

人 GM- CSF 基因真核表达载体构建与表达

卢燕茹, 江振友

(暨南大学医学院微生物学与免疫学教研室, 广东 广州 510632)

摘要: 【目的】构建以基因佐剂hGM- CSF 基因为基础的真核表达质粒 pIGM- CSF, 并在宫颈癌细胞 HeLa中表达与鉴定。【方法】采用聚合酶链反应从载体 pORF- hGM- CSF中, 扩增出hGM- CSF基因, 克隆到双顺反子真核表达载体pIRES的多克隆位点B(MCSB)中, 构建pIGM- CSF真核表达载体。然后采用脂质体转染法将其转染 HeLa细胞, 用 RT- PCR 在 RNA 水平和ELISA 在蛋白水平检测其在真核细胞中的表达。【结果】所克隆 hGM- CSF基因片段经测序完全正确; 重组质粒转染HeLa细胞后, 检测有hGM- CSF表达。【结论】成功构建含基因佐剂真核表达载体pIGM- CSF, 并在宫颈癌细胞中能有效表达, 为继续克隆目的抗原从而构建双顺反子真核表达质粒奠定了基础。

关键词: 真核表达载体; hGM- CSF; 基因佐剂; 双顺反子

中图分类号: R392.9

文献标识码: A

文章编号: 1672- 3554(2007)05- 0590- 04

Construction and Expression of Eukaryotic Expression Vector Containing Human GM- CSF Gene

LU Yan- ru, JIANG Zhen- you

(Department of Microbiology & Immunology, Medical College of Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: 【Objective】To construct eukaryotic expression plasmid pIGM- CSF based on gene adjuvant hGM- CSF, and express in HeLa cells. 【Methods】Plasmid pORF- hGM- CSF was used as template to amplify hGM- CSF gene by PCR, and the product was inserted into multiple cloning site 's B of bicstronic eukaryotic expression vector pIRES to construct eukaryotic expression plasmid pIGM- CSF, then transfected into HeLa cell by using liposome. Finally, the hGM- CSF gene expression of protein was detected by RT- PCR from RNA level and ELISA from protein level. 【Results】The length and sequence of the cloned hGM- CSF segment was correct. The hGM- CSF gene could be expressed in transfected HeLa cells. 【Conclusion】The eukaryotic expression plasmid pIGM- CSF containing gene adjuvant was successfully constructed and expressed in HeLa cells effectively, lays a foundation on constructing bicstronic eukaryotic co- expression plasmid.

Key words: eukaryotic expression plasmid; hGM- CSF; gene adjuvant; bicstronic

[J SUN Yat- sen Univ(Med Sci), 2007, 28(5):590- 593]

目前对DNA疫苗的研究已经成为热点, 一些研究表明DNA疫苗对许多病毒^[1,2]、细菌^[3]、寄生虫^[4]、肿瘤^[5]和慢性退行性疾病^[6]等有预防和治疗作用, 还可以调节自身免疫应答。HIV、疟原虫和病人独特型DNA疫苗等已进入人体临床试验^[7], 但是核酸疫苗的免疫效果在不同动物个体中差异较大, 有些疫苗在小个体的动物中免疫和保护效果

较好, 而在大个体动物中效果较差。某些肿瘤及病毒的T、B细胞表位抗原性弱, 难以诱导有效的T、B细胞免疫应答。基因佐剂(gene adjuvant)可将某些细胞因子编码基因与目的基因克隆到同一载体或不同载体共同免疫动物, 其表达的相应蛋白起到佐剂作用, 可大大增强T、B细胞的免疫应答水平。为此, 我们构建以基因佐剂人粒细胞- 吞噬细胞集

收稿日期: 2006-09-08

基金项目: 广东省中医药局科研基金(1060117); 广东省医学科研课题(A2005340)

作者简介: 卢燕茹(1978-), 女, 新疆奎屯人, 硕士研究生, 主要从事分子病毒学方向研究; 江振友, 通讯作者, 副教授, 硕士生导师, E-mail:tjzhy@jnu.edu.cn

