

MAGE-3 基因的表达、纯化及其抗血清的制备

肖 刚, 张文敏, 张 萌, 谢 丹, 郭爱林, 文剑明
(中山大学中山医学院病理学教研室, 广东 广州 510080)

摘 要:【目的】构建 MAGE-3 的原核表达质粒, 表达、纯化蛋白并制备多克隆抗体。【方法】利用 RT-PCR 方法扩增 MAGE-3 基因片段, 接入原核表达载体 pGEX-4T-1, 构建 MAGE-3 的原核表达质粒 pGEX-MAGE-3 并测序。将该质粒转化大肠杆菌 BL21 进行诱导表达, 并通过谷胱甘肽巯基转移酶纯化系统进行分离纯化。用纯化的融合蛋白 GST-MAGE-3 免疫新西兰大白兔, ELISA 法测定抗体效价, 饱和硫酸铵沉淀法纯化抗体, Western-blot 检测抗体活性。【结果】构建了 pGEX-MAGE-3 原核表达质粒, 含有该质粒的大肠杆菌经 IPTG 诱导后表达一相对分子质量约为 72×10^3 的蛋白, 经 GST 融合蛋白纯化系统纯化, 得到了 MAGE-3 的重组蛋白 GST-MAGE-3。制备了兔抗 GST-MAGE-3 抗体。Western blot 证实该抗体可与 GST-MAGE-3 蛋白特异性结合。【结论】获得了肿瘤抗原 MAGE-3 的纯化重组蛋白及其特异的多克隆抗体, 为进一步研究 MAGE-3 抗原在肿瘤免疫治疗中的作用提供了一件检测工具。

关键词: 黑色素瘤抗原-3; 原核表达; 重组蛋白; 纯化; 抗体

中图分类号: R735.2

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2005)02-0176-04

Prokaryotic Expression and Purification of MAGE-3 Gene and Preparation of Polyclonal Antibody against MAGE-3

XIAO Gang, ZHANG Wen-min, ZHANG Meng, XIE Dan, GUO Ai-lin, WEN Jian-ming
(Department of Pathology, Zhongshan Medical College, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】To construct MAGE-3 prokaryotic expression plasmid and express and purify protein for preparation of polyclonal antibody. 【Methods】MAGE-3 gene was amplified by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). After sequencing, the gene was cloned into the expression vector pGEX-4T-1 to construct MAGE-3 expression plasmid pGEX-MAGE-3. The *E.coli* BL21 contained the expression plasmid was induced by IPTG and the protein was purified with GSTrap FF column. White rabbits were immunized with the immunogen GST-MAGE-3. The titer was measured by ELISA and the polyclonal antibody was obtained. 【Results】The expression plasmid pGEX-MAGE-3 was constructed. The *E.coli* BL21 contained the plasmid expressed an 72×10^3 protein after being induced by IPTG and the 72 ku protein was purified by GSTrap FF column. The polyclonal anti-GST-MAGE-3 antibody could specifically recognize MAGE-3 protein in Western blot. 【Conclusion】In this study, the protein of human MAGE-3 segment was expressed and purified successfully, polyclonal anti-GST-MAGE-3 antibody has been prepared, which can be used as the diagnostic tool for further research of the MAGE-3 protein as a promising candidate in tumor immunotherapy.

Key words: MAGE-3; prokaryotic expression; recombinant protein; purification; antibody

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2005, 26(2): 176-179]

肿瘤的免疫治疗在预防肿瘤复发、转移、治疗微小残留肿瘤病灶等方面有其独特的优势, 是对传统治疗方法的重要补充^[1]。其分子基础是肿瘤细胞带有独特的肿瘤抗原, 可以调动机体的免疫系

统清除体内的肿瘤细胞, 达到治疗肿瘤的目的。1991年, van der Bruggen 等^[2]首先报道黑色素瘤抗原(melanoma antigen-encoding gene, MAGE)这一人类肿瘤抗原。它是一种肿瘤排斥抗原, 同时也是肿

收稿日期: 2004-09-20

基金项目: 广州市科技计划项目基金资助项目(2003J1-C0221)

