

肾癌 G250 抗原基因在 sp2/0 细胞中的表达及其意义

张亚东¹, 吴荣佩¹, 刘雷¹, 李乐军¹, 曹开源², 李晓飞¹

(中山大学 1. 附属第一医院泌尿外科, 2. 临床检验标准化中心, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】将 G250 抗原 cDNA 片段转入 sp2/0 细胞中并获得稳定表达, 为 G250 基因疫苗研究提供实验工具。【方法】用脂质体转染法将鉴定好的重组质粒转入 sp2/0 细胞中, 经 G418 筛选得到稳定表达, 采用逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)、间接免疫荧光、Western blot 检测 G250 基因在 sp2/0 细胞中的表达。【结果】转染 2 周后, 筛选出阳性 sp2/0 细胞克隆, 通过 RT-PCR 证实有 G250mRNA 转录, 间接免疫荧光可以见到阳性细胞, Western blot 证实有 G250 抗原表达。【结论】建立了稳定表达 G250 抗原的肿瘤细胞模型, 为研究基于肾癌 G250 基因的肿瘤基因疫苗治疗奠定了基础。

关键词:肾细胞癌(RCC); G250/MN/CAIX(G250)抗原; 基因表达

中图分类号: R737.25

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2008)01-0016-04

Eukaryotic Expression of Renal Cell Carcinoma G250 Antigen Gene in sp2/0 Cells and Its Significance

ZHANG Ya-dong¹, WU Rong-pei¹, LIU Lei¹, LI Le-jun¹, CAO Kai-yuan², LI Xiao-fei¹

(1. Department of Urology, The First Affiliated Hospital;

2. The Standard Clinical Examination Center, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】To provide a tool for the therapy of gene vaccine based on G250 gene, we transferred it into sp2/0 cells to obtain stable expression. 【Methods】The constructed recombinant plasmid was transfected into sp2/0 cells, which were screened by G418, then the positive cells was identified. 【Results】Two weeks after transfection, we got positive cells. RT-PCR and indirect immunofluorescence methods showed that the G250 gene was expressed in positive sp2/0 cells. 【Conclusion】The cell model expressing G250 antigen was established, which provided a basis for further exploring the therapy of gene vaccine based on RCC G250 gene.

Key words: renal cell carcinoma; G250/MN/CAIX antigen; gene expression

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2008, 29(1):16-19]

近年来研究发现肾癌 G250 抗原具有良好肿瘤特异性^[1], 基于 G250 基因的各种单克隆抗体(mAb)在肾癌的诊断与治疗中取得较大进展, Wilex/Ludwig 癌症研究院开发的一种嵌合抗体正在进行临床 II 期试验^[2]。我们在自行克隆了中国肾癌 G250 抗原基因编码区 cDNA 系列、构建其真核表达质粒^[3-6]的基础上, 将重组质粒转入 sp2/0 细胞中, 经鉴定证实获得稳定表达, 为肾癌 G250 基因疫苗治疗及 G250 单克隆抗体的制备奠

定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

大肠杆菌 DH5 α 、sp2/0 细胞、786-0 细胞、已经鉴定好的重组质粒 pcDNA3.0-G250 为本研究室保存。Plasmid Mini Kit、反转录试剂盒(RT-PCR)均购自 Invitrogen 公司; 转染试剂盒, LipofectamineTM

收稿日期: 2007-06-01

基金项目: 广东省科技攻关项目(2003c31201); 广州市科技攻关项目(2003Z2-E4011)

作者简介: 张亚东(1977-), 男, 河南罗山人, 硕士, 现在珠海市人民医院泌尿外科工作; 李晓飞, 通讯作者, 教授, 博士生导师, E-mail: lexiaofei377@sohu.com

2000, 美国 LIFE TECHNOLOGIES 公司产品。Carbonic Anhydrase IX (简称 CAIX) antibody 购自美国 Abcam 公司;二抗购自英国 KPL 公司;化学发光试剂为 Santa Cruz 产品,分 A 和 B 两种试剂。

1.2 pcDNA3.0-G250 质粒的提取和纯化

取阳性菌液以 1:100 接种至 5 mL 含 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Amp 的 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养过夜,次日取出后用质粒小量抽提试剂盒制备质粒 DNA。紫外分光光度法测浓度后备用。

1.3 sp2/0 细胞对 G418 的剂量-反应分析

细胞对 G418 的剂量-反应分析根据 Invitrogen 公司推荐的方法进行。确定杀死所有细胞的 G418 浓度,用紧邻的稍高的浓度进行筛选。

1.4 pcDNA3.0-G250 转染 sp2/0 细胞

将 $4 \times 10^5 \sim 8 \times 10^5$ 个细胞接种于 24 孔板,分为阴性对照,空质粒和重组质粒组。待 sp2/0 细胞生长至 80% ~ 90% 的融合度时,按 LipofectamineTM 2000 的转染方法把重组质粒 pcDNA3.0-G250 导入 sp2/0 细胞中,5 h 后更换含 150 mL/L 胎牛血清的 RPMI1640 培养基。24 h 后,以 1:20 的比例将细胞传代至新鲜培养基。48 h 后加入 G418 至终浓度 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 进行筛选,对筛选出的阳性克隆进行培养。

