

网络出版时间: 2020-7-15 9:01 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20200713.1200.002.html>

体外转录小鼠 MAGE-A3 mRNA 在 NIH/3T3 细胞中的表达

陈鹤丹^{1,2} 林焯^{1,2} 谢颖^{1,2} 陈尧^{1,2} 杨君仪^{1,2} 王赞^{1,2,3} 张世超^{1,2} 胡祖权^{1,2} 曾柱^{1,2,3,4} 刘丽娜^{1,2,4}

摘要 目的 构建编码 MAGE-A3 的真核表达载体,体外转录获得 MAGE-A3 mRNA,在哺乳动物细胞 NIH/3T3 中表达 MAGE-A3 蛋白。方法 通过逆转录 PCR 从三阴性乳腺癌细胞系 4T1 中扩增得到 MAGE-A3 编码基因,插入到载体 pcDNA3.1(+) 中,成功构建重组表达载体 pcDNA3.1-MAGE 作为体外转录 RNA 的模板。利用 T7 体外转录试剂盒获得 MAGE-A3 RNA,添加 poly(A) 尾后进行 mRNA 纯化。将纯化后的 MAGE-A3 mRNA 转染到 NIH/3T3 细胞中,Western blot 实验检测 MAGE-A3 蛋白的表达。结果 pcDNA3.1-MAGE-A3 正确表达和构建。体外转录 MAGE-A3 mRNA A_{260}/A_{280} 为 1.92,浓度是 872.3 ng/ μ l,长度约为 500 bp。转染 MAGE-A3 mRNA 后,NIH/3T3 能表达大小约 35 ku 的 MAGE-A3 蛋白。结论 成功构建编码 MAGE-A3 的真核表达载体,体外转录获得纯度较高的 MAGE-A3 mRNA,该 mRNA 能在 NIH/3T3 细胞中表达 MAGE-A3 蛋白。

关键词 MAGE-A3; 体外转录 mRNA; 蛋白表达

中图分类号 Q 812

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)08-1157-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.08.002

信使 RNA(messenger RNA, mRNA) 疫苗是近年来受到广泛关注的有潜力的抗肿瘤免疫治疗策略,现代分子生物学技术的发展增强了体外转录

mRNA 的稳定性和翻译效率的提高^[1],此外, mRNA 疫苗还具有合成简便、价格较低、安全性好、能同时诱导体液免疫和细胞免疫应答等优点^[2-3]。黑色素瘤抗原 A3(melanoma antigen family A3, MAGE-A3) 是一种肿瘤-睾丸抗原(cancer-testis antigens, CTA),在黑色素瘤、乳腺癌、肺癌等多种肿瘤组织中表达,在肿瘤患者中, MAGE-A3 能同时诱导体液和细胞免疫应答^[4]。多个以 MAGE-A3 为基础的疫苗进入临床试验,但试验结果提示需要在疫苗设计、佐剂选择等方面开展研究^[4]。因此,该研究通过构建编码 MAGE-A3 基因的真核表达载体,体外转录获得含 5' 抗反向帽类似物(anti-reverse cap analog, ARCA) 帽、3' Poly(A) 尾的修饰的 MAGE-A3 mRNA,并实现 MAGE-A3 mRNA 在哺乳动物细胞 NIH/3T3 中的翻译和表达,为 MAGE-A3 mRNA 疫苗的体内免疫实验奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 pcDNA3.1(+) 质粒、感受态细胞(DH5 α) 为实验室保存; NIH/3T3 细胞、4T1 细胞购自中国科学院上海细胞库; Anti- β -tubulin 抗体购自英国 Abcam 公司; HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体、Anti-MAGE-A 抗体购自美国 Santa Cruz 公司; Opti-MEM 无血清培养基购自美国 Gibco 公司; 胎牛血清购自杭州四季青生物技术有限公司; TRIzol 试剂、逆转录试剂盒购自美国 Invitrogen 公司; 质粒 DNA 小量纯化试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒、琼脂糖、*Ex Taq* DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、*EcoR* I、*Xho* I 限制性内切酶购自日本 TaKaRa 公司; MEGAscriptTM T7 试剂盒、MEGAcleanTM 试剂盒、poly(A) 尾试剂盒购自美国 Ambion 公司; TransIT[®]-mRNA 试剂盒购自美国 Mirus 公司; ARCA 帽购自美国 NEB 公司; 修饰核苷酸购自美国 TriLink Bio Tech 公司; 引物合成和质粒 DNA 测序由上海生工生物工程公司完成。

