

## 人前列腺特异膜抗原膜外区基因的克隆表达及抗体的制备

叶传忠<sup>1\*</sup> 赵旭东<sup>2</sup> 张芳林<sup>3</sup> 林震<sup>4</sup> 许明<sup>1</sup> 张永康<sup>1</sup> 陈常庆<sup>2</sup>

<sup>1</sup>(复旦大学附属中山医院泌尿外科 上海 200032) <sup>2</sup>(中国科学院上海生物工程研究中心 上海 200042)

<sup>3</sup>(上海第二医科大学附属瑞金医院 上海内分泌研究所 上海 200025) <sup>4</sup>(福建医科大学附属协和医院泌尿外科 福州 350001)

**摘 要** 利用 RT-PCR 技术,从前列腺癌组织总 RNA 中扩增人前列腺特异膜抗原(PSMA)基因编码区序列,克隆至 pcDNA3.1 载体,以此为模板再次 PCR 扩增出 PSMA 膜外区 cDNA(edPSMA),序列测定表明克隆获得的 PSMA 及 edPSMA 与基因库所登录的序列相一致。构建原核表达质粒 pMAL-c2x-edPSMA,经 IPTG 诱导表达的 MBP-edPSMA 融合蛋白分子量约 120 kD,Western blot 证实表达产物可特异地与 PSMA 单克隆抗体 4G5 结合。用直链淀粉琼脂糖凝胶(Amylose resin)亲和层析纯化蛋白质可得到电泳均一的融合蛋白,免疫 BALB/C 小鼠制备多抗,获得效价为 1:12800 的多克隆抗体,该抗体可用于前列腺癌组织标本 PSMA 表达的检测。

**关键词** 前列腺特异膜抗原膜外区,原核表达,亲和层析,抗体

**中图分类号** Q503 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2002)01-0035-05

前列腺特异膜抗原(Prostate-specific membrane antigen, PSMA)是一种新近发现的前列腺癌相关抗原,由于其较高的前列腺特异性和膜结合特性,使其在前列腺癌的临床诊断中,特别是在判断肿瘤的转移和进展方面,是一种较 PSA 更加敏感、特异的前列腺癌肿瘤标记物<sup>[1]</sup>,为了探讨 PSMA 的生物学性能和用于前列腺癌诊断的可能性,我们应用反转录聚合酶链反应(RT-PCR)方法克隆获得 PSMA 膜外区(Extracellular domain of PSMA, edPSMA) cDNA,在大肠杆菌中进行了融合表达,利用亲和层析纯化融合蛋白,得到了 edPSMA 蛋白,并通过免疫动物,制备了多克隆抗体。

### 1 材料和方法

#### 1.1 主要试剂、质粒及菌种

RNA 抽提试剂 RNeasy Mini Kit 购自 QIAGEN 公司;限制酶、Pfu DNA 多聚酶、T4 DNA 连接酶购自 Promega 公司;Exp Taq DNA 聚合酶、DNA Marker、IPTG 购自 TaKaRa 公司;禽源反转录酶 MMLV 购自 Gibco 公司;pMAL 蛋白融合及纯化系统(包括质粒 pMAL-c2x、大肠杆菌 TB1、MBP 抗血清及 amylose resin 等)购自 NEB 公司(pMAL Protein Fusion and Purifi-

cation System, NEB # 800);福氏佐剂(完全和不完全)购自 Sigma 公司;鼠抗人 PSMA 单克隆抗体 4G5 由中科院细胞生物研究所惠赠(YES Biotech Laboratories LTD 公司产品, Lot # 269),Protein G Sepharose 4B、CN-Br 活化的 Sepharose 4B 购自 Pharmacia 公司,SP 试剂盒及 DAB 购自福州迈新公司, BALB/C 小鼠, 8~10 周龄,由中科院上海生物工程研究中心动物中心提供。

