

基础研究

小鼠前列腺干细胞抗原的原核表达、纯化及抗原活性检测

董金凯^{1,2}, 罗津³, 阎瑾琦², 张亮², 高江平¹, 于继云²¹中国人民解放军总医院泌尿外科, 北京 100853; ²军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850; ³湖南省永州市人民医院, 湖南 永州 425000

摘要:目的 RT-PCR扩增小鼠前列腺干细胞抗原(mPSCA)基因,构建原核表达质粒pET-42a-mPSCA,诱导mPSCA蛋白表达并纯化,并检测mPSCA蛋白的抗原活性。方法 利用RT-PCR的方法从小鼠前列腺癌细胞系RM-1细胞中扩增mPSCA基因,测序正确后PCR的方法去掉mPSCA的信号肽序列将其克隆至原核表达载体pET-42a中构建重组载体pET-42a-mPSCA。将其转化至大肠杆菌BL21(DE3)中诱导表达,随后将表达的融合蛋白进行纯化。经SDS-PAGE分析后,Western blot检测纯化的蛋白,将纯化蛋白进一步包板后用ELISA法对其抗原活性进行评价。结果 测序结果证实成功扩增出全长mPSCA基因;酶切和测序结果证实pET-42a-mPSCA原核表达载体构建成功;转化后可以成功诱导并纯化出大小与预期一致的蛋白;Western blot检测证实纯化的蛋白能与特异性的抗体发生反应;ELISA检测显示纯化后的mPSCA抗原具有免疫原性。结论 成功扩增出小鼠全长PSCA基因,成功构建了mPSCA基因的原核表达载体,获得了纯化的mPSCA蛋白,该蛋白具有良好的抗原活性,为进一步研究以PSCA为靶点的前列腺癌的免疫治疗奠定了基础。

关键词:前列腺干细胞抗原;原核表达;蛋白纯化;前列腺癌

中图分类号:R31 文献标志码:A 文章编号:1673-4254(2012)04-0502-05

doi: 10.3969/j.issn.1673-4254.2012.04.013 http://www.cnki.net/kcms/detail/44.1627.R.20120405.1650.002.html

Prokaryotic expression, purification and antigenicity identification of mouse prostate stem cell antigen

DONG Jinkai^{1,2}, LUO Jin³, YAN Jinqi², Zhang Liang², GAO Jiangping¹, YU Jiyun²¹Department of Urology, General Hospital of PLA, Beijing 100853, China; ²Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China; ³Department of Urology, Yongzhou People's Hospital, Yongzhou 425000, China

Abstract: Objective To amplify mouse prostate stem cell antigen (mPSCA) gene and construct a recombinant plasmid to obtain mPSCA protein and identify its antigenicity. **Methods** The gene of mPSCA was amplified by RT-PCR from mouse prostate cancer cell line RM-1 with the signal peptide sequence removed. The PCR product was cloned into pET-42a prokaryotic expression vector to construct the recombinant plasmid pET-42a-mPSCA, which was transformed into BL21 (DE3) for mPSCA expression. The fusion protein was purified and identified by SDS-PAGE and Western blotting. The antigenicity of the purified protein was characterized by ELISA. **Results** The mPSCA gene was obtained with an identical sequence to that retrieved in GenBank. The prokaryotic expression vector for mPSCA was successfully constructed as confirmed by enzyme digestion and DNA sequencing. Both Western blotting and ELISA demonstrated the antigenicity of the purified mPSCA protein. **Conclusion** The purified mPSCA obtained possesses good antigenicity, which will facilitate further study of immunotherapy for prostate cancer targeting PSCA.

Key words: prostate stem cell antigen; prokaryotic expression; protein purification

前列腺干细胞抗原(PSCA)是1998年Reiter等^[1]在研究前列腺癌基因表达的过程中发现的一个肿瘤相关抗原,属于Ly-6/Thy-1家族,是具有123个氨基酸的糖蛋白。因为PSCA与干细胞抗原-2(SCA-2)具有30%的

收稿日期:2012-02-07

基金项目:国家自然科学基金(30840094);国家高技术研究发展计划(863)项目(2007AA02Z451)

Supported by National Natural Science Foundation of China (30840094) and National High Technology Research and Development Program of China (2007AA02Z451).

