

重组杆状病毒 TnNPV-KAI1 的构建及其在 Sf 细胞中的初步表达^①

胡卫列¹ 梅 骅¹ 李迎秋² 龙紫新² 王珣章²

(1 中山医科大学附属第一医院泌尿外科; 广州, 510080 2 中山大学生物防治国家重点实验室)

摘要 目的: 为了制备 KAI1 抗体^②, 本研究利用杆状病毒表达载体系统在 Sf 细胞中初步表达了 KAI1 基因^②。方法: 利用 PCR 在 KAI1 基因的 5' 端引入合适的克隆酶切位点 *EcoRI*, 经共转染、空斑筛选等技术, 构建重组杆状病毒 TnNPV-KAI1, 通过 SDS-PAGE 及 Western 免疫印迹, 检测 KAI1 基因在 Sf 细胞中的表达。结果: 重组病毒 TnNPV-KAI1 感染的细胞裂解液中有一条分子质量约 30 ku 的特异抗原反应带。结论: KAI1 在 Sf 细胞中得到表达, 表达产物具有抗原特异性, 为制备 KAI1 抗体提供新途径。

关键词 基因; 抑制; 肿瘤; 基因表达; 杆状病毒科; 斜纹夜蛾属

中图分类号 Q 753

THE CONSTRUCTION OF RECOMBINANT BACULOVIRUS TnNPV-KAI1 AND ITS EXPRESSION IN Sf CELLS

Hu Weilie Mei Hua Li Yingqiu Long Qingxin Wang Xunzhang

(Department of Urology, First Affiliated Hospital,
Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510080)

Abstract Objective: In order to prepare KAI1 antibody, the baculovirus expression system was employed to express KAI1 gene. **Methods:** Using PCR technique, the *EcoRI* recognizing sequences were inserted into the 5' terminal of KAI1 gene for easily cloning. By using co-transfection, plaque assay, etc, the recombinant baculovirus TnNPV-KAI1 was constructed. The expression product of KAI1 gene was analyzed by SDS-PAGE and Western blotting. **Results:** In cell lysate of infected cells, a 30 ku protein with antigen specificity was detected. **Conclusions:** The results suggested that KAI1 gene was expressed in insect cells, and a new way to prepare KAI1 antibody was found.

Subject headings genes, suppressor, tumor; gene expression; baculoviridae; spodoptera

肿瘤转移是肿瘤病人死亡和治疗失败的主要原因。KAI1(kang ai 1)基因, 中文含义为“抗癌 1 号”, 是近年来发现的 1 种新的肿瘤转移抑制基因, 国外在前列腺癌的研究中得到证实^①。为了制备并应用 KAI1 抗体来研究 KAI1 基因在我国前列腺癌病人中的表达情况, 我们在昆虫 Sf (*Spodoptera frugiperda*) 细胞中初步表达了 KAI1 基因。

1 材料与方 法

1.1 质粒、病毒与细胞

pSPORT1-KAI1 质粒由美国 John Hopkins 大学 Dong Jingtang 博士惠赠, 其中 1.6 kb 的 KAI1 cDNA 经 *SalI* 和 *NotI* 位点插入 pSPORT1, 构成重组质粒 pSPORT1-KAI1。杆状病毒载体质粒 pSX-IVVI⁺X3(5.8 kb)、亲本杆状病毒株 TnNPV-Gal⁺ 及昆虫 Sf 9 细胞由中山大学重点实验室王珣章教授惠赠。

1.2 KAI1 单克隆抗体

购自美国 PharMingen 公司。

1.3 PCR 引物的设计及扩增

由于 KAI1 基因的 5' 端没有合适的酶切位点,

通过计算机软件 DNASIS 对 *KAI1* 基因 5'端序列的分析,设计并合成 1 条 *KAI1* 基因 5'端引物:5'-CAGGAATTCGGGATG-3',其中小写字母为引入的 *Eco* RI 识别序列。使用该引物与 pSPORT1-*KAI1* 载体上的 pUC Forward 测序引物(该引物位于 *KAI1* 基因的 3'端),以质粒 pSPORT1-*KAI1* 为模板,在 PE 公司 480 型 PCR 仪上扩增 *KAI1* 基因,共 30 个循环,每 1 循环:94 °C 变性 0.5 min, 55 °C 退火 0.5 min, 72 °C 延伸 1 min。

1.4 重组转移载体质粒构建

将 PCR 扩增产物电泳,利用 DEAE-硝酸纤维素膜回收 *KAI1* 基因片段,并加以纯化^[2],经补平及 *Eco* RI 酶切后,与 *Eco* RI 和 *Sma* I 酶切的 pSXIVVI⁺X3 连接,连接产物转化大肠杆菌 DH5 α ,铺板挑选菌落,快速酚法粗筛质粒,进而酶切鉴定。