#### 1.2 标本取材

新鲜前列腺癌组织取自复旦大学附属中山医院泌尿外科,迅速液氮冷冻备用。mRNA 的分离及 cDNA 的合成均按试剂盒操作指南进行。

#### 1.3 引物及聚合酶链反应

按 Israeli<sup>[2]</sup> 等发表的人 PSMA 序列(GenBank 登录号 M99487)设计两对引物序列用于扩增 PSMA 和 edPSMA 的 cDNA(引物的 5' 和 3' 端添加了 Bam HI 和 Xho I 内切酶位点)。

| Amplified gene | Sequence of primer                     | Length |
|----------------|--|--------|
| PSMA           | P1: 5' CCGGATCCatgaagctgtgctgttgcctg3' | 2253   |
|                | P2: 5' CCGCTCGAGctatagctggcgggtcccag3' |        |
| edPSMA         | P3: 5' CCGGATCCaaatctctcaatgaagctac3'  | 2124   |
|                | P4: 5' CCGCTCGAGctatagctggcgggtcccag3' |        |

收稿日期:2001-07-30,修回日期:2001-10-29。

基金项目:复旦大学研究所专项基金资助项目(U-2)。

\* 通讯作者。 Tel:86-21-64041990 ext 2906; E-mail:chuanzhong@mycity.com.cn

#### 1.4 重组质粒 pcDNA3.1-PSMA 的构建

取反转录的 cDNA 链为模板进行 PCR 扩增。Pfu 酶和 Exp Taq 酶按 5:1 比例混和用于扩增,反应参数:95℃ 2min;95℃ 30s,55℃ 30s,72℃ 4min,30 个循环;最后 72℃ 延伸 5min。PCR 产物纯化后酶切过夜,亚克隆入载体 pcDNA3.1。质粒抽提、转化,酶切筛选阳性重组子等步骤均按常规分子克隆方法进行,pcDNA3.1-PSMA 送上海博亚公司测序鉴定。

#### 1.5 pMAL-c2x-edPSMA 的构建及融合蛋白的表达纯化

以 pcDNA3.1-PSMA 为模板,用引物 P3、P4 扩增出 edPSMA 的 cDNA, BamHI、XhoI 双酶切 PCR 产物;利用 XhoI 和 SalI 为共末端酶的特点,将 edPSMA 亚克隆到 pMAL-c2x 的 BamHI 和 SalI 位点间,选取测序正确菌种。IPTG 诱导在 *E. coli* TB1 中表达,根据 SDS-PAGE 电泳结果确定最佳表达条件。菌种按 2% 比例接种入 2L 的含葡萄糖的 LB 培养基中,37℃ 培养至  $A_{600}$  为 0.5 时,加入 IPTG 至终浓度 0.3mmol/L 诱导表达,改 30℃ 继续培养 8h 后收获菌体,7000 r/min 离心 10 min 沉淀菌体,并将收获菌体重悬于 50mL 的过柱缓冲液中, -20℃ 放置过夜后于 4℃ 超声裂解菌体,将裂解液 12500r/min 离心 15min,上清加 3 倍体积过柱缓冲液,样品过 amylose resin 亲和层析柱,用 9 倍体积的含 0.25% Tween-20 的过柱缓冲液洗床,最后用含 10mmol/L 麦芽糖的过柱缓冲液洗床,流出液中含有表达产物 MBP-edPSMA,收集流出液,透析过夜备用<sup>[3]</sup>。

#### 1.6 表达产物的 Western blotting 分析

将融合蛋白 MBP-edPSMA 进行 SDS-PAGE 后,电转印到硝酸纤维膜 (NC) 上,电压 100V,电转移 60 min。按参考文献[4]的方法进行 Western blotting 分析,抗 PSMA 单抗和羊抗鼠-IgG-ALP 二抗分别按 2μg/mL 和 1:1000 倍稀释后使用<sup>[5]</sup>。

#### 1.7 抗 edPSMA 多克隆抗体制备及纯化

用纯化的融合蛋白 200μg 与等体积福氏完全佐剂充分混匀,免疫 BALB/C 小鼠,2 周后用纯化的融合蛋白与等体积福氏不完全佐剂加强免疫 1 次,此后每间隔 1 周加强免疫 1 次共 4 次,眼眶采静脉血行琼脂双向扩散法测定抗体效价,7 天后处死动物分离血清。饱和硫酸铵沉淀和蛋白 G 亲和层析纯化多克隆抗体<sup>[6]</sup>,按 Pharmacia 公司提供的方法将大肠杆菌表达的 MBP 蛋白偶联到 CNBr 活化的 Sepharose 4B 上,免疫亲和层析去除抗血清中的抗 MBP 部分。间接酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 测定抗体效

