

肿瘤相关抗原 HCA520 真核表达载体的构建及细胞内表达的定位分析

杨美香^{1,2}, 曲 迅^{1*}, 韩克军², 马道新¹, 陈慰峰²

(¹ 山东大学齐鲁医院临床基础研究所, 济南 250012; ² 北京大学医学部免疫学系, 北京 100083)

摘要: 应用 PCR 技术获得肿瘤相关抗原 HCA520 编码基因, 构建至 pGEM-T Easy 载体, 测序正确后, 亚克隆至 pEGFP-N1 载体, 1% 的琼脂糖电泳得到两条带, 与预期结果相同; 鉴定正确的基因一过性转染至 CHO 细胞, 共聚焦显微镜观察 HCA520 基因编码蛋白主要位于胞浆靠近胞膜处, 为 HCA520 功能的进一步研究打下了基础。

关键词: HCA520; 肿瘤相关抗原; 细胞定位

中图分类号: Q291 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-9977(2004)02-193-04

HCA520 是由北京大学医学部韩克军等于 2002 年用 SEREX (Serological Identification of Recombinant cDNA Expressing Cloning) 方法从肝癌病人 cDNA 文库中筛选出来的一个新的肿瘤相关抗原编码基因^[1], 基因全长 2396bp, 开放阅读框架全长为 591bp, 有 7 个外显子组成, 编码 196 个氨基酸, 预期分子量约 23kD, 其蛋白序列与 CHP (Calcineurin homologous protein) 有很高的同源性 (61%)。据文献报道, CHP 是一种 Na⁺/H⁺ 交换子调节蛋白^[2, 3], 因此推测 HCA520 可能也参与 Na⁺/H⁺ 交换的调节作用。近几年的研究表明 NHEs (Na⁺/H⁺ exchangers) 不仅参与肿瘤细胞内 pH 值的调节, 也能激发肿瘤细胞的生长与增殖, 促进细胞的恶性转化及转移^[4, 5], 其活性受多种调节因素的影响, 但对其直接调节蛋白的研究很少。HCA52 可能参与细胞的 Na⁺/H⁺ 交换子的调节, 但其具体的功能还不清楚, 有待于进一步的研究。为了更好的探讨 HCA520 对肿瘤发生、发展的影响以及与 NHEs 的关系, 我们构建了 HCA520 的真核表达载体, 并且利用构建的载体对 HCA520 表达蛋白进行了初步的细胞内定位, 为进一步研究 HCA520 的生物学效应创造了条件。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 菌种和载体 菌种 TOP10F' 购自 Clontech 公司, 表达用菌株 JM109 为本研究室所存。质粒载

体 pGEM-T Easy 购自 Promega 公司, pEGFP-N1 由北京大学陈建国教授惠赠, 重组载体 pBluescript-HCA520 为本室构建, 含有 HCA520 开放阅读框架。

1.1.2 工具酶和试剂 限制性内切酶 SalI、XhoI 购自 Promega 公司, 质粒抽提和纯化试剂盒及胶回收试剂盒均购自 Promega 公司。引物序列由上海生物工程公司合成, DNA 序列测定由上海基康公司完成。

1.1.3 细胞 中国仓鼠卵巢细胞 CHO 由本室保存。

1.2 方法

1.2.1 目的基因的获得 利用 Generunner3.04 软件根据 HCA520 的基因序列设计上游及下游引物

上游引物: HCA520F 5'>ctc ctc gag atg ggg tgc cgc agc tcc cac<3'

下游引物: HCA520R 5'>acc gtc gac tgc ttc agg atc cgg atg c<3'

上游引物含有 XhoI 的酶切位点, 下游引物含有 SalI 的酶切位点。用稀释的含有 HCA520 基因的质粒作为模板, PCR 扩增, 反应条件为 94℃ 变性 5 min, 94℃, 20s, 68℃ 20s, 72℃ 1min, 35 个循环, 72℃ 延伸 10min。反应产物用 1% 琼脂糖电泳鉴定。

