

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.19.006

基于 SOE-PCR 的核酸疫苗 pIRES2-MLAA34-HSP70 的构建及免疫效果研究*

赵佳琪, 王婉莹, 范业宁, 马春平, 张东红, 吕 扬, 赵 臣[△]

(吉林医药学院检验学院, 吉林吉林 132013)

[摘要] **目的** 构建 pIRES2-MLAA34-HSP70 重组质粒, 并检测其免疫效果。**方法** 采用逆转录 PCR(RT-PCR)的方法提取急性单核细胞白血病相关抗原基因 MLAA-34 和热休克蛋白(HSP)70 基因, 设计特异性重叠引物, 以重叠延伸 PCR(SOE-PCR)技术扩增 MLAA34-HSP70 融合基因, 构建核酸疫苗 pIRES2-MLAA34-HSP70。将核酸疫苗免疫 BALB/c 小鼠, 检测小鼠脾淋巴细胞对 U937 细胞的杀伤作用及小鼠脾细胞悬液中白细胞介素(IL)-2、IL-4 和 γ 干扰素(IFN- γ)水平。**结果** 扩增出 MLAA34-HSP70 融合基因 2 956 bp, 成功构建了核酸疫苗 pIRES2-MLAA34-HSP70, 经鉴定与预期结果一致; 脾淋巴细胞杀伤活性结果显示, 核酸疫苗 pIRES2-MLAA34-HSP70 对 U937 细胞的杀伤效率明显高于其他实验组及对照组($P < 0.01$); 核酸疫苗 pIRES2-MLAA34-HSP70 组细胞因子 IL-2、IL-4 和 IFN- γ 水平亦明显高于其他实验组及对照组($P < 0.01$)。**结论** 成功构建了 pIRES2-MLAA34-HSP70 核酸疫苗, 该核酸疫苗能诱发强烈的体液免疫, 增强机体对肿瘤细胞的免疫应答, 对 MLAA34 阳性细胞具有特异性杀伤作用。

[关键词] 疫苗, DNA; 重叠延伸 PCR; 白血病, 单核细胞, 急性; MLAA-34; 热休克蛋白质类 70

[中图分类号] R733.7

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2017)19-2612-03

Study on immune effect of DNA vaccine pIRES2-MLAA34-HSP70 constructed by SOE-PCR*

Zhao Jiaqi, Wang Wanying, Fan Yening, Ma Chunping, Zhang Donghong, Lv Yang, Zhao Chen[△]

(Inspection College of Jilin Medical University, Jilin, Jilin 132013, China)

[Abstract] **Objective** To construct the DNA vaccine pIRES2-MLAA34-HSP70, and to detect its immune effect. **Methods** The acute monocytic leukemia associated antigen gene MLAA-34 and heat-shock protein (HSP)70 gene were extracted by using RT-PCR. The specific overlapping primer was designed, and the fusion gene MLAA34-HSP70 was amplified by using SOE-PCR technique. Then the DNA vaccine pIRES2-MLAA34-HSP70 was constructed, and BALB/c mice were immunized with this DNA vaccine. The splenic lymphocyte killing activity was detected by using MTT, levels of IL-2, IL-4 and IFN- γ were also detected by using ELISA. **Results** The MLAA34-HSP70 gene (2 956 bp) and the DNA vaccine pIRES2-MLAA34-HSP70 was amplified and constructed successfully. The killing efficiency of DNA vaccine pIRES2-MLAA34-HSP70 in U937 cells was significantly higher than that in other experimental groups and control group ($P < 0.01$), and levels of IL-4, IL-2 and IFN- γ in DNA vaccine pIRES2-MLAA34-HSP70 group were significantly higher than those in the other experimental groups and control group ($P < 0.01$). **Conclusion** The DNA vaccine pIRES2-MLAA34-HSP70 is constructed successfully. It is shown that the DNA vaccine induces strong humoral immunity, which could enhance immune responses to tumor cells and specifically kill MLAA34 positive cells.

