

# 重组外源性人热休克蛋白70基因真核表达载体的构建及鉴定\*\*\*◆

韩世伟<sup>1</sup>, 张阳德<sup>1,2</sup>, 万小平<sup>1</sup>, 陈玉祥<sup>2</sup>

## Construction and identification of a recombinant eukaryotic expression vector containing human heat shock protein 70 gene

Han Shi-wei<sup>1</sup>, Zhang Yang-de<sup>1,2</sup>, Wan Xiao-ping<sup>1</sup>, Chen Yu-xiang<sup>2</sup>

### Abstract

**BACKGROUND:** Heat shock protein 70 (Hsp70) has attracted widespread attention by domestic and foreign scholars for the role of tumor immunity in recent years. However, the commonly used methods, such as heat stress and ischemic preconditioning, have disadvantages in inducing exogenous recombinant Hsp70 gene expression.

**OBJECTIVE:** To construct a recombinant eukaryotic expression vector which expresses human HSP70 gene.

**METHODS:** The exogenous Hsp70 gene was connected to eukaryotic expression vector pDC315-EGFP. Then it was transformed to *E. coli* competent cells. The positive clone was evaluated by gene sequencing and PCR detection and then was transfected to human embryo kidney 293 cells. The exogenous gene expression was tested by fluorescence microscope and Western blot.

**RESULTS AND CONCLUSION:** It was confirmed by PCR and sequencing identification analysis that the target gene was cloned correctly to the eukaryotic expression vector. The expression of GFP could be observed by fluorescence microscope and western blot, which indicated that Hsp70 could be efficiently expressed in human embryo kidney 293 cells. Recombinant eukaryotic expression pDC315-EGFP-Hsp70 was constructed successfully.

Han SW, Zhang YD, Wan XP, Chen YX. Construction and identification of a recombinant eukaryotic expression vector containing human heat shock protein 70 gene. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(20): 3674-3677. [http://www.crter.cn http://en.zgckf.com]

<sup>1</sup>National Hepatobiliary & Enteric Surgery Research Center, Ministry of Health, Central South University, Changsha 410008, Hunan Province, China; <sup>2</sup>National Key Laboratory of Nanobiological Technology, Ministry of Public Health, Central South University, Changsha 410008, Hunan Province, China

Han Shi-wei★, Studying for master's degree, National Hepatobiliary & Enteric Surgery Research Center, Ministry of Health, Central South University, Changsha 410008, Hunan Province, China cco1985@yahoo.com.cn

Correspondence to: Zhang Yang-de, Doctor, Professor, Doctoral supervisor, National Hepatobiliary & Enteric Surgery Research Center, Ministry of Health, Central South University, Changsha 410008, Hunan Province, China ZYD@2118.cn

Supported by: the 863 Program of State Commission of Science Technology in the Tenth Five-Year Plan of China, No. 2007AA021104\*; Central South University Innovation Fund for Post-graduate Degree Thesis\*

Received: 2009-12-11 Accepted: 2010-02-26

### 摘要

**背景:** 热休克蛋白 70 的肿瘤免疫作用近年来受到国内外学者的广泛关注, 然而目前常用的诱导内源性热休克蛋白 70 表达的方法, 如热应激、缺血预处理等均存在一些弊端。

**目的:** 拟构建携带并正确表达外源性人热休克蛋白 70 基因的重组真核表达载体。

**方法:** 外源性热休克蛋白 70 基因连接入真核表达载体 pDC315-EGFP 中, 转化大肠杆菌感受态细胞, 重组真核表达载体外源基因测序及 PCR 检测鉴定阳性克隆后转染人胚肾 293 细胞, 荧光显微镜及 western blot 鉴定外源基因在细胞中的表达。

**结果与结论:** 经 PCR 和测序证实外源性人热休克蛋白 70 基因正确重组入真核表达载体 pDC315-EGFP, 转染 293 细胞后荧光显微镜观察到绿色荧光蛋白 GFP 的表达, Western blot 检测到热休克蛋白 70 在 293 细胞中有效表达。

