

前列腺特异性膜抗原基因片段在酿酒酵母中的诱导表达及意义

陈贤璟¹, 丘少鹏¹, 毛晓鹏¹, 王杜渐¹, 黎明涛²

(中山大学 1.附属第一医院泌尿外科, 2.中山医学院药理教研室, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】分析前列腺特异性膜抗原(PSMA)基因片段在酿酒酵母中的诱导表达情况,以便进一步探讨重组人 PSMA 的免疫活性并完成抗前列腺癌 PSMA 蛋白疫苗的制备。【方法】应用基因重组技术将人 PSMA cDNA 序列克隆入酿酒酵母穿梭诱导表达载体 pYES2/NT,构建重组酵母真核表达质粒 pYES2/NT-PSMA,转化酿酒酵母菌株 INVSc1,尿嘧啶筛选出阳性克隆转化子,经半乳糖诱导表达后进行菌体全蛋白的 Western blot 检测。【结果】成功构建了 PSMA 的酵母真核表达重组子 pYES2/NT-PSMA,并在酿酒酵母 INVSc1 中得到有效表达,Western blot 显示两个特异性的人重组 PSMA 全蛋白片段,相对分子质量分别为 $M_r=100\times 10^3$ 及 $M_r=85\times 10^3$ 。【结论】人 PSMA 基因片段能够在酿酒酵母中表达并进行翻译后糖基化修饰,为下一步进行抗前列腺癌 PSMA 疫苗的研制奠定了良好基础。

关键词: PSMA; 酿酒酵母; 基因表达; 前列腺癌

中图分类号: R737.25

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2005)06-0631-04

Inducible Expressing and Identification of Prostate Specific Membrane Antigen in *Saccharomyces cerevisiae*

CHEN Xian-jing¹, QIU Shao-peng¹, MAO Xiao-peng¹, WANG Du-jian¹, LI Ming-tao²

(1. Department of Urology, The First Affiliated Hospital of SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China.

2. Department of Pharmacology, Preclinical School of SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract:【Objective】To observe the inducible expression of gene fragment from human prostate specific membrane antigen (PSMA) in *Saccharomyces cerevisiae*, to explore the immune activity of the acquired recombinant human PSMA and to develop PSMA vaccine for prostate cancer in stepwise. 【Methods】The cDNA encoding human PSMA (hPSMA) sequence was subcloned into yeast shuttle inducible expression vector pYES2/Nt; the recombinant plasmid pYES2/NT-PSMA was constructed. *Saccharomyces cerevisiae* INVSc1 was transformed and the positive transformants were selected in the medium of drop-out uracil. The positive transformants were induced by galactose to express recombinant hPSMA (rhPSMA). The whole extract proteins of the lysis cells were analyzed using Western blot analysis. 【Results】pYES2/NT-PSMA was established successfully. Two specific rhPSMA were identified by the Western blot analysis; $M_r=100\times 10^3$ and $M_r=85\times 10^3$, respectively. 【Conclusions】Gene fragment from human PSMA could be expressed and processed post-translational modification of glycosylation in *Saccharomyces cerevisiae*, which laid foundation to develop PSMA vaccine for prostate cancer substantially.

Key words: PSMA; *Saccharomyces cerevisiae*; gene expression; prostate cancer

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2005, 26(6):631-634]

前列腺特异性膜抗原 (prostate specific membrane antigen, PSMA) 是新近发现的一种具有高度前列腺特异性的膜糖蛋白, 其表达在前列腺癌, 尤其是在激素抵抗及远处转移的前列腺癌上皮

细胞中显著增高, 这使之成为前列腺癌临床诊疗中的一个关键分子指标和靶点, 并显示出了良好的应用前景, 如血清 PSMA 含量检测和抗前列腺癌疫苗的研制等^[1-3]。此外, 一些研究结果证实, PSMA 与多

收稿日期: 2005-06-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30371426); 广东省自然科学基金重点资助项目(021907)

作者简介: 陈贤璟(1973-), 男, 福建福州人, 硕士; 丘少鹏, 教授, 博士生导师, 通讯作者, 课题负责人. E-mail: urology@vip.163.com