[Key words] vaccines, DNA; gene splicing by overlap extension PCR; leukemia, monocytic, acute; MLAA-34; heat-shock protein 70

核酸疫苗是将编码某种抗原蛋白的外源基因导入动物体细胞内, 并通过宿主细胞的表达系统合成抗原蛋白, 诱导宿主产生对该抗原蛋白的免疫应答反应, 以达到预防和治疗疾病的目的^[1]。抗原表位基因是核酸疫苗的核心部分, 以融合基因为目的基因构建核酸疫苗已是业界的共识。将相同或相似功能的基因融合, 可以增强目的蛋白的免疫原性, 提高核酸疫苗的免疫保护效应。重叠延伸 PCR(gene splicing by overlap extension PCR, SOE-PCR)采用互补末端引物, 使 PCR 产物形成重叠链, 从而将来源不同的多个基因片段拼接在一起^[2]。利用 SOE-PCR 技术不需要内切酶消化和连接酶处理即可进行有效的基因重组, 因而在构建融合基因、定点突变及基因敲除等方面有着广泛的应用^[3]。本研究拟采用 SOE-PCR 技术将急性单核细胞白血病相关抗原基因 MLAA-34 及热休克蛋白 70 (HSP70)融合为 MLAA34-HSP70 融合基因, 进而构建核酸疫

苗 pIRES2-MLAA34-HSP70, 免疫 BALB/c 小鼠并检测其脾淋巴细胞对 U937 细胞的杀伤效应, 为核酸疫苗的抗肿瘤研究提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料 U937 细胞、pIRES2-EGFP 和 pIRES2-EGFP-HSP70 质粒为本课题组保存。BALB/c 鼠[无特定病原体(SPF)级, 雌性, 6~8 周龄]购自北京维通利华实验动物技术有限公司。噻唑蓝(MTT)试剂、限制性内切酶(EcoR I/BamH I)购自美国 NEB 公司, 总 RNA 提取试剂盒、无内毒素质粒提取试剂盒、逆转录 PCR(RT-PCR)试剂盒、T4 DNA 连接酶、胶回收纯化和酶联免疫吸附试验(ELISA)等试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司, 胎牛血清、RPMI 1640(高糖)培养基购自美国 Hyclone 公司; 无水乙醇、氯仿等常规试剂均为国产分析纯。

* 基金项目: 吉林省科技厅自然科学基金资助项目(20160101179JC); 吉林省卫生和计划生育委员会项目(2015Z071); 吉林省教育厅“十三五”科技项目(JJKH20170416KJ); 吉林省大学生创新创业课题(2015024); 国家级大学生创新创业训练计划项目(201613706019)。 作者简介: 赵佳琪(1996-), 在读本科, 主要从事血液系统疾病免疫治疗方面的研究。 [△] 通信作者, E-mail: s2209503@sina.com。

1.2 引物设计与合成 根据质粒 pIRES2-EGFP 多克隆位点情况选取 EcoR I 和 BamH I 酶切位点进行基因克隆。MLAA-34 基因(GenBank: AY288977. 2)扩增片段理论长度为 1 014 bp, HSP70 基因(GenBank: NM_005345. 5)扩增片段理论长度为 1 927 bp, P2 和 P3 引物设计重叠序列 GGC GGC GGC GGC GGC, 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 见表 1。

表 1 引物碱基序列

名称	碱基序列(5'-3')
P1	GCG AAT TCA TGA AAA AAA TGC CTT TGT TTA GT
P2	GGC GGC GGC GGC GGC TCA AGG GGC CGT TTT CTT CAA G
P3	GGC GGC GGC GGC GGC ATG GCC AAA GCC GCG GCG ATC
P4	CGG GAT CCC TAA TCT ACC TCC TCA ATG GTG

