存在保守的半胱氨酸残基,可以通过二硫键形成双体。重组蛋白以包涵体和可溶形式

两种状态存在。可溶蛋白经过 Ni-NTA 柱纯化后,只有 14kD 的蛋白被纯化出来。

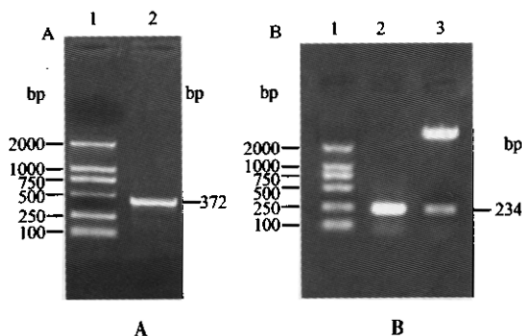


图 1 PSCA 基因的克隆(A)及 pQE-tPSCA 质粒酶切鉴定(B)

Fig.1 Clone of PSCA gene and confirmation of recombinant plasmid

pQE-tPSCA by restriction endonuclease *Hind*III digestion

A: 1:DL2000 DNA marker;2:PSCA gene amplified by RT-PCR.

B: 1:DL2000 DNA marker;2:the tPSCA gene amplified by PCR;3:pQE-tPSCA + *Hind*III

利用市售抗 PSCA 单抗进行 ELISA 和 Western blot,结果证明我们所表达的 tPSCA 重组蛋白能与抗 PSCA 单抗特异反应(见图 2),该蛋白确为 PSCA 蛋白的一部分。

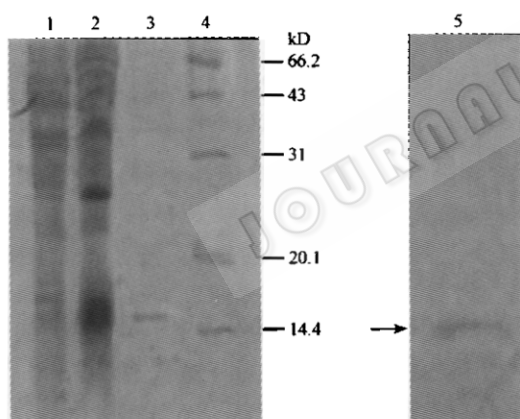


图 2 tPSCA 在 *E. coli* M15 中的表达、纯化及 Western blot 结果(18% SDS-PAGE)

Fig.2 Expression and purification of tPSCA in *E. coli* M15 and

Western blot for tPSCA using Anti-PSCA Mab

1: non-induced *E. coli* M15(pQE-tPSCA) cells lysate;

2: the *E. coli* M15(pQE-tPSCA) cells lysate after induction;

3: the purified tPSCA protein;

4: molecular weight standard of proteins;

5: Western blot for purified tPSCA with anti-PSCA Mab

### 2.3 PSCA 特异结合肽的筛选

3 轮淘洗中,每轮加入  $4 \times 10^9$  噬菌体,随着淘洗次数的增加,洗脱的噬菌体也随之增加,第 3 轮洗脱数比第一轮高出近 100 倍,说明在洗脱过程中出现了显著的富集效应。

第 3 轮淘洗后的噬菌体感染细菌后,随机挑取 20 个噬菌斑,制备原种。包被纯化的 tPSCA 蛋白,加入噬菌体原种,以 HRP-抗 M13 噬菌体单抗为二抗,进行 ELISA 检测,最终确定 7 个阳性克隆。

为了确定含有 12 肽的噬菌体与细胞表面含有 PSCA 蛋白的 DU145 细胞的结合,将 DU145 细胞培养到一定数目后,富集,经超声波破碎,包被酶联板,以 CHO 细胞、人黑色素瘤细胞 A375 作为阴性对照,加入上面确定的 7 个噬菌体原种,确定有 3 个噬菌体原种可与破碎的 DU145 细胞反应,而不与对照细胞发生反应,将这 3 个噬菌体携带的 12 肽进行测序。

### 2.4 特异结合肽功能鉴定

为了确认通过筛选噬菌体 12 肽库获得的 12 肽与 PSCA 蛋白的结合作用,挑选其中反应最好(ELISA 值最高)的一个肽与增强型荧光蛋白(EGFP)进行融合表达,12 肽的序列为 HTIRYDWHFTAR。为了保持两个蛋白的相对独立性,融合后的 12 肽以 GGGS 连接子与 EGFP 相连,重组融合蛋白命名为 11-EGFP。蛋白的 N 端有信号肽序列,可分泌表达至周质腔内,C 端带有 6 个 HIS 结构,易于纯化。11-EGFP 的表达、纯化见图 3。