落刺激因子 (granulocyte - macrophage colony - stimulating factor, hGM- CSF) 为基础的真核表达载体 pIGM- CSF, 为今后在该载体上克隆我们所需的目的抗原基因奠定了基础。

1 材料与amp;方法

1.1 质粒与菌株

大肠杆菌 DH5 和宫颈癌细胞 HeLa 为本实验室保存; 载体 pIRES 购自 BD Biosciences Clontech 公司, 质粒 pORF - hGM - CSF 购自 InvivoGen 公司。

1.2 主要试剂

Ex Taq DNA 聚合酶, T₄ DNA 连接酶, 限制性内切酶 Xba 和 Not , DL- 1 kb marker, 质粒提取试剂盒, DNA 胶回收纯化试剂盒购自大连宝生物公司。1 kb DNA marker 和 300 bp marker 购于鼎国生物公司。一对 PCR 引物、重组质粒上目的基因的序列测定由上海生工生物工程公司完成。MMLV 逆转录酶和脂质体转染试剂 Lipofectamine 2000 及配套转染液 Opti - MEMI Reduced Serum Medium 购自 Invitrogen 公司。人 hGM - CSF 蛋白 ELISA 双抗体夹心法检测试剂盒购自深圳市晶美生物科技公司。

1.3 引物设计

参照 GenBank 上人 GM - CSF 基因 CDS 序列分别设计引物如下。上游引物 P1: 5 - CA TCTAGA AAGGAGGGGCCACCATG TG - 3, 含 Xba 位点和起始密码子 ATG; 下游引物 P2: 5 - AT GCGGCGCG TGTCGAGC TAGCGAATTC - 3, 含 Not 位点, 含终止密码子 TGA。扩增基因长度为 474 bp。

1.4 hGM - CSF 基因的 PCR 扩增

以载体 pORFhGM - CSF 为模板, 用引物 P1、P2 进行 PCR 扩增 hGM - CSF 基因, 反应体系为 50 μ L, 其中上下游引物各 1 μ L, dNTP 3 μ L, 模板 DNA 4 μ L, 10 \times Ex Taq Buffer 5 μ L, MgCl₂ 3 μ L, Ex Taq 0.4 μ L, dd H₂O 33 μ L, 反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 95 $^{\circ}$ C 30 s, 56 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s, 共 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 再延伸 10 min。扩增产物取 5 μ L 进行 12 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 以确定扩增产物大小。

1.5 pIGM - CSF 真核载体的构建与鉴定

将 hGM - CSF 的 PCR 产物经过回收纯化后与载体 pIRES, 同时用 Xba 和 Not 双酶切, 酶切

后进行 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 并经过凝胶回收纯化试剂盒回收酶切产物, 将两者酶切纯化的产物按照 3 : 1 的摩尔比混合, 用 T₄ DNA 连接酶连接 24 h, 转化用低温 CaCl₂ 制备的 E.coli DH5 感受态细菌, 然后涂布于含氨苄青霉素 50 μ g/mL 的 LB 固体培养基中。次日, 随机挑取 10 个单菌落, 分别接种于 3 mL 含氨苄青霉素的 LB 培养液中, 37 $^{\circ}$ C 下 150 r/min 振荡培养过夜。将 100 μ L 过夜培养的菌液煮沸后离心取上清液 2 μ L 作为模板以引物 P1 和 P2 进行菌落 PCR, 如果结果经琼脂糖凝胶电泳显示大小正确则用质粒提取试剂盒提取质粒 DNA。将提取的质粒 DNA 用 Xba 和 Not 双酶切, 进行电泳检测, 以 DL - 1000 bp marker 为分子量参照, 将筛选出的阳性克隆产物的菌液进行测序鉴定。测序采用 Sanger 双脱氧链终止法, 对引物所在序列的两端进行测定, 测序工作由上海生物工程公司完成。

