

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.37.016

[http://www.crter.org]

赵国华, 张睿, 许国岩, 王冬梅. 真核表达载体 pcDNA3-ICOSIg 的构建及表达[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(37):6641-6644.

真核表达载体 pcDNA3-ICOSIg 的构建及表达**☆

赵国华¹, 张睿², 许国岩³, 王冬梅⁴ (辽宁省肿瘤医院, ¹胃外科, ²大肠外科, 辽宁省沈阳市 110042; ³沈阳市铁西区华康医院外科, 辽宁省沈阳市 110026; ⁴辽宁陆军预备役高射炮一师三团, 辽宁省沈阳市 110048)

文章亮点:

1 实验构建了 ICOSIg 融合基因及其分泌型真核表达载体 pcDNA3-ICOSIg, 旨在避免腺病毒载体可能对宿主基因造成的不良影响。

2 实验方法中利用脂质体转染、直接肌肉注射的方法将真核表达载体 pcDNA3-ICOSIg 转染至小鼠, 具有操作简便、广谱和高效的特点。

关键词:

组织构建; 组织构建基础实验; 真核表达; 肿瘤; 共刺激信号; 人可诱导共刺激分子; 免疫球蛋白; 质粒; 基因转染; 省级基金

主题词:

转染; 肿瘤; 可诱导 T 细胞共刺激分子蛋白; 质粒

基金资助:

辽宁省人社厅百千万人才工程资助项目(2011921027)*; 辽宁省科技厅博士启动基金资助项目(20081032)*

赵国华☆, 男, 1975 年生, 辽宁省丹东市人, 汉族, 2006 年中国医科大学毕业, 博士, 副主任医师, 主要从事普通外科基础与临床研究。

zgh1975070707@163.com

中图分类号:R318

文献标识码:B

文章编号:2095-4344

(2013)37-06641-04

收稿日期: 2013-01-19

修回日期: 2013-04-24

(20100807005/WLM · C)

摘要

背景: 人可诱导共刺激分子(ICOS)是迄今发现的重要共刺激分子家族成员, 可促进激活 T 细胞的增殖和分泌、调节 Th1/Th2 细胞的极化、增强依赖 T 细胞的 B 细胞功能, 阻断 ICOS 共刺激信号会导致 T 细胞的克隆失活或克隆无反应, 从而诱导肿瘤对机体的免疫逃逸。

目的: 构建表达 ICOSIg 的质粒, 观察其在小鼠体内的表达。

方法: 克隆编码 ICOS 的胞外片段, 将其与编码小鼠免疫球蛋白 IgG 恒定片段(Ig)的基因融合, 构建 ICOSIg 融合基因及其分泌型真核表达载体 pcDNA3-ICOSIg, 酶切鉴定重组子, 测序, 利用阳性脂质体载体包被 pcDNA3-ICOSIg 转染小鼠右侧大腿肌肉组织, Western blot 法检测血清 ICOSIg 水平。

结果与结论: 经测序鉴定证实 pcDNA3-ICOSIg 质粒目的基因片段与 Genbank 上公布的 ICOS 序列完全一致, 说明质粒构建成功。脂质体载体包被 pcDNA3-ICOSIg 转染小鼠 7 d, 在小鼠血清中检测到 ICOSIg 的阳性表达, 说明 pcDNA3-ICOSIg 能够在小鼠肌细胞内表达。证实利用基因合成和重组技术可成功构建真核表达载体 pcDNA3-ICOSIg。

Construction and expression of eukaryotic expression vector pcDNA3-ICOSIg

Zhao Guo-hua¹, Zhang Rui², Xu Guo-yan³, Wang Dong-mei⁴ (¹Department of Gastric Surgery, ²Department of Colorectal Surgery, Liaoning Cancer Hospital, Shenyang 110042, Liaoning Province, China;

³Department of Surgery, Huakang Hospital of Shenyang, Shenyang 110026, Liaoning Province, China;

⁴Regiment 3, Division 1 Anti-aircraft Artillery, Liaoning Army Reserve, Shenyang 110048, Liaoning Province, China)

Abstract

BACKGROUND: So far, inducible co-stimulator is the important costimulatory molecule family member. Inducible co-stimulator can promote the activation of T cells proliferation and secretion, regulate Th1/Th2 cell polarization dependence, enhance B cell function which depend on the T cells. So, blocking the inducible co-stimulator may result the inactivation and no reaction of cloning in T cells, thus inducing the immune escape of tumor on the body.