**关键词:** 热休克蛋白 70; 真核表达载体; 基因载体; 基因重组; 基因治疗

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.20.015

韩世伟, 张阳德, 万小平, 陈玉祥. 重组外源性人热休克蛋白 70 基因真核表达载体的构建及鉴定[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(20):3674-3677. [http://www.crter.org http://cn.zgckf.com]

## 0 引言

热休克蛋白被发现以来, 其作为分子伴侣的功能已被广泛研究<sup>[1-3]</sup>。直至20世纪80年代, 人们才发现其在免疫中的作用。经多年研究, 热休克蛋白的一些免疫特性已被揭示出来<sup>[4-5]</sup>。它可结合肿瘤细胞表达的多肽类抗原, 通过内源性途径传递给主要组织相容性抗原复合物 I 类分子, 引发特异性的细胞毒性T细胞反应, 诱导机体产生强大的抗肿瘤免疫效应<sup>[6-8]</sup>。

在已发现的热休克蛋白中, 热休克蛋白 70(heat shock protein 70, Hsp70)是含量最多也是最为保守的一类<sup>[9]</sup>。研究表明Hsp70可在体内诱导多个肿瘤特异的细胞毒T淋巴细胞活性, 特异杀伤肿瘤细胞, 具有肿瘤疫苗的作用<sup>[10-12]</sup>。

然而在诸多研究中采用热应激、缺血预处理等方法诱导内源性Hsp70表达<sup>[13-14]</sup>, 这种方法简单直接, 但仍存在一些弊端。因为在各种刺激因子作用下, 除Hsp70表达上调以外, 其他基因的表达也会不同程度受影响, 从而导致对结果的干扰。相对此, 利用携带Hsp70基因的载体将其导入特定细胞, 使其在细胞内稳定表达, 能更加客观地研究Hsp70在应激状态下对靶细胞的保护和肿瘤免疫效应。本实验将人Hsp70基因插入含EGFP标记增强荧光蛋白基因的真核表达质粒, 经大肠杆菌感受态细胞组装后, 获得可高效表达Hsp70的真核表达载体。

## 1 材料和方法

**设计:** 细胞分子学水平体外基因重组试验。

**时间及地点:** 于2009-06/12在中南大学卫生部纳米生物技术重点实验室完成。

**材料:**

主要试剂	来源
携带 EGFP 标记荧光蛋白基因的真核表达载体 pDC315-EGFP 质粒 pOTB7/Hsp70 <sup>[15]</sup>	中国本原正阳公司 美国 Open Biosystems 公司
限制性核酸内切酶 Age I 质粒提取试剂盒	英国 NEB 公司 美国 Promega 公司
dNTP	日本 Takara 公司
Taq 聚合酶	上海 SinoBio 公司
DNA marker	立陶宛 Fermentas 公司
In-Fusion™ 交换酶	日本 clontech 公司
脂质体 Lipofectamine 2000	美国 Invitrogen 公司
一抗 Mouse Anti-GFP	美国 Santa-Cruz 公司
二抗 Goat Anti-Mouse	美国 Santa-Cruz 公司
大肠杆菌 DH5α, 人胚肾 293 细胞	中南大学湘雅细胞中心

**实验方法:**

**引物设计:** 根据Genebank中Hsp70的序列编码(NM\_005345)及真核表达载体pDC315-EGFP的多克隆位点, 运用Primier 5.0软件设计钓取目的基因Hsp70和鉴定及测序所需的特异性引物。①Hsp70-Age I-F: GAG GAT CCC CGG GTA CCG GTC GCC ACC ATG GCC AAA GCC GCG GCG ATC。引物说明: 含交换配对碱基、Age I酶切位点(下划线标记)以及表达增强序列(双下划线记), 并含有目的基因5'端部分序列用于PCR钓取目的基因。②Hsp70- Age I-R: TCA CCA TGG TGG CGA CCG GAT CTA CCT CCT CAA TGG TG。引物说明: 含交换配对碱基、Age I酶切位点(下划线标记, 为了调整读码框去掉了T碱基), 并含有目的基因3'端部分序列用于PCR钓取目的基因。③Hsp70-SEQF: GAT CGA GGT GAC CTT CGA C。引物说明: 该引物位于目的基因中, 用于菌落PCR鉴定转化子。④Hsp70-W1F: GAT CAT CAA CGA GCC CAC G。引物说明: 该引物位于基因内, 用于测序。⑤pDC315-F: GGT ATA AGA GGC GCG ACC AG。引物说明: 该引物位于mCMV promoter中, 用于菌落PCR鉴定转化子及测序。⑥EGFP-N-R: CGT CGC CGT CCA GCT CGA CCA G。引物说明: 该引物位于载体上EGFP的N端, 用于菌落PCR鉴定转化子以及测序。

