

hTERT 主要 HLA-A2.1 相关基因的表达^{*}

王瑾雯¹, 李剑峰¹, 王^王章¹, 龙蔡新¹, 郑少斌²

(1. 中山大学生命科学学院//生物防治国家重点实验室, 广东 广州 510275;

2. 南方医院泌尿外科, 广东 广州 510515)

摘 要: 为了研究hTERT的表达特性及意义, 根据hTERT基因中与HLA-A2.1分子相关性较强的几个9mer肽段合成引物, 通过RT-PCR技术分别对14例RCC组织和2例肿瘤细胞株进行了扩增, 扩增片段大小为306 bp(小片段)和1 002 bp(大片段), 结果有13例癌肿组织表达hTERT基因小片段, 1例组织不表达hTERT基因; HeLa细胞和786-0肾腺癌细胞株均表达hTERT; 对大片段进行克隆, 酵母表达, 构建了pPICZαA-hTERT重组表达载体和*Pichia pastoris* X33/hTERT酵母工程菌; SDS-PAGE电泳显示毕赤酵母能分泌表达39kD的目标蛋白。得出, 大部分RCC肿瘤组织和细胞表达hTERT mRNA, 而正常组织则不表达, 提示hTERT可作为通用的抗肿瘤治疗尤其是免疫治疗的靶点。

关键词: 肾细胞癌; 端粒酶催化亚单位; 酵母; 表达

中图分类号: Q344⁺. 13 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579(2003) 01-0079-04

近年来的研究发现端粒酶活性与恶性肿瘤密切相关。而hTERT(human telomerase reverse transcriptase)是端粒酶活性的关键和限速元件, 并且有报道认为hTERT的表达与恶性肿瘤存在相关关系^[1]。基于hTERT在肾细胞癌(renal cell carcinoma, RCC)中的表达研究尚无明确而系统的报道, 本研究选取包含了与HLA I分子相关性较强的几个9mer肽段, 并结合GenBank中hTERT cDNA序列, 设计、合成引物, 分别扩增包含上述3个或2个9mer肽段的hTERT基因序列, 运用RT-PCR, 克隆、测序和酵母表达等分子生物学实验手段, 对14例肾细胞癌和2株肿瘤细胞系细胞进行了研究。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验试剂 RPMI-1640培养基购自Gibco公司, TriPure RNA分离试剂购自Roche公司, Taq plus Pfu DNA酶, M-MLV逆转录酶等均购自Sangon公司, *Eco*RI, *Xba*I, *Sac*I等内切酶, T4DNA连接酶, DNA Marker DL 2 000等均购自TaKaRa公司; 低相对分子质量蛋白质标准购自华美生物工程公司; QIAquick凝胶回收试剂盒购自QIAGEN公司。

1.1.2 细胞株 786-0肾腺癌细胞株购自上海细胞所, HeLa细胞株由吴文言博士惠赠。

1.1.3 hTERT质粒 由美国麻省科技所的Weinberg RA教授惠赠。

1.1.4 组织样本 肾细胞癌配对组织取自第一军医大学南方医院泌尿外科手术病例。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 786-0肾腺癌细胞和HeLa细胞均用含w=10%胎牛血清的1640培养基接种于50 mL培养瓶, 培养于37℃、φ=5% CO₂的孵箱中。

1.2.2 总RNA的分离 按照TriPure分离试剂的操作规程分离细胞和组织的总RNA。对数期生长良好的肿瘤细胞或新鲜液氮冻存组织, 按比例加入TriPure分离试剂, 使其匀浆化; 加入氯仿离心分层, 取无色上层含RNA水相, 用异丙醇、乙醇沉淀; 获取总RNA, 溶于无RNA酶的无菌水中。

1.2.3 RT-PCR

(1) 引物设计: 根据GenBank中人hTERT的cDNA序列设计引物。

第1对引物:

上游: 5'-CTG GAA TTC ATC CTG GCC AAG TTC CTG-3'

下游: 5'-TG TTC TAG ACC CAC CAA CAA GAA ATC ATC-3'

扩增片段为1 002 bp。

第2对引物:

上游: 5'-ATG CGT GAG GAG ATC CTG GCC AAG TT-3'

下游: 5'-CTA GTC CAT GTT CAC AAT CGG-3'

* 收稿日期: 2002-04-22

基金项目: 广东省博士后基金资助项目(2000332004204162)

作者简介: 王瑾雯(1969年生), 博士后, 助理研究员; 通讯联系人: 王^王章; E-mail: wxz@zsu.edu.cn

扩增片段为 306 bp。

(2) cDNA 的合成: 将 2 μ g RNA 加入逆转录体系中 (总体积 25 μ L), 混匀后 70 $^{\circ}$ C 变性 5 min, 冰浴 5 min, 42 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 95 $^{\circ}$ C 灭活 5 min, 冰浴 2 min, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

(3) PCR 反应: 取 2 μ L cDNA 模板加至 PCR 扩增反应体系中, 95 $^{\circ}$ C 变性 3 min。

扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 45 s 和 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 循环 30 次, 最后于 72 $^{\circ}$ C 补平 8 min。

1.2.4 重组表达载体 pPICZ α -hTERT 的构建 参照《Molecular Cloning》(Sambrook, et al, 1989) 中的 CaCl₂ 法制备 *E. coli* DH5 α 感受态细胞。连接分别经 *Eco*R I / *Xba* I 双酶切处理后的 pPICZ α 质粒和 hTERT 目标片段, 转化感受态细胞, 提取 AMP⁺ 抗性转化子 DNA, 酶切鉴定, 能切出与预期片段大小相同者即为重组质粒。

1.2.5 *Pichia pastoris* X33 hTERT 的构建 参照 Invitrogen Corporation 的 EasySelectTM *Pichia* Expression Kit 中的方法, 用 LiCl₂ 法进行转化, 转化宿主菌株为 *Pichia pastoris* X33。纯化的重组表达载体 pPICZ α -hTERT 用限制性内切酶 *Bst*XI 作线性化处理。用无菌牙签挑取单个转化子对应接种到 MM 和 MD 平板上, 于 30 $^{\circ}$ C 培养 2 d, 根据菌落生长大小判断转化子表型。以转化子基因组 DNA 为模板, 利用 α -Factor 5' 引物和 hTERT cDNA 3' 引物进行 PCR 扩增, 以证实线性化载体是否整合到酵母基因组中。

1.2.6 hTERT 在 *Pichia pastoris* X33 hTERT 中的诱导表达 将酵母工程菌 *Pichia pastoris* X33 hTERT 单菌落接种于 25 mL BMGY 中, 于 30 $^{\circ}$ C 250 r/min 振荡培养至 *A*₆₀₀ 为 2~6, 室温下以 6 000 r/min 离心收获细胞。去上清, 用 BMMY 重悬细胞至 *A*₆₀₀ 为 1.0, 将细胞悬液转至 1 L 的烧瓶中, 继续振荡培养, 每隔 24 h 补加甲醇至体积浓度为 0.5% 以维持诱导表达。分别于 12、24、48、72 h 等时间点收集培养物 1 mL, 12 000 r/min 离心 1 min, 转移上清至另一洁净 eppendorf 管中, -80 $^{\circ}$ C 贮存以备分析。

1.2.7 SDS-PAGE 参照《Molecular Cloning》(Sambrook, et al, 1989) 的方法。

2 结 果

2.1 hTERT 小片段在组织、细胞中的表达

标本编号按手术时间命名。用第 2 对引物扩增组织、细胞 hTERT 基因与 HLA 相关性较强的基元序列, 以空白对照和管家基因 β -actin 为参照。结

果显示: 对 12 对配对标本和 3 例不配对 RCC 组织进行扩增, 有 14 例癌肿组织表达 hTERT 基因小片段, 有 1 例配对组织 (515n、515c) 不表达 hTERT 基因。Hela 细胞和 786-0 肾腺癌细胞均有扩增条带, hTERT 基因有表达。