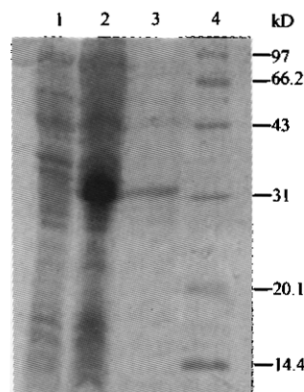


图 3 11-EGFP 蛋白的表达、纯化(12% SDS-PAGE 电泳)

Fig.3 Expression and purification of 11-EGFP protein

(12% SDS-PAGE electrophoresis)

1: non-induced *E. coli* M15(11-EGFP) cells lysate;

2: the *E. coli* M15 (11-EGFP) cells lysate after induction;

3: the purified 11-EGFP protein;

4: molecular weight standard of proteins

在得到纯化的 11-EGFP 重组蛋白之后,通过三种方式对其与 PSCA 蛋白的结合进行了确认。

在 ELISA 中,包被 11-EGFP,依次加入 tPSCA 蛋白,抗-PSCA 鼠单抗,HRP 标记羊抗鼠二抗,同时包被 EGFP 蛋白作为对照,结果显示 11-EGFP 蛋白与 tPSCA 蛋白有很好的结合。

在竞争抑制试验中,结果表明 11-EGFP 蛋白能

与含有该肽的噬菌体竞争与 tPSCA 蛋白结合,竞争抑制率达到 50% 以上(图 4)。而作为对照的 EGFP 蛋白没有竞争抑制作用。

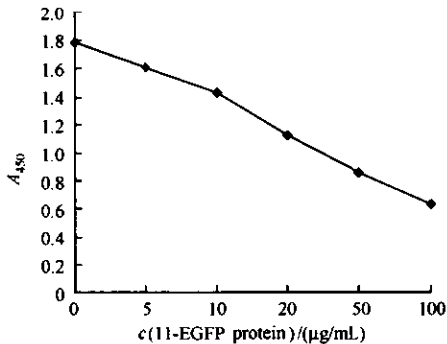


图 4 11-EGFP 蛋白对含有该 12 肽的噬菌体与 tPSCA 蛋白结合的竞争抑制试验

Fig.4 Competitive inhibition experiment for 11-EGFP's binding with tPSCA versus the 12-amino-acid peptide displayed by phage

为了验证 11-EGFP 蛋白与表面含有 PSCA 蛋白的 DU145 细胞的结合,将 11-EGFP 蛋白与 DU145 细胞孵育,同时将 EGFP 蛋白与 DU145 细胞孵育作为对照,通过流式细胞仪检测该蛋白是否与 DU145 细胞结合。由图 5 可看出,与 EGFP 蛋白相比,11-EGFP 蛋白与 DU145 细胞的结合明显增加,说明 11-EGFP 蛋白能与 DU145 细胞结合。

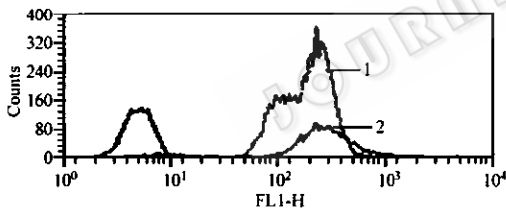


图 5 流式细胞仪检测 11-EGFP 蛋白与 DU145 细胞的结合

Fig.5 Detection of 11-EGFP protein's binding with DU145 cells using flow cytometry

Plot 1 11-EGFP protein was incubated with DU145 cells; Plot 2 EGFP protein was incubated with DU145 cells

### 3 讨论

自 1998 年发现 PSCA 蛋白以来,已对它进行了很多的研究报道。PSCA 蛋白含有相当数量的 Thy-1/Ly-6 基因家族特征性的高度保守半胱氨酸残基、N 末端信号序列、C 末端 GPI 锚定序列及多个 N-糖基化位点。PSCA 的生理功能目前尚不清楚,推测可能与 SCA-2 功能相似。研究表明 PSCA 具有很高的前列腺组织特异性,正常的 PSCA mRNA 仅在前列腺上皮基底细胞的一个亚群表达,但在前列腺癌中有高表达。进一步研究发现,PSCA 在胎盘、肾、小肠内有