1.2.2 pEGFP-N1-HCA520 融合表达载体的构建 取 PCR 产物与载体 pGEM-T Easy 以 3:1 的比例进行

收稿日期: 2003-08-13; 修回日期: 2003-09-15

国家“973”基金资助项目 (No.G1999053904) 和北京市自然科学基金资助项目 (No.7001002)

* 通讯作者, E-mail: quxun@sdu.edu.cn

连接,采用 Promega 公司质粒抽提和纯化试剂盒提取和纯化质粒,按说明书进行。质粒提取后,用 EcoRI 酶切进行初步鉴定。取 20 μ l 经酶切鉴定的重组质粒进行测序,结果与 GenBank 中登陆的序列进行比较。用限制性内切酶 SalI 及 XhoI 对含正确序列的重组质粒 pGEM-T-HCA520 进行双酶切,按照 Promega 公司提供的胶回收试剂盒说明回收目的 DNA。同时用 SalI 及 XhoI 对载体 pEGFP-N1 进行双酶切,获得线性载体,胶回收试剂盒进行回收。将回收的目的片断与线性载体按 3:1 的比例进行常规连接。质粒提取试剂盒提取重组质粒后,用限制性内切酶 SalI 及 XhoI 进行双酶切,1% 琼脂糖电泳鉴定。可见紫外分光光度计检测质粒的纯度及含量。

1.2.3 CHO 细胞的一过性转染 CHO 细胞以每孔 2.5×10^5 的起始细胞数铺于六孔板中,在含 5%CO₂ 的孵箱中 37 $^{\circ}$ C 培养 24h,待细胞长至 80% 汇合,即可用于转染。按照 Promega 公司的 TransFast™ 转染试剂盒的说明书进行转染。简言之:将 1 μ g pEGFP-N1-HCA520 重组质粒与 3 μ l TransFast™ 转染试剂和适量的无血清 DMEM 培养基混合,总体积为 1ml,震荡混匀,室温孵育 10~15min,形成重组质粒-转染试剂-无血清培养基混合物。吸出六孔板中的含有 10%NCS 的 DMEM 培养基,以无血清 DMEM 培养基洗两遍,然后加入 1ml 重组质粒-转染试剂-无血清培养基混合物,于含 5% CO₂ 的 37 $^{\circ}$ C 孵箱中孵育 1h,然后加入 37 $^{\circ}$ C 预热的含有 10%NCS 的 DMEM 培养基,继续培养 48 小时。同时平行转染了 pEGFP-N1 空载体,作为后续实验的对照。

1.2.4 共聚焦荧光显微镜检测 HCA520 蛋白在细胞中的定位 一过性转染的 CHO 细胞培养 48h 后收获细胞,将细胞重新铺于改进的 Petri 小皿中,待细胞贴壁后用 1 \times PBS 洗 2 遍,然后加 4% 多聚甲醛固定 10min,再用 1 \times PBS 洗 2 遍,在共聚焦显微镜下观察。为区分细胞的核和胞浆,将固定好的 CHO 细胞加适量的 PI 染色 2 min,用 PBS 洗涤两遍后在共聚焦显微镜下观察。

2 结果

2.1 目的基因的获得

以稀释的含有 HCA520 基因的重组质粒 pBluescript-HCA520 作为模板,利用 HCA520 特异性的引物进行 PCR 扩增,扩增产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳进行初步鉴定。结果如图 1 所示,所预期的 HCA520 片