价。

#### 1.8 抗 edPSMA 多抗的免疫组化检测

石蜡标本由福建医科大学附属协和医院泌尿外科提供,随机选取 1986~1995 年间资料完整的手术存档蜡块,其中前列腺增生 6 例,前列腺癌 6 例,膀胱移行细胞癌 6 例,腺性膀胱炎 2 例,所有病例均已经 HE 染色确诊。石蜡标本 5μm 厚连续切片,采用柠檬酸高温抗原修复-SP 免疫组化法染色,光镜下观察。免疫组化结果判断:阳性染色为细胞膜上的棕褐色沉淀,每张切片随机观察 5 个高倍镜视野,每个视野计数 500~1000 个细胞,计数阳性细胞的百分率,即标记指数 (Labelling index, LI),计数公式:LI = 阳性细胞数/所计数细胞总数 × 100%,为了便于进一步分析,将细胞染色情况分为 5 个等级:阴性为 (-),1%~25% 为 (+),26%~50% 为 (++) , > 50% 为 (+++) ,将表达分为 3 组:阴性、+ 低表达、++~+++ 高表达。

## 2 结 果

#### 2.1 人 PSMA 基因 cDNA 的克隆

以前列腺癌组织总 RNA 为模板,经 RT-PCR 获得一相当于 2.3kb 条带,将 PCR 产物亚克隆至 pcDNA3.1 载体。BamHI 和 XhoI 双酶切鉴定获得 2253 bp DNA 片段; BamHI 和 EcoRI 双酶切 (PSMA 中的 1316 位有 EcoRI 酶切位点),获得 1316bp 的 DNA 片段 (见图 1)。双链 DNA 测序显示克隆片段确实为人 PSMA 基因编码区 cDNA 序列,在所测范围内仅在 1584 位的碱基由 T 突变为 C,该密码子 (CTT→CTC) 的突变属于简并密码,编码的氨基酸仍为 Leu,编码的蛋白质未发生突变。

#### 2.2 原核质粒 pMAL-c2x-edPSMA 的构建

以质粒 pcDNA3.1-PSMA 为模板,用 P3、P4 为引物扩增 edPSMA 基因,PCR 扩增获得 2124bps 的 edPSMA 特异带,回收的 PCR 产物并与 pMAL-c2x 载体的连接产物转化感受态 *E. coli* TB1 后,在 LB 平板上筛选转化子,用 BamHI、XhoI 双酶切鉴定,获得预期大小的 DNA 片段 2124bp (图 1)。质粒的双链 DNA 测序,所读序列证明,克隆片段确实为 edPSMA cDNA 序列。

#### 2.3 重组子 pMAL-c2x-edPSMA 在大肠杆菌中的表达

为了获得 PSMA 基因编码的重组蛋白,我们选用易于纯化的 pMAL 原核蛋白表达纯化系统。pMAL-c2x 载体可编码产生 43 kD 的麦芽糖结合蛋

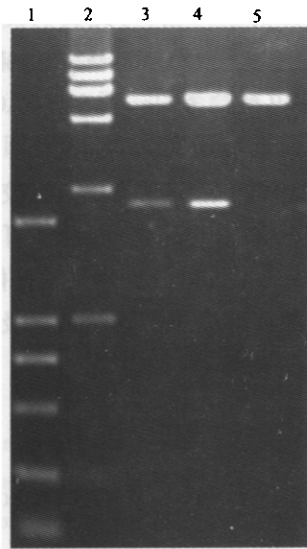


图1 重组子 pMAL-c2x-edPSMA 的酶切鉴定

Fig.1 Identification of the recombinant plasmid

pMAL-c2x-edPSMA by restriction enzyme assay

1. DL2000 DNA marker (2000bp, 1000bp, 750bp, 500bp, 250bp, 100bp); 2. DL15000 DNA marker (15000bp, 10000bp, 7500bp, 5000bp, 2500bp, 1000bp, 250bp); 3. pMAL-c2x-edPSMA/*Bam*HI + *Xho*I; 4. pMAL-c2x-edPSMA/*Bam*HI + *Xho*I; 5. pMAL-c2x/*Bam*HI + *Xho*I