OBJECTIVE: To build a plasmid expression of inducible co-stimulator Ig, in order to observe the expression in rat body.

METHODS: cDNA encoding the extracellular domain of human inducible co-stimulator was prepared. The encode of the domain was fused with the gene of immunoglobulin IgG constant fragment (Ig) of encoding mouse, in order to build the inducible co-stimulator Ig fusion gene and the secreted eukaryotic expression vector pcDNA3-inducible co-stimulator Ig. Enzyme digestion of the recombinant and sequencing was performed, and then the positive liposome coated pcDNA3-inducible co-stimulator Ig was transferred into the muscle tissue of mouse right thigh. Western blot was used to detect the level of inducible co-stimulator Ig.

Zhao Guo-hua☆, M.D., Associate chief physician, Department of Gastric Surgery, Liaoning Cancer Hospital, Shenyang 110042, Liaoning Province, China
zgh1975070707@163.com

Received: 2013-01-19

Accepted: 2013-04-24

RESULTS AND CONCLUSION: The sequencing confirmed that the size of target gene fragment pcDNA3- inducible co-stimulator Ig plasmid was exactly the same with the sequence of inducible co-stimulator published on Genebank, which indicated the successful of plasmid construction. After transferred into the mouse for 7 days, the liposome coated pcDNA3-inducible co-stimulator Ig was positively expressed in the mice serum, which showed that pcDNA3-inducible co-stimulator Ig could be expressed in the rat muscle cells. The results suggest that gene synthesis and recombinant technology can successfully construct the eukaryotic expression vector pcDNA3-inducible co-stimulator Ig.

Subject headings: transfection; neoplasms; inducible T-cell co-stimulator protein; plasmid

Funding: Hundred Talents Project of Liaoning Provincial Department of Human Resources and Social Security, No. 2011921027*; Doctoral Initiating Fund of Science and Technology Department of Liaoning Province, No. 20081032*

Zhao GH, Zhang R, Xu GY, Wang DM. Construction and expression of eukaryotic expression vector pcDNA3-ICOSIg. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2013;17(37):6641-6644.

0 引言 Introduction

1999年由德国学者Hutloff等^[1]在人外周血活化T细胞上发现了一种新的共刺激分子——ICOS(inducible co-stimulator), 后来被相继报道^[2]。研究表明, ICOS属于CD28家族, 是该家族中第3个被发现的成员, 是T细胞活化所需共刺激信号之一^[3-4]。在肿瘤免疫应答过程中, T细胞激活前期, 封闭B7RP-1/ICOS通路将导致T细胞克隆失活或克隆无反应性, 诱导免疫逃逸^[5]。

实验利用基因工程技术构建真核表达载体 pcDNA3-ICOSIg, 并检测其在哺乳动物体内的表达情况。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 基因水平观察实验。

时间及地点: 于2010年9月在辽宁省肿瘤医院完成。

材料:

实验动物: 健康清洁级近交系雄性昆明小鼠10只, 体质量(28±2) g, 8-10周龄, 由中国医科大学动物中心提供, 许可证号: SCXK(辽)2003-00009。

pcDNA3-ICOSIg真核表达载体构建及表达实验所用主要试剂:

试剂	来源
pGL-3-Basic 克隆载体	中国医科大学中心实验室
携带小鼠免疫球蛋白 Fc 段基因的质粒 pMD-18T-Ig	TAKARA 公司
pcDNA3.0 表达载体、阳性脂质体	Invitrogen 公司
载体 Lipofectamine2000 转染试剂盒	
免疫组化 SP 试剂盒、显色剂	迈新公司
RT-PCR 试剂盒、引物、DNA Marker	宝生物工程有限公司
质粒快速大量提取试剂盒	V-gene 生物公司