作者简介:董金凯,博士, E-mail: jk_dong@163.com

通讯作者:于继云,副研究员,电话:010-66932316, E-mail: yujiyun@126.com

同源性,因而被称为前列腺“干细胞抗原”,但是目前的研究表明,PSCA主要表达于分化成熟的细胞表面而不是干细胞表面^[2-3],其具体的功能还不清楚。PSCA在前列腺癌、膀胱癌以及胰腺癌中表达增加,并且发现其表达水平与前列腺癌的临床分期及转移密切相关,因此PSCA已经成为这些肿瘤的诊断和预后判断的生物学标记。除此之外PSCA也成为这些肿瘤的免疫治疗靶点,特别是在前列腺癌的免疫治疗中显示出很大的临床应用潜力^[4]。在PSCA为靶点的前列腺癌免疫治疗的临床前研究中,多采用小鼠或转基因小鼠前列腺癌模型进行临床前评价。为进一步探讨PSCA在前列腺癌免疫

治疗中的效果及其相关机制,本研究钓取了mPSCA全长基因,构建了mPSCA蛋白的原核表达载体,纯化得到了mPSCA蛋白并对其免疫原性进行了相关的检测,为下一步PSCA在前列腺癌免疫治疗临床前的研究奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

质粒pET-42a、感受态大肠杆菌*E.coli*. DH5 α 和*E.coli*. BL21(DE3)为本实验室保存;小鼠前列腺癌细胞系RM-1购自上海细胞库;T₄ DNA连接酶为TaKaRa产品;DNA限制性内切酶*Sal* I、*Bam*H I购自New England Biolabs;所用PCR引物均由Invitrogen合成;DNA片段纯化试剂盒、DNA片段凝胶回收试剂盒、质粒小量提取试剂盒均购自北京三博远志生物技术有限公司;Trizol为Invitrogen产品;逆转录试剂盒购自东洋纺生物科技有限公司;兔抗鼠PSCA多克隆抗体购自Santa Cruz;兔抗小鼠IgG抗体和HRP标记的山羊抗兔IgG的抗体购自中杉金桥公司;Western blot超敏发光液购自普利莱公司;IPTG购自Promega;凝血酶Thrombin购自Sigma;标准相对分子质量蛋白Marker购自经科宏达生物公司;谷胱甘肽琼脂糖凝胶Glutathione SepharoseTM4B纯化试剂购自GE Healthcare。

1.2 方法

1.2.1 mPSCA基因的扩增 根据小鼠PSCA的cDNA序列(序列号:NM_028216)设计引物,用于扩增PSCA全长基因:上游引物为F: 5'ACCATGAAGACCGTCTTCTTTC3';下游引物为R: 5'TCTCCCAGAGCCTACAGAC3'。用Trizol一步法提取小鼠前列腺癌细胞系RM-1细胞的总mRNA,按照东洋纺公司逆转录试剂盒说明书进行逆转录为cDNA,以其为模板进行PCR扩增。PCR反应条件为:94℃预变性5 min,94℃ 30 s、58℃ 30 s、72℃ 30 s进行30个循环,72℃延伸5 min。取反应产物50 μ l琼脂糖凝胶电泳,胶回收纯化PCR产物。将PCR产物连入pMD18-T载体,连接产物转化入大肠杆菌*E.coli*. DH5 α ,挑取阳性克隆,提取质粒,测序比对正确的质粒命名为pMD18-T-mPSCA。

