

人脑胶质瘤特异抗原肽白介素 13 α 2 受体的原核表达俞文桥^① 陈作兵^① 张 匀^① 梁忠炎^① 张绍阳^① 郑伟明^②

摘要 目的:构建白介素 13 α 2 受体(Interleukin-13 α 2 Receptor, IL-13R α 2)基因的表达质粒,并检测其在体外原核表达情况,为脑胶质瘤的免疫治疗奠定基础。方法:用 RT-PCR 技术从 U251 胶质瘤细胞株扩增 IL-13R α 2 基因,并与克隆质粒 pMD19 Simple T 载体连接转入 DH5 α 菌克隆,筛选重组阳性菌落,用 Xho I 和 Hind III 将目的基因从克隆质粒上切下并与同样双酶切后的表达质粒 pET-28a 连接,转入 BL21(DE3)菌,提取重组质粒进行酶切及测序鉴定正确后,在 IPTG 诱导下原核表达 IL-13R α 2 抗原肽,并利用镍柱进行纯化回收,SDS-PAGE 检测表达蛋白。结果:成功扩增出 IL-13R α 2 基因序列,大小为 1 142 bp,并表达纯化出 IL-13R α 2 抗原肽,大小为 60 kD,于诱导第 3 h 表达量最高,以包涵体形式表达。结论:IL-13R α 2 基因表达质粒能在体外成功构建,并能在 IPTG 诱导下成功表达及纯化得到 IL-13R α 2 抗原肽。

关键词 胶质瘤 IL-13R α 2 抗原肽 表达质粒

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2011.09.003

Prokaryotic Expression and Purification of IL-13R α 2 Antigen in Human Gliomas

Wenqiao YU¹, Zuobing CHEN¹, Yun ZHANG¹, Zhongyan LIANG¹, Shaoyang ZHANG¹, Weiming ZHENG²

Correspondence to: Weiming ZHENG, E-mail: zhwm61@126.com

¹Department of Emergency Surgery, The First Affiliated Hospital of Zhejiang University Medical School, Hangzhou 310000, China

²Department of Neurosurgery, The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, China

Abstract **Objective:** To construct the expression plasmid of the Interleukin-13 α 2 Receptor (IL-13R α 2) and to detect *in vitro* prokaryotic expression of the receptor gene, in order to investigate the theoretical basis of immunotherapy for human gliomas. **Methods:** The object gene IL-13R α 2 was obtained from U251 glioma cell line by RT-PCR, then the cloning plasmid pMD19 Simple T vector was connected and transferred to DH5 α . Positive colonies were screened and recombined. The IL-13R α 2 was digested from recombinant cloning plasmid using Xho I and Hind III, and was connected to the expression plasmid pET-28a that was also digested by the same enzymes. It was then transferred to the BL21(DE3). After the recombinant plasmid was abstracted for digestion and sequencing, the prokaryotic expression of IL-13R α 2 antigenic peptide was conducted by the induction of IPTG. Nickel column was used for recovery and purification, and SDS-PAGE was conducted to detect the protein expression. **Results:** The IL-13R α 2 antigen was successfully expressed and the molecular weight was 60kD, which existed with the modality of inclusion bodies. **Conclusion:** The object gene IL-13R α 2 could be obtained from U251 glioma cell line by RT-PCR and connected to the expression plasmid pET-28a very successfully. The expression plasmid of IL-13R α 2 gene can be successfully constructed *in vitro* and can be successfully expressed and purified by IPTG induction to obtain the IL-13R α 2 antigenic peptide.