1.3 细胞培养及基因提取

1.3.1 U937 细胞培养 U937 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中, 37 °C 5% CO₂, 收集 U937 细胞并调整细胞浓度至 2×10⁵/mL, 接种于 96 孔细胞培养板中, 每孔加 U937 细胞 100 μL 作为脾淋巴细胞杀伤活性实验的靶细胞。

1.3.2 MLAA-34 基因提取 U937 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中, 37 °C 5% CO₂, 收集培养的 U937 细胞, Trizol 法抽提总 RNA, 逆转录合成互补 RNA (cRNA), 分别以 P1/P2 和 P3/P4 为引物, 严格按照试剂盒说明书进行 RT-PCR。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 60 s, 共 30 个循环; 最后 72 °C 5 min。RT-PCR 扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 用胶回收试剂盒回收纯化 PCR 产物。

1.4 SOE-PCR 扩增 MLAA34-HSP70 融合基因 将回收纯化的 PCR 产物, MLAA-34 和 HSP70 目的基因片段作为模板, 以 P1、P4 为引物, 采用 SOE-PCR 法扩增融合基因 MLAA34-HSP70。SOE-PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 60 s, 共 30 个循环; 最后 72 °C 5 min。PCR 扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 用胶回收试剂盒回收纯化 PCR 产物。

1.5 核酸疫苗 pIRES2-MLAA34-HSP70 的构建及鉴定 提取质粒 pIRES2-EGFP, 与回收的 MLAA34-HSP70 融合基因片段分别进行 EcoR I / BamH I 双酶切, 37 °C 1.5 h, 酶切产物经琼脂糖电泳回收纯化, 利用 T4 DNA 连接酶将 MLAA34-HSP70 融合基因亚克隆至 pIRES2-EGFP 质粒中, 16 °C 连接过夜, 构建 pIRES2-MLAA34-HSP70 重组质粒。将连接产物转化大肠杆菌(E. coli) DH5α 感受态细胞, 并在卡那霉素抗性 LB 培养基上涂板培养。将卡那霉素抗性 LB 培养基上生长的阳性转化克隆子编号, 用接种环挑取克隆子(不要完全挑完)于 3 mL LB 液体培养基中 37 °C 过夜培养, 次日提取 pIRES2-MLAA34-HSP70 质粒并进行 PCR 扩增和酶切鉴定。

1.6 核酸疫苗免疫 BALB/c 小鼠 质粒 DNA 大量制备和纯化(按试剂盒说明书进行)并用生理盐水调整至 1.0 g/L。BALB/c 鼠 40 只, 分为 4 组, 每组 10 只。对照组(A 组)、实验组(B、C、D 组)分别在小鼠两侧股四头肌内注射空质粒 pIRES2、pIRES2-MLAA34、pIRES2-HSP70 和 pIRES2-MLAA34-HSP70, 每只 100 μg。小鼠每次接种前 24 h, 均用 0.25% 布比卡因 100 μL 预处理。在 0、2、4 周进行 3 次同样剂量免疫。

1.7 脾淋巴细胞悬液的制备 末次免疫后第 7 天, 处死小鼠, 置 70% 乙醇浸泡 3~5 min, 无菌取脾脏, 置于不含胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中, 剪去脂肪及筋膜组织, 于 200 目不锈钢网筛上研碎, 重悬于含 5% 胎牛血清的 Hank's 液中, 2 000 r/min

离心 5 min, 低渗裂解红细胞, 用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基清洗 3 次, 并调整浓度为 1×10⁷/mL。