1.2.2 mPSCA原核表达载体的构建及鉴定 在mPSCA原序列基础上,运用PCR方法进行改造,去掉mPSCA基因序列中的信号肽序列,引物设计如下:上游引物F: 5'GCGGATCCCTGCAGTGCTATTCATG3';下游引物R: 5'GCGTCGACTCTCCCAGAGCCTACAGAC3'。在mPSCA基因上下游分别引入*Bam*H I和*Sal* I两个酶切位点,以pMD18-T-mPSCA质粒为模板,PCR反应条件为:94℃预变性5 min,94℃ 30 s、58℃ 30 s、72℃

30 s进行30个循环,最后72℃延伸5 min。取反应产物50 μ l琼脂糖凝胶电泳,胶回收纯化PCR产物。将PCR产物连入T载体,连接产物转化入大肠杆菌*E.coli*. DH5 α ,挑取阳性克隆,提取质粒,送英骏生物技术公司测序。测序正确的质粒和pET-42a载体分别用*Bam*H I和*Sal* I双酶切,T₄连接酶连接,连接产物转化感受态菌*E. coli*. DH5 α ,卡那霉素平板筛选阳性克隆,提取阳性克隆质粒,用*Bam*H I和*Sal* I双酶切及PCR鉴定,鉴定正确的质粒送测序,测序正确的质粒命名为pET-42a-mPSCA。

1.2.3 mPSCA蛋白的诱导表达 将重组表达质粒pET-42a-mPSCA转化至感受态菌*E.coli*. BL21 (DE3)中,挑取阳性克隆,37℃培养过夜,同时转化pET-42a空载体作为对照。将50 μ l菌液接种于5 ml Kana抗性LB培养基中,37℃振荡培养至D₆₀₀≈0.6。取出1 ml未诱导的菌液做为对照,其余液体加入IPTG至终浓度0.25 mmol/L,30℃继续培养。在诱导4 h后取1 ml菌液放到离心管中,4℃,12 000 r/min离心1 min,弃上清,加入1 \times SDS上样缓冲液100 μ l,100℃加热5 min,行SDS-PAGE检测,鉴定融合蛋白的诱导表达。同时以含有GST标签蛋白的pET-42a空载体转化并进行诱导表达作为对照。

1.2.4 GST-mPSCA蛋白的纯化 对含重组质粒pET-42a-mPSCA的*E.coli*. BL21(DE3)菌落进行大量扩增,37℃培养至菌液D₆₀₀≈0.6时,加入IPTG终浓度为0.25 mmol/L诱导30℃培养4 h。4℃,8000 r/min离心5 min离心收集菌体,采用预冷的裂解缓冲液重悬菌体,进行超声波碎菌,随后4℃,12 000 r/min离心30 min收集上清液进行纯化,具体纯化操作参照GE Healthcare生物公司的Glutathione SepharoseTM4B纯化试剂说明书进行,将得到的蛋白样品测浓度后分装保存于-70℃冰箱备用。取部分样品用1 \times SDS上样缓冲液处理后进行12%的SDS-PAGE分析。

1.2.5 GST-mPSCA融合蛋白的Western blot检测 融合蛋白GST-mPSCA经12% SDS-PAGE分离后电转移至PVDF膜,室温封闭2 h,1:200稀释兔抗小鼠PSCA多抗体(Santa Cruz)孵育过夜,TBST洗膜3次,10 min/次,最后加入1:2000稀释的HRP标记的羊抗兔IgG抗体,37℃孵育1 h,TBST洗膜3次,10 min/次,显影。未诱导的转化pET42a-mPSCA质粒的菌液总蛋白按相同步骤操作,设为对照。

1.2.6 ELISA检测 纯化的GST-mPSCA蛋白用凝血酶室温过夜切割纯化回收后,用包被液将纯化后的mPSCA蛋白稀释至2 μ g/ml,100 μ l包被96孔ELISA酶标板4℃过夜,PBST洗板3次,1 min/次,1% BSA 37℃封闭1 h;PBST洗板3次,1 min/次,各孔分别加入按照1:100、1:200、1:400、1:800、1:1600、1:3200稀释