Keywords Gliomas; IL-13R α 2 antigen; Expression plasmid

脑胶质瘤是脑内最常见的恶性肿瘤,危害极大,虽然在显微手术、放疗、化疗等方面不断取得进步,但是胶质瘤患者的预后仍无实质性的突破。近年来,随着对分子生物学及免疫治疗认识的不断提高,胶质瘤的免疫治疗不断得到重视,研究发现白介素 13 α 2 受体(IL-13R α 2)在胶质瘤存在特异性高表达,并与肿瘤的发生发展关系密切,同时可由树突状细胞递呈抗原信息,激活细胞毒性T淋巴细胞来杀伤肿瘤细胞,因此有望成为免疫治疗的靶点。本研究旨在构建 IL-13R α 2 的表达质粒,原核表达 IL-13R α 2 抗原肽,为今后用 IL-13R α 2 抗原肽免疫治疗脑胶质瘤

奠定坚实的实验研究基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与细胞株

Trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司),第一链 cDNA 合成酶试剂盒(MBI 公司),U251 胶质瘤细胞株(中科院上海生物细胞研究所),DMEM 高糖培养基(上海生工),Ex Taq 酶、Hind III 内切酶、Xho I 内切酶、T4 DNA 连接酶、X-Gal、IPTG、pMD19 Simple T 载体、DH5 α 菌(大连宝生物公司),胶回收试剂盒、质粒小抽试剂盒(购自 BBI 公司),pET-28a 表达质粒(上海捷瑞公司),Ni-NTA His $\times$ bind resin 及层析柱(Novagen 公司),

BL21菌为本实验室保存。

1.2 主要仪器

细胞培养箱(HARRIS USA),超净工作台(Telstar Bio- II -A),倒置显微镜(LEICA DMIL),PCR仪(Thermo Hgbaidd),高速离心机(Saitexiangyi TDZ5-WS),全温振荡器(HZQ-FX),凝胶成像仪(BioSens SC 620),HHS型电热恒温水浴锅,DU 800核酸/蛋白分析仪

1.3 实验方法

1.3.1 U251胶质瘤细胞培养 将胶质瘤细胞接种于含高糖DMEM培养基(含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素、100 U/mL链霉素)的6孔培养板孔中,37℃、5%CO₂条件下进行培养,3d传代1次。

1.3.2 RT-PCR扩增IL-13R α 2基因 Trizol一步法提取U251胶质瘤细胞总RNA,Fermentas逆转录初始链cDNA合成试剂盒反转录为cDNA,并以cDNA为模板,用Ex Taq酶进行PCR扩增获得目的基因,PCR引物根据Genbank中IL-13R α 2全序列(ACCESSION NM_000640)设计,引物为上游:5'-GGC CTC GAG ATG GCT TTC GTT TGC TT-3',下游:5'-GCG AAG CTT TCA TGT ATC ACA GAA AAA TTC-3'划线处分别为Xho I和Hind III酶切点,前3个均为保护碱基。PCR反应条件如下:94℃预变性5 min,再以94℃变性30 s,59℃退火45 s,72℃延伸1 min,35个循环。最后72℃延伸5 min。

1.3.3 感受态细胞的制备 挑取1 μ L DH5 α 及BL21甘油菌于5 mL LB培养基中37℃,220 r/min摇菌过夜,次日以1:100转接,再摇菌3 h。将菌液预冷片刻后取1.5 mL置于EP管中,4℃,4 000 r/min离心10 min收集菌体,弃上清后用0.75 mL预冷的0.1 mmol/L氯化钙液悬浮细胞,冰浴放置30 min,再以4℃,4 000 r/min离心10 min收集菌体,弃上清后用50 μ L冰浴冷却的0.1 mmol/L氯化钙液悬浮细胞置于-70℃冰箱备用。

1.3.4 克隆质粒的构建 将IL-13R α 2基因进行胶回收纯化后与pMD-19 simple T载体在16℃条件下连接1 h,全量的连接液加入100 μ L的DH5 α 感受态菌,42℃热击45 s,再置于冰中1 min,加入890 μ L SOC培养基,37℃、220 r/min震荡培养1 h,最后铺于含100 μ g/mL Ampicillin、24 μ g/mL IPTG及20 mg/mL X-Gal的LB固体培养基中,37℃条件下培养过夜,次日进行蓝白筛选,挑取白色单个阳性菌落进行PCR、酶切及测序鉴定。