方法:

ICOS胞外段基因的克隆: 根据人源ICOS分子胞外区序列设计带酶切位点的引物: P1(*Kpn* I): 5'-GGT ACC GAA ATC AAT GGT TCT GCC AAT-3'; P2(*Sma* I):

5'-TCT AGA CCC GGG CTT CAG CTG GCA ACA AAG TTG-3'。用终浓度为20 μg/L的丙二醇甲醚醋酸酯和200 μg/L的离子霉素刺激人外周血单个核细胞72 h, 收集细胞, 移入2 mL无菌Eppendorf管中。加入1 mL Trizol试剂, 组织匀浆后室温静止5 min, 加0.2 mL氯仿涡旋振荡15 s, 室温放置2.0-3.0 min, 4 ℃、12 000 r/min离心20 min, 将上清移入另一新管, 加入0.5 mL异丙醇混匀, 室温放置10 min, 4 ℃、12 000 r/min离心10 min, 弃上清, 加体积分数75%乙醇(DEPC水配制)1 mL, 涡旋漂洗1次, 4 ℃、7 500 r/min离心5 min, 弃上清, 空气干燥15 min, 沉淀溶于体积分数0.01% DEPC水(经过焦碳酸二乙酯处理并经高温高压消毒的MiliQ纯水), 取少量RNA用于含量及纯度测定, 其余分装后置-70 ℃保存。甲醛变性, 1%琼脂糖凝胶电泳分离总RNA, 检测RNA质量。

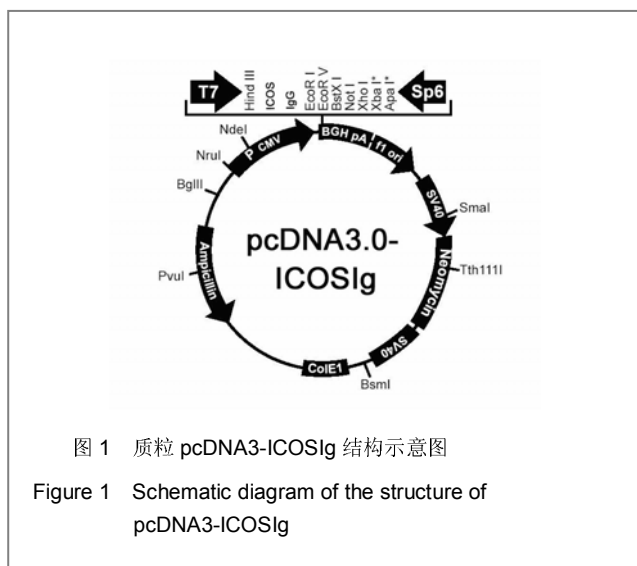
合成cDNA第一链: 用反转录试剂盒将总RNA反转录成cDNA第一链, 反应体积20 μL: MgCl₂(25 mmol/L) 4 μL, 10×buffer 2 μL, dNTP(10 mmol/L)2 μL, RNA酶抑制剂(1 U/μL) 0.5 μL, AMV Reverse Transcriptase 0.6 μL, Oligo(dT)₁₅ Primer 1 μL, 总RNA(1 g/L) 1 μL, 双蒸水补足20 μL。42 ℃ 1 h, 99 ℃ 5 min变性, -20 ℃保存。

ICOS基因的PCR扩增: 以cDNA为模板, PCR扩增此基因的开放阅读框架。引物序列利用Primer 3.0软件设计, 上游: 5'-ATA TGG ATC CAT GGC TTG TCT TGG A-3', 下游: 5'-CCT CGA ATT CAC AAA TGG CCT TTC AGT T-3', 扩增片段长度704 bp。真核表达载体引物上游引入*Bam*H I 酶切位点, 下游引入*Eco*R I 酶切位点。反应体系如下: cDNA 2 μL, 10 × buffer 2.5 μL, dNTP (2 mmol/L)1 μL, 上、下游引物(10 μmol/L)各1 μL, Taq酶(5 U/μL)0.2 μL。反应条件如下: 95 ℃ 5 min, 94 ℃ 1 min, 退火温度1 min, 57 ℃ 7 min, 4 ℃保存。取10 μL PCR产物进行1%的琼脂糖凝胶电泳, 紫外灯下观察。

pcDNA3-ICOSIg融合基因表达载体的构建: *Kpn* I、*Sma* I 双酶切pMD-18TICOS质粒, 将切下的ICOS胞外段定向装入pGL-3Basic克隆载体。 *Sma* I、*Xba* I 双酶

