



## Her2/neu膜外及跨膜区蛋白基因重组腺病毒的构建和鉴定

Her2/neu不但是细胞膜上重要的酪氨酸激酶信号传导通路的受体,而且它的膜外区和跨膜区具有很强的免疫原性,比全长Her2/neu基因能更有效的诱导保护性的免疫应答[1][2],因此作为免疫性抗原更具有价值。为此,我们分别构建表达Her2/neu基因膜外第一受体区(Her2-ECDs),全长膜外区(Her2-ECD)和全长膜外跨膜区(Her2-TM)蛋白的重组腺病毒载体,为研究酪氨酸激酶信号通路和抗肿瘤疫苗治疗打下物质基础。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

Her2高表达的SK-BR-3乳腺癌细胞株,本科生物治疗中心保存;人胚肾293细胞株,由本校丁振华教授惠赠。表达绿色荧光蛋白(GFP)的pAdtrack穿梭质粒、已转化5型腺病毒骨架质粒Adeasy-1的BJ5183菌株由本校鲁枫博士惠赠。逆转录反应试剂盒购自上海申能博采生物工程公司。Pfu-DNA聚合酶PCR试剂盒、DNA加A试剂盒、DNA胶回收试剂盒购自上海生物工程公司。pMD18-T载体连接试剂盒为大连Takara产品。Wizard Plus SV DNA纯化试剂盒和内切酶为Promega公司产品。引物合成和测序由上海生物工程公司完成。Polyfect转染试剂为Qiagen产品;Her2-ECD的Ab-20单抗为Neo-marker产品。

#### 1.2 引物的设计

用软件Primer Premier 5.0在Her2的cDNA全长序列(Genbank: |M11730.1|P04626|)中设计3对引物,引物1: 5'-TGAGCACCATGGAGCTGGC-3';引物2: 5'-CTACGGCAGAAATGCCAGGCTCC-3';引物3: 5'-CTAGCAGCCCTTGTCATCCAG-3';引物4: 5'-CTACTGCCGTCGCTTGATGAGGAT-3',引物1含起始密码子,引物2,3,4加上终止密码子。引物1和引物2扩增Her2-ECDs(143U-1284L, M1-P378),引物1和引物3扩增Her2-ECD(143U-2076L, M1-C642),引物1和引物4扩增Her2-TM(143U-2187L, M1-Q679)。

#### 1.3 目的基因的扩增

以Trizol法从SK-BR-3细胞株中提取的总RNA为模板,引物4为特异性逆转录引物,逆转录酶MM-LV, 37℃, 1 h; 70℃, 10 min,合成cDNA。以cDNA 2μl为模板, Pfu DNA聚合酶PCR扩增。反应条件: 94℃, 1min; 94℃, 30s; 58℃, 45s; 68℃, 5min 30s (ECD&TM) or 3min (ECDs); 共30个循环; 68℃, 7min。琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下观察电泳带。

#### 1.4 目的基因的PMD18-T载体克隆和转化大肠杆菌

PCR产物纯化后,用DNA加A试剂盒使其末段加上A,胶回收,加入T<sub>4</sub>DNA连接酶,与pMD18-T载体, 16℃,连接30min。按文献[3]转化用氯化钙法制备大肠杆菌DH5α感受态,涂布于含2%X-gal, 7μl 20% IPTG和50μg/ml氨苄抗性的LB平板上, 37℃倒置平皿培养18~20h。

#### 1.5 目的DNA片段与pAdTrack载体的连接和转化

用Promega Wizard Plus SV DNA纯化试剂盒制备质粒DNA, Nde I和EcoR V双酶切筛选正确的重组pMD18,目的基因测序正确后,将pAdTrack-CMV载体和重组pMD18的DNA用Kpn I和HindIII双酶切,胶回收目

的片段。加入 $T_4$  DNA连接酶，22℃连接3h，按1.4的方法转化转化大肠杆菌DH5 $\alpha$ ，Pac I 酶切筛选连接正确的质粒。

### 1.6 细菌内同源重组构建Her2-ECDs, ECD和TM病毒质粒

将pAdTrack-CMV重组穿梭质粒DNA经Pme I 酶切线性化，胶回收纯化，按1.4方法将2  $\mu$ g DNA转化含腺病毒骨架质粒Adeasy-1的BJ5183感受态细菌，铺卡那抗性的平板。经20 h培养后，挑取菌落摇菌，SDS碱裂解法[3]小量提取质粒DNA。Pac I 酶切筛选正确质粒，