1.3.5 表达质粒的构建 用Xho I和Hind III将目的基因从克隆质粒上切下,同时对表达质粒pET-28a在37℃条件下双酶切3 h,并进行胶回收纯化。在16℃

条件下,将IL-13R α 2目的基因与表达质粒在T4 DNA连接酶作用下体外连接过夜,转化感受态菌BL21(DE3),并铺于含50 μ g/mL卡那霉素的LB固体培养基,37℃培养过夜,次日挑菌进行PCR、酶切及测序鉴定。

1.3.6 目的蛋白的优化诱导表达 挑取重组菌BL21置于5 mL含50 μ g/mL卡那霉素的LB培养基,37℃震荡培养过夜,次日取100 μ L菌液分别转接于5管含50 μ g/mL卡那霉素的LB培养基中(编号分别为1、2、3、4、5),37℃震荡培养3 h至OD值为0.6,抽取1号管菌液1 mL离心收集菌体置于-20℃保存作为未诱导对照,余4管分别加入24 μ g/mL IPTG 50 μ L至终浓度为1 mol/L,按试管编号分别在37℃下震荡诱导表达1、2、3、4 h。各取1 mL菌液离心收集菌体,以PBS悬浮加上样缓冲液后行SDS-PAGE电泳分析。

1.3.7 目的蛋白的纯化 将500 mL经IPTG诱导后的菌液离心收集菌体,用PBS洗涤2次后,以功率300W,超声5 s,间隙5 s,总时间30 min进行超声破菌,离心收集沉淀,加入30 mL pH 8.0含8 mol/L尿素的buffer B液,室温放置2 h,离心后将上清置于经buffer B平衡过的镍柱过柱,经pH 6.3含8 mol/L尿素的buffer C洗涤后,用pH 4.5含8 mol/L尿素的buffer E洗脱并收集目的蛋白。

2 结果

2.1 U251胶质瘤细胞形态的观察

胶质瘤细胞在培养第2d后,呈贴壁生长,胞体较大,多形性,有多个突起,第3d后细胞密度明显增加,胞体成纤维样,如图1A。

2.2 IL-13R α 2目的基因的获得

通过RT-PCR成功获得IL-13R α 2目的基因,取5 μ L PCR产物1.5%(W/V)琼脂凝胶电泳80 mv 45 min,紫外灯下见1 142 bp处有一明亮目的条带,符合理论值大小,如图1B所示。同时将PCR产物胶回收纯化后进行测序,与Genbank中IL-13R α 2全序列(ACCESSION NM_000640)比对后同源性和为100%。

2.3 克隆质粒构建

将IL-13R α 2目的基因与pMD-19 simple T载体连接转化DH5 α 菌后,见LB固体培养基生长约40个单个菌落(包括白色及蓝色菌落),挑取其中白色转化子,如图1C所示,进行摇菌提质粒并用PCR、双酶切及测序鉴定后证明克隆质粒构建成功。

2.4 表达质粒构建

将IL-13R α 2用Xho I和Hind III从克隆质粒上双酶切下与同样进行双酶切后的表达质粒pET-28a连接转化BL21(DE3)后,见LB培养基上生长约20个单个菌落,挑取1个单个菌落后摇菌提质粒,并用PCR、

双酶切及测序鉴定后证明克隆质粒构建成功,如图1D所示为酶切鉴定结果。

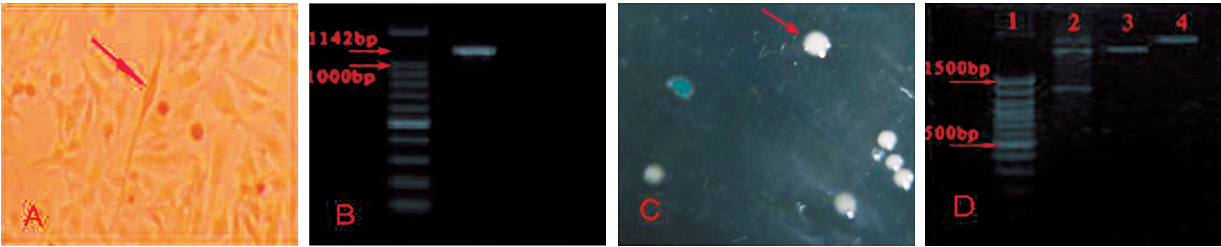
2.5 目的蛋白的诱导表达

IL-13R α 2 抗原肽经 IPTG 诱导后成功表达,经 SDS-PAGE 电泳分析后示大小约为 60kD,与文献报导相符,且以诱导时间为第 3 h 表达量最高,均以包