1.6 重组质粒转染

将 HeLa 细胞加入含有 Lipofectamine 2000 及配套转染液 Opti - MEMI Reduced Serum Medium 的 6 孔板内, 500 μ L/孔。取 0.7 μ g 重组质粒 DNA 和 2 μ g 脂质体分别溶于 250 μ L 的 Opti - MEMI 转染液中。5 min 后加入到转染专用的管中混匀, 室温静置 20 min, 加入到上述 6 孔板内, 培养 6 h 后, 换成 PRMI 1640 完全培养基继续培养。

1.7 细胞的培养和传代

冻存的 HeLa 细胞株经复苏后培养于含 100 mL/L 小牛血清 PRMI 1640 完全培养基中, 在 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 饱和湿度的培养箱中培养, 每 3 d 消化传代一次。

1.8 重组质粒 pIGM - CSF 转染 HeLa 细胞

转染前 1 d 将 HeLa 细胞传代接种在 6 孔板内, 细胞生长至 80% - 90% 时; 以 Opti - MEM Reduced Serum Medium 各 250 μ L 分别稀释 5 μ g pIGM - CSF 质粒和 10 μ L Lipofectamine - 2000 转染 1 孔, 培养 6 h, 更换 PRMI 1640 完全培养基继续培养。

1.9 RT - PCR 检测 hGM - CSF 基因表达

分别收集 pIRES 和 pIGM - CSF 质粒转染 48 h 的 HeLa 细胞, 应用异硫氰酸胍一步法提取细胞中的总 RNA, 以 Oligo dT 为引物, 在 MMLV 逆转录酶作用下, 37 $^{\circ}$ C 1 h 将 RNA 逆转录为 cDNA。95 $^{\circ}$ C 灭活 MMLV, 以 cDNA 为模板用 P1 和 P2 为

引物进行 PCR, 反应体系为 50 μL , 其中上下游引物各 1 μL , cDNA 模板 10 μL , 5 \times PCR Buffer 10 μL , Ex Taq 0.25 μL , dd H₂O 28.75 μL , 反应条件为: 95 预变性 5 min, 95 30 s, 56 30 s, 72 60 s, 共 30 个循环, 72 再延伸 10 min。扩增产物取 5 μL 进行 12 g/L 琼脂糖凝胶电泳。

1.10 ELISA 法检测 hGM-CSF 蛋白表达水平

分别收集 pIRES 和 pIGM-CSF 质粒转染 24 h 和 48 h 的 HeLa 细胞的细胞培养的上清液, 采用 ELISA 双抗体夹心法检测 hGM-CSF 蛋白的表达量, 按照试剂盒说明进行操作。用酶标仪在吸光度 A₄₅₀ 下测定样品和试剂盒提供的标准品的 A 值。根据标准品所测 A 值绘制的蛋白浓度与 A 值相关标准曲线计算各样品中 hGM-CSF 蛋白的含量。

1.11 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 处理数据统计用 SPSS13.0 软件包进行分析, 组间比较采用两组样本 t 检验, P < 0.05 具有统计学意义。

2 结果

2.1 hGM-CSF 基因的 PCR 产物电泳分析

12 g/L 琼脂糖凝胶电泳的结果显示, PCR 扩增产物为均一条带, 对比 Marker, 大小同预期结果一致(图 1)。

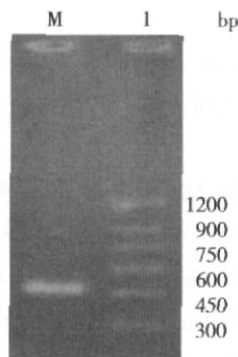


图 1 hGM-CSF PCR 产物电泳分析

Fig.1 Analysis of PCR product of hGM-CSF by agarose gel electrophoresis

1: hGM-CSF PCR product; M: DL-300 bp Marker

2.2 限制性内切酶消化鉴定

质粒 pIGM-CSF 经 Xba I 和 Not I 双酶切后, 电泳可见大小约为 6.1 kb 与 0.47 kb 两片段, 载体 pIRES 经上述两个酶双酶切后, 仅见一条 6.1 kb 的片段(图 2)。