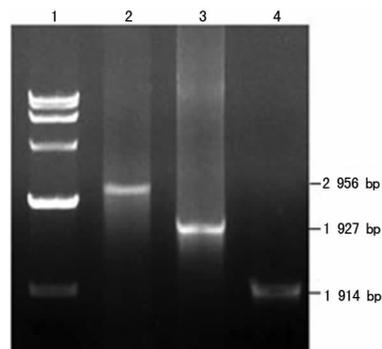
1.8 脾淋巴细胞杀伤活性的检测 取步骤 1.7 制备的脾淋巴细胞悬液, 倍比稀释。96 孔细胞培养板各反应孔中加脾淋巴细胞 100 μL, 使效靶比分别为 50 : 1、25 : 1、12.5 : 1 和 6.25 : 1 (各设 3 个复孔), 在 37 °C 5% CO₂ 中孵育 24 h, 测定每组小鼠特异性淋巴细胞杀伤活性。反应结束后, 每孔加入 20 μL MTT 工作液, 37 °C 反应 4 h, 弃去 MTT 反应液, 每孔加入二甲亚砜(DMSO) 200 μL, 室温振荡 10 min, 酶标仪测定 570 nm 处吸光度值(A₅₇₀)。脾淋巴细胞杀伤活性(%) = [1 - (反应孔 A₅₇₀ - 效应细胞对照孔 A₅₇₀) / 靶细胞对照孔 A₅₇₀] × 100%。

1.9 细胞因子水平的检测 将步骤 1.7 制备的脾淋巴细胞悬液加入 96 孔细胞培养板, 每孔 100 μL (各设 3 个复孔), 37 °C 5% CO₂ 培养 72 h, 以纯化的 MLAA-34 蛋白(20 μg/mL) 刺激抗原。以刀豆蛋白 A (ConA, 10 μg/mL) 为阳性对照, 未用抗原刺激孔为阴性对照, 培养 48 h 后收集上清液, ELISA 法检测细胞因子, 包括白细胞介素(IL)-2、IL-4 和干扰素-γ(IFN-γ) 水平(严格按照试剂盒说明书操作)。

1.10 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行统计分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用方差分析, 组间两两比较采用 LSD-t 检验, 以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 SOE-PCR 扩增 MLAA34-HSP70 融合基因结果 以 MLAA-34 基因和 HSP70 基因为模板, 以 P1、P4 为引物, 采用 SOE-PCR 法扩增 MLAA34-HSP70 融合基因, 经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 见图 1。



1: 标记物; 2: MLAA34-HSP70 融合基因; 3: HSP70 基因; 4: MLAA34 基因

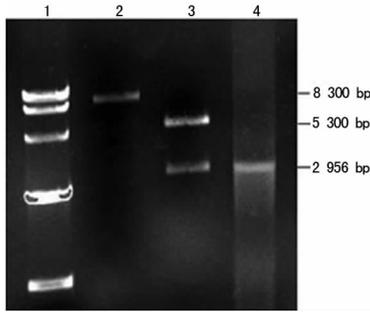
图 1 MLAA34-HSP70 融合基因扩增结果

2.2 核酸疫苗 pIRES2-MLAA34-HSP70 的构建及鉴定 将质粒 pIRES2-EGFP 与 MLAA34-HSP70 融合基因分别进行 EcoR I / BamH I 双酶切, 采用 T4 连接酶将 MLAA34-HSP70 融合基因与 pIRES2-EGFP 载体连接, 构建重组质粒 pIRES2-MLAA34-HSP70, 挑取阳性克隆菌, 扩增后提取重组质粒进行 PCR 及 EcoR I / BamH I 双酶切鉴定, 经 1.0% 琼脂糖电泳鉴定, 见图 2。

2.3 脾淋巴细胞杀伤活性的检测 将核酸疫苗分组免疫小鼠后, 检测致敏脾淋巴细胞对 U937 细胞的杀伤效率, 见表 2。其中, 核酸疫苗 D 组的杀伤效率明显高于 A、B、C 组, 差异有统计学意义(P < 0.01); 而 A、B、C 组杀伤效率比较, 差异无统计学意义(P > 0.05)。

2.4 细胞因子水平的检测 脾淋巴细胞悬液经纯化的 MLAA-34 蛋白刺激后, ELISA 法检测脾细胞上清液中细胞因子 IL-2、IL-4 和 IFN-γ 水平, 见表 3。核酸疫苗 D 组的细胞因