切载有小鼠IgG基因的质粒, 将切下的Fc片段克隆入pGL-3-BasicICOS载体, 完成ICOS胞外段与Fc段的连接。设计引物PS1(*Sfi* I): 5'-GCG GCC CAG CCG GCC GAA ATC AAT GGT TCT CC-3'; PS2(*Xho* I): 5'-GTC TAG ACT CGA GTC ATT TAC CCG GAG TCC GGG-3', 以pGL-3-Basic-ICOSIg质粒为模板扩增ICOSIg片段, *Sfi* I, *Xho* I双酶切下ICOSIg片段克隆入pcDNA3.0质粒的相应位点, 获得带融合基因的分泌型真核表达载体pcDNA3-ICOSIg^[6]。

真核表达载体质粒pcDNA3-ICOSIg的抽提: 将含有带融合基因的分泌型真核表达载体pcDNA3-ICOSIg的菌液接种于含有100 mg/L氨苄青霉素的LB液体培养基中, 37 °C振荡过夜, 收集菌液, 采用无内毒素质粒快速大量提取试剂盒大量抽提质粒, 见图1。取上清, 酶切鉴定, -20 °C保存备用。



真核表达载体质粒pcDNA3-ICOSIg转染小鼠: 用阳性脂质载体Lipofectamine2000将pcDNA3-ICOSIg包裹后, 将10 μL Lipofectamine2000与4 μg pcDNA3-ICOSIg的混匀液注入小鼠右侧大腿肌肉组织, 注射7 d后每只小鼠取血1 mL, 应用Western blot法检测血清ICOSIg水平。

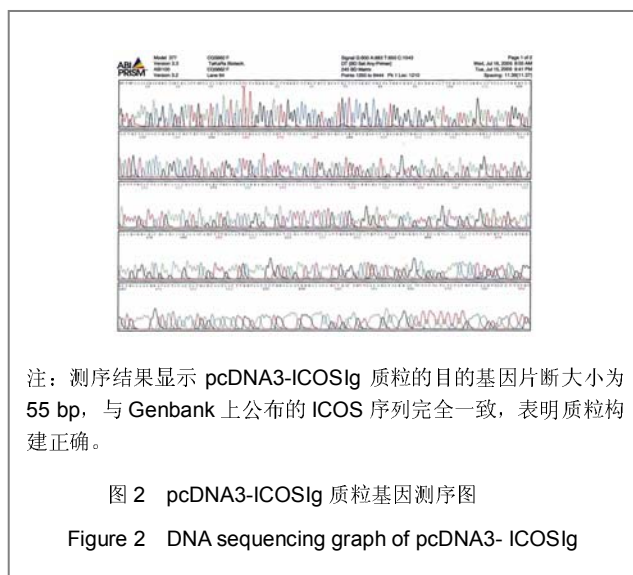
主要观察指标: RNA含量及纯度; 真核表达载体质粒pcDNA3-ICOSIg的鉴定结果; ICOSIg在小鼠体内的表达。