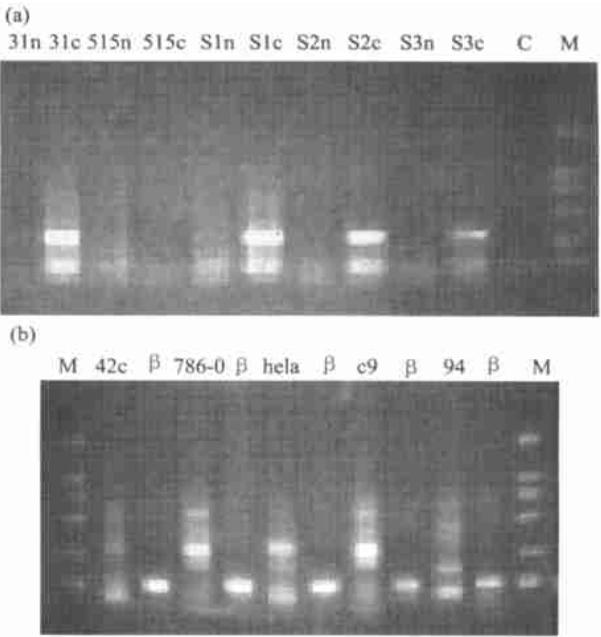


图 1 RT-PCR 分析 hTERT 小片段在 RCC 和细胞中的表达

Fig. 1 RT-PCR for tissues and cell lines

M: DL 2 000 DNA 相对分子质量标准;
C: 对照 (Rnase-free distilled H₂O 代替模板);
 β : β -actin 内参对照 (115 bp);
S (1, 2, 3) n: 临近正常组织样本;
S (1, 2, 3) c: RCC 组织样本

2.2 hTERT 大片段在组织、细胞中的表达

用第 1 和第 2 对引物 (适用于酵母表达) 分别扩增 Weinberg 教授提供的质粒, 得到 hTERT 大片段 (1 002 bp) 和小片段 (306 bp)。结果如图 2。

2.3 重组表达载体 pPICZ α -hTERT 的构建

Pichia 酵母表达载体 pPICZ α 多克隆位点上游依次为 *AOX1* 启动子区域、 α -factor 信号肽编码序列、一个 Kex2 及两个 Ste13 信号肽切割位点; 下游为 *myc*、6 $\times$ His 编码序列及 *AOX1* 转录终止区等。将扩增的 hTERT 大片段经 *Eco*R I / *Xba* I 双酶切后, 插入 *Pichia* 酵母表达载体 pPICZ α , 构建含 hTERT 大片段的重组表达载体 pPICZ α -hTERT。经酶切鉴定和 PCR 扩增证明 hTERT 大片段插入正确。

用 pPICZ α 表达载体测序引物对插入的 hTERT 大片段进行测序, 结果正确无误。

2.4 hTERT cDNA (1 002 bp) 在 *Pichia pastoris* X33 / hTERT 中的表达

取对数生长期 *Pichia* 酵母菌体, 通过甲醇诱



图 2 HLA-A2.1 相关 hTERT 基因的扩增
Fig. 2 PCR for hTERT plasmid
M: DL 2 000DNA 相对分子质量标准
L: 扩增大片 (1 002 bp)
S: 扩增小片段 (306 bp)

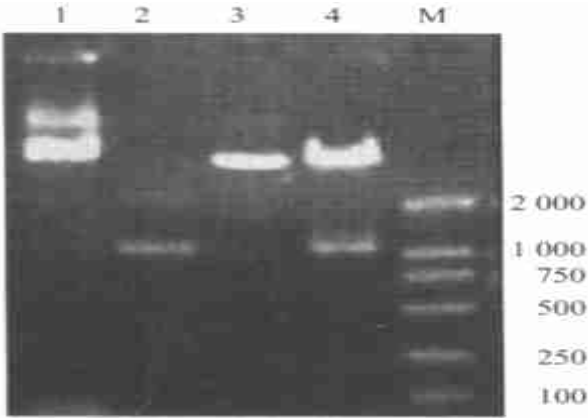


图 3 pPICZαA-hTERT 的双酶切及 PCR 鉴定
Fig. 3 Characterization of pPICZαA-hTERT by
EcoRI /Xba I digestion and PCR amplification
1: pPICZαA-hTERT 重组载体;
2: 扩增的 hTERT 大片段 (1 002 bp);
3: pPICZαA 载体;
4: pPICZαA-hTERT 经 EcoRI /Xba I 双酶切产物;
M: DL 2 000 DNA 相对分子质量标准