子 IL-2、IL-4 和 IFN- γ 水平明显高于 A、B、C 组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。B 组和 C 组上述各细胞因子水平明显高于 A 组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。B 组和 C 组间上述各细胞因子水平比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。



1: 标记物; 2: pIRES2-MLAA34-HSP70 重组质粒; 3: 双酶切鉴定结果; 4: PCR 鉴定结果

图 2 重组质粒 pIRES2-MLAA34-HSP70 的鉴定

表 2 小鼠脾淋巴细胞杀伤活性比较 ($n=10, \bar{x} \pm s, \%$)

组别	效靶比			
	50:1	25:1	12.5:1	6.25:1
A 组	8.56 \pm 1.59*	6.21 \pm 1.68*	5.07 \pm 1.14*	3.92 \pm 0.84*
B 组	9.03 \pm 1.98*	6.53 \pm 1.27*	4.88 \pm 0.69*	3.37 \pm 0.53*
C 组	8.82 \pm 1.25*	6.93 \pm 2.07*	5.33 \pm 0.91*	4.32 \pm 0.74*
D 组	42.61 \pm 5.17	31.87 \pm 4.52	27.12 \pm 3.45	19.42 \pm 1.94

*: $P < 0.01$, 与 D 组比较

表 3 小鼠脾淋巴悬液细胞因子水平比较 ($n=10, \bar{x} \pm s, \text{pg/mL}$)

组别	IL-2	IL-4	IFN- γ
A 组	28.58 \pm 10.53 $\#$	26.23 \pm 6.61 $\#$	25.27 \pm 9.12 $\#$
B 组	159.03 \pm 22.49* $\#$	96.83 \pm 11.47* $\#$	124.88 \pm 31.62* $\#$
C 组	208.25 \pm 31.24* $\#$	126.23 \pm 12.34* $\#$	155.38 \pm 22.94* $\#$
D 组	412.65 \pm 45.12	211.35 \pm 24.35	522.32 \pm 53.77

*: $P < 0.01$, 与 A 组比较; #: $P < 0.01$, 与 D 组比较

3 讨论

核酸疫苗制作简单、应用安全, 是白血病免疫治疗的策略之一。核酸疫苗导入宿主体内后可被抗原提呈细胞或机体组织细胞摄取, 在细胞内表达蛋白抗原, 刺激机体产生细胞免疫和体液免疫, 免疫保护作用好^[4]。在构建核酸疫苗时笔者使用了 SOE-PCR 技术, 将 MLAA-34 基因和 HSP70 基因融合在一起, 形成 MLAA34-HSP70 融合基因。MLAA-34 基因与急性单核细胞白血病的发生密切相关, 其表达下调能显著抑制 U937 细胞在体外的增殖, 同时会诱发白血病细胞的凋亡, 是理想的急性白血病免疫治疗的靶基因^[5-7]。HSP70 参与肿瘤基因调控及细胞增殖, 具有抗原递呈功能, 能强烈刺激免疫系统针对肿瘤抗原的免疫反应, 进而诱导机体产生特异性抗肿瘤免疫应答, 以 HSP 为基础的肿瘤疫苗是目前肿瘤疫苗研究中的热点^[8-9]。

SOE-PCR 技术的关键主要在于引物的设计, 在设计引物时, 重叠序列可以是基因序列上的任意位点, 不需要考虑融合位点及其附近的特殊序列。通过特定的重叠互补序列的引物作为桥梁, 从而使 PCR 扩增产物末端形成了相同的重叠链, 通过重叠链的延伸将 PCR 扩增片段拼接起来, 从而将两个目的基因融合在一起, 相比于限制性内切酶的酶切和连接酶的连接更加简便快捷^[10]。因此, 在融合基因、突变体分子的构建过程中, 特别是在人类体细胞敲除、疫苗的研究、多克隆抗体的产

