

【基础研究】

DOI:10.7683/xyxyxb.2016.12.003
收稿日期:2016-08-22
基金项目:全国大学生创新训练项目(编号:201410472040)。
作者简介:张青苗(1994-),女,河南南阳人,新乡医学院生命科学技术学院2012级本科学学生。
通信作者:张光谋(1965-),男,河南新乡人,学士,教授,硕士研究生导师,研究方向:肿瘤的发生机制;E-mail:951028@xxmu.edu.cn。

1 材料与方法

1.1 质粒 大肠杆菌 BL-21 和 PET-28a 质粒由新乡医学院合成生物实验室保存。

1.2 细菌 大肠杆菌 BL-21 (DE3) 由新乡医学院复杂型疾病治疗实验室保存。

1.3 试剂与仪器 原核表达载体 PET-28a 和 HSP65 基因全长均由新乡医学院复杂型疾病治疗实验室保存;卡纳霉素、聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 产物回收试剂盒、琼脂糖胶回收试剂盒和质粒抽提试剂盒均为上海生工生物工程技术服务有限公司产品; *Nco* I 与 *Not* I 内切酶及 DNA 连接试剂盒购自大连宝生物生物技术有限公司;其他试剂均为分析纯级。

1.4 方法

1.4.1 目的片段扩增 根据 HSP65 结合载体 PET-28a-HSP65, 由 Oligo6 软件设计引物扩增 HSP65, HSP65 引物上游序列: 5'-CATGCCATGGCCAAGCAATT-3' (含 *Nco* I 酶切位点); HSP65 引物下游序列: 5'-TTTTCCTTTTGC GGCCGCTTAGAAATCCATGCA-3' (含 *Not* I 酶切位点)。95 ℃ 预变性 5 min; 94 ℃ 变性 1 min, 62.7 ℃ 退火 45 s, 72 ℃ 延伸 1 min, 30 个循环; 72 ℃ 延伸 5 min。扩增反应结束后, 取 5 μL 反应液进行质量分数 1% 琼脂糖电泳检测, 然后用 PCR 液体回收试剂盒进行扩增片段的回收。

1.4.2 PCR 产物酶切 将获得的 PCR 产物用 *Not* I 进行单酶切, 37 ℃ 条件下孵育 2 h。待反应结束后, 取 5 μL 上述反应液进行质量分数 1.7% 琼脂糖电泳检测酶切结果, 然后用 PCR 回收试剂盒回收, 所得产物溶于 ddH₂O, 用 *Nco* I 进行单酶切, 待反应结束后, 用 PCR 产物纯化试剂盒将反应产物进行纯化, 在纯化最后一步将产物溶于适当体积的洗脱缓冲液中。

1.4.3 载体质粒酶切 将本实验室保存的 PET-28a 质粒分别用 *Not* I 和 *Nco* I 限制性内切酶进行酶切, 待反应结束后, 取 5 μL 上述反应液进行质量分数 0.8% 琼脂糖电泳检测酶切结果, 然后用 PCR 回收纯化试剂盒回收纯化, 所得产物溶于洗脱缓冲液, -20 ℃ 保存备用。

1.4.4 连接 连接体系中目的片段 HSP65 的含量为 0.3 pmol, PET-28a 载体的含量为 0.03 pmol; 连接体系为 10 × T4 DNA 连接酶缓冲液 1 μL, T4 DNA 连接酶 1 μL, HSP65 经酶切后纯化产物 4 μL, 酶切后的质粒量为 0.9 mL, 加 ddH₂O 补至 10 μL, 反应在 16 ℃ 条件下过夜连接。