1.5 sp2/0 细胞中 G250 基因的转录

于转染 2 周后获取稳定表达时,分别提取已经转染和未转染的 sp2/0 细胞总 RNA,用蛋白核酸定量仪(Eppdorf 公司)进行定量。按照说明书进行逆转录,以逆转录得到的 cDNA 为模板进行 PCR 反应,引物和反应条件同重组质粒构建法^[3]。同时做阳性和阴性对照。取 5 μL PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶上进行电泳鉴定。

1.6 间接免疫荧光检测阳性克隆 G250 蛋白表达

于 2 周后获取稳定表达时,分别取阳性和阴性克隆细胞制作抗原片,滴加用 PBS 以 1:100 稀释的 CAIX 抗体,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,PBS 洗 3 次。滴加按 1:50 稀释的荧光标记山羊抗兔 IgG,制成细胞滴片,在荧光显微镜下观察并拍照,检测稳定转染细胞目的蛋白的表达。

1.7 Western blot 分析表达产物

已达融合生长的成功转染 pcDNA3.0 的 sp2/0 单层细胞用冷 PBS 洗 3 次后,加入裂解液冰上裂解 30 min,12 000 g,5 min 离心去除细胞碎片后,

取样品与上样缓冲液混合,煮沸 5min,进行 10% SDS-PAGE 电泳,转硝酸纤维素膜。含 5% 脱脂奶粉 TBST 中室温下封闭 1 h,随后加入兔多克隆抗体 CAIX 抗体,羊抗兔二抗,ECL 化学发光试剂检测(Santa Cruz)。

2 结 果

2.1 构建的重组表达质粒的提取、鉴定

碱裂解法提取、纯化已构建好的重组质粒,分别单、双酶切后琼脂糖凝胶电泳,可见与预定位置相符条带^[3]。

2.2 sp2/0 细胞对 G418 的剂量-反应浓度

经测定 G418 浓度在 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,所有的 sp2/0 细胞均已死亡,故筛选浓度为 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。pcDNA3.0-G250 转染 sp2/0 细胞经 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 G418 浓度筛选后,得到有 G250 抗原表达的细胞克隆(图 1)。

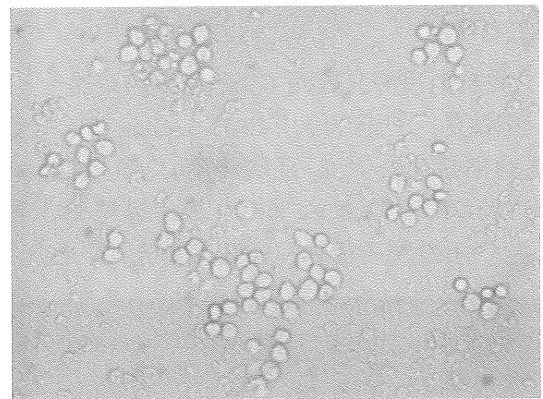


图 1 G418 筛选的阳性克隆

Fig.1 Positive cells by G418 selection ($\times 200$)

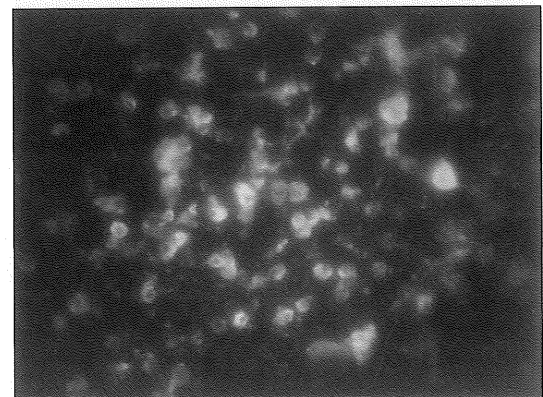


图 2 转染后阳性克隆的间接免疫荧光

Fig.2 Indirect immunofluorescence of positive transfected cells ($\times 200$)

2.3 RT-PCR 检测 G250 基因的表达

用特异性引物对筛选后克隆细胞及阳性对照 786-0 细胞进行 RT-PCR 测定, 扩增得到了一条约 1 600 bp 的特异性条带, 与预定位置相符, 而未经转染细胞及阴性对照细胞则均为阴性(图 3)。