1.5 共转染法构建重组杆状病毒

本研究使用磷酸钙沉淀法,将重组转移载体质粒 DNA 及亲本杆状病毒 DNA,同时导入对数生长期 Sf 细胞($1 \times 10^9/L$),27 °C 培养 4~6 d,可得到重组病毒,收集感染上清,以预期的重组病毒的筛选标记,进行空斑纯化,反复筛选 3~4 次,可得所需的纯的重组杆状病毒毒株。

1.6 SDS-PAGE 及 Western 免疫印迹检测

参考文献[2]进行。

2 结果

2.1 PCR 扩增结果

将 PCR 扩增产物进行电泳,得到 1 条特异性扩增带,大小约 1.5 kb,其大小与预计含 800 bp *KAI1* 基因、600 bp *KAI1* 基因 3'端非编码序列及 3'端 90 bp 的 pSPORT1 序列,共 1.5 kb 相符合,序列分析表明扩增产物确为 *KAI1* 基因。

2.2 重组质粒 pSXIVVI⁺-*KAI1* 的鉴定结果

重组子经 *Eco*RI/*Xba*I *Xba*I 是从 pSPORT1 引入的酶切位点双酶切后,0.8% 琼脂糖电泳显示两条带,其大小分别为 5.8 kb、1.5 kb(图 1),说明 *KAI1* 基因已克隆到 pSXIVVI⁺X3 中,构建成 *KAI1* 杆状病毒载体,命名为 pSXIVVI⁺X3-*KAI1*。构建过程如图 2。

2.3 重组病毒株 TnNPV-*KAI1* 的构建

经同源重组,转移载体质粒 pSXIVVI⁺X3-*KAI1* 中反方向的多角体基因和 *KAI1* 基因,置换了亲本病毒 TnNPV-*Gal*⁺ 中的 β 半乳糖苷酶(β -

Gal)基因,因此可以以多角体的形成及白色空斑的形成(β -*Gal* 遇 X-*gal* 呈蓝色颜色反应),纯化出重组病毒株。

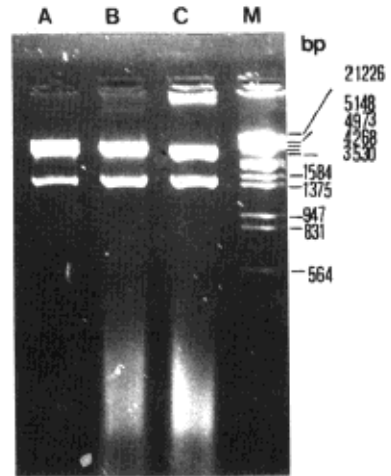


图 1 pSXIVVI⁺X3-*KAI1* 的酶切鉴定图谱

Fig. 1 Restriction digestion pattern of pSXIVVI⁺X3-*KAI1*
A, B; pSXIVVI⁺X3-*KAI1* digested with *Eco* RI/*Xba* I; C; pSPORT1-*KAI1* digested with *Sal*I / *Not* I ; M; λ DNA digested with *Eco*RI/*Hind* III

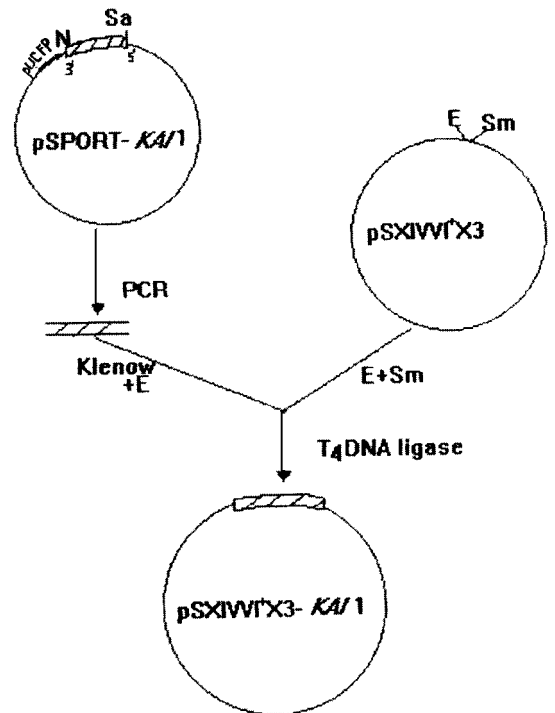


图 2 pSXIVVI⁺X3-*KAI1* 的构建过程

Fig. 2 Construction of pSXIVVI⁺X3-*KAI1*

N: *Not* I, Sa: *Sal* I, E: *Eco* RI, Sm: *Sma* I pUC FP: pUC Forward Primer

2.4 *KAI1* 在 Sf 细胞中的表达鉴定

对重组病毒株 TnNPV-*KAI1* 及亲本毒株

TnNPV-*Gal*⁺ 分别感染的细胞的裂解液进行 SDS-PAGE 并转膜,用 *KAI1* 单克隆抗体作免疫印迹,结果显示,重组病毒株感染的细胞裂解液中有 1 条特异抗原反应带,分子质量约为 30 ku,与预计的 *KAI1* 基因的表达产物大小相符,说明 *KAI1* 基因在昆虫细胞中得到了表达(图 3)。