**目的基因的获取:** 从携带有目的基因的质粒pOTB7/Hsp70中用PCR法扩增目的基因<sup>[16]</sup>。

**反应体系:** 质粒pOTB7/Hsp70 1 μL; Hsp70-Age I-F 0.4 μL; Hsp70-Age I-R

0.4 μL; 5×Taq buffer 4 μL; DNTPs (2.5 mmol/L) 1.6 μL; Taq聚合酶0.2 μL; 无菌去离子水补足使得总反应体系为20 μL。

**反应条件:** 94 °C 预变性5 min; 之后94 °C 30 s、55 °C 30 s、72 °C 3 min, 共30个循环; 最后72 °C 延伸10 min, 4 °C 冷却。取5 μL PCR产物于1 g/L的琼脂糖凝胶中电泳, 凝胶自动成像系统分析结果。切下前述电泳的目的胶带, 切时尽可能小, 放入1.5 mL Ep管中按照DNA回收纯化试剂盒说明对产物进行纯化回收。将回收的PCR产物置-20 °C 保存备用。

**真核表达载体pDC315-EGFP酶切线性化:** 使用Age I 进行酶切消化, 使pDC315-EGFP线性化。反应体系: 纯化的pDC315-EGFP质粒(1 g/L)2 μL; Age I (10 U/μL)1 μL; 10×buffer 5 μL; 灭菌去离子水补足总体积到50 μL。将上述反应体系装入1.5 mL Ep管中置于37 °C 水浴, 反应过夜。将反应产物置0.8%琼脂糖凝胶电泳, 通过与DNA标准分子质量Marker比较作出判断, 按前面所述方法回收线性化的载体DNA片段。

**目的基因连接线性化载体:** 将获取的目的基因PCR产物与获取的线性化真核表达载体PCR产物用PCR法, 从质粒pOTB7/Hsp70中钓取的目的基因Hsp70的纯化回收产物与真和表达载体pDC315-EGFP的酶切线性化产物采用In-Fusion交换酶交换连接, 即为连接组。同时设置阳性对照组和自连对照组。

**反应体系:**

反应体系	阳性对照	自连对照	交换组
dd H <sub>2</sub> O	13.5 μL	15.5 μL	13.5 μL
10 × In-Fusion 交换酶缓冲液	2 μL	2 μL	2 μL
线性化载体 DNA 100 mg/L	2 μL	2 μL	2 μL
纯化的 PCR 产物 100 mg/L	2 μL	0	2 μL
In-Fusion 交换酶	0.5 μL	0.5 μL	0.5 μL
<b>Total</b>	<b>20 μL</b>	<b>20 μL</b>	<b>20 μL</b>

其中, 阳性对照组加入的纯化PCR产物为GAPDH基因。将以上体系于25 °C 反应30 min, 再于42 °C 反应15 min制备克隆交换液, 保存与4 °C 冰箱中备用。交换产物转化大肠杆菌感受态细胞: 参考《分子克隆》第3版的方法采用氯化钙制备的新鲜大肠杆菌感受态细胞DH5α<sup>[17]</sup>, 将感受态细胞分装成小份, 保存与-70 °C 冰箱中。取10 μL连接产物加入无菌1.5 mL Ep管中。从-70 °C 取出感受态细胞

<sup>1</sup> 中南大学卫生部肝胆肠外科研究中心, 湖南省长沙市 410008; <sup>2</sup> 中南大学卫生部纳米生物技术重点实验室, 湖南省长沙市 410008

韩世伟★, 男, 1985年生, 内蒙古自治区锡林郭勒盟人, 蒙古族, 中南大学湘雅医学院在读硕士, 主要从事肝胆肠疾病的基础与临床研究。cco1985@yahoo.com.cn