白(Maltose-binding protein, MBP),外源基因以融合蛋白形式表达,所融合表达的外源肽用交联的直链淀粉树脂的亲层析柱分离,极易纯化,而且其内置凝血酶位点可通过 Xa 因子使目的蛋白与载体蛋白分离<sup>[3]</sup>。携有 edPSMA 融合表达质粒 pMAL-c2x-edPSMA 在宿主菌 *E. coli* TB1 经 IPTG 诱导后,菌体裂解物进行 SDS-PAGE 电泳,结果显示携有重组表达质粒的工程菌在约 120kD (MBP-edPSMA) 位置处有一特异条带。薄层扫描显示表达量约占菌体总蛋白的 30% (图 2)。表达产物约 50% 存在上清液中,经 amylose resin 亲和层析后得到纯化的 MBP-edPSMA。

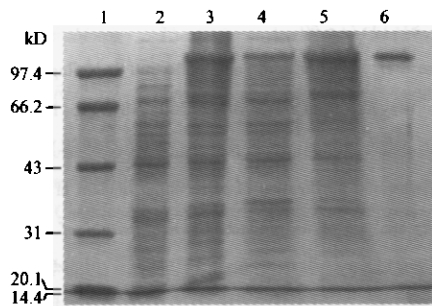


图2 TB1/pMal-edPSMA 菌的表达及亲和层析结果

Fig.2 SDS-PAGE analysis of expression and purification of MBP-edPSMA

1. Standard protein molecular marker ( $M_r \times 10^3$ ); 2. Bacterial total protein before IPTG induction; 3. Bacterial total protein after IPTG induction; 4. Supernatant of the induced protein; 5. Precipitation of the induced protein; 6. Purified MBP-edPSMA by affinity chromatograph

## 2.4 表达产物的 Western blotting 分析

图 3 示表达产物与 PSMA 单抗 4G5 的 Western blotting 分析结果,由于 edPSMA 和 MBP 分子量分别为 76kD 和 43kD, pMAL-c2x-edPSMA 分子量约为 120kD,在 120 kD 附近形成特异性杂交条带出现。

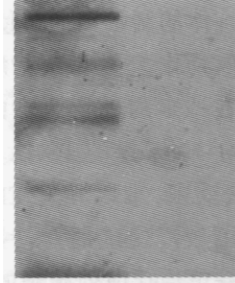


图3 重组蛋白 edPSMA 的 Western blotting 检测

Fig.3 Western blotting analysis of recombinant protein

## 2.5 抗 edPSMA 多克隆抗体制备及样品检测

BALB/C 小鼠用融合蛋白 MBP-PGDS 免疫后,由于本研究使用的抗原为 edPSMA 和 MBP 的融合蛋白,产生的抗血清中既有抗 MBP 部分,又有抗 edPSMA 部分。为了去除抗 MBP 部分,我们通过免疫亲和层析法用 MBP 抗原去除多抗中的抗 MBP 部分。间接 ELISA 测定显示免疫前的小鼠血清对融合蛋白和 MBP 均无反应,而免疫后的抗血清效价逐渐提高,末次免疫后抗血清对 edPSMA-MBP 和 MBP 的滴度分别可达 1:12800 和 1:6400 以上(以  $A_{450} > 0.2$  为阳性),经 MBP 抗原中和后的抗血清基本不与 MBP 反应,而与 edPSMA 保持较好的反应。SP 法免疫组化检测在前列腺增生及前列腺癌组织中均有不同程度的 edPSMA 表达,阳性染色主要分布于前列腺上皮细胞和癌细胞内,表达主要定位于胞膜,呈弥漫性分布,部分组织胞浆内亦可见少量表达,前列腺癌组织为阳性或强阳性表达,而前列腺增生为阳性表达,膀胱移行细胞癌及腺性膀胱炎 edPSMA 染色均为阴性。

## 3 讨论

PSMA 是前列腺上皮细胞分泌的一种  $1 \times 10^5$  MW 的 II 型转膜糖蛋白。包含 10 个潜在的 N-连接的糖基化位点,定位于染色体的 11p11-p12。PSMA 由 3 个结构域组成,分别是含 19 个氨基酸 aa 的胞内 N-末端区、含 24 个 aa 的跨膜区和含 707 个 aa 的胞外区。PSMA 在前列腺组织中有较高的特异性,其表达水平与肿瘤的术后复发、激素抵抗及较差