兔抗小鼠PSCA多克隆抗体100 μl,并以同型无关抗体兔抗小鼠IgG抗体作阴性对照,以PBS为空白对照,每个浓度设立3个副孔,37℃孵育1h;PBST洗板3次,1min/次,加入1:2000稀释的HRP标记的羊抗兔IgG 50 μl,37℃孵育1h;PBST洗板3次,TMB底物显色后,以2 mol/L H₂SO₄终止,D_{450nm}测定吸光度值。

2 结果

2.1 mPSCA基因的扩增及序列测定

经1%琼脂糖凝胶电泳分析,以小鼠前列腺癌细胞系RM-1的cDNA为模板的PCR反应,成功扩增出大小约为380 bp的条带,与预期的片段长度一致(图1)。连接入过度载体pMD18-T后测序证实与GenBank中公布的序列一致(序列号:NM_028216)。

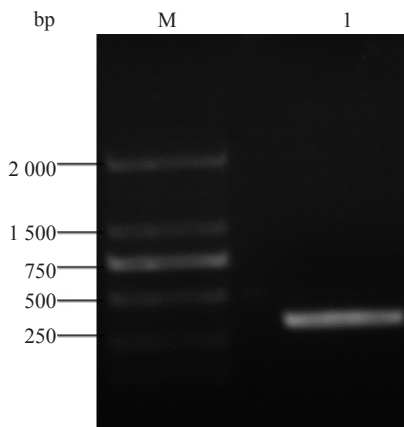


图1 RT-PCR扩增mPSCA基因产物琼脂糖电泳图

M: DNA Marker (DL2000); 1: mPSCA 基因 RT-PCR扩增产物
Fig.1 Agarose gel electrophoresis of the RT-PCR product of mPSCA gene.

2.2 pET-42a-mPSCA 重组质粒的鉴定

PCR的方法去除mPSCA基因的信号肽序列后接入pET-42a载体构建重组质粒pET-42a-mPSCA。该重组质粒用BamH I和Sal I双酶切鉴定,可以获得大小约为320 bp的基因片段(图2)。同时以该质粒为模板和去除信号肽序列时的引物进行PCR扩增可以获得大小约为320 bp片段(图2)。鉴定正确的质粒,送测序,将测序正确的重组质粒命名为pET-42a-mPSCA并保存。

2.3 GST-mPSCA 蛋白的诱导表达及纯化的 SDS-PAGE 分析

在预试验中通过对IPTG的浓度,诱导的温度和时间进行了一系列的优化,最终确定诱导的条件为:IPTG终浓度为0.25 mmol/L,30℃诱导4h时,GST-mPSCA蛋白的可溶性表达最好。纯化后的融合蛋白

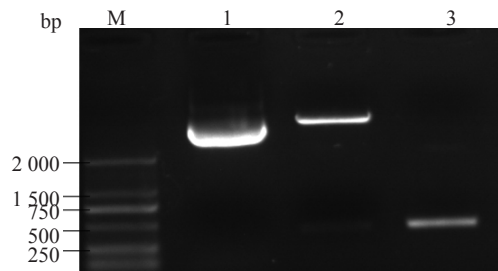


图2 重组质粒pET-42a-mPSCA酶切鉴定及PCR鉴定电泳图

M: DNA Marker(DL2000); 1: 重组质粒pET-42a-mPSCA; 2: 重组质粒BamH I, Sal I 双酶切鉴定; 3: 去信号肽后mPSCA基因PCR鉴定

Fig.2 Identification of the recombinant plasmid pET-42a-mPSCA by enzyme digestion and PCR.