1.2 方法

1.2.1 三阴性乳腺癌 4T1 细胞总 RNA 提取 将三阴性乳腺癌 4T1 细胞培养至细胞生长汇合度达

2020-05-15 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81760556); 贵州省科技计划项目(编号: 黔科合基础[2016]1118); 贵州省科技合作计划项目(编号: 黔科合 LH 字[2015]7318); 贵州医科大学 2018 年度学术新苗培养及创新探索专项项目(编号: 黔科合平台人才[2018]5779-55); 贵阳市科技计划项目(编号: 筑科合同[2016]1001]40、筑科合同[2017]5-27 号); 贵州省卫生健康委科学技术基金项目(编号: gzwjkj2019-1-041); 国家级大学生创新创业训练计划项目(编号: 20195200134)

作者单位: 贵州医科大学¹ 生物与工程学院生物技术教研室、² 生物与医学工程重点实验室/贵州省免疫细胞与抗体工程研究中心/医药生物技术工程研究中心、³ 基础医学院、⁴ 环境污染与疾病监控教育部重点实验室, 贵阳 550025

作者简介: 陈鹤丹,女,硕士研究生;

刘丽娜,女,教授,博士生导师,责任作者, E-mail: strawberry2@126.com;

曾柱,男,教授,博士生导师,责任作者, E-mail: zeng-zhu100@sina.com

80% ~ 90% 时 , 采用 TRIzol 试剂法提取 4T1 细胞总 RNA , 最后用 15 μ l DEPC 水溶解 RNA 沉淀。

1.2.2 MAGE-A3 基因的扩增及回收 以含 MAGE-A3 基因全长的 4T1 cDNA 为模板 , 进行 PCR 扩增 , 反应条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min , 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s , 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s , 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min 20 s , 30 个循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min 终止。PCR 扩增产物切胶回收后得到 MAGE-A3 目的片段。MAGE-A3 基因上游引物: 5'-GTGGAATTCCGCCACCATGGCTGATTCCC AT-3' (下划线部分为 *EcoR* I 酶切位点) ; 下游引物: 5'-ATACTCGAGCTAGAATGTGTGTAGGT-3' (下划线部分为 *Xho* I 酶切位点) 。

1.2.3 重组质粒 pcDNA3.1-MAGE-A3 的构建及鉴定 分别对 PCR 回收产物和 pcDNA3.1(+) 质粒进行 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切。双酶切后用切胶回收试剂盒回收酶切片段 , 将回收片段用 T4 DNA 连接酶于 16 $^{\circ}$ C 连接过夜。次日将连接产物转化到 DH5 α 感受态细胞中 , 培养过夜后挑选阳性单克隆菌落进行扩大培养。按照质粒提取试剂盒说明书提取质粒。对重组质粒进行单 / 双酶切 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定后 , 对其进行测序确认重组质粒成功构建。

1.2.4 体外转录修饰的 MAGE-A3 RNA、加尾及纯化 以上述 pcDNA 3.1(+) /MAGE-A3 重组质粒作为体外转录模板 , 使用修饰核苷酸代替 MEGAscriptTM T7 试剂盒内的胞苷和尿苷 , 添加 ARCA 按体外转录试剂盒说明书进行体外转录合成 RNA 后添加 Poly(A) 尾 , 最后按照清除试剂盒说明书对产物进行纯化。

1.2.5 纯化的 MAGE-A3 mRNA 转染 NIH/3T3 细胞 将 NIH/3T3 细胞铺于六孔板中 , 培养至细胞密度达到 80% 后 , 用 TransIT[®]-mRNA 试剂盒转染 NIH/3T3 细胞 , 具体步骤参考试剂盒说明书。

1.2.6 Western blot 检测 MAGE-A3 蛋白的表达 收集目的细胞 , 分别取 20 μ g 细胞总蛋白样品 , 恒压 140 V 进行蛋白电泳 2 h , 在低温恒流 250 mA 的条件下 , 转膜 1 h。50 g/L 脱脂奶粉室温封闭 1 h , 洗膜。Anti-MAGE-A 抗体和 Anti- β -tubulin 抗体一抗 (1 : 1 000) 4 $^{\circ}$ C 过夜后 , 室温孵育 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗 (1 : 5 000) 1 h。使用凝胶成像系统对 PVDF 膜进行曝光。