的预后正相关。目前,PSMA 被认为是一种较 PSA 更加特异的新型前列腺癌肿瘤标记物。

FDA 于 1997 年批准了钢<sup>111</sup> 标记 PSMA 抗体 7E11.C5(商品名 ProstaScint)检测前列腺癌的研究,此后国外又陆续报道了一些抗 PSMA 抗体,如 4G5、J591 等<sup>[7]</sup>。这些抗体的制备多通过使用前列腺癌细胞株 LNCap 的提取物作为免疫原免疫动物获得,由于其制作本身存在一定的生物源性的污染,并且产量低,无法获得均一、标化的 PSMA 抗原。这使得 PSMA 的检测方法受限,难以开发 ELISA、放射免疫等临床上应用范围较广的试剂盒。另一方面,目前国外 PSMA DNA 疫苗治疗前列腺癌的研究已进入 II 期临床,应用 PSMA 蛋白加强免疫有可能增加 PSMA DNA 疫苗的疗效。因此,通过基因工程表达 PSMA 及制备其抗体,具有很高的应用价值<sup>[1]</sup>。

PSMA cDNA 的全长为 2253bp,edPSMA 的长度也在 2kb 以上,从组织标本中扩增长片段的 PSMA 基因具有一定的难度,高保真嗜热 DNA 聚合酶如 Pfu,Pwo 等具有 3'→5' Exonuclease 活性,错配率低,但其扩增能力亦有限,而增加循环次数又增加了错配率;其次,目前商品化的 PCR 产物 A/T 克隆的 T 载体如 pUCm-T、pMD-18T 等均衍生于 pUC18 克隆载体,与 PSMA 的大小十分接近,在 0.7% Agarose 中难以将载体与目的基因分开,这也增加了实验的难度系数。在本实验中,我们将 Pfu 酶和 Exp Taq 酶按比例混合后进行 PCR 扩增,获得的 PCR 产物则通过增加酶切时间(20h),成功地获得了 PSMA 序列。

对于重组 PSMA 蛋白在大肠杆菌中的获得,此前我们曾经尝试在 pMAL-c2x、pGEX-4T-1(GST 融合表达质粒)及 pKK233 等融合或非融合系统中进行全长 PSMA cDNA 的表达,SDS-PAGE 电泳或 Western blotting 均未检测到相应的表达蛋白。这可能是因为:(1)PSMA 的 5'端(N 端)序列二级结构不利于翻译的起始;(2)膜内区富含的碱性氨基酸易受蛋白酶攻击;(3)PSMA 的膜内区的半胱氨酸(Cys22)可能引起二硫键的错配,导致其空间结构改变。虽然 PSMA 的空间构象尚未明确,但以往的实验及计算机结构预测结果均证实其活性位点及大部分的抗原决

定簇位于 PSMA 的膜外区,为此我们设计扩增表达 edPSMA 片段。实验表明,edPSMA 在 pMAL-c2x 载体中能够表达 MBP 融合蛋白。用 SDS-PAGE 电泳方法及 Western Blotting 均证实 edPSMA 基因编码蛋白的表达,用 BALB/C 小鼠制备抗血清,在较短的时间内获得所需多克隆抗体,所制备的抗体可用于临床标本的检测。edPSMA 蛋白的表达及其抗体的制备,为研究 PSMA 在前列腺癌中的表达情况及前列腺癌的免疫治疗提供了条件。

## REFERENCES(参考文献)

- [ 1 ] YE C Z(叶传忠),TANG Q Y(唐群业),ZHANG Y K(张永康). Advances in diagnostic utility of prostate-specific membrane antigen (PSMA). *Foreign Medical Sciences Section of Clinical Chemistry and Laboratory Science* (国外医学临床生物化学与检验学分册), 2001,22(1):46~47
- [ 2 ] Israeli R S,Powell C T, Fair W R *et al*. Molecular cloning of a complementary DNA encoding a prostate-specific membrane antigen. *Cancer Res*, 1993,53(2):227~230
- [ 3 ] YE C Z(叶传忠),GUAN M(关明),ZHANG F L(张芳林) *et al*. Expression and purification of secreted form TNF-related activation-induced cytokine in *E. coli* as a Maltose-binding protein fusion. *Journal of Fudan University (Medical Science)* (复旦学报(医学版)), 2001,28(4):307~310
- [ 4 ] Frederick M A *et al*. Short Protocols in Molecular Biology 3<sup>rd</sup> ed, John Wiley&Sons, Inc, 1995, pp. 59~60, 63~65, 141~146
- [ 5 ] ZHU Z Y,ZHONG C P,XU W F *et al*. PSMA simotope isolated from phage displayed peptide library can induce PSMA specific immune response. *Cell Res*, 1999,9(4):271~280
- [ 6 ] Richard I, Brooux O, Allamand V *et al*. Mutations in the proteolytic enzyme calpain 3 cause limb-girdle muscular dystrophy 2A. *Cell*, 1995,81(1):27~40
- [ 7 ] Holme E H. PSMA specific antibodies and their diagnostic and therapeutic use. *Exp Opin Invest Drugs*. 2001,10(3):511~519
- [ 8 ] GUAN M(关明),LU Y(吕元),NI Z M(倪赞明) *et al*. Cloning, expression and purification of extracellular domain of tissue factor and activity analysis of its product. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular biology* (中国生物化学与分子生物学报), 2001, 17(1):35~39