GST-mPSCA经SDS-PAGE分析,可见一清晰的相对分子质量大小约为40 000的条带(箭头所指)与预期的蛋白大小相符(图3)。pET-42a空载体可见诱导的GST蛋白的表达(箭头所指)。

2.4 GST-mPSCA 蛋白的 Western blot 检测

GST-mPSCA蛋白应用特异性的抗小鼠PSCA的抗体可以检测到相对分子质量与预期的片段大小一致的特异性条带(图4),可见纯化后的融合蛋白具有与特异性抗体结合的能力。

2.5 间接ELISA法鉴定mPSCA蛋白的抗原性

以切割纯化后的mPSCA蛋白包被酶标板,用不同稀释倍数的兔抗mPSCA抗体对包被蛋白进行ELISA检测,以同型无关抗体兔抗鼠IgG作阴性对照,每个稀释度做3个复孔,所有数据用均数±标准差表示,结果如表1所示。

将表1数据以抗体浓度为横坐标(x),以D_{450nm}值为纵坐标(y)绘制曲线见图5,线性回归方程为y=0.607x+0.177,相关系数R²=0.979。由于R²>0.9,可判定为y与x之间为高度线性相关。由图中可以看出纯化后的mPSCA抗原具有较高的灵敏性及特异性。

3 讨论

前列腺癌是西方国家人群最常见的恶性肿瘤之一,在我国的发病率也呈上升趋势。目前对于发展到雄激素非依赖期以后的前列腺癌的治疗尚缺乏特别有效的手段。因此,免疫治疗作为一种通过激活机体免疫系统特异性清除肿瘤细胞的新方法,也正逐步应用到前列腺癌的治疗中。2010年美国FDA已经批准以PAP-GM-CSF融合蛋白致敏的自体抗原递呈细胞(APC)疫苗“Sipuleucel-T”^[5]上市用于治疗雄激素难治性的转移性前列腺癌,开创了前列腺癌免疫治疗的新时代。

PSCA是一种发现相对较晚的前列腺癌相关抗原,在前列腺癌细胞中表达显著增加,组织特异性相对较好

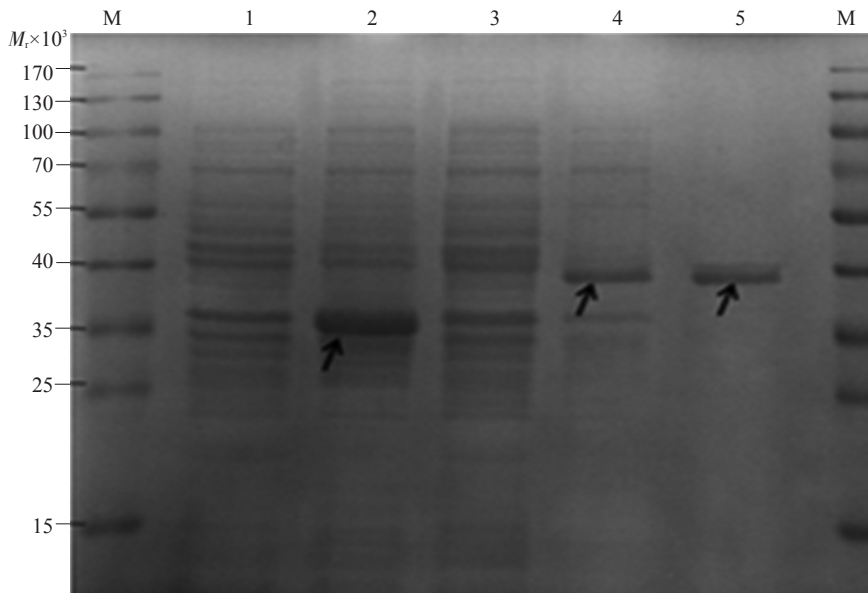


图3 GST-mPSCA 融合蛋白的诱导表达及其纯化产物的SDS-PAGE分析

M: 蛋白预染Marker; 1: pET-42a空载体未诱导; 2: pET-42a空载体诱导; 3: pET-42a-mPSCA未诱导; 4: pET-42a-mPSCA诱导; 5: 纯化后的GST-mPSCA蛋白

Fig.3 SDS-PAGE analysis of expressed and purified products of GST-mPSCA fusion protein.