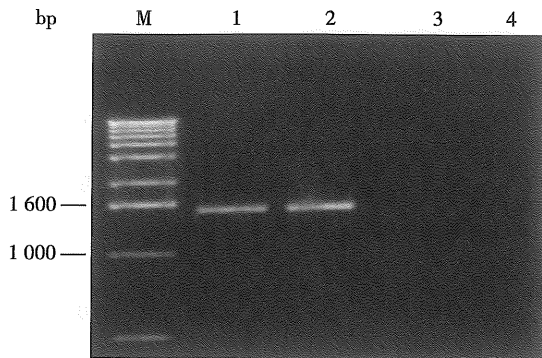


图 3 转染 G250 基因的 sp2/0 细胞的 RT-PCR

Fig.3 Agrose gel electrophoresis of RT-PCR product

Lane M: Standardmarker(bp) 8 000, 7 000, 6 000, 5 000, 4 000, 2 000, 1 600, 1 000, 517, 396; Lane 1: Transfected sp2/0 cells; Lane 2: Positive control; Lane 3: Normal sp2/0 cells; Lane 4: Negative control;

2.4 间接免疫荧光检测 G250 基因的表达

阳性稳定转染克隆用 CAIX antibody、羊抗兔二抗进行间接免疫荧光, 证实转染 G250 基因 sp2/0 细胞有 G250 抗原表达(图 2), 而未转染则为阴性(图 4)。阳性对照细胞间接免疫荧光(图 5)。

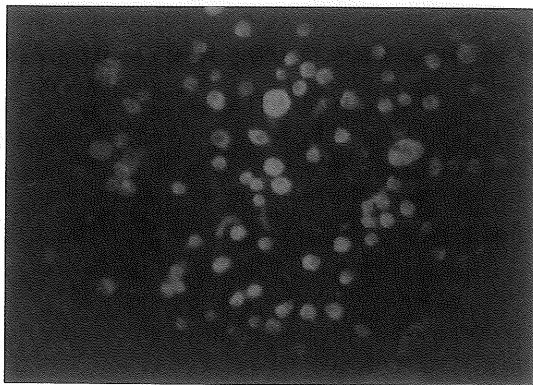


图 4 阴性细胞的间接免疫荧光

Fig.4 Indirect immunofluorescence of negative control ($\times 200$)

2.5 G250 抗原的 Western blot 检测

PVDF 膜经过抗原抗体反应后曝光, 可见转染重组质粒的阳性克隆细胞在 54 ku 处显示宽且颜色深的条带, 阳性对照 786-0 细胞同一位置也可见宽且深的条带, 与预定位置相符。而阴性对照则

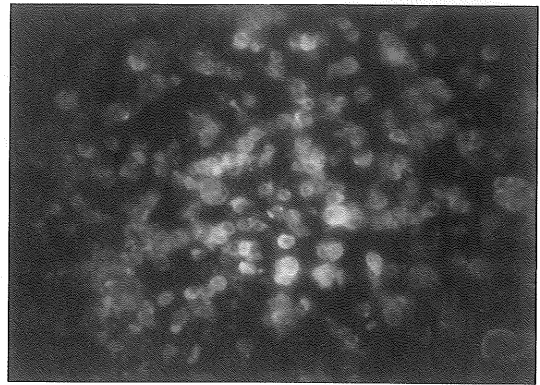


图 5 阳性对照细胞的间接免疫荧光

Fig.5 Indirect immunofluorescence of positive control ($\times 200$)

无条带(图 6)。说明重组质粒转染的阳性克隆细胞表达的蛋白质分子量为 54 ku 的 G250 蛋白。

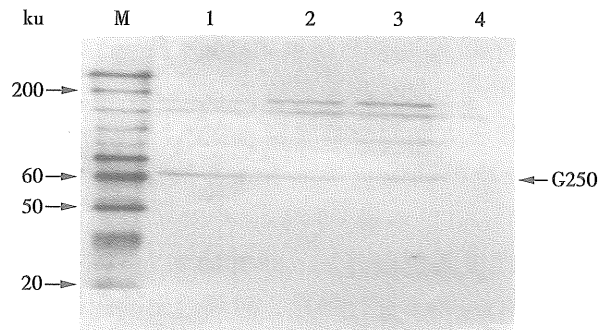


图 6 Western blot 分析

Fig.6 Western blot analysis

Lane M: Protein standard weight marker (ku) 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 100, 140, 200; Lane 1: 786-0 cells positive control; Lane 2, 3: Positive transfected sp2/0 cells; Lane 4: Normal sp2/0 cells

3 讨论

G250 抗原是分布于细胞膜和核膜上的跨膜糖蛋白, 在大多数正常组织均不表达^[7], 这就为我们利用 G250 抗原作为靶点进行免疫诊断和治疗提供了强有力的支持。