低水平表达,但其表达水平不足正常前列腺的 1%<sup>[4,5,6]</sup>。

免疫治疗对于前列腺癌的治疗来说也是一个新希望。由于 PSCA 具有很高的前列腺组织特异性,抗原锚定在细胞表面而不呈分泌形式表达,并且几乎在所有的前列腺癌中高表达,因此很可能成为前列腺癌主动性免疫治疗及靶向治疗的理想抗原。Saffran<sup>[7]</sup>等报道 PSCA 鼠单抗在动物模型中有抑制肿瘤生长及转移的作用。通常小分子抗体结合其它细胞因子或毒素作为靶向治疗的常用手段,在本研究中,我们试图用与 PSCA 蛋白特异结合的小肽起到同样作用。

在本篇文章中,我们克隆了 PSCA 基因,表达了截断型 PSCA 蛋白,截断型 PSCA 蛋白的表达主要是为了将其部分疏水区去掉,以便于在大肠杆菌中获得可溶性表达。用此蛋白筛选噬菌体 12 肽展示文库,获得了与截断型 PSCA 蛋白特异结合的 12 肽,将此蛋白与 EGFP 蛋白耦联表达,去进一步验证该肽的特异结合性。在此部分,我们通过 ELISA、竞争抑制试验、流式细胞仪检测说明了该肽能够与 PSCA 蛋白特异结合。下一步的工作,我们将把这个 12 肽与某种细胞因子或毒素相连接,研究针对前列腺癌细胞的靶向免疫治疗。

### REFERENCES(参考文献)

- [1] Reiter RE, Gu Z, Watabe T *et al.* Prostate stem cell antigen: A cell surface marker overexpressed in prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**:1735 - 1740
- [2] Dannull J, Diener PA, Priker L *et al.* Prostate stem cell antigen is a promising candidate for immunotherapy of advanced prostate cancer. *Cancer Res*, 2000, **60**:5522 - 5528
- [3] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2<sup>nd</sup> ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [4] Gu Z, Thomas G, Yamashiro J *et al.* Prostate stem cell antigen (PSCA) expression increases with high gleason score, advanced stage and bone metastasis in prostate cancer. *Oncogene*, 2000, **19**:1288 - 1296
- [5] Amara N, Palapattu GS, Schrage M *et al.* Prostate stem cell antigen is overexpressed in human transitional cell carcinoma. *Cancer Res*, 2001, **61**:4660 - 4665
- [6] Hara N, Kasahara T, Kawasaki T *et al.* Reverse transcription-polymerase chain reaction detection of prostate-specific antigen, prostate-specific membrane antigen, and prostate stem cell antigen in one milliliter of peripheral blood: Value for the staging of prostate cancer. *Clin Cancer Res*, 2002, **8**:1794 - 1799
- [7] Saffran DC, Taitano AB, Hubert RS *et al.* Anti-PSCA mAbs inhibit tumor growth and metastasis formation and prolong the survival of mice bearing human prostate cancer xenografts. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**: 2658 - 2663

## Expression of Prostate Stem Cell Antigen (PSCA) and Selection of its Specific Binding Peptide

HOU Li-Hua DU Yong ZHANG Xiao-Peng AN Xiao-Ping CHEN Wei\*

(Beijing Institute of Microbiology and Epidemiology, Beijing 100071, China)

**Abstract** Prostate stem cell antigen (PSCA), a homologue of the Ly-6/Thy-1 family of cell surface antigen, is expressed by a majority of human prostate cancers and is a promising target for prostate cancer immunotherapy. To obtain the specific peptide binding with PSCA for targeted immunotherapy, PSCA gene was obtained by RT-PCR from human prostate cancer cell line DU145 and the transcribed PSCA (tPSCA) gene was cloned into vector pQE30 for soluble expression in *E. coli*. The identity of recombinant tPSCA was confirmed through ELISA and western blot by use of anti-PSCA monoclonal antibody. Then the 12-peptide phage display library was screened with the purified tPSCA protein for its specific binding peptide through 3 rounds panning. For identifying the peptide's specificity, the peptide was coupled with EGFP (enhanced green fluorescent protein) by recombinant DNA technology and the recombinant coupled protein was termed 11-EGFP. The binding specificity with tPSCA of 11-EGFP was further confirmed by ELISA and competitive inhibition experiment. Flow cytometry demonstrated its binding specificity with cell line DU145. In conclusion, a 12-amino-acid peptide which could bind with PSCA specifically was found and it may be a potential tool for targeted immunotherapy of prostate carcinoma.

**Key words** prostate stem cell antigen (PSCA), binding peptide, expression

Received: 02-09-2004

\* Corresponding author. Tel: 86-10-66948563; Fax: 86-10-63869835; E-mail: chenwei@im.ac.cn 微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>