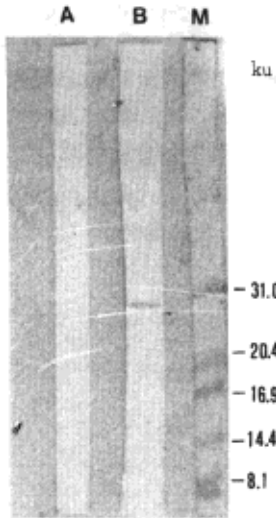


图 3 *KAI1* 基因在昆虫 Sf 9 细胞中表达产物的 Western 检测

Fig. 3 Western blotting detection of *KAI1* gene's expression in insect Sf 9 cells

A: Cells infected with parental virus B: Cells infected with recombinant virus M: Standard protein molecular weight marker

3 讨论

KAI1 基因位于人类染色体 11p11.2, 表达蛋白质为 267 个氨基酸, 分子质量为 29 610 U, 具有 4 个疏水区和 1 个含有 3 个潜在的 N-糖基化位点细胞外亲水区, 在人体许多组织中都有表达, 其中以前列腺等组织含量最丰富^[1]。前列腺癌是欧美国家较为常见的恶性肿瘤之一, 发病率和死亡率均居前列, 近年来前列腺癌在我国发病率也有增高趋势。以前人们依靠临床分期、病理分级来预测前列腺癌的恶性趋势, 但在具体病人的应用中并不满意, 而 *KAI1* 基因表达水平的下降, 与前列腺癌进展和转移密切相关^[3], 有望成为 1 种新的临床判断

转移的指标。

作为真核基因的高效表达载体系统, 近年来杆状病毒载体系统发展迅猛, 应用相当广泛^[4]。它具有较完备的翻译后加工修饰系统, 在该系统表达的真核基因产物能够正确折叠、形成二硫键、形成多聚体, 并得到翻译后修饰, 如糖基化、磷酸化、蛋白酶特异水解(如切除信号肽)等, 从而成为具有生物活性的产物^[4]。据统计, 至今已有数百种与医学相关的外源基因在杆状病毒载体系统中得到表达, 其中, 第一个为美国食品和药物管理局(FDA)批准上人体实验、拟用于预防艾滋病的基因工程疫苗, 就是应用该系统表达生产的^[5]。*KAI1* 的结构较复杂且含有 3 个潜在的 N-糖基化位点, 为了获得具有较好抗原性的 *KAI1* 蛋白, 故选用杆状病毒载体系统作表达。本研究首次将 *KAI1* 基因克隆到杆状病毒表达载体, 并在昆虫细胞中表达了 *KAI1* 基因, 为进一步制备 *KAI1* 抗体打下基础。由于 Western 免疫印迹只检测到 1 条约 30 ku 的抗原特异蛋白带, 可能是因为 *KAI1* 基因的表达量较低, 较难鉴定出是否有糖基化的 *KAI1*, 故有必要筛选高表达的毒株, 相关研究正在进行。

参 考 文 献

- 1 Dong J T, Lamb P W, Rinker-Schaeffer C W, *et al.* *KAI1*, a metastasis suppressor gene for prostate cancer on human chromosome 11p11.2. *Science*, 1995, 268: 884
- 2 Sambrook J, Maniatis T, Fritsch E A. *Molecular Cloning*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. 6.24 ~ 6.27
- 3 Dong J T, Suzuki H, Pin S S *et al.* Down-regulation of the *KAI1* metastasis suppressor gene during the progression of human prostatic cancer infrequently involves gene mutation or allelic loss. *Cancer Res*, 1996, 56: 4387
- 4 O'Reilly D R, Miller L K, Luckow V A. *Baculovirus expression vectors. A laboratory Manual*. New York: New York WH Freeman & Co, 1992. 200 ~ 231
- 5 Luckow V A, Summers M D. Trends in the development of baculovirus expression vectors. *Bio Technol*, 1988, 6: 47

(1997-09-01 收稿 1997-12-08 修回)