1.4.5 质粒转化与鉴定 挑单菌落于 5 mL 溶菌肉汤 (luria-bertani, LB) 培养基中, 37 ℃ 振荡培养过夜,

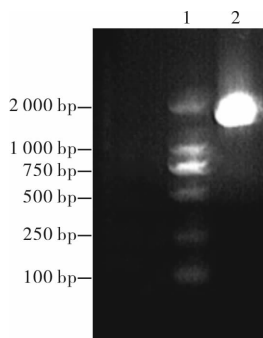
次日抽取 5 μL 接种于 20 mL 的 LB 培养基中, 37 ℃ 振荡培养 2.0 ~ 2.5 h; 然后将菌液转移到 2 个用冰预冷的 50 mL 无菌聚丙烯管中, 在冰上放置 10 min, 使培养物冷却至 0 ℃; 于 4 ℃ 下 4 100 r · min⁻¹ 离心 10 min, 回收细胞; 倒出培养液, 将管倒置 1 min 以使最后的痕量培养液流尽; 在沉淀的细胞中加入 12 mL 预冷的 0.1 mol · L⁻¹ CaCl₂ 溶液, 重悬每份细胞沉淀; 于 4 ℃ 下 4 100 r · min⁻¹ 离心 10 min, 回收细胞; 倒出培养液, 将管倒置 1 min 以使最后的痕量培养液流尽; 每管加入 800 μL 用冰预冷的 0.1 mol · L⁻¹ CaCl₂ 溶液, 重悬每份细胞沉淀; 每管加入 28 μL 二甲亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO), 轻轻混匀, 将悬液置冰上 15 min; 每份细胞悬液再加 28 mL DMSO, 轻轻旋转混匀, 置冰上 15 min; 迅速将悬液分装到冷却的无菌微量离心管中, 封紧管口, 贮存于 -70 ℃ 备用。取连接液 5 μL, 加入到制备好的感受态细胞悬液中, 充分混匀; 冰浴放置 30 min 后, 立即放入 42 ℃ 循环水浴中热休克 90 s, 再冰浴放置 2 min; 加入 800 μL 在 37 ℃ 水浴中预热的新鲜 LB 液体培养基, 37 ℃ 振荡培养 45 min; 4 000 r · min⁻¹ 离心 2 min 后, 弃去 700 μL 上清液; 用余下的液体充分悬浮菌体沉淀, 均匀涂布于含 50 mg · L⁻¹ 卡纳霉素的 LB 固体培养基上, 将平板正置于培养箱中至液体被吸收, 然后 37 ℃ 倒置培养 12 ~ 16 h, 挑单个菌落接种于含有卡纳霉素的液体 LB 培养基中培养过夜, 挑选抗性转化子。用 PCR 法初步筛选阳性克隆, 阳性克隆送南京金思特生物科技有限公司进一步测序验证。同时用上述方法将载体 PET-28a 转化至 BL-21 (DE3) 中, 作为 HSP65 的对照。

1.4.6 HSP65 的诱导表达 分别吸取 1.4.5 中过夜培养的含重组质粒和空质粒的大肠杆菌 BL-21 (空质粒组作为对照组) 10 μL 分别接种于含 50 mg · L⁻¹ 卡那霉素的 5 mL LB 培养基中, 培养 6 h 后, 在培养基中加入质量分数 25% 的灭菌乳糖至终浓度为质量分数 2%, 37 ℃ 震荡过夜培养。

1.4.7 目的蛋白提取与蛋白电泳 将诱导后的菌液倒入 1.5 mL 的离心管中, 4 000 r · min⁻¹ 离心 5 min, 弃上清, 加入 5 × 上样缓冲液 20 μL, 沸水煮 5 min, 12 000 r · min⁻¹ 离心 10 min, 加入 5 μL 上清液, 用 100 g · L⁻¹ 十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 进行蛋白电泳并分析。

2 结果

2.1 PCR 法扩增 HSP65 片段 对 HSP65 结合载体 PET-28a/HSP65 进行 PCR, 扩增出 1 623 bp 的目的片段 HSP65 (图 1)。

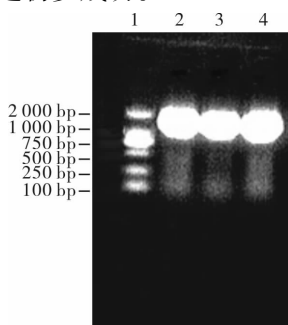


1:标准 DNA;2:目的片段 HSP65。

图 1 HSP65 片段 PCR 电泳结果

Fig.1 Results of PCR electrophoresis of HSP65 fragment

2.2 重组子的鉴定 采用 PCR 法对平板上的克隆进行鉴定(图 2),目的片段大小约 1 623 bp,与预期相符,显示构建初步成功。



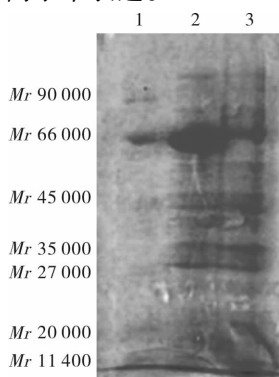
1:标准 DNA;2~4:目的片段 HSP65。

图 2 PCR 阳性克隆鉴定

Fig.2 Identification of the positive clones by PCR

2.3 PET-28a/HSP65 重组子测序结果 经 PCR 初筛后的阳性克隆重组子送至苏州金唯智生物科技有限公司测序,测序结果显示与目的序列完全相符,重组子 PET-28a/HSP65 构建成功。

2.4 乳糖诱导获得表达蛋白 采用 SDS-PAGE 蛋白电泳对诱导后的菌种进行检测,对照组为含有空载体 BL-21 (DE3) 菌(图 3),结果显示乳糖诱导后的目的蛋白获得高水平表达。