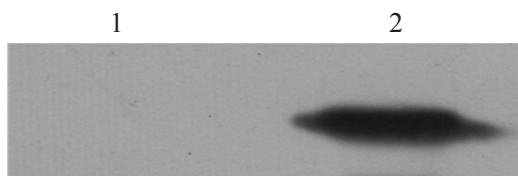


图4 GST-mPSCA 融合蛋白的Western blot 鉴定

1: 阴性对照(未诱导的菌液蛋白); 2: GST-PSCA融合蛋白

Fig.4 Identification of GST-PSCA fusion protein by Western blotting.

表1 mPSCA 抗原包被的检测结果

Tab.1 Results of ELISA with mPSCA as the coating antigen

抗体稀释倍数	抗体浓度(ng/μl)	D _{450 nm}	
		兔抗鼠mPSCA	兔抗鼠IgG
1:100	2	1.341±0.186	0.083±0.011
1:200	1	0.853±0.134	0.080±0.006
1:400	0.5	0.562±0.140	0.079±0.011
1:800	0.25	0.349±0.093	0.073±0.007
1:1600	0.125	0.203±0.065	0.061±0.009
1:3200	0.0625	0.148±0.044	-
空白对照	0	0.052±0.007	0.053±0.004

且不易引起免疫耐受,成为前列腺癌免疫治疗的良好靶点^[6]。目前以PSCA抗原肽致敏的DC细胞疫苗已经在晚期抗前列腺癌患者中进行了I-II期临床试验^[7-8],与对照组相比可以延长患者的中位生存时间达14个月,患者体内可以检测到迟发性超敏反应从而说明该

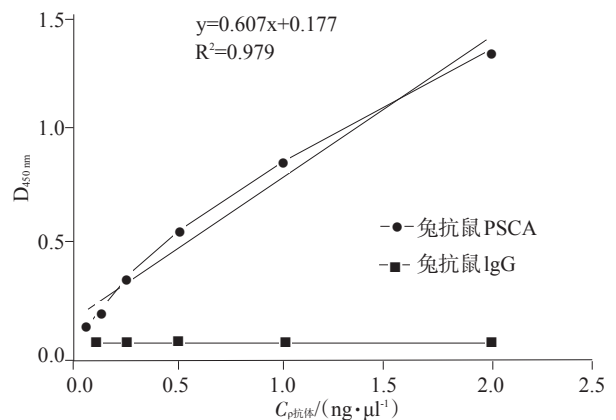


图5 D_{450 nm}随抗体浓度变化的曲线

Fig.5 Curve of D_{450 nm} for different antibody concentrations.

DC疫苗可以激活机体产生抗原特异性的肿瘤免疫反应。以PSCA为靶点的前列腺癌免疫治疗的其他形式的疫苗也已经进行了临床前的评价。编码鼠PSCA基因的DNA疫苗进行的临床前评价证实,疫苗能够诱导产生PSCA特异性的CD8⁺T细胞免疫反应,可以抑制小鼠体内前列腺癌移植瘤的生长,延缓前列腺癌转基因小鼠的肿瘤发展,并对疫苗发挥作用的可能机理进行了初步的探讨^[9-11]。另外的研究发现PSCA抗体与T细胞受体β链融合后修饰的T细胞可以特异性地杀伤PSCA阳性的肿瘤细胞^[12]。本实验室前期已经成功表达并纯化出人PSCA蛋白^[13],但是目前以PSCA为靶点的免疫治疗的临床前评价中大多采用小鼠或转基因小鼠前列腺癌模型进行评价,因此钓取小鼠全长PSCA基因并纯

化小鼠PSCA蛋白对研究PSCA为靶点的免疫治疗的临床前研究具有重要作用,在后续的免疫治疗实验中可以用于评价血清中PSCA抗体水平、致敏DC、制备单克隆抗体以及用于PSCA为靶点的免疫治疗的机制研究。