通讯作者: 张阳德, 博士, 教授, 博士生导师, 中南大学卫生部肝胆肠外科研究中心, 湖南省长沙市 410008 zyd@2118.cn

中图分类号: R318  
文献标识码: B  
文章编号: 1673-8225 (2010)20-03674-04

收稿日期: 2009-12-11  
修回日期: 2010-02-26  
(20091211014/N-Z)

DH5 $\alpha$ , 在两手间搓动, 使其迅速复苏, 并立即取100  $\mu$ L加入连接产物中, 轻轻旋转以混匀内容物, 在冰中放置30 min。将管放到预加温到42  $^{\circ}$ C的循环水浴中放好的试管架上, 恰恰放置90 s, 不要摇动试管。快速将管转移到冰浴中, 使细胞冷却1.0~2.0 min。每管加800  $\mu$ L LB培养基。用水浴将培养基加温至37  $^{\circ}$ C, 然后将管转移到37  $^{\circ}$ C摇床上, 温育45 min使细菌复苏。将150  $\mu$ L已转化的感受态细胞转移到含AMP抗性 (100 mg/L)的LB琼脂培养基上。将平板置于室温直至液体被吸收。倒置平皿于37  $^{\circ}$ C培养16 h。长出的克隆进行后续PCR鉴定。

**阳性克隆的PCR鉴定:** 在交换组转化产物长出菌克隆表面沾一下, 于不同部位随机沾取7次, 分别溶于10  $\mu$ L LB培养液中, 各自混匀后作为模版; 阴性对照组使用水作为模版; 自连对照组使用自连对照转化产物作为模版; 阳性对照组使用阳性对照转化产物作为模版, 之后各组进行PCR反应。

**反应体系:** 各组模版1  $\mu$ L; Hsp70-SEQF(10  $\mu$ mol/L) 0.4  $\mu$ L; EGFP-N-R(10  $\mu$ mol/L)0.4  $\mu$ L; 5 $\times$ Taq buffer 4  $\mu$ L; DNTPs (2.5 mmol/L) 1.6  $\mu$ L; Taq聚合酶0.2  $\mu$ L; 无菌去离子水补足使得总反应体系为20  $\mu$ L。

**反应条件:** 94  $^{\circ}$ C 预变性2 min; 之后94  $^{\circ}$ C 30 s、60  $^{\circ}$ C 30 s、72  $^{\circ}$ C 40 s共30个循环; 最后72  $^{\circ}$ C延伸6 min, 4  $^{\circ}$ C冷却。取5  $\mu$ L PCR产物于1 g/L的琼脂糖凝胶中电泳, 凝胶自动成像系统分析结果并测序。

**pDC315-EGFP-Hsp70转染人胚肾293细胞并检测:** 依据Lipofectamine 2000说明书的步骤, 采用脂质体法将pDC315-EGFP-Hsp70转染入对数生长期293细胞<sup>[18]</sup>, 转染后继续于37  $^{\circ}$ C, 体积分数5%CO<sub>2</sub>细胞培养箱中培养24 h。之后荧光显微镜观察GFP的表达情况; Western blot检测目的蛋白Hsp70的表达情况<sup>[17-19]</sup>。收集转染后生长良好的目的细胞, 提取总蛋白。

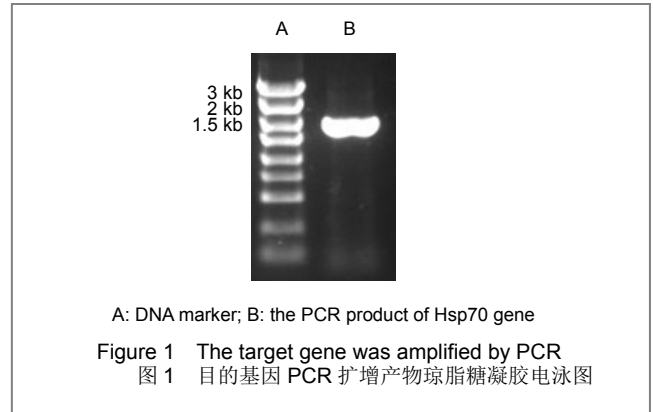
取两份同样量的蛋白加入相同体积的上样缓冲液, 上样后SDS-PAGE电泳。湿法转膜后免疫显色, 其中一抗为Mouse Anti-GFP, 二抗为Goat Anti-Mouse。另设空白细胞组做阴性对照。