导表达外源蛋白。挑取 *Pichia* X33/hTERT 单菌落于 BMGY 中活化, 转移菌体至 BMMY 中, 于 30 °C 振荡培养, 在 φ=5% 甲醇诱导下, hTERT 大片段得到了表达。收集诱导 24、36、48、60、72、84 h 的培养上清, 进行 SDS-PAGE 结果显示, 在 39 000 处有特异性条带出现。结果见图 4。

3 讨 论

端粒酶在细胞的永生中发挥着关键的作用, 而恶性肿瘤细胞的一个重要的特征是具有无限增殖的能力即永生。因此, 端粒酶活性的检测对认识

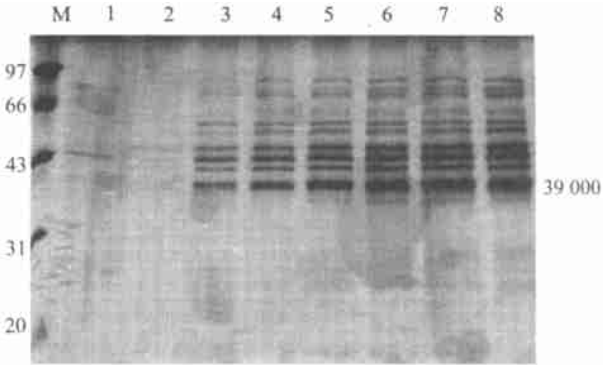


图 4 hTERT 表达时相的 SDS-PAGE 分析
Fig. 4 SDS-PAGE analysis for expression of hTERT fragment
M: 低相对分子质量标准蛋白;
1: 空载体对照;
2: *Pichia pastoris* X33/ pPICZαA 未经诱导 24 h 上清;
3: *Pichia pastoris* X33/ pPICZαA 24 h 表达上清;
4: *Pichia pastoris* X33/ pPICZαA 36 h 表达上清;
5: *Pichia pastoris* X33/ pPICZαA 48 h 表达上清;
6: *Pichia pastoris* X33/ pPICZαA 60 h 表达上清;
7: *Pichia pastoris* X33/ pPICZαA 72 h 表达上清;
8: *Pichia pastoris* X33/ pPICZαA 84 h 表达上清

肿瘤生物学生长行为提供了新的思路, 也为肿瘤的诊断和治疗提供了新的途径。通过 cDNA 和 RACE 法得出人端粒酶催化亚单位基因 hTERT 表达序列约为 4 kb, 编码 127 000 大小的蛋白质。Northern 杂交发现 hTERT mRNA 在各种细胞系和原发肿瘤中都过度表达, 它是决定端粒酶活性的最关键的成分。相当一部分研究支持 hTERT 是端粒酶多种成分中最关键的, 而且只有 hTERT 的表达与端粒酶活性有显著的相关性, hTERT 是端粒酶复合物的限速元件^[1,2]。由于肾细胞癌的诊断往往在晚期做出, 而且肾细胞癌对放疗和化疗皆不敏感, 外科手术似乎是惟一可行的治疗。鉴于上述研究资料, 本课题选取了肾细胞癌及其 hTERT 基因为研究目标。

采用 RT-PCR 技术共对 12 对配对标本和 3 例不配对 RCC 组织进行扩增, 有 14 例癌肿组织表达 hTERT 基因小片段, 有 1 例组织不表达 hTERT 基因, 实验结果与 Kyo 等^[3]的结论一致。Kyo 等^[3]采用 RT-PCR 技术分析了 36 例 RCC 和邻近正常组织, 发现大部分肿瘤组织表达 hTERT mRNA, 而正常组织则不表达。部分病例不表达 hTERT mRNA, 可能有其它未知因子代替了 hTERT 亚单位的功能。

