

## 人前列腺干细胞抗原在大肠杆菌中的表达及抗血清的制备

Expression of human prostate stem cell antigen in *E. coli* and preparation of its antiserum顾正勤<sup>1,2</sup>, 许传亮<sup>1</sup>, 孙颖浩<sup>1\*</sup>, 高旭<sup>1</sup>, 王林辉<sup>1</sup>

(1. 第二军医大学长海医院泌尿外科, 上海 200433; 2. 复旦大学华山医院泌尿外科, 上海 200040)

**[摘要]** 目的: 克隆并在大肠杆菌中表达人前列腺干细胞抗原(PSCA)基因, 制备其抗血清。方法: 通过 PCR 方法扩增包含蛋白融合点的 PSCA 基因片段, 经 DNA 测序证实后克隆至带有 Trx. 6His 标签的原核表达载体 pET32a, 重组质粒转化大肠杆菌 BL21, IPTG 诱导表达, SDS-PAGE 分析表达结果, 经 Ni-NTA 树脂亲和纯化的蛋白皮下注射免疫小鼠, ELISA 检测抗血清的滴度, 免疫组化鉴定其特异性。结果: PCR 扩增得到 241 bp 的目的片段, 序列测定证实与 GenBank 上登录的序列一致; 成功构建了 PSCA 基因片段的原核表达载体 pET32a-PSCA; 在大肠杆菌中表达, 于相对分子质量为  $20.4 \times 10^3$  处有一蛋白新生带; PSCA 融合蛋白免疫小鼠后, ELISA 确认抗血清的滴度  $>1:4000$ 。抗血清检测到前列腺癌组织中 PSCA 的表达。结论: 成功克隆、表达了人 PSCA 融合基因片段, 并制备了相应的抗血清。

**[关键词]** 前列腺; 干细胞; 抗原; 基因表达; 免疫血清

**[中图分类号]** R 737.25 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 0258-879X(2006)03-0344-03

前列腺干细胞抗原(PSCA)是表达于前列腺上皮细胞的一种膜抗原, 与前列腺癌的发生发展以及转移相关, 因此, PSCA 是一种很有前途的用于前列腺癌早期诊断和免疫治疗的特异性瘤标<sup>[1]</sup>。我们用 PCR 扩增了 PSCA 融合蛋白的基因片段, 并在大肠杆菌中进行了表达, 表达产物经纯化后, 用于免疫小鼠, 得到可识别该抗原的小鼠抗血清。

## 1 材料和方法

1.1 材料 人前列腺癌细胞株 DU145(ATCC-HTB-81), 表达质粒 pET32a(Navagene 公司), *E. coli* BL21, 总 RNA 提取试剂盒、胶回收试剂盒、异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(IPTG)购于华舜生物工程有限公司, Ni-NTA-agarose 柱(Vector 公司)克隆质粒 pMD18-T、*EcoR* I, *Xho* I, *T<sub>4</sub>* DNA 连接酶、RT-PCR 试剂盒购于 TaKaRa 公司; *Taq* DNA 聚合酶, 小量质粒抽提试剂盒购于上海增健公司。BALB/c 小鼠购置于中科院上海动物实验中心。

1.2 引物设计与融合基因表达质粒的构建 根据载体多克隆酶切位点及 PSCA 的序列, 设计引物, 其中引物 5'端中引入 *EcoR* I 酶切位点, 3'端引入 *Xho* I 酶切位点。引物由上海生工生物科技有限公司合成, 引物的序列为: P1 5'-CGA ATT CCT GCT GTG CTA CTC CTG CAA-3'; P2 5'-CCT CGA GCT ATT AGG CAT GGG CCC CGC TGG CG-3'。从培养的人前列腺癌细胞株 DU145 细胞中提取总 RNA, 将 mRNA 反转录合成 cDNA, PCR 产物经电泳回收纯化后插入 pMD18-T 载体进行 DNA 序列分析, 从正确克隆的载体中用 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切含有 PSCA 融合基因片段, 插入质粒 pET32a, 得到表达 PSCA 融合蛋白的质粒 pET32a-PSCA。

1.3 重组人 PSCA 的表达及纯化 用表达质粒 pET32a-PSCA 转化大肠杆菌 BL21, 加入 IPTG 至终浓度为 0.2 mmol/L, 于 37°C 分别诱导培养 3 h, 按常规方法收菌, 进行 SDS-PAGE<sup>[2]</sup>。以超声波打碎细胞, 收集表达菌体后, 离心

弃去上清, 用 8 mol/L 尿素溶解沉淀的蛋白, 在 Ni-NTA-agarose 柱(Vector 公司)上进行亲和层析。用 250 mmol/L 咪唑洗脱。收集洗脱的蛋白, 透析后冻干保存。

1.4 抗血清的制备 用 50  $\mu$ g 基因重组的 PSCA 融合蛋白与等量的弗氏佐剂混成黏稠的乳剂(油包水态), 于小鼠皮下多点注射, 以后换为弗氏不完全佐剂, 每周 1 次, 共 4 次, 第 4 周腹腔注射加强 1 次, 加强免疫后 14 d 取血, 用盐析法(50% 过饱和硫酸铵)粗提抗血清。ELISA 法鉴定抗体效价和抗体的特异性。抗体保存于 -20°C。