2 结果 Results

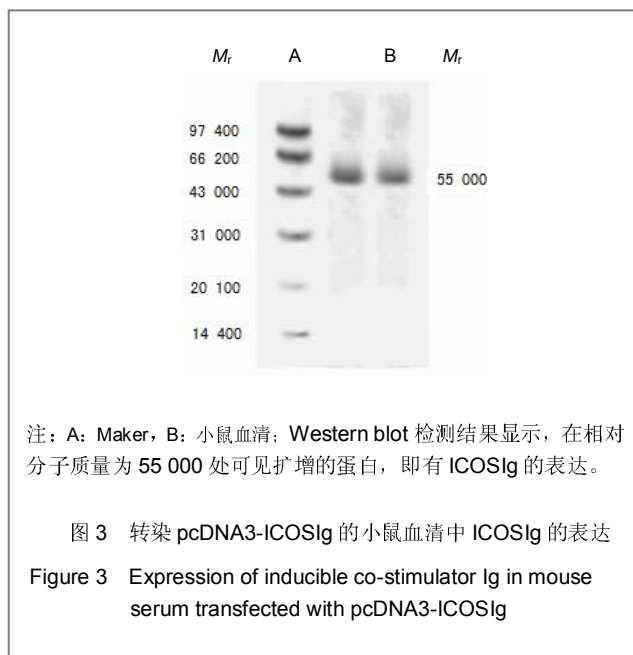
2.1 实验动物数量分析 实验纳入的10只小鼠均进入结果分析, 无脱失。

2.2 实验提取的ICOS胞外段基因RNA的纯度 利用分光光度计测量 A_{260} 与 A_{280} 的比值, 该RNA的 A_{260}/A_{280} 为1.9-2.1。

2.3 真核表达载体质粒pcDNA3-ICOSIg的鉴定结果 对含有pcDNA3-ICOSIg质粒的LB菌液进行鉴定测序, 目的基因片断大小为55 bp, 与Genbank上公布的ICOS序列完全一致, 表明质粒构建正确, 见图2。



2.4 ICOSIg在小鼠体内的表达 利用阳性脂质载体包被pcDNA3-ICOSIg转染小鼠后, ICOSIg基因有不同程度的表达。转染第7天, 在10只小鼠中, 有3只血清中检测到ICOSIg的表达, 显示pcDNA3-ICOSIg能够在小鼠肌细胞内表达, 见图3。



3 讨论 Discussion

近年来, 肿瘤逃逸机体免疫监测机制的研究备受关

注^[7]。肿瘤免疫主要是T细胞免疫应答,T细胞的完全活化需要抗原刺激和共刺激两个信号的共同作用^[8]。抗原刺激是T细胞上的T细胞受体识别抗原提呈细胞上的抗原肽——主要组织相容性复合体,它决定了T细胞的活化特异性;共刺激是T细胞上的共刺激分子与抗原提呈细胞上配体分子结合形成所谓共刺激通路。

共刺激分子是一类参与免疫反应的辅助性分子,与其配体结合所产生的共刺激信号在T细胞活化、分化及效应性细胞因子分泌中起着非常重要的作用^[9-10]。目前的研究已证实,ICOS可以激活T细胞的增殖和分泌、调节Th1/Th2细胞的极化、增强依赖T细胞的B细胞功能^[11];阻断ICOS共刺激信号会出现白细胞介素2, 4, 10、干扰素 γ 、趋化因子等细胞因子表达减少、免疫球蛋白类型转换受损,导致T细胞的克隆失活或克隆无反应,从而诱导肿瘤对机体的免疫逃逸^[12]。

基因合成和基因转染技术的成熟为细胞长期稳定表达某种特殊基因产物提供了可能^[13-14]。实验克隆编码ICOS胞外片段,并将其与编码小鼠免疫球蛋白IgG恒定片段(Ig)的基因融合,构建ICOSIg融合基因及其分泌型真核表达载体 pcDNA3-ICOSIg。经测序证实 pcDNA3-ICOSIg质粒目的基因片断与Genbank上公布的ICOS序列完全一致。进一步应用阳性脂质体载体包被 pcDNA3-ICOSIg 转染小鼠右侧大腿肌肉组织,Western blot法检测结果显示,10只小鼠中有3只血清中检测到ICOSIg的阳性表达,说明pcDNA3-ICOSIg能够在小鼠肌细胞内表达。

实验应用pcDNA3质粒构建表达载体,避免了腺病毒载体可能对宿主基因造成的不良影响。同时,实验利用的脂质体转染、肌肉直接注射的方法,具有操作简便、广谱和高效的特点。