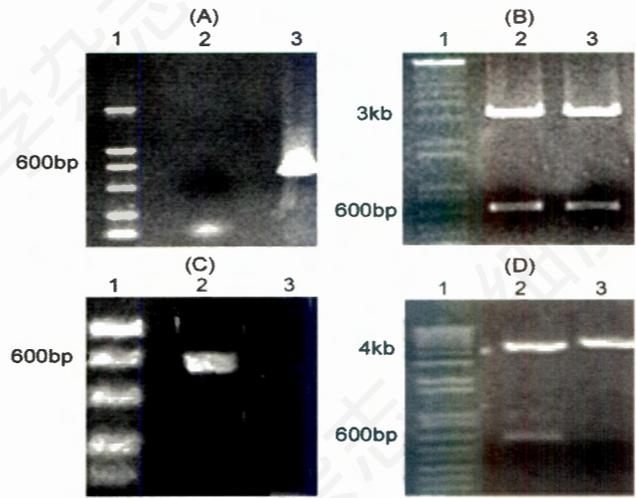


图 1 琼脂糖电泳结果

(A)HCA520 的 PCR 产物琼脂糖电泳图(1, DNA marker; 2 阴性对照; 3, HCA520); (B)pGEM-T-HCA520 经限制性内切酶 XhoI、SalI 双酶切产物电泳图(1, DNA marker; 2, 3, 酶切产物); (C)回收产物琼脂糖电泳图(1, DNA marker; 2, 回收产物; 3, 阴性对照); (D) pEGFP-N1-HCA520 经限制性内切酶 XhoI、SalI 双酶切产物琼脂糖电泳图(1, DNA marker; 2, pEGFP-N1-HCA520 酶切产物; 3, pEGFP-N1 酶切产物)。

段长度约为 600bp, PCR 产物电泳后,片段大小与预期结果相符(图 1A)。

2.2 真核表达载体 pEGFP-N1-HCA520 的构建及鉴定

首先将 PCR 产物与载体 pGEM-T Easy 连接, EcoRI 酶切后电泳鉴定,结果出现两条带,一条带为 3.0kb 大小,为酶切得到的线性载体,另一条带为 600bp 大小片断,为目的基因 HCA520(图 1B),与理论长度相符,目的基因进行胶回收,1% 琼脂糖电泳,得一 600bp 大小的片段(图 1C)。测序结果与 GenBank 中登陆的 HCA520 完全一致。将测序正确的目的基因亚克隆至真核表达载体 pEGFP-N1 编码基因的 N 端,构建的载体用双酶切进行初步的鉴定,结果显示两条带,一条为载体 pEGFP-N1,另一条为目的基因 HCA520(图 1D)。经可见紫外分光光度计测定其纯度与含量均达到转染要求。大量抽提质粒, -20 $^{\circ}$ C 保存用于后续转染。

2.3 激光共聚焦显微镜观察 HCA520 蛋白在细胞中的定位

将构建的 pEGFP-N1-HCA520 一过性转入 CHO 细胞,培养 48h 后收获细胞,将细胞重新铺于改进的 Petri 小皿中在共聚焦显微镜下观察。为区分细胞的核和胞浆,将固定好的 CHO 细胞加适量的 PI 染

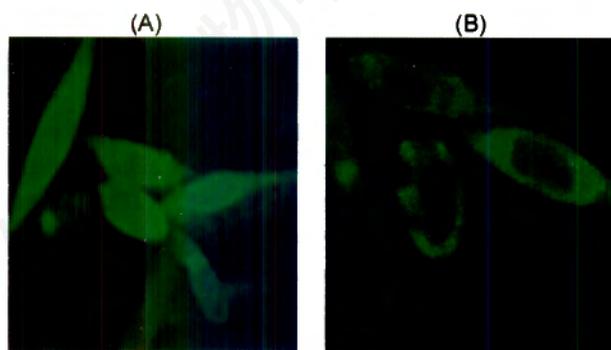


图2 HCA520-GFP 融合蛋白在细胞中的定位
(A)GFP; (B)HCA520-GFP。

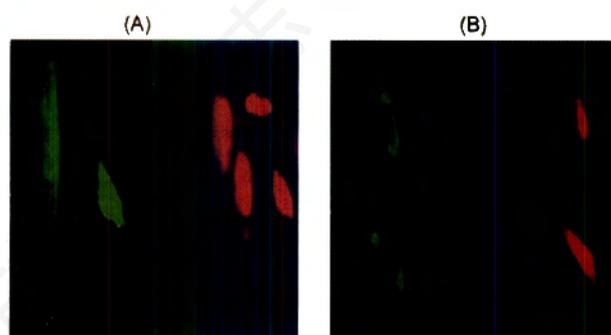


图3 HCA520-GFP 融合蛋白在细胞中的定位(PI 染色)
(A)GFP; (B)HCA520-GFP。

色 2 min, 用 PBS 洗涤两遍后在共聚焦显微镜下继续观察。观察结果显示 pEGFP-N1-HCA520 重组载体转染的 CHO 细胞, 其绿色荧光主要分布于细胞的胞浆中, 而且是相对集中在细胞的两极靠近胞膜处, 而对照组 pEGFP-N1 空载体质粒转染的 CHO 细胞的细胞核有较强的绿色荧光, 细胞核的荧光强度高于胞浆, 胞浆中的荧光分布较均一, 因此可初步判定 HCA520 编码蛋白主要分布在胞浆内(图 2, 图 3)。