1.5 ELISA 向 ELISA 板中加入纯化的 PSCA 融合蛋白(5  $\mu$ g/ $\mu$ l)100  $\mu$ l, 4°C 包被过夜。5% BSA 封闭后, 加入不同稀释度的鼠多克隆抗血清(血清稀释度为 1:500, 1:1000, 1:2000, 1:4000, 1:8000, 1:16000), 37°C 孵育 1 h。加入 HRP 标记的二抗, 37°C 孵育 1 h, 洗涤后加底物显色液 TMB 显色, 在 495 nm 下测量光密度。空白对照孔用 PBS 代替融合蛋白包被 ELISA 板, 阴性对照孔加入免疫前的鼠血清。

1.6 免疫组织化学染色鉴定抗血清生物学活性 正常前列腺组织 2 例, 前列腺增生 4 例, 前列腺癌 10 例。所有组织标本来源于长海医院泌尿外科手术标本, 离体后进行甲醛固定, 石蜡包埋。对所有标本行常规石蜡切片(6  $\mu$ m), 采用 DAKO 公司免疫组化试剂盒进行染色。PSCA 多克隆抗血清稀释度为 1:400; 二抗为即用型羊抗鼠 IgG HRP。免疫前鼠血清代替一抗作为阴性对照, PSCA 融合蛋白封闭抗体后染色作为阴性对照。

**[基金项目]** 国家自然科学基金(39900147); 上海市科技启明星计划资助项目(02QB14001)。Supported by National Natural Science Foundation of China (39900147), and Shanghai Rising Star Program (02QB14001)。

**[作者简介]** 顾正勤, 主治医师。E-mail: docgu@sohu.com

\* Corresponding author. E-mail: sunyinh@online.sh.cn

## 2 结果

2.1 PSCA 基因的克隆及测序 电泳显示 PCR 扩增出 1 条特异的核酸片段(241 bp) (图 1)。PSCA 基因的扩增片段纯化后与 pMD18-T 载体连接,进行 DNA 序列分析,测序结果与已知基因库上登录的 PSCA cDNA 序列(AF043498)完全一致。

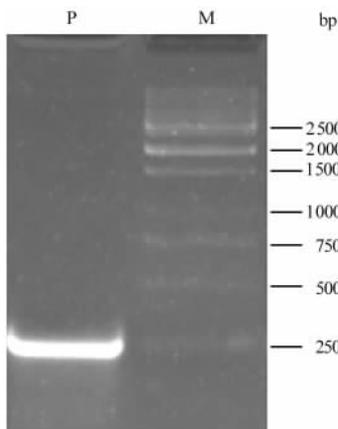


图 1 PSCA 基因的 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳分析  
M: DNA 标记; P: PSCA 的 PCR 产品扩增

2.2 PSCA 融合蛋白的诱导表达 用 PSCA 表达质粒 pET32a-PSCA 转化大肠杆菌 BL21,培养后用 IPTG 进行诱导。SDS-PAGE 分析结果表明,与用 pET32a 转化的 BL21 及未转化质粒的 BL21 裂解产物相比,在相对分子质量为 20 400 处有一新生蛋白带,与预期的融合蛋白分子大小相同(图 2)。灰度扫描显示 IPTG 诱导 3 h 后融合蛋白的表达约占细菌总蛋白的 24%。

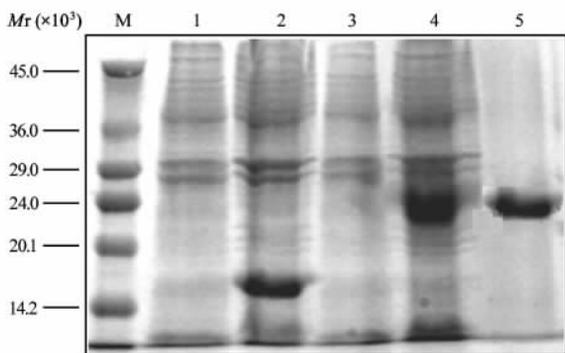


图 2 表达产物形式的分析及 PSCA 融合蛋白的纯化

M: Marker; 1: 未诱导的 pET32a; 2: 诱导的 pET32a; 3: 未诱导的 pET32a/PSCA; 4: 诱导的 pET32a/PSCA; 5: 纯化的 PSCA

2.3 PSCA 融合蛋白的纯化 用 Ni-NTA-agarose 亲和层析柱进行 PSCA 融合蛋白的纯化,收集蛋白峰,PBS 透析后,得到纯度达 90% 的蛋白;进行 SDS-PAGE 分析。表达的 PSCA 融合蛋白被纯化为单一条带(图 2)。

2.4 PSCA 融合蛋白在小鼠体内的抗体应答 收集免疫小

鼠的抗血清,ELISA 检测抗血清的滴度 > 1 : 4 000 (结果见图 3),与正常对照比较,接受融合蛋白免疫的小鼠产生了较高滴度的血清,说明基因重组的 PSCA 融合蛋白对小鼠具有免疫原性。

