

[文章编号] 1007-385X(2005)04-0249-04

一种新的黑色素瘤相关抗原 MAGE-C2 的基因克隆及表达

庄 然, 欧阳为明, 谢 鑫, 张新海, 蓝 天, 李 林, 方 亮, 金伯泉(陕西省西安市第四军医大学免疫学教研室, 西安 710032)

[摘 要] **目的:** 克隆人黑色素瘤相关抗原 MAGE-C2 的 cDNA, 构建真核、原核表达载体并转入相应细胞获得表达。**方法:** 采用 RT-PCR 技术, 从直肠癌细胞系 SW480 的总 RNA 中克隆了 MAGE-C2 cDNA 序列, 并将开放读框分别插入质粒 pEGFP-C1 和 pGEX-4T-3 中, 获得 pEGFP-MAGE-C2 绿色荧光蛋白(GFP)融合表达载体和 pGEX-MAGE-C2 谷胱甘肽转移酶(GST)融合蛋白表达载体, 将 pEGFP-MAGE-C2 转染 293T 细胞, 观察绿色荧光融合蛋白在细胞中的定位; 将 pGEX-MAGE-C2 转化大肠杆菌 BL21 株, 经 IPTG 诱导表达 GST 融合蛋白, 并用谷胱甘肽亲和层析法纯化重组蛋白。**结果:** 获得 MAGE-C2 开放读框并构建表达载体, 测序结果与 GenBank 收录的序列相一致。真核表达载体转染 293T 细胞后显示 MAGE-C2 蛋白定位于细胞核; 原核重组蛋白大部分以可溶性形式表达, 亲和层析后, 获得了较高纯度的 MAGE-C2-GST 融合蛋白。分析显示原核表达 GST 融合蛋白的相对分子质量为 70 000, 使用抗 GST 单克隆抗体进行 Western blot 分析证实为目的蛋白。**结论:** 成功的获得 MAGE-C2 基因, 构建了其表达载体并获得表达, 为进一步制备 MAGE-C2 特异性单抗及深入探讨 MAGE-C2 可能参与肿瘤发生发展的机制提供了重要条件。

[关键词] MAGE-C2; RT-PCR; 载体构建; 基因

[中图分类号] R392 [文献标识码] A

Cloning and Expression of a Novel MAGE-C2 (Melanoma Associated Antigen) Gene

ZHUANG Ran, OUYANG Wei-ming, XIE Xin, ZHANG Xin-hai, LAN Tian, LI Lin, FANG Liang, JIN Bo-quan (Department of Immunology, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

[**Abstract**] **Objective:** To clone and express human MAGE-C2 gene and to investigate the expression pattern in transfected eukaryote cells. **Methods:** MAGE-C2 cDNA was amplified by RT-PCR from total RNA of human colorectal adenocarcinoma cell line SW480. Expression vectors of complete open reading frame (ORF) sequence of MAGE-C2 were constructed by PCR and gene cloning technique. After sequencing, the vectors were transfected into *E. coli* BL21 and 293T cell, respectively. Recombinant GST-MAGE-C2 fusion protein was expressed via IPTG induction. GST-MAGE-C2 fusion protein was purified through glutathione agarose column. **Results:** The sequence of cloned MAGE-C2 was identical with that reported in GenBank. GFP-MAGE-C2 fusion protein was localized on nuclear identified by fluorescent microscope. SDS-PAGE and Western blot analysis that purified GST-MAGE-C2 fusion protein exhibited a band with Mr. 70 000. **Conclusion:** The MAGE-C2 gene was cloned and expressed successfully, which not only provides the immunogen for further preparation of anti-MAGE-C2 antibodies, but also applies to research the mechanism of tumor's pathogenesis and cellular immunity response to MAGE.