种恶性实体肿瘤新生血管的形成有关,这为进一步探讨其临床应用价值提供了新的依据^[9]。但是,由前列腺癌临床标本或前列腺癌细胞株中分离、纯化获得的天然 PSMA 蛋白有限,无法满足科研及临床应用的需要。本研究拟应用基因重组技术,分析人 PSMA 基因片段在酿酒酵母 INVSc1 中的诱导表达情况,以便进一步探讨其功能和免疫原性,并为抗前列腺癌 PSMA 蛋白疫苗的研制打下基础。

1 材料和方法

1.1 材料

限制性内切酶 *Bam*H I、*Xho* I 和 T4 DNA 连接酶购自英国 NEB 公司;DNA 片段胶回收试剂盒购自德国 Qiagen 公司;酿酒酵母穿梭质粒 pYES2/NT、酿酒酵母菌株 INVSc1 及酵母感受态制备和转化试剂盒 S.C.Easycomp™ transformation Kit 购自美国 Invitrogen 公司;酵母培养基、半乳糖、PSMF、玻璃珠(0.4~0.6 mm)购自美国 Sigma 公司;鼠抗人 PSMA 单克隆抗体 T/PSMA1 购自美国 Biodesign 公司;鼠抗 Xpress 表位单克隆抗体购自美国 Invitrogen 公司;含有 PSMA cDNA 的重组质粒 pcDNA_{3.0}-PSMA 及大肠杆菌受体菌 DH5α 由中山大学检验系提供。

1.2 pYES2/NT-PSMA 酵母表达载体的构建

用 *Bam*H I、*Xho* I 双酶切重组质粒 pcDNA_{3.0}-PSMA,酶切产物经琼脂糖凝胶电泳,回收 2.2 kb 的 hPSMA cDNA 片段,亚克隆到 pYES2/NT 中相应的多克隆位点,PSMAcDNA 与 pYES2/NT 质粒多克隆位点 N 端的 Xpress DNA 片段接合,连接产物经酶切鉴定(质粒抽提、转化、酶切筛选阳性重组子等步骤均按常规方法进行,DNA 凝胶回收按照 QiagenDNA 片段胶回收试剂盒说明书进行)。

1.3 酵母的 pcDNA_{3.0}-PSMA 质粒转化及阳性转化子的筛选

参照 Invitrogen S.c.Easycomp™ transformation 试剂盒说明书制备感受态酿酒酵母,室温下取 50 μL 感受态酿酒酵母菌,加入 1~3 μg 重组 pYES2/NT-PSMA 震荡混匀,30 ℃水浴 1 h,取 100~150 μL 混合液铺于含 20 g/L 葡萄糖的 Sc-ura 90 mm 培养板,30 ℃孵育 2~4 d 至培养板上明显长出阳性单克隆菌落。

1.4 pYES2/NT-PSMA 在酿酒酵母中的表达

将阳性克隆单菌落接种于 15 mL 含 20 g/L 葡萄糖的 SC-Ura 培养液,30 ℃培养(300 r/min)至 $A_{600} \approx 3-6$,1 500 r/min($r=15$ cm)离心收集细胞,转于

50 mL 含 20 g/L 半乳糖的 Sc-Ura 培养液使 $A_{600} \approx 0.4$,继续培养,分别于 0、4、9、14、19 h 后取 5 mL 培养液 1 500 r/min($r=15$ cm)离心 5 min 收集细胞,细胞沉淀参照 Invitrogen 说明书提供的方法配制破菌缓冲液(50 mmol/L 磷酸钠缓冲液,1 mmol/L EDTA,体积分数 5%甘油,1 mmol/L PMSF)并进行玻璃珠破碎抽提蛋白。取以上时间点的样品(蛋白总量为 40 μg)进行 SDS PAGE 电泳后,电转印至硝酸纤维素膜(NC)上,电压 100 V,电转移 60 min,分别应用鼠抗人 PSMA 单克隆抗体 Y/PSMA1 和鼠抗 Xpress 表位单克隆抗体进行 Western blot 分析。