**主要观察指标:** 重组真核表达载体外源基因测序及PCR检测, 绿色荧光蛋白表达, 外源基因表达。

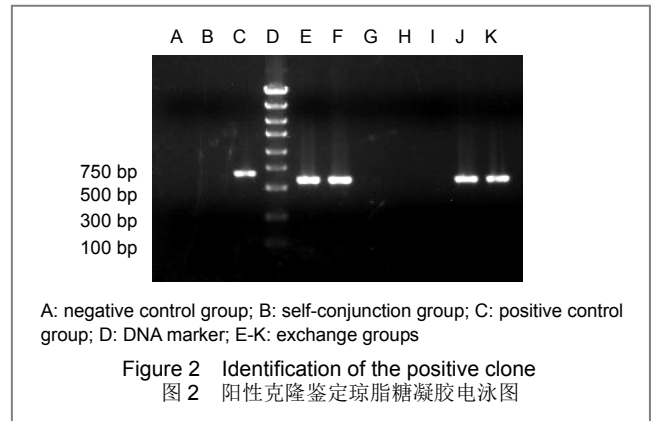
**设计、实施、评估者:** 实验设计为第一、三、四作者, 实验实施为第一作者, 评估为第二、三、四作者。均经过系统培训, 未使用盲法评估。

## 2 结果

**2.1 目的基因的PCR产物鉴定** 用PCR法从质粒pOTB7/Hsp70上扩增的产物, 经琼脂糖凝胶电泳, 在约1 966 bp处得到特异性条带, 与理论预计值相符, 见图1, 测序后与Genebank报道的人Hsp70基因编码序列一致。



## 2.2 阳性克隆pDC315-EGFP-Hsp70鉴定结果 见图2。



交换组、阴性对照组、阳性对照组和自连对照组各组PCR反应所得产物琼脂糖凝胶电泳示阴性对照组和自连对照组无特征性条带泳出; 阳性对照组在约700 bp左右有特异性条带; 7个交换组中, 4组跑出特异性条带, 位置约为584 bp处, 另有3组无条带泳出,

测序结果与Genebank中给出的Hsp70编码序列结果为1 921/1 924, 相似度达99%, 其中有3处同义突变, 分别为待测基因304~306位的ATT同义突变为ATC; 待测基因1 139~1 141位的CAG 同义突变为CAA; 待测基因1 792~1 794位的GTG 同义突变为GTT。

## 2.3 pDC315-EGFP-Hsp70转染293细胞后蛋白表达结果 见图3。

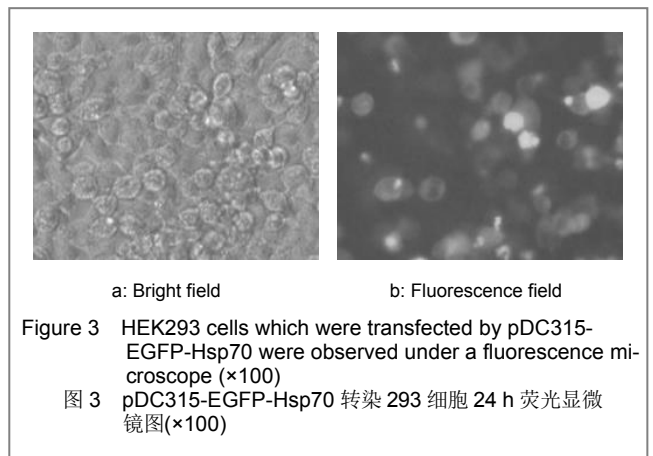
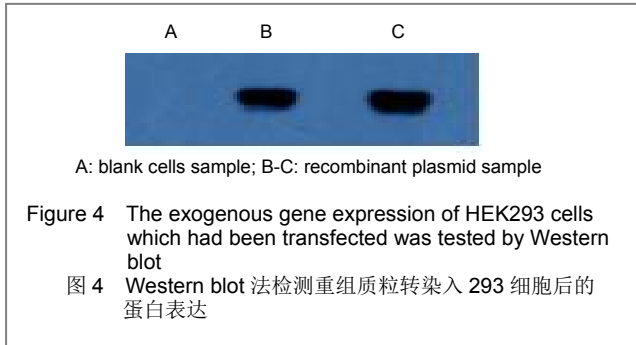