总之,实验利用基因合成技术自主合成ICOS胞外片段,并自行构建了真核表达载体pcDNA3-ICOSIg,并应用阳性脂质体载体包裹质粒后肌肉直接注射转染成功,为研究肿瘤免疫逃逸机制提供了新的途径。

作者贡献: 赵国华进行实验设计,实验实施为张睿,实验评估为赵国华,资料收集为王冬梅,许国岩成文,赵国华审核,赵国华对文章负责。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求: 实验过程中对动物的处置符合2009年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

学术术语: 诱导性共刺激分子-CD278, CD28家族成员。主要表达于活化的Th2细胞,配体分别为人的B7-H2/ICOSL

和鼠的B7相关蛋白1,上调活化的Th2细胞表达黏附分子和产生细胞因子,促进B细胞分化为浆细胞并产生抗体。

作者声明: 文章为原创作品,数据准确,内容不涉及泄密,无一稿两投,无抄袭,无内容剽窃,无作者署名争议,无与他人课题以及专利技术的争执,内容真实,文责自负。

4 参考文献 References

- [1] Hutloff A, Dittrich AM, Beier KC, et al. ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature*. 1999;397(6716):263-266.
- [2] Ozkaynak E, Gao W, Shemmeri N, et al. Importance of ICOS-B7RP-1 costimulation in acute and chronic allograft rejection. *Nat Immunol*. 2001;2(7):591-596.
- [3] McAdam AJ, Greenwald RJ, Levin MA, et al. ICOS is critical for CD40-mediated antibody class switching. *Nature*. 2001;409(6816):102-105.
- [4] Yamada A, Kishimoto K, Dong VM, et al. CD28-independent co-stimulation of T cells in alloimmune responses. *J Immunol*. 2001;167(1):140-146.
- [5] 王甲甲,叶启发. 调节性T细胞与肿瘤免疫治疗[J]. 医学与哲学, 2012,33(3):46-48.
- [6] 武佳,杨耿兵,李伟,等. 真核生物表达成熟体miR-449a及其生物学活性的研究[J]. 浙江理工大学学报, 2010,27(5):784-788.
- [7] Tougeron D, Fauquembergue E, Latouche JB. Immune response and colorectal cancer. *Bull Cancer*. 2013;100(3):283-294.
- [8] Lokhov PG, Balashova EE. Tumor-induced endothelial cell surface heterogeneity directly affects endothelial cell escape from a cell-mediated immune response in vitro. *Hum Vaccin Immunother*. 2013;9(1):198-209.
- [9] Romagnoli PA, Premenko-Lanier MF, Loria GD, et al. CD8 T cell memory recall is enhanced by novel direct interactions with CD4 T cells enabled by MHC class II transferred from APCs. *PLoS One*. 2013;8(2):e56999.
- [10] Metz DP, Mohn D, Zhang M, et al. Defining dose-response relationships in the therapeutic blockade of B7RP-1-dependent immune responses. *Eur J Pharmacol*. 2009;610(1-3):110-118.
- [11] Yoshino S, Yoshimura K, Suzuki N, et al. Immunoregulatory effects of PSK on the Th1/Th2 balance and regulatory T-cells in patients with colorectal cancer. *Gan To Kagaku Ryoho*. 2010;37(12):2234-2236.
- [12] Khayyamian S, Hutloff A, Buchner K, et al. ICOS-ligand, expressed on human endothelial cells, costimulates Th1 and Th2 cytokine secretion by memory CD4+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(9):6198-6203.
- [13] Gainer AL, Korbitt GS, Rajotte RV, et al. Expression of CTLA4-Ig by biolistically transfected mouse islets promotes islet allograft survival. *Transplantation*. 1997;63(7):1017-1021.
- [14] Chahine AA, Yu M, McKernan MM, et al. Immunomodulation of pancreatic islet allografts in mice with CTLA4Ig secreting muscle cells. *Transplantation*. 1995;59(9):1313-1318.