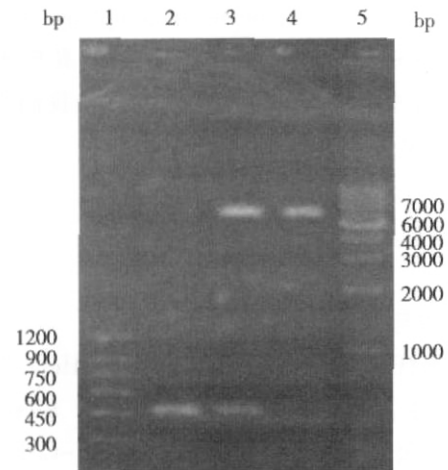


图 2 质粒 pIGM-CSF 酶切鉴定

Fig.2 Digestion analysis of plasmid pIGM-CSF

1: DL-300 bp Marker; 2: hGM-CSF PCR product; 3: pIGM-CSF digest with Xba I and Not I; 4: pIRES digest with Xba I and Not I; 5: DL-1000 bp Marker

2.3 序列分析鉴定

对质粒 pIGM-CSF 上的多克隆位点 B(MCSB) 内的 DNA 序列进行序列分析鉴定, 结果与 hGM-CSF (NCBI 登陆号: M11220) 的基因序列完全相同

2.4 RT-PCR 结果

如图 4 所示, 在电泳图中转染质粒 pIGM-CSF 的有 hGM-CSF 基因条带的出现, 而转染了空质粒 pIRES 的则没有 hGM-CSF 基因条带的出现。

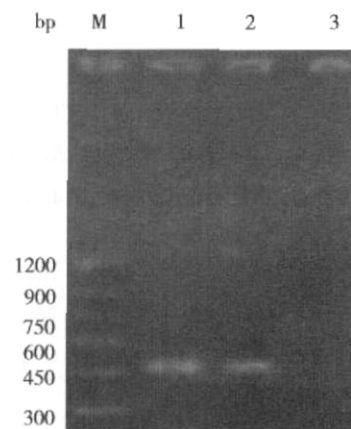


图 4 RT-PCR 检测 hGM-CSF 在 HeLa 中的表达

Fig.4 Analysis of hGM-CSF gene expression in HeLa cells

M: DL-300 bp Marker; 1,2: HeLa transfected by pIGM-CSF; 3: HeLa transfected by pIRES

2.5 ELISA 检测结果分析

以空载体 pIRES 为阴性对照, 结果表明,

pIGM-CSF 在转染 24 h 和 48 h 可检测到 hGM-CSF 分泌, 表达水平在标准曲线范围之内, 与对照组比较均有统计学意义(表 1)。

表 1 培养细胞上清中 hGM-CSF 含量检测结果
Table 1 hGM-CSF content in cell culture supernatant
[(n=3, $\bar{x} \pm s$ (pg/mL))]

Group	24 h hGM-CSF	48 h hGM-CSF
pIRES control	1.65 \pm 0.11	1.81 \pm 0.14
pIGM-CSF transfected	153.07 \pm 4.20 ¹⁾	142.75 \pm 3.97 ¹⁾

1) P < 0.01, vs control

3 讨 论

细胞因子是一类可溶性的小分子多肽或蛋白质, 通过与细胞膜表面受体相互作用发挥其生理活性。细胞因子在体内能激活和调节免疫细胞, 通过不同的作用环节调节或增强 DNA 疫苗的免疫效应而发挥佐剂作用。目前已发现多种细胞因子具有佐剂效应, 在 DNA 疫苗领域研究最为活跃的是 IL-2、IL-12、IL-18、GM-CSF 和 IFN- γ 。GM-CSF 属于酸性糖蛋白, 是一种多效的细胞因子, 它具有刺激髓样祖细胞的增殖和成熟并维持髓性细胞的功能特性, 促进巨噬细胞的增殖和分化, 调节粒细胞和单核组细胞生长和分化, 增强成熟的中性粒细胞、巨噬细胞和嗜酸性粒细胞的功能, 以及加强单核-巨噬细胞抗肿瘤和 ADCC 作用等生物学活性。作为基因佐剂, GM-CSF 能够增强 CTL、NK 细胞活性, 但更主要的是调节抗原提呈细胞尤其是树突状细胞的数量和功能来调节免疫应答的强度。Hongxun 等^[2]将携带 GM-CSF 基因的重组质粒 (pNGV-hFL+3L) 作为佐剂与 HIV 基因疫苗 p17HIV 共同免疫小鼠, 结果在注射部位及其相应的淋巴结中可聚集大量的树突状细胞, 并且比单独应用基因疫苗产生更强烈的细胞免疫应答及脾细胞抗原特异性 IFN- γ 。Zhang 等^[3]发现将只含有结核杆菌单基因的重组质粒 pAg85A 和有 GM-CSF 基因的重组质粒 pAg85A/GMCSF 同时注射免疫小鼠时, 结果 pAg85A/GM-CSF 组比 pAg85A 组产生更高水平的 IFN- γ , 并能够增强 CTL 细胞活性。Miyashita 等^[4]将克隆的 GM-CSF 转染 JA 细胞作为疫苗皮下包埋免疫患食管癌的小鼠, 与未转染组比较结果肿瘤体积明显缩小, 表明对该肿瘤