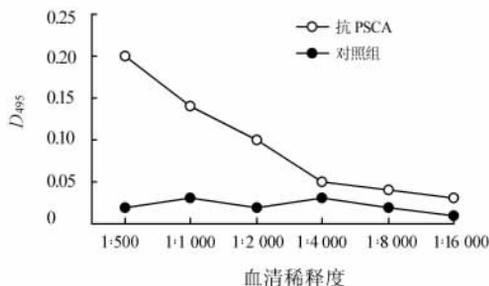


图 3 间接 ELISA 检测抗 PSCA 抗血清的活性

2.5 免疫组化染色结果 所有正常前列腺组织、前列腺增生组织及前列腺癌都有不同强度和范围的染色,在前列腺癌上皮细胞可见较深的棕黄色阳性染色(图 4、5)。阴性对照不着色。

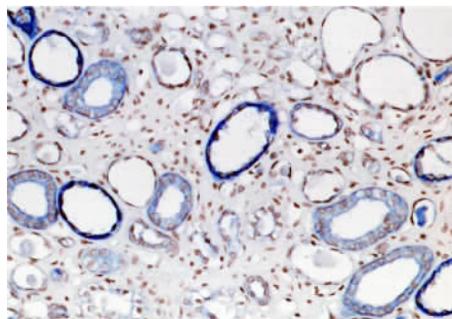


图 4 前列腺增生 PSCA 染色(×200)

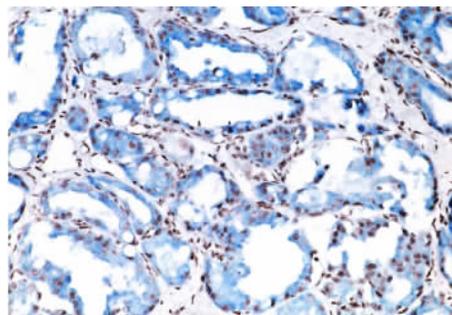


图 5 抗血清检测前列腺癌组织中 PSCA 的表达(×200)  
可见前列腺癌上皮细胞呈棕黄色染色

## 3 讨论

PSCA 是 Reiter 等<sup>[3]</sup>用特征性差异分析的方法在人前列腺癌动物模型 LAPC-4 鼠中发现的一个前列腺癌相关肿瘤抗原,它与干细胞抗原 2(SCA-2) 30% 同源而被命名为 PSCA<sup>[4]</sup>。研究发现 PSCA 主要在前列腺上皮细胞中表达,具有很高的前列腺组织特异性;在 80% 以上的前列腺癌其 PSCA 表达均较正常组织明显增高,而且在激素依赖和激素

非依赖前列腺癌中同样高表达;Gu等<sup>[5]</sup>对9例前列腺癌骨转移标本进行免疫组化检测发现表达水平较原发灶更高,提示PSCA在前列腺癌骨转移时出现表达上调。PSCA具有前列腺组织特异性,与前列腺癌的发生发展以及转移相关,因此,PSCA可望作为前列腺癌早期诊断指标、前列腺癌免疫治疗的靶抗原。

我们采用RT-PCR技术从培养的人前列腺癌细胞株DU145中提取总RNA并进行扩增,获得人PSCA基因片段大小约241bp,测序证实与基因库报道的人PSCA基因中相应序列完全一致。在此基础上成功构建了融合表达载体pET32a-PSCA,并表达了PSCA融合蛋白(相对分子质量为20400)。纯化后得到纯度为90%PSCA融合蛋白。PSCA融合蛋白的原核表达产物,经纯化后用于免疫小鼠,得到了可识别该抗原的小鼠抗血清,ELISA确认抗血清的滴度 $>1:4000$ ;免疫组化证实其能检测到前列腺癌中PSCA蛋白的表达,在前列腺癌上皮细胞可见较深的棕黄色阳性染色。抗人PSCA多克隆抗体的制备为随后的单克隆抗体制备及免疫治疗的研究奠定了基础。

[参考文献]

[1] Dannull J, Diener PA, Prikler L, et al. Prostate stem cell antigen is a promising candidate for immunotherapy of advanced prostate cancer[J]. *Cancer Res*, 2000, 60:5522-5528.

[2] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning, a laboratory manual*[M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989:880-885.

[3] Reiter R, Gu Z, Watabe T, et al. Prostate stem cell antigen: A cell surface marker overexpressed in prostate cancer[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95:1735-1740.

[4] Antica M, Wu L, Scollay R. Stem cell antigen 2 expression in adult and developing mice[J]. *Immunol Letts*, 1997, 55:47-51.

[5] Gu Z, Thomas G, Yamashiro J, et al. Prostate stem cell antigen (PSCA) expression increases with high gleason score, advanced stage and bone metastasis in prostate cancer[J]. *Oncogene*, 2000, 19:1288-1296.

[收稿日期] 2005-09-15

[修回日期] 2005-11-01

[本文编辑] 贾向春