[**Key words**] MAGE-C2; RT-PCR; vector construction; gene

黑色素瘤相关抗原(melanoma associated antigen, MAGE)是在黑色素瘤细胞系中发现的第一个人类肿瘤相关抗原, 其编码基因被命名为黑色素瘤相关基因^[1]; 随后又有多个与 MAGE 基因高度同源的黑色素瘤相关基因被发现, 从而组成了包括 5 个亚家族的

MAGE 超家族^[2]。除睾丸生精细胞外, MAGE 家族成

[作者简介] 庄然(1978-), 男, 山东济南人, 博士研究生, 主要从事免疫新分子功能研究

[通讯作者] 金伯泉, immu_jin@fmmu.edu.cn

员几乎不表达于正常组织,但在多种组织类型来源的恶性肿瘤中可以见到不同程度的表达。由于 MAGE 家族成员可以诱导机体产生特异性的抗体和 CTL 细胞,因而在肿瘤的免疫学治疗方面具有重大的潜在价值。通过 RDA (representation-difference analysis) 技术, MAGE-C2 最先发现于一个广泛表达 MAGE 抗原的黑素瘤细胞系 SK-MEL-37 中。RT-PCR 结果显示 MAGE-C2 表达于正常成人睾丸和 20% ~ 30% 的人类恶性肿瘤^[3]。我们通过 RT-PCR 方法,从直肠癌细胞系 SW480 中获得了 MAGE-C2 开放读框,构建了原核和真核表达载体。

1 材料与方法

1.1 材料

细胞系 SW480、293T,大肠杆菌 DH5 α 和 BL21 菌株,均为本教研室冻存。总 RNA 抽提试剂 TRIzol 购自 GIBCOL BRL 公司;反转录酶 AMV, dNTP, Pyrobest 高保真 DNA 聚合酶及限制性内切酶、T 载体试剂盒购自 TaKaRa 公司;质粒提取及胶回收试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司;pGEX-4T-3 质粒、谷胱甘肽交联 Sepharose 4B 葡聚糖珠购自 Amersham Pharmacia 公司;pEGFP-C1 质粒购自 Clontech 公司;脂质体购自 Invitrogen 公司;Western blotting 试剂盒购自 Roche 公司。HRP 标记羊抗鼠 IgG 抗体购自 DAKO 公司。抗 GST 单克隆抗体 (mAb) E4.2 由本室制备^[4]。

1.2 引物设计与合成

参照 NCBI GenBank 公布的 MAGE-C2 全长序列,使用在线引物设计软件 Primer 3 ([http:// bioinformatics. weizmann. ac. il/cgi-bin/primer/primer3. cgi](http://bioinformatics.weizmann.ac.il/cgi-bin/primer/primer3.cgi)) 辅助设计。由上海生工生物工程公司合成。序列分别为: F₀: GAA GAA GTC GTC ATG CCT CC, R₀: TGG CCC TCC ACT ACC TAG AA。为克隆入表达载体设计了巢式 PCR 引物,引入酶切位点。pEGFP-C1: F₁: GA AGA TCTATG CCT CCC GTT CCA GGC GT (Bgl II), R₁: GG GGT ACCTCA CTC AGA AAA GGA GAC GT (Kpn I); pGEX-4T-3: F₂: CG GGA TCCATG CCT CCC GTT CCA GGC GT (BamH I), R₂: TCC CCC GGG TCA CTC AGA AAA GGA GAC GT (Sma I)。

1.3 cDNA 克隆及载体构建

用含 10% (v/v) 胎牛血清 DMEM 培养基常规培养 SW480 细胞,以 TRIzol 溶解细胞后,氯仿抽提总 RNA, AMV 反转录酶合成 cDNA。使用引物 F₀、R₀ 进行 PCR 扩增目的基因,反应条件为:94℃ 预变性 5 min;94℃ 45 s,58℃ 45 s,72℃ 90 s,循环 30 次后再于 72℃ 延长 10 min。MAGE-C2 基因片段连接入 pMD18-T 载体,送上

海生工生物工程公司测序。利用两对引物 F₁、R₁ 和 F₂、R₂,以 pMD18-T-MAGE-C2 载体为模板分别进行巢式 PCR,克隆得带有酶切位点的 MAGE-C2 基因开放读框,分别插入 pEGFP-C1 和 pGEX-4T-3 载体,转化 DH5 α 菌株和 BL21 菌株。少量提取 pEGFP-MAGE-C2 质粒,用脂质体法转染 293T 细胞。