涵体的形式表达,如图 2A 所示。

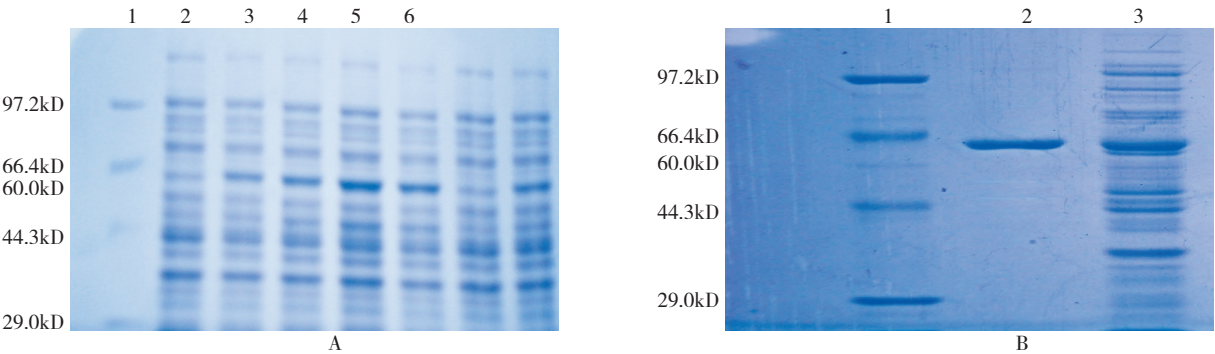
2.6 目的蛋白的纯化

诱导后菌体经超声破碎和 8 mol/L 尿素溶解后,过镍柱进行纯化,得到较纯的 IL-13R α 2 抗原肽,经 SDS-PAGE 电泳分析后,大小 60kD,与文献报导相符,如图 2B 所示。



A.U251 胶质瘤细胞,胞体大,梭形状,呈贴壁生长
B.RT-PCR 技术扩增的 IL-13R α 2 基因(1 142bp)
C.目的基因转化 DH5 α 菌后的克隆子(白色菌落为重组子,蓝色为非重组子)
D.表达质粒酶切结果(1.Marker;2.酶切后质粒;3.空质粒;4.重组质粒)
图1 U251 胶质瘤细胞及 IL-13R α 2 表达质粒构建

Figure 1 U251 glioma cells and construction of IL-13R α 2 expression plasmid



A.SDS-PAGE 蛋白优化表达时间梯度。(1.低分子量蛋白 Marker;2.无 IPTG 诱导对照;3.IPTG 诱导表达 1 h 后;4.IPTG 诱导表达 2 h 后;5.IPTG 诱导表达 3 h 后,可见蛋白表达量最高;6.IPTG 诱导表达 4 h 后)
B.SDS-PAGE 纯化后目的蛋白。(1.低分子量 Marker;2.纯化后目的蛋白;3.未纯化对照)
图2 IL-13R α 2 的表达及纯化后 SDS-PAGE 检测

Figure 2 Detection of SDS-PAGE after the IL-13Ra2 antigen expression and purification

3 讨论

胶质瘤为颅内的最具破坏力的恶性肿瘤之一,虽然近年来在显微手术、放疗、化疗等治疗手段取得了长足的进步,但是胶质瘤患者的预后仍不容乐观。由于免疫治疗自身具有高选择性及长时免疫记忆的优点,而树突状细胞(dendritic cell, DC)作为最强的专职抗原递呈细胞,在启动抗肿瘤免疫的抗原递呈中有强大的作用,因此利用 DC 疫苗对脑胶质瘤的免疫治疗不断得到重视^[1-4]。但是多年来胶质瘤免疫治疗的抗原肽主要是以肿瘤细胞裂解物和总 RNA 为主,由于其包括了已知和未知的众多抗原肽,而容易发生自身免疫性疾病的潜在风险^[5-7]。因此,非常