Vonderheide 等^[9]发现 hTERT 小肽段与 HLA-A * 0201 (一种被 50% 的肿瘤病人表达的 MHC I 等位基因) 结合, 产生 CTL 反应, 特异性地杀伤 hTERT⁺ 的 MHC 限制的肿瘤细胞。Minev 等^[6]分析 hTERT 的氨基酸序列, 筛选含能与 HLA-A2.1 分子结合的

基元的 9 mer 小肽，此分子亚型包含 95% 的 HLA-A2 等位基因，在约 50% 的高加索人群中表达。通过经典的锚定残基反向遗传法明确与 HLA-A2.1 对应的肽段，并借助 Bioinformatics & Molecular Analysis Section 软件，根据与 HLA I 分子分离系数的半数时间，得到 9 mer 肽段。本课题亦根据上述软件，得到 HLA peptide motif search results 表，从中选取了与 HLA I 分子分离系数的半数时间较长的⁵⁴⁰ILAKFLHWL⁵⁴⁸，⁵⁵⁵ELLRSFFYV⁵⁶³和⁸⁶⁶RLVDDFLV⁸⁷³等 3 个 9 mer 肽段，并结合 GenBank 中 hTERT cDNA 序列，设计、合成引物，分别扩增包含上述 3 个或 2 个肽段的 hTERT 基因序列，并以大片段（1 002 bp）为目标基因构建表达载体，在 *Pichia pastoris* 中进行诱导表达，SDS-PAGE 显示培养上清在蛋白相对分子量 39 000 处有蛋白条带，提示目标蛋白在酵母中有分泌表达。

有关 Western blot 和 Elisa 检测的工作正在进行中。由于人类肿瘤中广泛存在着高度的端粒酶活性和 hTERT 的表达，hTERT 可作为一种广义的抗原

用于免疫治疗和疫苗制备。

参考文献:

[1] MEYERSON M, COUNTER C M, EATON E N, et al hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization[J] . Cell, 1997, 90(4): 785—95.
[2] VASEF M A, ROSS J S, COHEN M B. Telomerase activity in human solid tumors. Diagnostic utility and clinical applications[J] . Am J Clin Pathol, 1999, 112(Suppl 1): 68—75.
[3] KANAYA T, KYO S, KAKAKURA M, et al hTERT is a critical determinant of telomerase activity in renal-cell carcinoma[J] . Int J Cancer, 1998, 78: 539—543.
[4] VONDERHEIDE R H, HAHN W C, SCHULTZE J L, et al The telomerase catalytic subunit is a widely expressed tumor-associated antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes[J] . Immunity, 1999, 10: 673—679.
[5] MINEV B, HIPPEL J, FIRATH, et al Cytotoxic T cell immunity against telomerase reverse transcriptase in humans[J] . Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(9): 4796—4801.

Expression of HLA-A2.1 Restricted hTERT Gene in *Pichia pastoris*

WANG Jin-wen¹, LI Jian-feng¹, WANG Xun-zhang¹, LONG Qing-xin¹, ZHENG Shao-bin²

(1. State Key Laboratory for Biocontrol //School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China;
2. Department of Urology, Nanfang Hospital, Guangzhou 510515, China)

Abstract: In order to understand the immune and biological significance of expression of hTERT mRNA, primers were synthesized based on hTERT cDNA sequences which contains several coding regions for HLA-A2.1 restricted peptides, and the hTERT mRNA levels were assessed in 14 RCC tissues and 2 tumor cell lines, with RT-PCR, the obtained hTERT gene fragment was cloned and expressed in a *Pichia* yeast expression system. The findings showed that hTERT mRNA was expressed in 13 RCC tissues, not expressed in 1 RCC tissue and adjacent normal tissues; Hela and 786-0 cell lines expressed hTERT mRNA; The target fragment was constructed recombinant expression vector of pPICZαA-hTERT and expressed in yeast engineering strain of *Pichia pastoris* X33/hTERT; SDS-PAGE showed a 39 000 protein band in the supernatant of *Pichia* medium. These results identified that hTERT mRNA was expressed in most RCC tissues and tumors cell lines, and suggested hTERT as a potentially important and widely applicable target for anticancer immunotherapeutic strategies.

Key words: renal cell carcinoma; human telomerase reverse transcriptase; yeast; expression