将外源基因导入哺乳动物细胞我们采用了脂质体转染法, 它简单有效、转染效率高、对细胞损伤小; 而且具有同源性, 有利于进一步的动物实验。作为间接转移技术的重要组成部分, 靶细胞的选择成为人们关注的焦点, 我们拟采用 Balb/c 小鼠作为实验动物, 所以选用和 Balb/c 小鼠遗传背景一致的鼠骨髓瘤细胞株 sp2/0 细胞作为靶细胞^[8]。Tokushige 等^[9]选择遗传背景与实验动物相

同的肿瘤细胞作为候选靶细胞,将抗原基因转染肿瘤细胞,形成稳定表达目的抗原的靶细胞,攻击免疫动物使其荷瘤。由于瘤细胞表达转染的抗原,部分模拟目的抗原的攻击作用,建立了特异性 CTL 杀伤活性体内诱生实验模型。因此首创选择 sp2/0 细胞,一种小鼠骨髓瘤细胞来做 G250 抗原基因的 stable 表达。它是哺乳动物细胞,可以正确的进行翻译后修饰,遗传稳定并且表达量高;另一方面,因为要对表达产物进行免疫原性分析,也为了实验具有可重复性,所以选择 stable 表达方式。

1996 年,Opavsky 等^[10]发现 G250 抗原的中央区域与 Zn 结合后具有碳酸酐酶(CA)的活性,与 CA 家族具有高度的同源性。因此,认为它是 CA 家族的异构体之一。进一步的研究已证实 G250 抗原与 MN/CAIX 抗原的基因结构相同。间接免疫荧光法是一种简单而且标准的方法,是以特异性抗原抗体反应为基础,利用荧光色素作为标记物检测未知抗原或抗体的免疫学检测方法。我们也采用了这种方法,实验中一抗采用 CAIX 抗体,这是一种兔多克隆抗体,具有结合位点能够与 G250 抗原特异结合^[11]。再用荧光素标记的二抗结合一抗,在荧光显微镜下就能看到阳性细胞。实验结果证实转染后的 sp2/0 细胞有 G250 抗原表达。

将含有 G250 基因的重组质粒转染进 sp2/0 细胞,这一表达 G250 抗原的鼠源瘤细胞将作为研究 G250 基因疫苗的有效实验工具,为我们研究 G250 基因疫苗激发的小鼠 CTL 应答和移植瘤模型建立奠定了物质条件。目前,我们正在进行动物实验检验其是否具有免疫保护作用。

参考文献:

- [1] Potter CPS, Harris AL. Diagnostic, prognostic and therapeutic implications on carbonic anhydrases in cancer [J]. *Bri J Cancer*, 2003,89(1):2-7.
- [2] Kennett RH. Technology evaluation: WX-G250, Wilex/Ludwig Institute for Cancer Research [J]. *Curr Opin Mol Ther*, 2003,5(1):70-75.
- [3] 李晓飞,曹开源,徐霖,等. 肾癌 G250 抗原基因真核表达载体的构建和序列测定 [J]. *中华泌尿外科杂志*, 2006,17(1):5-8.
- [4] 徐霖,曹开源,崔蕴霞,等. 牛 pcDNA3-BFGF 真核表达重组体的构建与鉴定 [J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2002,23(5):336-338.
- [5] 王烈峰,汪华侨,张革,等. 以 β -淀粉样蛋白为靶的单价及二价真核表达载体的构建和表达 [J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2006,27(3):250-253,317.
- [6] 王烈峰,汪华侨,张革,等. β -淀粉样蛋白真核表达质粒的构建及鉴定 [J]. *解剖学研究*, 2006,28(1):18-19,32.
- [7] Grabmaier K, Vissers JL, DE weijert MC, et al. Molecular cloning and immunogenicity of renal cell carcinoma-associated antigen G250 [J]. *Int J Cancer*, 2000,85(6):865-870.
- [8] 许信刚,胡建和,张彦明. 逆转录病毒载体介导的猪痘病毒 E2 基因在真核细胞中表达及动物免疫试验初报 [J]. *中国农学通报*, 2005,21(5):20-23.
- [9] Tokushige K, Wakita T, Pachuk C, et al. Expression and immune response to hepatitis C virus core DNA-based vaccine constructs [J]. *Hepatology*, 1996,24(1):14-20.
- [10] Opavsky R, Pastorekova S, Zeinik V, et al. Gene, a novel member of the carbonic anhydrase family: structure and exon to protein domain relationships [J]. *Genomics*, 1996,33(3):480-487.
- [11] Bui MH, Seliqson D, Han KR, et al. Carbonic anhydrase IX is an independent predictor of survival in advanced renal clear cell carcinoma: implications for prognosis and therapy [J]. *Clin Cancer Res*, 2003,9(2):802-811.

(编辑 徐杰)