有必要研究一种靶向性高,不产生自身免疫疾病,且容易生产运输的胶质瘤特异性抗原肽,而本实验主要构建胶质瘤特异抗肽的重组表达质粒,为今后胶质瘤的免疫治疗作好充分的准备。

研究表明,白细胞介素 13 α 2 受体与人脑胶质瘤的发生发展有着密切的联系,其作为一种诱骗性受体,与 IL-13 结合后,并不能启动 IL-13 依赖的 JAK-STAT 信号传导途径,同时抑制了能激活此信号途径的 IL-4R、IL-13R α 1 二聚体与 IL-13 的结合,从而使得胶质细胞不断的有丝分裂最终导致胶质瘤的形成。同时,Kawakami 等^[8-9]和 Joshi 等^[10-11]及其他一些研究者^[12-13]均采用了 RT-PCR 和免疫组化等方法

对IL-13R α 2在胶质瘤的表达作了检测,结果发现IL-13R α 2在高级别的胶质瘤中存在着特异性的高表达,在低级别胶质瘤中表达较低或不表达,正常脑组织中不表达。本研究之前用RT-PCR和免疫组化等方法同样显示IL-13R α 2在胶质瘤表面存在特异的表达,且与胶质瘤的级别呈正相关^[14]。因此,IL-13R α 2作为脑胶质瘤特异性相关抗原可以成为免疫治疗的靶标。

近年来,Okano等^[15]实验研究显示IL-13R α 2抗原肽负载树突状细胞后可以激活HLA-A0201⁺限制的细胞毒性T淋巴细胞(cytotoxicity T lymphocyte, CTL),从而来杀伤靶细胞,Eguchi等^[16]同样用实验证明,IL-13R α 2抗原肽与树突状细胞结合后能将抗原信息递呈给T淋巴细胞,在共刺激分子B7的作用下激活HLA-A0201⁺限制的CD8⁺T细胞,最终启动细胞免疫介导的CTL反应和特殊的 γ -干扰素反应来杀伤肿瘤细胞,同时有相关研究表明,局部浸润的CD8⁺T细胞具有长期记忆功能,在一定合适抗原的刺激下可以再次被活化而起到抗肿瘤的作用。因此,IL-13R α 2有望作为抗原肽疫苗用于胶质瘤特异性免疫治疗。

本实验显示,IL-13R α 2目的基因可以通过RT-PCR的方法从培养的U251神经胶质瘤细胞中获得,经过胶回收纯化后可以将其以T-A连接的方式与克隆质粒pMD-19 simple T载体高效连接,并克隆入DH5 α 菌进行大量克隆扩增。在摇菌提取重组质粒后,IL-13R α 2目的基因可以利用Xho I和Hind III两酶(引物上已设计此两酶的酶切位点)以双酶切的方式从重组克隆质粒上切下纯化回收,与同样进行双酶切后的表达质粒pET-28a在T4 DNA连接酶的作用下进行体外连接,构建pET-28a-IL-13R α 2重组表达质粒,经PCR、酶切和测序等方法鉴定同源性为100%后,在IPTG的诱导下能原核表达出IL-13R α 2抗原肽,并能过镍柱纯化得到较纯的IL-13R α 2抗原肽,大小为60kD,与文献报道一致。

通过本实验研究显示,重组表达质粒pET-28a-IL-13R α 2可以通过分子生物学的方法成功的构建,并能通过原核表达及镍柱纯化的方法得到IL-13R α 2抗原肽,为将来利用IL-13R α 2抗原肽来单抗原免疫治疗胶质瘤提供了良好的理论依据。