3 讨论

SEREX 方法, 是利用肿瘤病人自身或异体血清中的抗体筛选肿瘤组织来源的重组 cDNA 文库的方法^[6]。该方法与细胞免疫学筛选肿瘤相关性/特异性抗原基因方法相比, 较为简便易行^[7]。所识别的抗原基因经过 Northern 杂交或 RT-PCR 分析, 鉴定其是否为肿瘤相关性。采用该方法发现的肿瘤相关性抗原已愈 700 个^[6]。HCA520 即是用此方法从肝癌病人组织 cDNA 文库中筛选出来的肿瘤相关抗原, 通过组织表达谱发现其 mRNA 在正常肝中无表达, 但在部分的肝癌组织中(~50%)可检出高丰度的表达^[1],

这说明 HCA520 可能与肿瘤的发生发展有密切的关系。在本文中我们主要利用 HCA520 的 GFP 融合表达系统研究了 HCA520 表达蛋白在细胞内的定位, 为进一步研究 HCA520 的功能打下基础。为了减少 GFP 对外源蛋白定位的影响, 我们采用了 pEGFP-N1 表达载体, 将 HCA520 加在 GFP 编码基因的 N 端, 除去 HCA520 的终止密码子, 保证 HCA520 与 GFP 在同一读框内。pEGFP-N1 中含有 Kozak 引导序列, 可以明显提高重组载体在真核细胞中的表达效率, 编码 EGFP 荧光蛋白的基因的下流含有 SV40 polyA 信号序列保证了 EGFP 3' 端的正常转录及翻译。同时载体中含有新霉素抗性编码基因, 因此可用于转染真核细胞, 通过药物 G418 进行筛选获得稳定转染细胞株。

构建的重组载体经酶切鉴定后用载体通用引物测序, 证明序列准确无误后, 通过脂质体介导将测序鉴定的 pEGFP-N1-HCA520 重组载体转染入 CHO 细胞。48h 后收获细胞, 4% 多聚甲醛在共聚焦显微镜下观察。GFP 在蓝光激发下可发绿色荧光, PI 染色可使细胞核着红色胞浆基本不着色, 因此可方便的通过观察细胞内 GFP 的荧光分布来判断该融合分子在细胞内的定位。结果提示 HCA520 编码蛋白主要分布在胞浆内, 在细胞浆两端及靠近细胞膜处荧光强度较强。HCA520 的同源蛋白 CHP 也主要分布在胞浆内, 并且已经证明 CHP 参与组织细胞 Na^+/H^+ 交换子的调节作用。 Na^+/H^+ 交换子在肿瘤的发生、发展及转移的过程中发挥重要作用^[8]。NHEs 为胞浆蛋白, 由跨膜区和胞浆区两部分组成, 其中胞浆区靠近胞膜的地方是其功能调节区域, 本实验的结果提示 HCA520 主要分布在胞浆靠近胞膜的地方, 这进一步说明了 HCA520 与 CHP 功能的相似性及 HCA520 参与 NHEs 活性调节的可能性。而且 HCA520 氨基酸序列中含有典型的 EF-hand 模序, 是一种新的钙离子结合蛋白。钙离子是细胞内信使系统的重要一员, 钙离子结合蛋白是钙信使的靶分子或受体, 钙信使传递是通过钙结合蛋白介导的。钙离子结合蛋白与钙离子结合后产生构象变化后, 可以激活一些调节酶或离子通道的活性, 有的钙离子结合蛋白本身就是一种调节酶或功能酶, 参与调解细胞的多种生物学功能。因此可以推测 HCA520 可能通过两条途径对 NHEs 的活性进行调节, 第一条途径为外源性的刺激与相应的受体结合后, 通过第二信使钙离子与钙结合蛋白 HCA520 结合后产生构