有抑制作用。实验证明, GM-CSF 可以作为免疫佐剂和肿瘤疫苗免疫促进剂^[9]。目前国内外对于 GM-CSF 基因的研究和报道多以鼠 mGM-CSF 为主, 但对于人 hGM-CSF 基因克隆和研究的报道并不多见。本实验以人 hGM-CSF 基因为目的基因, 主要是为了进一步研究人 hGM-CSF 基因在 DNA 疫苗中的免疫学作用, 其对今后 DNA 疫苗应用于临床人体实验比 mGM-CSF 有着更为重要的临床意义。

本实验所采用的真核表达载体 pIRES 能在细胞基因组外扩增表达目的基因。质粒 pIRES 含有人巨细胞病毒启动子、脑心肌炎病毒的内部核糖体进入位点 (internal ribosome entry site, IRES), IRES 连接两个开放读码框, 其转录产物在翻译时, 核糖体能同时进入并开始翻译 IRES 上游及下游的两个转录子^[9]。本实验在启动子下游的 MCSB 的酶切位点 Xba 和 Not 之间插入人 hGM-CSF 构建含有基因佐剂功能的真核表达质粒 pIGM-CSF, 并通过 RT-PCR 在 RNA 水平和 ELISA 在蛋白水平检测其在真核细胞中表达。现已有研究认为以 pIRES 为双表达质粒将目的抗原与细胞因子共表达在不同的实验系统中均显著增强免疫力^[10,11]。我们成功构建含基因佐剂 hGM-CSF 的真核表达质粒, 为下一步在该载体上克隆我们所用的抗原基因研制新型优效的 DNA 疫苗奠定了基础。

参考文献:

- [1] 李志刚, 江元森, 杨林, 等. HBV S 基因、PreS2/S 基因真核重组载体的构建与鉴定 [J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2004, 25(3S): 25-27.
- [2] HONGXUN S, VLADIMIR M P, COREY M, et al. Regional, but not systemic recruitment/ expansion of dendritic cells by a pluronic-formulated Flt3-ligand plasmid with vaccine adjuvant activity [J]. Vaccine, 2003, 21(26):3019-3020.
- [3] ZHANG X Z, MAZIAR D, PATRICIA N, et al. Intramuscular immunization with a monogenic plasmid DNA tuberculosis vaccine: Enhanced immunogenicity by electroporation and co-expression of GM-CSF transgene [J]. Vaccine, 2007, 25(7): 1342-1352.
- [4] 陈观今, 陈海峰, 郭虹, 等. SAGI 和 IL-2 基因佐剂混合免疫诱导鼠抗弓形虫感染的研究 [J]. 热带医学杂志, 2002, 2(1): 1-4, 15.