图3结果表明质粒中携带的GFP基因可以很好的在293细胞中表达绿色荧光蛋白。

Western Blot法检测pDC315-EGFP-Hsp70重组质粒转入293细胞后的样品, 在 $M_r$  98 000处有特征性条带, 符合Hsp70-GFP融合蛋白的大小。重复两次得到相同结果, 未转染重组质粒的空白293细胞样本无条带, 如图4。表明重组质粒表达外源基因良好。



### 3 讨论

本实验在阳性克隆的鉴定环节中, 分别设置了阴性对照组、阳性对照组和自连对照组。其中阴性对照使用水作为模板, 用以排除系统中外源核酸污染导致的假阳性结果; 阳性对照组中连接了GAPDH基因, 此基因同样带有交换臂, 此组使用阳性对照转化子作为模板, 扩增GAPDH基因的一部分, 用来排除PCR试剂、PCR仪器以及PCR反应条件等原因导致的假阴性结果<sup>[20-21]</sup>; 自连对照组的设置是用以排除非特异性扩增导致的假阳性结果。PCR鉴定时采用的引物分别为位于Hsp70目的基因中的Hsp70-SEQF和位于pDC315-EGFP真核表达载体上EGFP的N端的EGFP-N-R, 若质粒转染成功, 则质粒中含有Hsp70基因, PCR扩增后才能跑出特征条带, 从而更加准确地鉴定阳性克隆。

本实验成功构建了携带外源性Hsp70基因的重组真核表达载体, 并成功转染人胚肾293细胞, 应用 western blot鉴定结果表明, pDC315-EGFP-Hsp70可以在293细胞中高效表达外源基因。从而为进一步研究 Hsp70对应激状态下细胞的保护作用、肿瘤免疫作用及其在临床治疗和诊断中的应用奠定了实验基础。

### 4 参考文献

- [1] Yokota S, Kitahara M, Nagata K. Benzylidene lactam compound, KNK437, a novel inhibitor of acquisition of thermotolerance and heat shock protein induction in human colon carcinoma cells. *Cancer Res.* 2000;60(11):2942-2948.
- [2] Ozdemirler Erata G, Kanbağlı O, Durlanik O, et al. Induced oxidative stress and decreased expression of inducible heat shock protein 70 (hsp70) in patients with colorectal adenocarcinomas. *Jpn J Clin Oncol.* 2005;35(2):74-78.
- [3] Macario AJ, Brocchieri L, Shenoy AR, et al. Evolution of a protein-folding machine: genomic and evolutionary analyses reveal three lineages of the archaic hsp70(dnaK) gene. *J Mol Evol.* 2006;63(1):74-86.