本研究中我们应用RT-PCR的方法成功扩增出小鼠全长PSCA基因,为下一步构建以PSCA为靶点的DNA疫苗奠定了基础。同时我们将去除信号肽的mPSCA基因构建到原核表达载体pET-42a中并在大肠杆菌BL21中诱导表达,在实验中对mPSCA蛋白的表达条件进行了优化,确定了IPTG的浓度、诱导温度、诱导时间的最佳条件从而降低重组蛋白的合成速度,实现GST-mPSCA融合蛋白在大肠杆菌中高效、可溶性表达及纯化。对纯化后的蛋白进行了Western blot检测,证实纯化后的mPSCA蛋白能与特异性抗体发生反应,同时对纯化后蛋白进行ELISA检测,结果证实该蛋白具有良好的抗原性,且其 $D_{450\text{nm}}$ 值与抗体浓度变化呈高度线性相关,为下一步以PSCA为靶点的前列腺癌免疫治疗的临床前评价中抗体水平的检测提供了理想抗原。总之,mPSCA基因的扩增以及mPSCA蛋白的纯化为下一步以PSCA为靶点的DNA疫苗的构建以及动物体内免疫学评价研究奠定了坚实的基础。

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[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(4): 1735-40.
- [2] Tran CP, Lin C, Yamashiro J, et al. Prostate stem cell antigen is a marker of late intermediate prostate epithelial cells[J]. Mol Cancer Res, 2002, 1(2): 113-21.
- [3] Sakamoto H, Yoshimura K, Saeki N, et al. Genetic variation in PSCA is associated with susceptibility to diffuse-type gastric cancer [J]. Nat Genet, 2008, 40(6): 730-40.
- [4] Saeki N, Gu J, Yoshida T, et al. Prostate stem cell antigen: a Jekyll and Hyde molecule [J]? Clin Cancer Res, 2010, 16(14): 3533-8.
- [5] Hall SJ, Klotz L, Pantuck AJ, et al. Integrated safety data from 4 randomized, double-blind, controlled trials of autologous cellular immunotherapy with sipuleucel-T in patients with prostate Cancer [J]. J Urol, 2011, 186(3): 877-81.
- [6] 韩刚,于继云,高江平.以PSCA为靶点的前列腺癌免疫治疗的研究进展[J].军医进修学院学报,2009,30(2): 225-6.
- [7] Fuessel S, Meye A, Schmitz M, et al. Vaccination of hormone-refractory prostate cancer patients with peptide cocktail-loaded dendritic cells: results of a phase I clinical trial[J]. Prostate, 2006, 66(8): 811-21.
- [8] Waeckerle-Men Y, Uetz-von Allmen E, Fopp M, et al. Dendritic cell-based multi-epitope immunotherapy of hormone-refractory prostate carcinoma[J]. Cancer Immunol Immunother, 2006, 55(12): 1524-33.
- [9] Zhang X, Yu C, Zhao J, et al. Vaccination with a DNA vaccine based on human PSCA and HSP70 adjuvant enhances the antigen-specific CD8+ T-cell response and inhibits the PSCA + tumors growth in mice[J]. J Gene Med, 2007, 9(8): 715-26.
- [10] Garcia-Hernandez Mde L, Gray A, Hubby B, et al. Prostate stem cell antigen vaccination induces a long-term protective immune response against prostate cancer in the absence of autoimmunity[J]. Cancer Res, 2008, 68(3): 861-9.
- [10] Ahmad S, Casey G, Sweeney P, et al. Prostate stem cell antigen DNA vaccination breaks tolerance to self-antigen and inhibits prostate cancer growth[J]. Mol Ther, 2009, 17(6): 1101-8.
- [12] Morgenroth A, Cartellieri M, Schmitz M, et al. Targeting of tumor cells expressing the prostate stem cell antigen (PSCA) using genetically engineered T-cells[J]. Prostate, 2007, 67(10): 1121-31.
- [13] 任杰,高江平,阎瑾琦,等.人前列腺干细胞抗原的原核表达、纯化及鉴定[J].解放军医学杂志,2010,35(8): 986-8.

(编辑:陈望忠)