(下转第 597 页 to page 597)

后逐渐恢复。其中 CO₂CP 下降最明显, 且于第 5 天迅速恢复, 到第 7~14 天出现显著升高。Cr 恢复最慢, 到第 14 天其平均水平仍然显著升高。血清 Cr 和 BUN 相比, 前者在反映 DEG 肾损害更敏感。以上提示, 早期出现的严重酸中毒和继而出现的血清 Cr 显著升高是早期发现 DEG 中毒的重要线索。

综上所述, DEG 的腹腔注射途径可以引起大鼠的明显的肾功能损害甚至死亡, 包括肾组织出现的急性肾小管坏死的病理改变。早期出现严重的酸中毒和 Cr 的显著升高为 DEG 中毒的早期诊断提供重要线索, 同时 Cr 和 CO₂CP 随时间的变化规律也有助于我们深入了解 DEG 中毒的特点, 并提示部分大鼠的肾功能变化是可能是可逆的, 这些均有利于指导临床的治疗, 但 DEG 中毒引起肾中毒的具体机制尚需进一步研究。

参考文献:

[1] 周邦荣.二甘醇应用前景广阔[J].精细化工原料及中间体, 2006,(3):22- 24.

[2] 蔡皓东.1937 年磺胺酞剂(含二甘醇)事件及其重演[J].药物不良反应, 2006,8(3):217- 220.

[3] O BRIEN K L, SELANIKIO J D, HECDIVERT C, et al. Epidemic of pediatric deaths from acute renal failure caused by diethylene glycol poisoning. Acute Renal Failure Investigation Team [J]. JAMA, 1998, 279(15):1175- 1180.

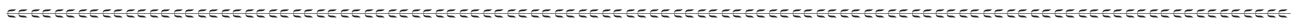
[4] 李卫国, 陈伟良, 艾 虹, 等.小剂量顺铂联合 ~(32)P 玻璃微球对小鼠 S180 瘤细胞的细胞毒作用 [J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2005,26(1):65- 68.

[5] HEILMAIR R, LENK W, LOHR D. Toxicokinetics of diethylene glycol (DEG) in the rat [J]. Arch Toxicol, 1993, 67 (10):655- 666.

[6] 张国华, 陈丽萍, 胡更奕, 等. 二甘醇中毒死亡 1 例 [J]. 法医学杂志, 2001,17(4):236- 237.

[7] KRAUL H, JAHN F, BRAUNLICH H, et al. Nephrotoxic effects of diethylene glycol (DEG) in rats [J]. Exp Pathol, 1991, 42(1):27- 32.

(编辑 孙慧兰)



(上接第 593 页 from page 593)

[5] MIYASHITA T, ARMSTRONG T D, WANG J, et al. Granulocyte macrophage colony stimulating factor transfected vaccine for esophageal cancer causes regression of subcutaneous implants in rats [J]. J Surg Res, 2007, 137(2): 194- 195.

[6] 张 革, 汪华侨, 邹俊涛, 等. A _(1- 15)多价 DNA 疫苗的构建及其对体液免疫的效果 [J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2005,26(4):371- 376.

[7] 赵 楷. 病毒疫苗的研究现状与展望 [J]. 第二军医大学学报, 2002, 23 (8):813- 815.

[8] KAPOOR D, AGGARWAL S R, SINGH N P, et al. Granulocyte - macrophage colony - stimulating factor enhances the efficacy of hepatitis B virus vaccine in previously unvaccinated haemodialysis patients [J]. J Viral Hepat, 1999, 6(5):405- 409.

[9] 张森涛, 白 华, 童德文. 双顺反子表达质粒在 DNA 疫苗研究中的应用 [J]. 中国兽医科学, 2006,36(5): 424- 428.

[10] GHERARDI M M, RAMIREZ J C, ESTEBAN M. Interleukin - 12 enhancement of the cellular immune response against human immunodeficiency virus type I env antigen in a DNA prime virus boost vaccine regimen is time and dose dependent: suppressive effects of IL- 12 boost are mediated by nitric oxide [J]. J Virol, 2000, 74 (14):6278- 6286.

[11] KUSAKABE K, XIN K Q, KATOH H, et al. The timing of GM- CSF expression plasmid administration influence the Th1/Th2 response induced by HIV- 1- specific DNA vaccine [J]. J Immunol, 2000, 164(6):3111- 3120.

(编辑 徐 杰)