### 1.7 重组腺病毒载体的产生和筛选

碱裂解法[3]大量提取重组病毒质粒DNA，各取12 $\mu$ g，经Pac I 酶切后，用酚/氯仿法抽提纯化。加40 $\mu$ l PolyFect转染试剂到DNA溶液中，转染293细胞，37℃、5%CO<sub>2</sub>培养2h后，用1.25%琼脂糖和3.75%FBS的DMEM混合培养基覆盖。以后每3~4d补加混合培养基1.5 ml直至病毒噬斑形成。

### 1.8 病毒的筛选和扩增

挑出单个病毒噬斑，感染培养的293细胞，48h后按文献[4]采用Hirt试验提取病毒DNA，PCR筛选。将含目的片段DNA的病毒感染的293细胞悬液-20℃~37℃冻溶3次，离心，取上清，加50 $\mu$ l到近80%融合的293细胞的6孔板中。达到完全细胞病变效应时振摇收集细胞悬液。冻溶3次，离心，取病毒上清。

### 1.9 Western blot 检测293中Her-ECDs, ECD和TM蛋白的表达

分别用纯化的表达Her2-ECDs, ECD及TM的重组腺病毒以感染复数(MOI)=100；表达Her2-TM的重组腺病毒分别按MOI为 $8 \times 10^3$ ， $1.6 \times 10^3$ ， $3.2 \times 10^2$ ，64，13感染 $1 \times 10^6$  293细胞48h后，收集细胞，按文献[3]操作。蛋白信号由ECL试剂盒检测。成像后的胶片在凝胶成像分析系统上测定灰度值。以MOI=13的灰度值作为参照，计算每个梯度与其的比值(相对值)进行分析。对于不同MOI感染293细胞的蛋白测定，试剂用量及处理过程均相同。

## 2 结果

### 2.1 Her2/neu膜外及跨膜区基因RT-PCR结果

通过RT-PCR扩增出了Her2-ECDs, ECD及TM三个目的基因片段，长度分别为1147 bp，1940 bp和2051 bp。凝胶电泳显示条带清楚，特异性好(图1)。

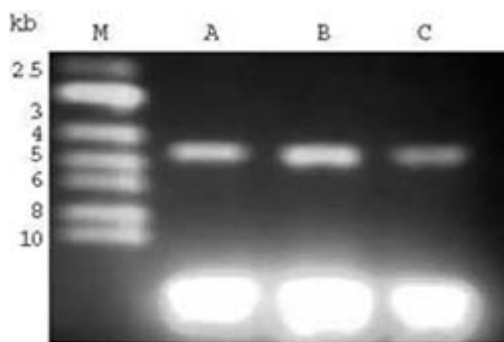


图1 RT-PCR扩增Her2-ECDs, ECD及TM蛋白基因  
Fig.1 RT-PCR for Her2-ECDs, ECD and TM cDNA  
Lane A: Her2-ECDs; Lane B: Her2-TM; Lane C: Her2-ECD

### 2.2 重组PMD18载体的目的基因的测序

测序结果经Blast比较(RID: 1084341062-12428- 209726979065.BLASTQ3)，序列完全正确。TM片段基因在跨膜区第一和二个氨基酸(644和645)密码子均为GTC，即缬氨酸(val)-缬氨酸(val)，这是Her2/neu基因多态性在这个位点出现的频率最低(1.2%)的一种排列。2.3 Her2-ECDs, ECD及TM的重组腺病毒质粒DNA的Pac I 酶切鉴定

正确的Her2-ECDs, ECD及TM的重组腺病毒质粒应见到3.5 kb或4.5 kb, 以及30 kb附近的两条带, 凝胶电泳显示获得了正确的重组腺病毒质粒(图2)。

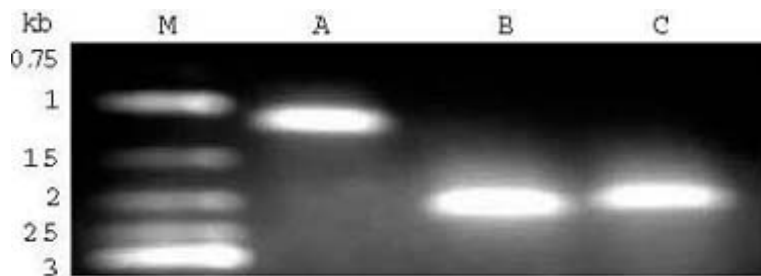


图2 Her2-ECDs, ECD及TM的重组腺病毒质粒DNA Pac I 酶切鉴定

Fig.2 Identification of the inserted DNA in recombinant adenoviral plasmids encoding Her2-ECDs, ECD and TM with Pac I