2 结果

2.1 pYES2/NT-PSMA 酵母重组子的构建

酶切结果显示 PSMAcDNA 片段(2.2 kb)已克隆入酿酒酵母诱导表达载体 pYES2/NT(图 1)。

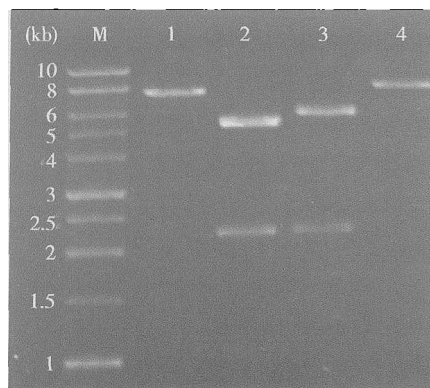


图 1 PSMA 酵母重组子的酶切鉴定

Fig.1 Identification of the recombinant plasmid pYES2/NT-PSMA

M: marker; Lane 1: pcDNA3.0-PSMA/*Bam*H I; Lane 2: pcDNA3.0-PSMA/*Bam*H I + *Xho* I; Lane 3: pYES2/NT-PSMA/*Bam*H I; Lane 4: pYES2/NT-PSMA/*Bam*H I + *Xho* I

2.2 酵母的 pcDNA3.0-PSMA 质粒转化及阳性转化子的筛选

感受态酿酒酵母菌转化重组质粒后,经尿嘧啶筛选出阳性转化子,30 ℃孵育 2~4 d 平均每个培养板可获得 200~500 个阳性转化子。

2.3 重组 pYES2/NT-PSMA 在酿酒酵母 INVSc1 中的诱导表达和 Western blot 分析

携有重组质粒 pYES2/NT-PSMA 的宿主菌 INVSc1 进行半乳糖诱导表达,菌体裂解物分别应用鼠抗人 PSMA 单克隆抗体 Y/PSMA1 和鼠抗 Xpress 表位单克隆抗体进行 Western blot 分析。结果显示,

重组工程菌可表达两种 rhPSMA, 相对分子质量分别为 $M_r=100 \times 10^3$ 及 $M_r=85 \times 10^3$, 且在半乳糖诱导表达约 9 h 后达到表达高峰(图 2,3)。

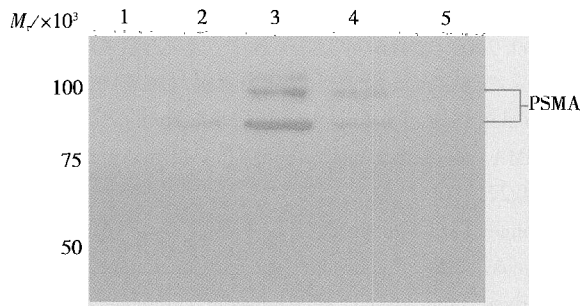


图 2 不同时间酵母中 PSMA 表达情况 (用抗 X-press 单克隆抗体)

Fig.2 PSMA expression at different time (anti-Xpress monoclonal antibody)

Lane 1: 0 h; Lane 2: 4 h; Lane 3: 9 h; Lane 4: 14 h; Lane 5: 19 h

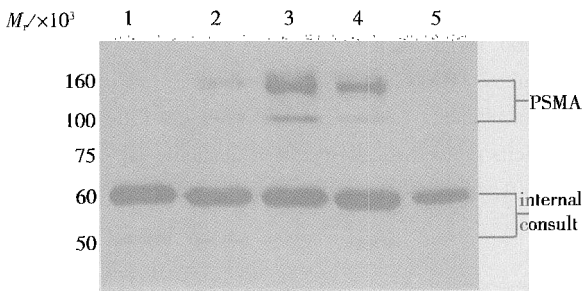


图 3 不同时间酵母中 PSMA 表达情况 (用抗 PSMA 单克隆抗体)

Fig.3 PSMA expression at different time (anti-PSMA monoclonal antibody)

Lane 1: 0 h; Lane 2: 4 h; Lane 3: 9 h; Lane 4: 14 h; Lane 5: 19 h. internal control: two non-specific strips by identification of Y/PSMA1

3 讨论

hPSMA 是一种 II 型跨膜糖蛋白, 由 750 个氨基酸组成, 理论相对分子质量为 $M_r=84 \times 10^3$, 存在有十个潜在的 N-连接糖基化位点, 糖基化的 PSMA 相对分子质量 $M_r=100 \times 10^3$ 。我们将 hPSMA cDNA 全序列克隆入酿酒酵母表达载体 pYES2/NT 构建重组质粒 pYES2/NT-PSMA, 并转化宿主菌 INVSc1, 阳性重组子经扩增、诱导表达融合了 Xpress 多肽的 rhPSMA。我们分别用 anti-Xpress 和 Y/PSMA1 两种单克隆抗体对转化宿主菌的全蛋白进行 Western blot 分析, 结果均显示在 $M_r=100 \times 10^3$ 和 $M_r=84 \times 10^3$ 处各有一条特异性的 rhPSMA 表达带。而应用单克隆抗体 Y/