生, 以及在植物基因工程中具有广泛的应用^[11-13]。本研究设计引物时采用柔性肽基因 GGC GGC GGC GGC GGC 作为重叠序列, 融合蛋白 MLAA-34 和 HSP70 之间以柔性肽相连接, 保证了两个蛋白融合表达且正确折叠, MLAA-34 和 HSP70 皆能发挥其独特功能, 从而保证了核酸疫苗的免疫活性。实验表明, 核酸疫苗 pIRES2-MLAA34-HSP70 免疫 BALB/c 小鼠后, 致敏脾淋巴细胞对 U937 细胞具有较强的杀伤效率, 明显高于其他实验组和对照组, 说明核酸疫苗 pIRES2-MLAA34-HSP70 能有效地刺激机体产生针对 U937 细胞的特异性杀伤作用; 此外, 致敏小鼠脾细胞培养液中细胞因子 IL-2、IL-4 和 IFN- γ 水平明显增高, 说明该核酸疫苗能诱发强烈的体液免疫, 增强机体对肿瘤细胞的免疫应答, 具有明显的免疫保护作用。

参考文献

- [1] 宋晓晖, 陈洪锁, 孙雅楠, 等. 白血病疫苗的研究进展[J]. 吉林医药学院学报, 2013, 34(3): 208-212.
- [2] Thornton JA. Splicing by overlap extension PCR to obtain hybrid DNA products[J]. Methods Mol Biol, 2016, 1373: 43-49.
- [3] 彭雷, 赵艳, 马银花. 基于巢式 PCR 的重叠延伸 PCR 优化[J]. 安徽农业科学, 2016, 44(20): 126-127.
- [4] Donnelly JJ, Wahren B, Liu MA. DNA vaccines: progress and challenges[J]. J Immunol, 2005, 175(2): 633-639.
- [5] Zhao J, He A, Zhang W, et al. Quantitative assessment of MLAA-34 expression in diagnosis and prognosis of acute monocytic leukemia[J]. Cancer Immunol Immunother, 2011, 60(4): 587-597.
- [6] Zhang WJ, Zhang WG, Zhang PY, et al. The expression and functional characterization associated with cell apoptosis and proteomic analysis of the novel gene MLAA-34 in U937 cells[J]. Oncol Rep, 2013, 29(2): 491-506.
- [7] 赵天宇, 赵佳琪, 范业宁, 等. pIRES2-MLAA34-EGFP 穿梭载体的构建及表达[J]. 吉林医药学院学报, 2016, 37(3): 184-187.
- [8] 游朝勇. HSP70 与恶性肿瘤关系的研究进展[J]. 实用癌症杂志, 2012, 27(1): 89-91, 94.
- [9] Guzhova IV, Margulis BA. HSP70-based anti-cancer immunotherapy[J]. Hum Vaccin Immunother, 2016, 12(10): 2529-2535.
- [10] Dahm P, Jennewein S. Introduction of the early pathway to taxol biosynthesis in yeast by means of biosynthetic gene cluster construction using SOE-PCR and homologous recombination[J]. Methods Mol Biol, 2010(643): 145-163.
- [11] 张旻, 姜绍通, 郑娟, 等. 潮霉素 B 抗性为选择标记的整合型表达载体的构建及在米根霉中的遗传转化[J]. 生物工程学报, 2015, 31(8): 1203-1218.
- [12] Yuelan Z, Yiwei L, Liyuan L, et al. Expression and identification of the ADF-linker-3-1E gene of Eimeria acervulina of chicken[J]. Parasitol Res, 2016, 115(4): 1641-1647.
- [13] Li B, Ye J, Lin Y, et al. Preparation and identification of a single-chain variable fragment antibody against Newcastle diseases virus F48E9[J]. Vet Immunol Immunopathol, 2014, 161(3/4): 258-264.