1.4 融合蛋白的表达、纯化及鉴定

质粒 pEGFP-MAGE-C2 转染 293T 细胞 24 h,转种至无菌载玻片上,继续培养 12 h,以 PBS 冲洗并经 4% 多聚甲醛固定,在激光共聚焦显微镜下观察。扩大培养转染细胞,提取 mRNA 后进行 RT-PCR 鉴定 MAGE-C2 分子在 mRNA 水平的表达。pGEX-MAGE-C2 质粒转化 BL21 菌株,IPTG 诱导融合蛋白表达,SDS-PAGE 鉴定,发现经过诱导的菌主要以包涵体形式表达分子量约 70 kD 的蛋白,优化诱导条件可使大部分重组蛋白以可溶性形式表达。大量培养转化菌并诱导融合蛋白表达,经反复冻融及超声裂解菌体,上清用谷胱甘肽交联的 Sepharose 4B 亲和层析柱纯化融合蛋白。纯化产物经 SDS-PAGE、Western blot 鉴定,一抗使用 mAb E4.2。

2 结果

2.1 MAGE-C2 基因载体的构建

经 RT-PCR,从培养的 SW480 细胞系中获得 MAGE-C2 cDNA 基因(图 1)。经巢式 PCR 引入酶切位点后分别插入 pEGFP-C1 和 pGEX-4T-3 载体,转化 *E. coli*,挑取克隆,进行 PCR 及酶切鉴定(图 2,图 3)。

图 1 以 SW480 细胞系 cDNA 为模板的 MAGE-C2 基因 PCR 扩增

Fig.1 PCR product of MAGE-C2 gene(cDNA of SW480 cell line was used as the template)

1: Marker; 2: Positive control (β -actin);
3: MAGE-C2

2.2 MAGE-C2-GFP 融合蛋白的表达

在激光共聚焦显微镜下,可观察到转染了重组质粒 pEGFP-MAGE-C2 的 293T 细胞中,绿色荧光蛋白的表达仅限于细胞核,而转染了对照空载体 pEGFP-C1 的 293T 细胞中,绿色荧光蛋白则呈弥漫性表达于整个细胞中(图 4)。经 RT-PCR 鉴定,从转染的 293T 细胞中可以扩增出 MAGE-C2 基因(图 5)。

分子量相符合。Western blot 分析结果证实纯化的重组蛋白为带有 GST 标签的 MAGE-C2 融合蛋白(图 7)。

图 2 重组质粒 pEGFP-MAGE-C2 Bgl II
and EcoRI 双酶切鉴定

Fig. 2 Restrictive enzyme (Bgl II and EcoR I) analysis
1: Marker (bp); 2: Vector digested with Bgl II + EcoR I

图 3 重组质粒 pGEX-MAGE-C2 BamHI
and EcoRI 双酶切鉴定

Fig. 3 Restrictive enzyme (BamHI & EcoRI) analysis
1: Marker (bp); 2: Clone1; 3: Clone2

2.3 MAGE-C2-GST 融合蛋白的表达及鉴定

IPTG 诱导 MAGE-C2-GST 融合蛋白表达适宜的浓度为 0.05 mol/L,最佳温度为 37℃,最佳诱导时间为 2~2.5 h。上述条件下,超声裂解表达菌的上清中表达产物含量较高,说明大部分融合蛋白以可溶形式表达,经 SDS-PAGE 鉴定,分子量约为 70 kD (图 6),与预期

图 4 MAGE-C2-GFP 融合蛋白在 293T 细胞中的表达

Fig. 4 The expression of MAGE-C2-GFP
fusion protein in 293T cells

A: pEGFP-MAGE-C2 transfectant, GFP-fusion
protein localized at nuclear; B: pEGFP-C1 transfectant,
GFP expressed diffusely