PSMA1 进行 Western blot 分析, 我们亦检测到在 $M_r=60 \times 10^3$ 和 $M_r=50 \times 10^3$ 的两处蛋白条带。由于重组酵母真核表达质粒 pYES2/NT-PSMA 是一种半乳糖诱导表达质粒, rhPSMA 的表达需要半乳糖参与诱导方可进行, 而实验结果显示: 未经半乳糖诱导的转化酵母菌(半乳糖诱导时间为 0 h)即存在有此两种蛋白, 且它们的表达量不随半乳糖诱导表达时间而改变, 因此我们分析这两条蛋白条带是单克隆抗体 Y/PSMA1 所识别的两个非特异性蛋白条带。而此两处非特异性的蛋白条带, 恰恰为我们更好地比较分析转化酵母菌中 rhPSMA 的表达情况, 提供了一个颇为理想的内参照。

由于单克隆抗体 anti-Xpress 可识别融合蛋白的 N 末端 Xpress 标识表位, 而单克隆抗体 Y/PSMA1 可特异地识别 PSMA 的 C 末端抗原表位 (716~723 氨基酸)^[6], 实验结果显示转化宿主菌可表达两种相对分子质量不同的 rhPSMA 全蛋白。这一结果与 Holmes 等^[7]报道的由前列腺癌活体标本及 Lncap 细胞株表达的糖基化和经去糖基化处理的 PSMA 的相对分子质量相一致, 从而进一步提示在我们构建的转化宿主工程菌中成功表达出了糖基化和未糖基化的两种 rhPSMA。虽然 Western blot 分析中 $M_r=100 \times 10^3$ 的糖基化 rhPSMA 条带存在着部分漂移, 我们分析这跟宿主菌中 rhPSMA 与天然 PSMA 间糖基化方式的差异有关。有研究显示由于生物种类差异, 宿主细胞中重组蛋白的糖基化一般是通过在糖基化位点加以 N 连接的甘露糖来完成, 而只有一部分的重组蛋白能够完成与天然蛋白相一致的糖基化过程^[8]。

在酿酒酵母中成功诱导表达 PSMA 具有重要的意义。PSMA 作为前列腺癌特异性抗原, 已成为抗前列腺癌疫苗研制的重要靶点, 目前虽然肿瘤抗原疫苗具备高度的靶向性、可靠的安全性和简便的制备方法等特点, 但是以肿瘤特异性抗原(TSA)或肿瘤相关性抗原(TAA)研制的肿瘤抗原疫苗因为其较弱的抗原性, 往往只能诱导机体产生体液免疫应答, 而不能诱导出有效的细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)介导的细胞免疫应答。通过佐剂增强肿瘤抗原疫苗的免疫原性, 进而诱导机体产生特异性的 CTL 应答, 已成为人们的共识。Stubbs 等^[9]研究发现基因重组酵母肿瘤疫苗既携带肿瘤特异性抗原, 又能发挥佐剂效应诱导出特异性 CTL 效应治疗淋巴瘤。我们应用基因亚克隆技术, 对 rhPSMA 基因片段在酿酒酵母菌中的表达情况进行了研究, 获得了糖基化和未糖基化的两种 rhPSMA 全蛋白。而蛋白翻

译后加工、修饰对其免疫原性具有重要意义,且酵母菌的某些组分可能发挥免疫佐剂的作用而提高 PSMA 疫苗的免疫活性。转化酵母菌所表达的这两种糖基化和未糖基化的 rhPSMA, 为我们进一步探讨其免疫活性并完成抗前列腺癌重组酵母 PSMA 疫苗的研制奠定了良好的基础。

参考文献:

- [1] 黄海, 黄健, 潘秋辉, 等. 中国人前列腺特异性膜抗原基因的克隆及鉴定 [J]. 中山大学学报(医学科学版), 2005, 26(1): 84-7.
- [2] Xiao Z, Adam BL, Cazares LH, *et al.* Quantitation of serum prostate-specific membrane antigen by a novel protein biochip immunoassay discriminates benign from malignant prostate disease[J]. *Cancer Res*, 2001, 61(16): 6029-33.
- [3] Mincheff M, Zoubak S, Altankova I, *et al.* Human dendritic cells genetically engineered to express cytosolically retained fragment of prostate-specific membrane antigen prime cytotoxic T-cell responses to multiple epitopes [J]. *Cancer Gene Ther*, 2003, 10 (12): 907-17.
- [4] Foss CA, Mease RC, Fan H, *et al.* Radiolabeled small-molecule ligands for prostate-specific membrane antigen: *in vivo* imaging in experimental models of prostate cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(11):4022-8.
- [5] Kuratsukuri K, CY Wang, T Sone, *et al.* Induction of antibodies against prostate-specific membrane antigen (PSMA) by vaccination with a PSMA DNA vector[J]. *Eur Urol*, 2002, 42(1):67-73.
- [6] Zhu ZY, Zhong CP, Xu WF, *et al.* PSMA mimotope isolated from phage displayed peptide library can induce PSMA specific immune response[J]. *Cell Research*, 1999, 9(4):271-80.
- [7] Holmes EH, Greene TG, Tino WT, *et al.* Analysis of glycosylation of prostate-specific membrane antigen derived from LNCaP cells, prostatic carcinoma tumors, and serum from prostate cancer patients [J]. *Prostate Suppl*, 1996, 7:25-9.
- [8] Xiao Z, Jiang X, Beckett ML, *et al.* Generation of a baculovirus recombinant prostate-specific membrane antigen and its use in the development of a novel protein biochip quantitative immunoassay[J]. *Protein Expr Purif*, 2000, 19(1):12-21.
- [9] Stubbs AC, Martin KS, Coeshott C, *et al.* Whole recombinant yeast vaccine activates dendritic cells and elicits protective cell-mediated immunity [J]. *Nat Med*, 2001, 7(5):625-9.
- [10] (编辑 张敏瑞)

- (上接第 630 页 from page 630)
- randomized prospective study of posterolateral lumbar fusion: outcomes with and without pedicle screw instrumentation[J]. *Spine*, 1999, 24(5):553-60.
- [11] Minamide A, Tamaki T, Kawakami D, *et al.* Experimental Spinal fusion using sintered bovine bone coated with type I collagen and recombinant human bone morphogenetic protein-2[J]. *Spine*, 1999, 24(18): 1863-72.
- [12] Curylo LJ, Johnstone B, Petersilge CA, *et al.* Augmentation of spinal arthrodesis with autologous bone marrow in a rabbit posterolateral spine fusion mode [J]. *Spine*, 1999, 24(5):434-9.
- [13] Yee, AJM, Bae HW, Friess D, *et al.* Accuracy and interobserver agreement for determinations of rabbit posterolateral spinal fusion[J]. *Spine*, 2004, 29(12):1308-13.
- [14] Cheng JCY, Guo X, Law LP, *et al.* How does recombinant human bone morphogenetic protein-4 enhance posterior spinal fusion? [J]. *Spine*, 2002, 27(5):467-74.
- [15] Suh DY, Boden SD, Louis-Ugbo J, *et al.* Delivery of recombinant human bone morphogenetic protein-2 using a compression-resistant matrix in posterolateral spine fusion in the rabbit and in the non-human primate [J]. *Spine*, 2002, 27(4): 353-60.
- [16] 匡代军, 陈松龄, 冉伟, 等. rhBMP-2 珊瑚复合人工骨诱导骨形成的动物实验研究[J]. 中山大学学报(医学科学版), 2003, 24(3S):17-9.
- [17] Minamide A, Kawakami D, Hashizume H, *et al.* Evaluation of carriers of bone morphogenetic protein for spinal fusion[J]. *Spine*, 2001, 26(8): 933-9.
- [18] Kraiwattanapong C, Boden SD, Louis-Ugbo J, *et al.* Comparison of healos/bone marrow to INFUSE(rhBMP-2/ACS) with a collagen-ceramic sponge bulking agent as graft substitutes for lumbar spine fusion[J]. *Spine*, 2005, 30(9):1001-7.
- [19] Boden SD, Martin GJ, Morone M, *et al.* The use of coralline hydroxyapatite with bone marrow, autogenous bone graft, or osteoinductive bone protein extract for posterolateral lumbar spine fusion[J]. *Spine*, 1999, 24(4): 320-7.
- [20] Peterson B, Iglesias R, Zhang J, *et al.* Genetically modified human derived bone marrow cells for posterolateral lumbar spine fusion in athymic rats: beyond conventional autologous bone grafting[J]. *Spine*, 2005, 30 (3): 283-90.
- (编辑 张敏瑞)