1:标准蛋白;2:诱导的 HSP65 重组菌;3:诱导的 PET-28a 菌株(对照组)。

图 3 PET-28a/HSP65 表达产物的 SDS-PAGE 电泳结果

Fig.3 Results of SDS-PAGE electrophoresis of PET-28a/HSP65 expression products

3 讨论

目前,肿瘤的治疗多采用手术、化学治疗与放射治疗,但这些传统治疗方法均有其局限性。手术虽能有效切除肉眼所见的肿瘤,但无法保证所有的肿瘤细胞都被切除,也未能改变肿瘤发生的内环境;放射治疗、化学治疗除了有严重的不良反应外,许多肿瘤对其不敏感或产生抗性,再加上肿瘤本身有易侵袭、转移和复发等生物学特性,使治疗效果非常局限。如今已有针对乳腺癌特异抗原的抗体如 Herceptin 被美国食品药品监督管理局(food and drug administration, FDA)批准应用于乳腺癌的靶向临床治疗^[4],但其代价高昂,需要不断注射,且长时间使用肿瘤细胞易产生抗性。而由肿瘤相关抗原发展起来的肿瘤疫苗能有效启动自身免疫反应,产生持久有效的肿瘤免疫,杀伤肿瘤细胞,而对正常组织细胞损伤较小,有望克服上述治疗方法的缺陷,达到特异、安全、经济、有效地治疗肿瘤的目的^[5]。2006 年,美国 FDA 已批准人乳头瘤病毒疫苗为宫颈癌的预防性疫苗^[6];另外,2008 年 8 月,俄罗斯也批准 HSP-原癌基因复合体(Oncophage)作为疫苗用于某一阶段的肾癌治疗,以防肿瘤复发^[7]。2010 年,美国 FDA 也首次批准了 1 项治疗晚期前列腺癌的前列腺癌疫苗 Provenge(sipuleucel T)^[8]。因此,利用肿瘤疫苗治疗或预防肿瘤复发被认为是最具有应用前景的肿瘤治疗方法。

分枝杆菌 HSP65 能够协助外源蛋白进入抗原递呈细胞并经主要组织相容性复合体 I 类途径递呈,进而激活外源蛋白特异性的细胞毒性 T 淋巴细胞,重组的 HSP 融合蛋白(抗原序列融合到 HSP 的 N 端或 C 端)显示能激发 CD8⁺ 的 T 细胞及抗体反应^[9],将胃泌素释放肽的 B 细胞抗原表位融合到结核分枝杆菌 HSP65 的 C 端,证明确实能极大提高抗原的免疫原性^[10]。天然的 HSP 可以与伴侣抗原肽非共价形式形成非共价复合体,同时也可以稳定共价连接到 HSP 蛋白上,这些特点允许一个 HSP 分子上并入多个抗原决定簇用于免疫反应^[11]。

本研究通过将 HSP65 的开放阅读框经 PCR 扩增,成功构建了原核表达载体 PET-28a/HSP65,然后将重组质粒转入大肠杆菌 BL-21 (DE3) 中,PCR 筛选阳性克隆,并经 DNA 测序显示与目的序列完全相符。阳性克隆进一步扩大培养并进行乳糖诱导,SDS-PAGE 检测了诱导表达的菌体蛋白,结果显示,HSP65 蛋白获得了高表达,为进一步以分枝杆菌 HSP65 为载体的抗肿瘤疫苗研究奠定了基础。

(下转第 1035 页)

the collagen stabilizing effect of crosslinked chitosan nanoparticles against collagenase degradation [J]. *Dent Mater*, 2016, 32 (8) : 968-977.

[7] PEI Y, YANG J, LIU P, *et al.* Fabrication, properties and bioapplications of cellulose/collagen hydrolysate composite films [J]. *Carbohydr Polym*, 2013, 92 (2) : 1752-1760.

[8] KOJIMA C, NISHISAKA E, SUEHIRO T, *et al.* The synthesis and evaluation of polymer prodrug/collagen hybrid gels for delivery into metastatic cancer cells [J]. *Nanomedicine*, 2013, 9 (6) : 767-775.

[9] 史佳巍, 李学敏, 刘玲蓉, 等. D-核糖交联胶原膜的性质研究 [J]. *功能材料*, 2009, 40 (6) : 1013-1016.