## Cloning and Expression of Extracellular Domain of Prostate Specific Membrane Antigen in *Escherichia coli* and Preparation of Polyclonal Antibody

YE Chuan-Zhong<sup>1\*</sup> ZHAO Xu-Dong<sup>2</sup> ZHANG Fang-Lin<sup>3</sup> LIN Zhen<sup>4</sup>  
XU Ming<sup>1</sup> ZHANG Yong-Kang<sup>1</sup> CHEN Chang-Qing<sup>2</sup>

<sup>1</sup>(Department of Urology, Zhongshan Hospital, Medical center of Fudan University, Shanghai 200032, China)

<sup>2</sup>(Shanghai Institute of Biotechnology, The Chinese Academy of Science, Shanghai 200233, China)

<sup>3</sup>(Shanghai Institute of Endocrinology, Shanghai 200025, China)

<sup>4</sup>(Department of Urology, Union Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou 350001, China)

**Abstract** Human Prostate Specific Membrane Antigen (PSMA) cDNA was amplified using total RNA extracted from prostate carcinoma tissue by RT-PCR. The cDNA fragment of extracellular domain of PSMA (edPSMA) gene was amplified by PCR and cloned into expression vector pMAL-c2x. Sequence analysis of both PSMA and edPSMA revealed identity to the GenBank reported. The edPSMA was expressed in *E. coli* as part of a fusion protein with MBP as the induction of IPTG. Western blot analysis showed the recombinant protein could react with PSMA monocloned antibodies 4G5. MBP-edPSMA fusion protein were purified by amylose resin affinity chromatography and showed to be homogeneity in SDS-PAGE (120kD). BALB/C mice were immunized with the purified protein for the preparation of polyclonal antibody. The polyclonal antibody, which had a title of 1:12800, were indicated the specificity to prostate tissue.

**Key words** extracellular domain of prostate-specific membrane antigen, expression, affinity chromatography, fusion protein, polyclonal antibody

Received: 07-30-2001

This work was supported by Grants from Institute Project of Fudan University (U-2).

\* Corresponding author. Tel: 86-21-64041990 ext 2906; E-mail: chuanzhong@mycity.com.cn

## The Editorial Board of Chinese Journal of Biotechnology

### EDITOR-IN-CHIEF

JIAO Rui-Shen (J. S. Chao) Professor

(Shanghai Institute of Plant Physiology, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China)

### VICE-EDITOR-IN-CHIEF

MANG Ke-Qiang Professor

(Institute of Microbiology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

FAN Yun-Liu Academician

(Biotechnology Research Center, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

YANG Kai-Yu Professor

(Institute of Microbiology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

SHEN Zhong-Yao Professor

(Department of Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

### MEMBERS OF THE BOARD (alphabetically)

WANG Hui-Lian

WANG Ji-Cheng

LU Jing-Liang

YE Min

LIU Er-Xiang

ZHU Shou-Yi

ZHU Xiang-Yuan

LI Zai-Ping

LI Xiang-Hui

LUN Shi-Yi

SONG Hou-Yan

ZHENG You-Xia

ZHENG Zhao-Xin

CHEN Zhang-Liang

CHEN Shou-Yi

MENG Guang-Zhen

ZHANG Shu-Zheng

ZHANG Qi-Xian

ZHANG Ke-Xu

YANG Yun-Liu

HOU Yun-De

SHI Lu-Ji

YU Jun-Tang

HONG Guo-Fan

LU De-Ru

GUO Li-He

HUANG Cui-Fen

GE Xi-Rui

ZHEN Yong-Su

WANG Jun (Hong Kong)

### MANAGING EDITORS

WU Wen YE Jun