作者简介: 肖 刚(1974-), 男, 山西大同人, 博士生; 文剑明, 教授, 课题负责人, 通讯作者。E-mail: jmwen@gzsums.cn

瘤特异性抗原,是肿瘤特异性免疫治疗理想的靶分子。MAGE 基因是一个大家族,包括 12 个 MAGE-A、4 个 MAGE-B 和 1 个 MAGE-C 成员。在 MAGE 基因家族中,MAGE-3 是恶性肿瘤中表达率最高的成员之一。本研究的目的是构建 MAGE-3 原核表达质粒,在大肠杆菌中进行表达并分离得到纯化的 MAGE-3 重组蛋白,进而制备 MAGE-3 的抗血清,获得特异的多克隆抗体,为进一步研究 MAGE-3 全蛋白肿瘤疫苗提供实验资料。

1 材料和方法

1.1 引物设计

根据 MAGE-3 cDNA 序列,按照引物设计原则设计引物(由上海生工生物技术有限公司合成)。上游引物 P1:5'GTAGTCCGACACATCATGCCTCTTGAGCAG,包含了 *Sal* I 的酶切位点(划线部分);下游引物 P2:5'CATGCGGCCCGCTCTCTCAA AACCAC,包含了 *Not* I 的酶切位点(划线部分)。用该对引物扩增的 PCR 产物预期目的片段长度为 958 bp。

1.2 MAGE-3 基因原核表达质粒的构建

H4M 肝癌细胞(由本室原代培养建株)用含有 150 mL/L FCS 的 RMPI1640 培养液常规培养。用 Trizol(Sigma 公司产品)一步法提取总 RNA,溶于 30 μ L DEPC 处理的去离子水。逆转录反应按试剂盒(MBI 公司产品)说明操作。取 2 μ L cDNA 用 P1 与 P2 引物进行 PCR 反应。反应条件:94 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 60 s,30 个循环。所得目的片段回收后插入 pGEX-4T-1(本室保存)的 *Sal* I 与 *Not* I 之间,所得质粒命名为 pGEX-MAGE-3,进行测序。

1.3 MAGE-3 基因在大肠杆菌中的表达

含有 pGEX-MAGE-3 质粒的大肠杆菌 BL-21 接种含氨苄青霉素 100 μ g/mL 的 LB 培养基,震荡培养过夜,取 0.5 mL 过夜菌接种于含氨苄青霉素 100 μ g/mL 的 2 \times 氨苄青霉素酵母提取物胰化蛋白胨(yeast extract tryptone ampicillin,YTA)培养液 4.5 mL 中,37 $^{\circ}$ C 剧烈震荡培养至 $A_{600\text{nm}}=0.5$,加入 100 mmol/L IPTG 至终浓度为 1 mmol/L,25 $^{\circ}$ C 剧烈震荡培养 4 h,取 1 mL 菌液进行 SDS-PAGE 鉴定^[3]。

1.4 MAGE-3 蛋白的分离与纯化

取 1 000 mL 诱导表达的菌液,4 000 \times g 4 $^{\circ}$ C 离心 15 min。菌体沉淀用 50 mL PBS 重悬,冰浴,超声裂解细菌,冰浴放置 30 min。12 000 \times g 4 $^{\circ}$ C 离心 20 min。取上清液,SDS-PAGE 鉴定目的蛋白的可溶性。5 mL PBS 平衡 1 mL GSTrap FF 柱(Pharmacia 公司产品),上清液经 0.45 μ m 针头过滤器过滤后上样,0.2~1 mL/min,10 mL PBS 洗脱未结合成分。10 mL 洗脱液(50 mmol/L Tris \cdot Cl,10 mmol/L 还原型谷胱甘肽,pH8.0)洗脱蛋白,收集洗脱峰,经 SDS-PAGE 电泳及凝胶薄层扫描鉴定纯化蛋白的纯度。PBS 透析 24 h,每 6 h 更换 PBS 1 次,-70 $^{\circ}$ C 保存。