参考文献

- 1 Yu JS, Liu G, Ying H, et al. Vaccination with tumor lysate-pulsed dendritic cells elicits antigen-specific, cytotoxic T-cells in patients with malignant glioma[J]. Cancer Res, 2004, 64(14): 4973-4979.
- 2 Jiang X, Lu X, Liu R, et al. Induction of cytotoxic T lymphocytes

- specific to malignant glioma using T2 cells pulsed with HLA-A2-restricted interleukin-13 receptor alpha 2 peptide in vitro[J]. Acta Biochim Biophys Sin(Shanghai), 2007, 39(9): 641-648.
- 3 Shimato S, Natsume A, Wakabayashi T, et al. Identification of a human leukocyte antigen-A24-restricted T-cell epitope derived from interleukin-13 receptor alpha2 chain, a glioma-associated antigen[J]. J Neurosurg, 2008, 109(1): 117-122.
- 4 Mintz A, Gibo DM, Madhankumar AB, et al. Protein- and DNA-based active immunotherapy targeting interleukin-13 receptor alpha2[J]. Cancer Biother Radiopharm, 2008, 23(5): 581-589.
- 5 孟庆海, 薄勇力, 李 洛, 等. 树突状细胞疫苗治疗大鼠脑胶质瘤的实验研究[J]. 中华神经外科杂志, 2006, 22(1): 55-57.
- 6 Carpentier AF, Meng Y. Recent advances in immunotherapy for human glioma[J]. Curr Opin Oncol, 2006, 18(6): 631-636.
- 7 詹仁雅, 童 鹰, 周永庆, 等. 肿瘤RNA冲击致敏树突状细胞治疗G422胶质母细胞瘤的实验研究[J]. 中华神经外科杂志, 2003, 19(2): 99-102.
- 8 Kawakami M, Taguchi J, Murata T, et al. The interleukin-13 receptor alpha2 chain: an essential component for binding and internalization but not for interleukin-13-induced signal transduction through the STAT6 pathway[J]. Blood, 2001, 97(9): 2673-2679.
- 9 Kawakami M, Kawakami K, Takahashi S, et al. Analysis of interleukin-13 receptor alpha2 expression in human pediatric brain tumors[J]. Cancer, 2004, 101(5): 1036-1042.
- 10 Joshi BH, Plautz GE, Puri RK. Interleukin-13 receptor alpha chain: a novel tumor-associated transmembrane protein in primary explants of human malignant gliomas[J]. Cancer Res, 2000, 60(5): 1168-1172.
- 11 Joshi BH, Puri RA, Leland P, et al. Identification of interleukin-13 receptor alpha2 chain overexpression in situ in high-grade diffusely infiltrative pediatric brainstem glioma[J]. Neuro Oncol, 2008, 10(3): 265-274.
- 12 Okada H, Low KL, Kohanbash G, et al. Expression of glioma-associated antigens in pediatric brain stem and non-brain stem gliomas[J]. J Neurooncol, 2008, 88(3): 245-250.
- 13 Wykosky J, Gibo DM, Stanton C, et al. Interleukin-13 receptor alpha 2, EphA2, and Fos-related antigen 1 as molecular denominators of high-grade astrocytomas and specific targets for combinatorial therapy[J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(1): 199-208.
- 14 郑伟明, 章剑剑, 李剑敏, 等. 星形细胞瘤IL-13R α 2的表达及其与预后的关系[J]. 中华神经外科杂志, 2006, 22(5): 324.
- 15 Okano F, Storkus WJ, Chambers WH, et al. Identification of a novel HLA-A*0201-restricted, cytotoxic T lymphocyte epitope in a human glioma-associated antigen, interleukin 13 receptor alpha2 chain[J]. Clin Cancer Res, 2002, 8(9): 2851-2855.
- 16 Eguchi J, Hatano M, Nishimura F, et al. Identification of interleukin-13 receptor alpha2 peptide analogues capable of inducing improved antitumor CTL responses[J]. Cancer Res, 2006, 66(11): 5883-5891.

(2010-11-15收稿)

(2011-02-09修回)

(王展宏校对)