- [4] Multhoff G. Heat shock proteins in immunity. *Handb Exp Pharmacol.* 2006;(172):279-304.
- [5] Tsan MF, Gao B. Heat shock protein and innate immunity. *Cell Mol Immunol.* 2004;1(4):274-279.
- [6] Chan T, Chen Z, Hao S, et al. Enhanced T-cell immunity induced by dendritic cells with phagocytosis of heat shock protein 70 gene-transfected tumor cells in early phase of apoptosis. *Cancer Gene Ther.* 2007;14(4):409-420.
- [7] Bachleitner-Hofmann T, Strohschneider M, Krieger P, et al. Heat shock treatment of tumor lysate-pulsed dendritic cells enhances their capacity to elicit antitumor T cells responses against medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006 ;91(11):4571-4577.
- [8] Ueda G, Tamura Y, Hirai I, et al. Tumor-derived heat shock protein 70-pulsed dendritic cells elicit tumor-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) and tumor immunity. *Cancer Sci.* 2004;95(3):248-253.
- [9] Musch MW, Kaplan B, Chang EB. Role of increased basal expression of heat shock protein 72 in colonic epithelial c2BBE adenocarcinoma cells. *Cell Growth Differ.* 2001;12(8):419-426.
- [10] Yokota S, Kitahara M, Nagata K. Benzylidene lactam compound, KNK437, a novel inhibitor of acquisition of thermotolerance and heat shock protein induction in human colon carcinoma cells. *Cancer Res.* 2000;60 (11):2942-2948.
- [11] Xu Y, Whittall T, McGowan E, et al. Identification of stimulating and inhibitory epitopes within the heat shock protein 70 molecule that modulate cytokine production and maturation of dendritic cells. *J Immunol.* 2005;174(6):3306-3316.
- [12] Qiu J, Li GW, Sui YF, et al. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi. 2005;13(5): 635  
邱健, 李国威, 隋延仿, 等. 热休克肿瘤细胞抗原负载的树突状细胞疫苗对原位接种结肠肿瘤的免疫预防作用[J]. 世界华人消化杂志, 2005, 13(5): 635.
- [13] Xu XN, Qu Y. Qingdao Daxue Yixueyuan Xuebao. 2008;44(2): 162-164.  
徐小娜, 曲彦. 热休克蛋白70重组腺病毒载体的构建及鉴定[J]. 青岛大学医学院学报, 2008, 44(2): 162-164.
- [14] Singleton KD, Serkova N, Beckey VE, et al. Glutamine attenuates lung injury and improves survival after sepsis: role of enhanced heat shock protein expression. *Crit Care Med.* 2005;33(6):1206-1213.
- [15] Pollheimer J, Zellner M, Eliassen MM, et al. Increased susceptibility of Glutamine-depleted monocytes to fever-range hyperthermia: the role of 70-kDa heat shock protein. *Ann Surg.* 2005;241(2):349-355.
- [16] Zhang YD, Wu JL, Liu DJ, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2009;13(41):8065-8070.  
张阳德, 吴霖, 刘东京, 等. MAGE-3-HSP70融合基因真核表达载体的构建与鉴定[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(41): 8065-8070.
- [17] J. 萨姆布鲁克 D.W. 拉塞尔. Beijing: Science Press. 2003.  
J. 萨姆布鲁克 D.W. 拉塞尔著. 黄培堂译. 分子克隆实验指南[M]. 3版. 北京: 科学出版社, 2003
- [18] Li YM, Zhao YQ. Beijing: Science Press. 1998.  
李永明, 赵玉琪. 实用分子生物学方法手册[M]. 北京: 科学出版社, 1998.
- [19] E Z. Beijing: Beijing Press. 1995.  
鄂征. 组织培养和分子细胞学技术[M]. 北京: 北京出版社, 1995
- [20] Li YS, Wang CY, Su N, et al. Jiepo Kexue Jinzhan. 2009;15(1): 85-87, 92.  
李彦妹, 王春玉, 苏楠, 等. hLMO4基因重组质粒的构建及蛋白表达和定位[J]. 解剖科学进展, 2009, 15(1): 85-87, 92.
- [21] Wang R, Yang WZ, Shi SS, et al. Expressions of heat shock factor 1 and heat shock proteins in human benign meningiomas. *Chin J Neurosurg.* 2008;13(11):661-663.

来自本文课题的更多信息--

**基金资助:** 国家科技部“十五”863 计划项目(2007AA021104), 课题名称: Hsp70、GM-CSF 双修饰 DU145、PC3 激素非依赖性前列腺癌细胞株全细胞疫苗的研制; 中南大学研究生学位论文创新基金, 课题名称: Hsp70、GM-CSF 双修饰 DU145、PC3 激素非依赖性前列腺癌细胞株全细胞疫苗的研制。

**课题的意义:** 目前临床上对于恶性肿瘤的免疫治疗已有所应用, 但由于免疫原性低等原因, 使得现今的免疫治疗疗效并不佳。实验成功构建可在真核细胞中高效表达外源基因 Hsp70 的重组真核表达载体, 为下一步构建重组腺病毒转染肿瘤细胞构建肿瘤疫苗提供了关键的实验材料。

**课题的偏倚与不足:** 虽然初步的试验证实了重组真核表达载体 pDC315-EGFP-Hsp70 可以在真核细胞 293 细胞内有效转染, 且有较高转染效率, 外源基因在细胞内有效表达, 但其对肿瘤细胞的转染及免疫效应仍待进一步研究。