[10] WILLEMS N M, LANGENBACH G E, STOOP R, *et al.* Higher number of pentosidine cross-links induced by ribose does not alter tissue stiffness of cancellous bone [J]. *Mater Sci Eng C*, 2014, 42 (1) : 15-21.

[11] 陈红丽, 吕洁丽, 南文滨, 等. 胶原/纤维蛋白胶/载 BSA 微球复合支架的制备及体外性能研究 [J]. *中国生物医学工程学报*, 2014, 33 (1) : 79-85.

[12] CHATZISTAVROU X, RAO R, CALDWELL D, *et al.* Collagen/fibrin microbeads as a delivery system for Ag-doped bioactive glass and DPSCs for potential applications in dentistry [J]. *J Non Cryst Solids*, 2016, 432 (15) : 143-149.

[13] RIOJA A Y, ANNMALAI R T, PARIS S, *et al.* Endothelial sprouting and network formation in collagen and fibrin-based modular microbeads [J]. *Acta Biomate*, 2016, 29 (1) : 33-41.

[14] MENTINK C J, HENDRIKS M, LEVELS A A, *et al.* Glucose-mediated cross-linking of collagen in rat tendon and skin [J]. *Clin Chim Acta*, 2002, 321 (1/2) : 69-76.

[15] MAHMOUD A A, SALAMA A H. Norfloxacin-loaded collagen/chitosan scaffolds for skin reconstruction: preparation, evaluation and *in vivo* wound healing assessment [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2016, 83 (15) : 155-165.

[16] 王迎军, 杨春蓉, 汪凌云. EDC/NHS 交联对胶原物理化学性能的影响 [J]. *华南理工大学学报*, 2007, 35 (12) : 66-69.

[17] CHIUE H, YAMAZOYE T, MATSUMURA S. Localization of the dominant non-enzymatic intermolecular cross-linking sites on fibrous collagen [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 461 (3) : 445-449.

(本文编辑: 孟 月 英文编辑: 孟 月)

(上接第 1030 页)

参考文献:

[1] TEL J, ANGUILLE S, WATERBORG C E, *et al.* Tumoricidal activity of human dendritic cells [J]. *Trends Immunol*, 2014, 35 (1) : 38-46.

[2] KAMIGAKI T, KANEKO T, NAITOH K, *et al.* Immunotherapy of autologous tumor lysate-loaded dendritic cell vaccines by a closed-flow electroporation system for solid tumors [J]. *Anticancer Res*, 2013, 33 (7) : 2971-2976.

[3] 李晓玲, 刘春雷, 孙立荣. 卡介苗热休克蛋白 70 基因转染人原代白血病细胞瘤苗的制备及其抗瘤机制 [J]. *中华实用儿科临床杂志*, 2015, 30 (3) : 216-220.

[4] GRAZUANO C. HER-2 breast assay, linked to Herceptin, wins FDA's okay [J]. *CAP Today*, 1998, 12 (10) : 1, 14-16.

[5] VESELY M D, SCHREIBER R D. Cancer immunoediting: antigens, mechanisms, and implications to cancer immunotherapy [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2013, 1284 : 1-5.

[6] CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). FDA licensure of bivalent human papillomavirus vaccine (HPV2, Cervarix) for use in females and updated HPV vaccination recommendations from the Advisory Committee on Immunization Prac-

tices (ACIP) [J]. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 2010, 59 (20) : 626-629.

[7] DI PIETRO A, TOSTI G, FERRUCCI P F, *et al.* Oncophage : step to the future for vaccine therapy in melanoma [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2008, 8 (12) : 1973-1984.

[8] CHEEVER M A, HIGANO C S. PROVENGE (Sipuleucel-T) in prostate cancer: the first FDA-approved therapeutic cancer vaccine [J]. *Clin Camcer Res*, 2011, 17 (11) : 3520-3526.

[9] FREY B, RUBNER Y, KULZER L, *et al.* Antitumor immune responses induced by ionizing irradiation and further immune stimulation [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2014, 63 (1) : 29-36.

[10] HONG X, DONG T, HU J, *et al.* Synergistical toll-like receptors activated dendritic cells induce antitumor effects against carcino-embryonic antigen-expressing colon cancer [J]. *Int J Colorectal Dis*, 2013, 28 (1) : 25-33.

[11] KANDALAFT L E, CHIANG C L, TANYI J, *et al.* A phase I vaccine trial using dendritic cells pulsed with autologous oxidized lysate for recurrent ovarian cancer [J]. *J Transl Med*, 2013, 11 : 149.

(本文编辑: 李胜利 英文编辑: 徐自超)