1.5 兔抗融合蛋白 GST-MAGE-3 抗体的制备

取纯化的融合蛋白 GST-MAGE-3 600 μ L(约 600 μ g)与 600 μ L 弗氏完全佐剂彻底乳化,经背部皮下多点注射新西兰白兔。4 周后取纯化的融合蛋白 GST-MAGE-3 300 μ L(约 300 μ g)与 300 μ L 弗氏不完全佐剂彻底乳化,进行第 2 次免疫,之后第 2、4 周分别加强免疫 1 次。最后 1 次加强免疫后 8 d 耳缘静脉采血 20 mL,测定血清中抗体的效价。并于最后 1 次免疫后 10 d,颈动脉插管放血,分离血清,置-80 $^{\circ}$ C 保存。

1.6 ELISA 测定效价及抗体的纯化

ELISA(酶联免疫吸附分析)测定抗体效价,操作步骤按说明书:纯化后的融合蛋白 GST-MAGE-3 按 2 μ g/mL 用包被缓冲液稀释后包被酶联板,分别加入不同倍数的抗血清,HRP 标记的羊抗兔 IgG 抗体孵育,最后加 TMB 底物液显色,终止后用酶标仪测 A_{490} 值。

1.7 兔抗融合蛋白 GST-MAGE-3 抗体的纯化

往 20 mL 免疫兔血清中加等量的 PBS(pH 7.4),慢慢摇动避免形成气泡;4 $^{\circ}$ C 搅拌下,逐滴加入 20 mL 饱和硫酸铵溶液,此时即有大量的 IgG 析出,于冰箱中静置 30 min;4 $^{\circ}$ C 1 400 \times g 离心 30 min;弃上清,沉淀用 20 mL 预冷的 PBS 溶解,逐滴加入 10 mL 饱和硫酸铵溶液,使硫酸铵饱和度为 33%,置 4 $^{\circ}$ C 冰箱 30~60 min;1 400 \times g 离心 30 min,收集沉淀,沉淀用 20 mL 预冷的 PBS 溶解,获得纯化的 IgG 抗体溶液。PBS 透析 24 h,每 6 h 更换 PBS 1 次,-70 $^{\circ}$ C 保存。

1.8 兔抗融合蛋白 GST-MAGE-3 抗体的特性鉴定

用制备的兔抗融合蛋白 GST-MAGE-3 抗体对

原核表达蛋白作 Western blot 分析 (Western blot 试剂盒为 Cell Signaling 公司产品)。菌体蛋白经 SDS-PAGE 后转移至 PVDF 膜上,以 50 g/L 脱脂奶粉室温封闭后依次滴加 1:500 的兔抗融合蛋白 GST-MAGE-3 血清及 1:10 000 的 HRP 标记的羊抗兔 IgG 抗体。最后加入化学发光试剂后,X 片显影、定影。

2 结果

2.1 MAGE-3 原核表达质粒的构建

通过 PCR 获得了约 958 bp 的 MAGE-3 基因片段,成功地构建了 MAGE-3 的原核表达质粒 pGEX-MAGE-3,经测序与 GenBank 公布的一致 (DNA 序列分析由上海博亚生物技术有限公司完成)。质粒的酶切鉴定结果见图 1。

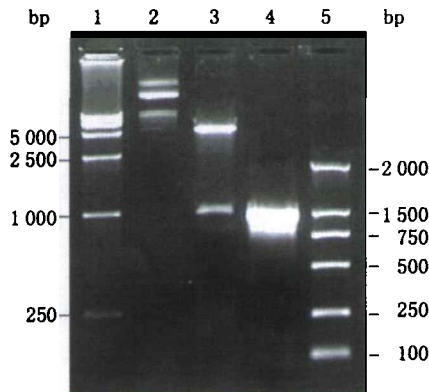


图1 原核表达质粒 pGEX-MAGE-3 的双酶切和 PCR 鉴定

Fig.1 Prokaryotic expression plasmid pGEX-MAGE-3 was identified by double enzyme digestion and PCR

Lane 1: Marker DL 15 000; Lane 2: Recombinant plasmid pGEX-MAGE-3; Lane 3: Recombinant plasmid pGEX-MAGE-3 digested with *Sal* I and *Not* I; Lane 4: PCR product of the recombinant plasmid; Lane 5: Marker DL 2 000

2.2 融合蛋白的诱导表达

经 IPTG 诱导后,含重组质粒的大肠杆菌能够表达相对分子质量 $M_r=72 \times 10^3$ 的蛋白,其中 GST 蛋白 $M_r \approx 26 \times 10^3$,见图 2。