Lane A: Her2-ECDs; Lane B: Her2-ECD; Lane C: Her2-TM

#### 2.4 脂质体转染线性化病毒质粒DNA到293细胞

在转染后第4天, 可见到明显的绿色荧光, 第7天荧光进一步增强, 第10天见到明显的病毒噬斑产生(图3)。

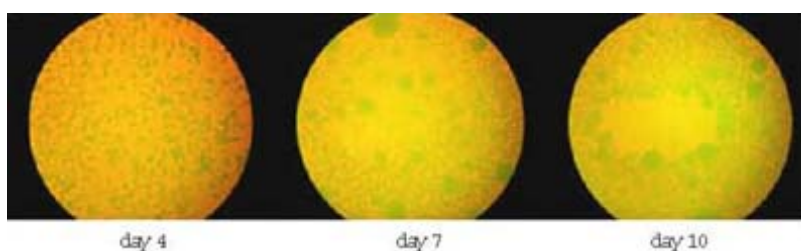


图3 线性化病毒质粒DNA转染293细胞后4、7、10天GFP的表达和病毒噬斑形成

Fig.3 Expression of GFP and viral plaque formation on days 4, 7, and 10 in 293 cells transfected by linearized viral plasmids (Original magnification:  $\times 100$ )

#### 2.5 Western blot 检测293中Her2-ECDs, ECD和TM蛋白的表达

结果显示, Her2-ECDs, ECD和TM蛋白在293细胞中获得了表达, 蛋白表达量随着MOI的升高而增高。以MOI=13的灰度值作为参照, 在MOI为13, 64,  $3.2 \times 10^2$ ,  $1.6 \times 10^3$ ,  $8 \times 10^3$ 时, 相对比值分别为1, 1.1, 1.5, 2.7, 3.3。见图4、5。

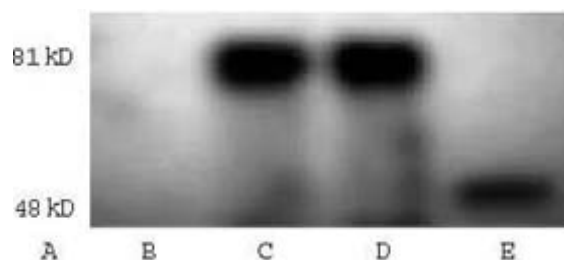


图4 Her2-ECDs, ECD和TM蛋白在293细胞中的表达

Fig.4 Expression of Her2-ECDs, ECD and TM in 293 cells

Lane A: Predicted molecular weight of proteins; Lane B: Negative control; Lane C: Her2-ECD; Lane D: Her2-TM; Lane E: Her2-ECDs

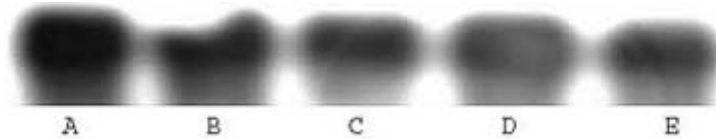


图5 不同MOI的Her2-TM重组腺病毒感染 $1 \times 10^6$  293细胞48 h后蛋白表达差异  
 Fig.5 Amount of Her2-TM expression in  $1 \times 10^6$  293 cells infected by recombinant adenovirus of different MOIs  
 Lanes A-E correspond to MOI of  $8 \times 10^3$ ,  $1.6 \times 10^3$ ,  $3.2 \times 10^2$ , 64 and 13, respectively

### 3 讨论

Her2/neu原癌基因编码p185跨膜蛋白，是酪氨酸激酶信号通路的重要受体，通常也被认为是一种自身抗原[5]，主要在胚胎发育期间表达，在成人正常组织极少表达[6]，但超过1/3的乳腺癌和卵巢癌组织中存在Her2/neu原癌基因扩增和/或过度表达[7]。如何打破机体已经产生的免疫耐受，诱导针对Her2/neu基因产物的有效应答，是Her/neu疫苗研究的重点。