图 5 RT-PCR 鉴定转染 293T 细胞中
MAGE-C2 mRNA 的表达

Fig. 5 The expression of MAGE-C2
mRNA in 293T transfectant
1: Marker; 2: MAGE-C2

3 讨 论

MAGE 超家族从属于一个更大的肿瘤特异性抗原家族——肿瘤/睾丸相关抗原(Cancer/Testis antigen, CT)家族。CT 抗原属于多基因家族,多数具有在睾丸和肿瘤组织中限制性表达的特点,在肿瘤中蛋白表达呈异质性,编码基因大多位于 X 染色体,在癌症患者体内具有免疫原性。MAGE-C2 是黑色素瘤相关抗原 MAGE 超家族成员,表达于多种人类恶性肿瘤,除睾丸早期生精细胞外,不表达于正常成人组织。MAGE 超家族成员在多种组织类型来源的恶性肿瘤中有不同程度不同比例的表达,并且其表达与肿瘤的进展和肿瘤的恶性潜力相关^[5]。MAGE 基因的确切作用还不清楚,还有研究还表明,MAGE 超家族成员有可能参与细

胞增殖和分化的调控,或是属于蛋白质代谢相关分子。在精子发生早期发现 MAGE 基因的表达,但在分化过程中的细胞不表达,表明 MAGE 基因在精子发生的早期阶段同样也具有重要作用^[6]。同时,MAGE 超家族成员的组织分布具有肿瘤特异性,并且可以诱导机体免疫应答,因而在肿瘤的免疫学治疗方面显示了良好的应用前景^[7]。基于以上认识,深入探讨 MAGE 超家族成员的功能无疑对揭示肿瘤发生发展机制以及肿瘤疫苗的研制具有重要意义。

图 6 SDS-PAGE 鉴定 MAGE-C2-GST 融合蛋白的表达

Fig. 6 The expression of MAGE-C2-GST fusion protein displayed by SDS-PAGE

- 1: Marker; 2: Lysate of uninduced BL21;
3: Lysate of induced BL21; 4: Inclusion body;
5: Supernatant of BL21 lysate; 6: Effluent fraction;
7: Purified MAGE-C2-GST

图 7 Western blot 鉴定 MAGE-C2-GST 融合蛋白

Fig. 7 Identification of MAGE-C2-GST fusion protein by Western blot using anti-GST mAb

- 1: Lysate of uninduced BL21; 2: Supernatant of induced BL21 lysate; 3: Purified MAGE-C2-GST fusion protein

本研究设计的 MAGE-C2 引物,可用于扩增 MAGE-C2 的开放读框全长。293T 细胞转染 pEGFP-MAGE-C2 质粒后激光共聚焦显微镜观察表明,MAGE-C2 蛋白定位于细胞核内,说明 MAGE-C2 基因的表达产物含有核定位序列,合成后进入细胞核,初步提示该分子在细胞核内发挥其生物学功能。真核表达质粒 pEGFP-MAGE-C2 的成功构建,为进一步研究 MAGE-C2 基因的生物学功能提供了条件。而在现代免疫学研究中,特异性单克隆抗体具有巨大的和不可替代的作用,本研究中原核表达载体的成功构建和较高纯度 MAGE-C2-GST 融合蛋白的获得为制备特异性单克隆抗体提供了充足而优质的抗原保证。

[参 考 文 献]

- [1] 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): 1643-1647.
- [2] Ohman Forslund K, Nordqvist K. The melanoma antigen gene—any clues to their functions in normal tissues[J]. *Exp Cell Res*, 2001, 265(2): 185-194.
- [3] Gure AO, Stockert E, Arden KC, *et al.* CT10: A new cancer-testis (CT) antigen homologous to CT7 and the MAGE family, identified by representational difference analysis[J]. *Int J Cancer*, 2000, 85(5): 726-732.
- [4] 刘 飞, 金伯泉, 朱 勇, 等. Notch 信号途径效应分子 HES1 的原核表达及其多克隆抗体的制备与鉴定[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2002, 18(4): 329-331.
- [5] Bodey B, Siegel SE, Kaiser HE. MAGE-1, a cancer/testis-antigen, expression in childhood astrocytomas as an indicator of tumor progression[J]. *In Vivo*, 2002, 16(6): 583-588.
- [6] Old LJ. Cancer/testis (CT) antigens - a new link between gametogenesis and cancer[J]. *Cancer Immun*, 2001, 1(1): 1-7.
- [7] Bodey B. Cancer-testis antigens: Promising targets for antigen directed antineoplastic immunotherapy[J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2002, 2(6): 577-584.

[收稿日期] 2005 - 07 - 01

[修回日期] 2005 - 09 - 25

[本文编辑] 韩 丹