2.3 融合蛋白的分离纯化

超声裂解细菌后取可溶性部分用 GSTrap FF 柱分离纯化,得到了 $M_r \approx 72 \times 10^3$ 的蛋白,见图 2。

2.4 抗体的制备与鉴定

用纯化的融合蛋白 GST-MAGE-3 作抗原,免疫大白兔,所得的抗体是多克隆抗体。用 ELISA 检

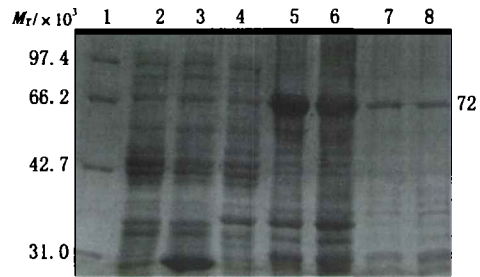


图2 pGEX-MAGE-3 在大肠杆菌的表达产物及其纯化产物

Fig.2 The expressed product of pGEX-MAGE-3 in *E. coli* and its purified product (SDS-PAGE)

Lane 1: Protein marker; Lane 2: pGEX-4T-1 transformants without IPTG induction; Lane 3: pGEX-4T-1 transformants with IPTG induction for 4 h; Lane 4: pGEX-MAGE-3 transformants without IPTG induction; Lane 5, 6: pGEX-MAGE-3 transformants with IPTG induction for 4 h; Lane 7, 8: Purified product of soluble protein of pGEX-MAGE-3 transformants

测抗血清的效价为 1 600。用制备的多克隆抗体对融合蛋白 GST-MAGE-3 作 Western blot 分析,在约 72 ku 处呈现特异性的结合条带与预计结果相符见图 3。表明所制备的抗体具有较好的活性,可与免疫原特异性结合。

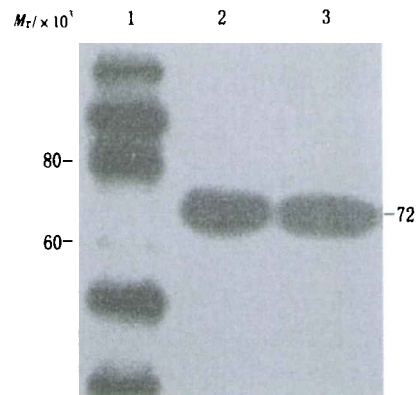


图3 MAGE-3 的 Western blot 分析

Fig. 3 Western blot analysis of GST-MAGE-3 protein

Lane 1: Protein marker; Lane 2, 3: GST-MAGE-3 protein

3 讨论

肿瘤免疫治疗的关键是发现并利用肿瘤特异的抗原。近年来,随着肿瘤抗原鉴定方法学的进展,越来越多的肿瘤抗原在分子水平得以鉴定。其中,肿瘤-睾丸 (cancer-testis, CT) 抗原备受关注。MAGE-3 是 CT 抗原的一个典型代表,它在黑色素瘤、肺癌、肝癌、食道癌和骨肉瘤中都有非常高的

表达率^[4,5],而在除睾丸和胎盘外的正常组织中没有表达。因而,MAGE-3是一个理想的可用于主动免疫治疗的靶抗原。国外相关研究已进展到:以该抗原的表位肽段和这些肽处理过的树突状细胞(dendritic cells DCs)来免疫动物和应用于病人的肿瘤免疫治疗,并已取得了一定的疗效。

MAGE-3基因位于X染色体q28区,含有3个外显子,开放阅读框位于第3个外显子,46×10³的胞质蛋白,由315个氨基酸残基组成。在MAGE-3蛋白分子内已知至少有5个MHC-I类分子限制的表位和4个MHC-II类分子限制的表位^[6,7],并不断有新的表位发现。人工合成MAGE-3分子内MHC-I类分子限制CTL表位肽段,在体外确能诱导出特异性抗肿瘤免疫应答,但小肽在体内很容易被降解,且受特定的HLA表型的限制。根据MAGE-3已知抗原表位设计多表位疫苗可以激发针对几种不同抗原表位的CTLs,但由于对表位的认知还不够充分,所谓的多表位疫苗可能还是遗漏了某些重要的表位。因此,获得包含多抗原表位的MAGE-3完整蛋白对提高肿瘤免疫治疗效果非常重要。在本研究中,使用MAGE-3完整蛋白作为疫苗,理论上它不仅含CTL表位,而且还包含CD4⁺T细胞表位,免疫效果应更好,且其作用不被特定的HLA表型限制,使用更方便、范围更广泛^[8]。