象变化, 激活离子通道; 第二条途径为 HCA520 本身具有调节酶的活性, 直接与 NHEs 结合, 调节离子通道的活性。HCA520 可能为胞浆内的一类重要的信号转导分子。其具体的功能正在进一步的实验研究中。

参 考 文 献

- [1] WANG Y, HAN KJ, PANG X W, *et al.* Large scale identification of human hepatocellular carcinoma-associated antigens by autoantibodies [J]. *J Immunol*, 2002, **169**(2): 1102 – 1109.
- [2] LIN X, BARBER D L. A calcineurin homologous protein inhibits GTPase-stimulated Na-H exchange [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**: 12631 – 12636.
- [3] PANG T, SU X H, WAKABAYASHI S, *et al.* Calcineurin homologous protein as an essential cofactor for Na⁺/H⁺ exchangers [J]. *J Biol Chem*, 2001, **276**(20): 17367 – 17372.
- [4] RESHKIN S J, BELLIZZI A, CALDEIRA S, *et al.* Na⁺/H⁺ exchanger-dependent intracellular alkalinization is an early event in malignant transformation and plays an essential role in the development of subsequent transformation-associated phenotypes [J]. *FASEB J*, 2000, **14**: 2185 – 2197.
- [5] LIN X, SIKKINK R A, RUSNAK F, *et al.* Inhibition of Calcineurin Phosphatase Activity by a Calcineurin B Homologous Protein [J]. *J Biol Chem*, 1999, **274**(51): 36125 – 36131.
- [6] SAHIN U, TURECIO, SCHMITT H, *et al.* Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92**: 11810 – 11813.
- [7] 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**: 1643 – 1647.
- [8] RESHKIN S J, BELLIZZI A, CALDEIRA S, *et al.* Na⁺/H⁺ exchanger-dependent intracellular alkalinization is an early event in malignant transformation and plays an essential role in the development of subsequent transformation-associated phenotypes [J]. *FASEB J*, 2000, **14**: 2185 – 2197.
- [9] WAKABAYASHI S, BERTRAND B, IKEDA T, *et al.* Mutation of calmodulin-binding site renders the Na⁺/H⁺ exchanger (NHE1) highly H(+)-sensitive and Ca²⁺ regulation-defective [J]. *J Biol Chem*, 1994, **269**(18): 13710 – 13715.
- [10] BERTRAND B, WAKABAYASHI S, IKEDA T, *et al.* The Na⁺/H⁺ exchanger isoform 1 (NHE1) is a novel member of the calmodulin-binding proteins. Identification and characterization of calmodulin-binding sites. *J Biol Chem*, 1994, **269**(18): 13703 – 13709.

Construction of HCA520 and GFP Fusion Gene Eukaryotic Expression Recombinant and Analysis Its Cell Location

YANG Mei Xiang^{1,2}, QU Xun^{1*}, HAN Ke Jun², MA Dao Xin¹, CHEN Wei Feng²

(¹Basic Research Institute of Clinic Medicine, Qilu Hospital, Shandong University, Jinan 250012; ²Department of Immunology, Peking University Health Science Center, Beijing 100083, China)

Abstract: Using PCR technique to obtain HCA520 encoding gene and cloned into the pGEM-T Easy vector. The fusion gene was identified by DNA sequencing. The identified gene was subcloned into the pEGFP-N1 vector and further identified by Sall and XhoI restriction enzymes. The confirmed recombination was transfected into the CHO cells, analysis the cell location using laser scanning confocal microscope. Most of the HCA520 protein was located in the cytoplasm. The eukaryotic expression recombination of HCA520 and its cell location analysis were valuable for further study of HCA520.

Key words: HCA520; tumor associated antigen; cell location

Supported by National "973" Foundation (No.G1999053904) and Beijing Natural Science Foundation (No.7001002)

*Corresponding author, E-mail: quxun@sdu.edu.cn