以Her2/neu膜外区和跨膜区作为靶向抗原基因，对Her2/neu而言，首先，避免了整个原癌基因被完整表达，在体内有潜在的转化危险。为避免上述问题，人们以Her2/neu为抗原基因时通常对其进行修饰[8]。其次，除了完整的自我蛋白抗原能否诱导免疫应答存在着疑问之外，用与人Her2/neu蛋白高度同源的完整小鼠neu基因病毒载体疫苗诱导小鼠的免疫应答已有失败的报道[9]，更多一致的观点是截尾的Her2/neu基因诱导的免疫应答的效率比完整的Her2/neu基因明显为高[1][2][9]。

腺病毒因其具有安全性较好，感染能力强，可感染各细胞周期的细胞，蛋白表达量高，不整合到宿主的染色体中，没有插入性突变而成为基因转染和治疗常用的载体[10][11][12]。目前，制备重组腺病毒主要方法是，同源重组产生能在包装细胞系(293或911等)复制的缺陷型腺病毒，由包装细胞系提供其缺失的基因。然后通过包装细胞形成的噬斑筛选获得需要的重组病毒。虽然这种方法已被证明非常有效，但是存在着同源重组效率低下，需要多轮次的反复噬斑纯化和花费时间较长等缺点。为此，Bert Vogelstein等开发了新的腺病毒重组系统—AdeasyTM系统，它有如下特点：(1)骨架载体包含腺病毒以超螺旋形式存在的大部分基因组，无需酶切；(2)重组在大肠杆菌，而不是在哺乳细胞内进行；(3)利用细菌内的高效同源重组，不需连接步骤；(4)载体可以插入10 kb以上的基因序列和在同一病毒内允许表达多个目的基因；(5)将GFP基因并入腺病毒骨架质粒，可以直接地观察转染和感染的效率。这些特点使同源重组效率大为提高，简化了噬斑纯化，只需较短的时间就可以生产出有用的重组腺病毒[12]。据此，我们利用AdeasyTM系统成功地构建了表达Her2-ECDs，ECD和TM基因蛋白的重组腺病毒，为进一步的免疫研究打下基础。

(责任编辑：陈望忠)

#### 参考文献：

- [1]Amici A, Smorlesi A, Noce G, et al. DNA vaccination with full-length or truncated neu induces protective immunity against the development of spontaneous mammary tumors in HER-2/neu trans-genic mice[J]. Gene Ther, 2000, 7(8): 703-6.
- [2]Chen Y, Hu D, Eling DJ, et al. DNA vaccines encoding full-length or truncated Neu induce protective immunity against Neu-expressing mammary tumors[J]. Cancer Res, 1998, 58(9): 1965-71.
- [3]J. 萨姆布鲁克, D.W. 拉塞尔著. 黄培堂, 王嘉玺, 朱厚础, 等译. 分子克隆实验指南[M]. 第3版,

北京：科学出版社，2002：26-34.

[4]DL. 斯佩克特, RD. 戈德曼, LA. 莱因万德著. 黄培堂, 译. 细胞实验指南[M]. 北京：科学出版社, 2001: 827-9.

[5]Cheever MA, Disis ML, Bernhard H, et al. Immunity to oncogenic proteins[J]. Immunol Rev, 1995, 145: 33-59.

[6]Kokai Y, Cohen JA, Drebin JA, et al. Stage- and tissue-specific expression of the neu oncogene in rat development[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1987, 84(23): 8498-501.

[7]Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer[J]. Science, 1989, 244(4905): 707-12.

[8]Wei WZ, Shi WP, Galy A, et al. Protection against mammary tumor growth by vaccination with full-length, modified human ErbB-2 DNA[J]. Int J Cancer, 1999, 81(5): 748-54.

[9]Bernards R, Destree A, McKenzie S, et al. Effective tumor immunotherapy directed against an oncogene-encoded product using a vaccinia virus vector[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1987, 84(19): 6854-8.

[10]Shen LZ, Wu WX, Xu DH, et al. Specific CEA-producing colorectal carcinoma cell killing with recombinant adenoviral vector containing cytosine deaminase gene[J]. World J Gastroenterol, 2002, 8: 270-5.

[11]Wu HG, Zhou LB, Shi DR, et al. Morphological study on colonic ulcerative colitis treated by moxibustion[J]. World J Gastroenterol, 2000, 6: 861-5.

[12]He TC, Zhou SB, Da Costa LT, et al. A simplified system for generating recombinant adenoviruses[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95: 2509-14.