本研究中采用pGEX-4T-1原核表达质粒,对于表达、纯化和检测大肠杆菌表达的融合蛋白是有用的工具。pGEX-4T-1带有非常强的T7启动子、终止子和抗Amp基因,其本身表达1个26×10³的GST蛋白,该系统可以克服转录与转录后水平对外源基因表达可能带来的不利影响,便于融合基因翻译起始,是一种高效的蛋白表达载体,并可用商品化的谷胱甘肽琼脂糖通过亲和层析方便地从细菌裂解物中纯化蛋白,分子内的GST部分还可通过蛋白酶消化被释放,因此获得的蛋白适合抗体和疫苗的制备。

本实验得到纯度较高的MAGE-3重组蛋白。并可进一步利用蛋白酶去除GST,得到MAGE-3蛋白。用该蛋白负载抗原提呈细胞,刺激特异性T细胞增殖,诱导MAGE-3特异性CTL应答,对MAGE-3阳性肿瘤细胞进行杀伤,达到免疫治疗肿瘤的目的。这也是本研究下一步的实验方向。

制备高效价的抗体是示踪基因的表达和研究

基因功能的首要前提^[9]。单克隆抗体具有特异性好,性质稳定和重复性好的优点,但它制备复杂,费时费力,且存在局限性^[10]。兔多克隆抗体的制备具有简单、快速和效果好等特点^[11]。本研究中利用重组的MAGE-3蛋白免疫新西兰大白兔,成功获得效价为1:1600的MAGE-3的多克隆抗体血清,为进一步深入研究MAGE-3蛋白的生物学功能及其在肿瘤免疫治疗中的作用提供了方便快捷的检测用抗体。

参考文献:

- [1] 黄亚渝,隋延仿,叶菁,等. MAGE-n的原核表达与分离纯化[J]. 免疫学杂志, 2004,20(2): 103-7.
- [2] van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, et al. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma[J]. Science, 1991, 254(5038):1643-7.
- [3] 叶菁,隋延仿,李增山,等.超抗原SEA的基因克隆、原核表达与鉴定[J]. 免疫学杂志, 2002,18(6):418-20.
- [4] 倪兵,李燕秋,王莉,等.人肿瘤特异抗原MAGE-3基因疫苗的构建和表达[J]. 第三军医大学学报, 2002,24(10):1133-6.
- [5] 贾正才,吴玉章. MAGE家族研究进展[J]. 国外医学肿瘤学分册, 2000,27(增刊):42-5.
- [6] Chau P, Vantomme V, Stroobant V, et al. Identification of MAGE-3 Epitopes presented by HLA-DR molecules to CD4⁺T lymphocytes[J]. J Exp Med, 1999, 185(5): 767-77.
- [7] Eifuku R, Takenoyama M, Yoshino I, et al. Analysis of MAGE-3 derived synthetic peptide as a human lung cancer antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes [J]. Int J Clin Oncol, 2001,6(1):34-9.
- [8] 吴金民,孙晓东,刘杏娥. 人MAGE-3真核表达载体的构建与表达[J]. 实用肿瘤杂志, 2003,18(4):271-4.
- [9] Ed Harlow, David I. Antibodies, a laboratory manual[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998. 282-318, 615-23.
- [10] Saito H, Taniguchi M, Fukasawa T, et al. Establishment of internal-image anti-idiotypic monoclonal antibodies to a human antibody to lung cancer [J]. Cancer Immunol Immunother, 1997, 44(2):83-7.
- [11] 董国伟,王沫,刘贤进,等.兔抗甲胺磷多克隆抗体的制备[J]. 华中农业大学学报, 2001,20(4): 340-3.

(编辑 黄小廷)