1.3 统计学处理 采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行数据分析及统计图绘制。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示 , 两组间比较采用 *t* 检验 , 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 三阴性乳腺癌 4T1 细胞提取总 RNA 琼脂糖凝胶电泳 通过 TRIzol 试剂从 4T1 乳腺癌细胞中提取得到总 RNA 样品 , 取 2 μ l RNA 样品进行琼脂糖凝胶电泳。图 1 可见提取的总 RNA 条带分别为 28、18、5 s (s 为沉降系数) , 说明提取的总 RNA 符合后续要求。

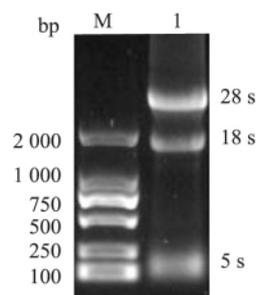


图 1 三阴性乳腺癌 4T1 细胞提取的总 RNA 琼脂糖凝胶电泳
M: DL 2 000 DNA Marker; 1: 4T1 细胞总 RNA

2.2 RT-PCR 扩增 MAGE-A3 基因 PCR 扩增结束后 , 取 9 μ l PCR 样品 , 加入 1 μ l 10 \times Loading Buffer 混匀后 , 进行琼脂糖凝胶电泳。由图 2 可看出 PCR 扩增的特异性条带在 1 000 bp 左右 , 与预期相符 , 表明成功扩增 MAGE-A3 基因。

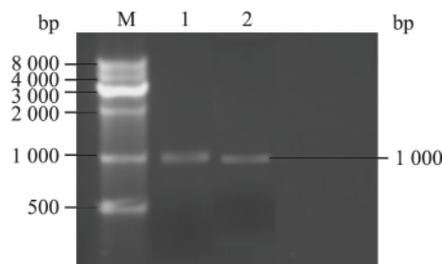


图 2 PCR 扩增 MAGE-A3 琼脂糖凝胶电泳
M: DL 8000 DNA Marker; 1, 2: MAGE-A3 PCR 产物

2.3 重组质粒的酶切鉴定和测序分析 挑单克隆扩大培养后 , 提取质粒后进行酶切鉴定 , 待酶切过夜后 , 取出。然后加入 1 μ l 10 \times Loading Buffer 混匀之后 , 进行电泳。由图 3 可见 , 只有 2 号质粒双酶切后出现一条 1 000 bp 左右的目的基因条带和一条 4 000 ~ 5 000 bp 的载体条带 , 证实重组质粒构建成功。

2.4 体外转录 mRNA 的检测 经 Thermo Nano DropTM 2000 测定的体外转录 mRNA A_{260} / A_{280} 比值为 1.92 , mRNA 浓度为 872.3 ng / μ l。最后将转录模板 DNA 与转录产物 mRNA 进行琼脂糖凝胶电泳 ,

从图 4 可看出, 转录模板条带在 1 000 bp 左右, mRNA 转录产物条带在 500 bp 左右, 因为模板 DNA 为双链结构, 而转录得到的 mRNA 为单链, 转录得到的 mRNA 理论上应该为双链 DNA 的一半。

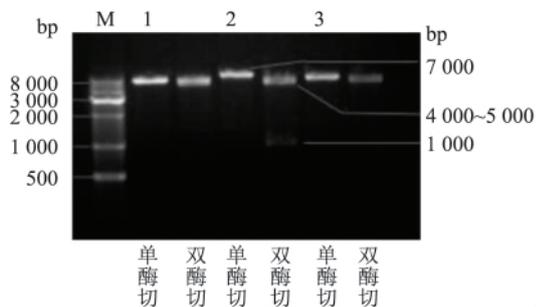


图 3 重组质粒单/双酶切后的琼脂糖凝胶电泳

M: DL 8000 DNA Marker; 1、2、3: 重组质粒的单/双酶切产物

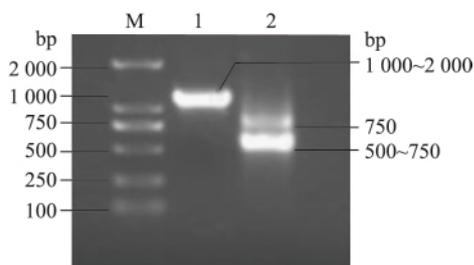


图 4 体外转录 mRNA 的琼脂糖凝胶电泳

M: DL 2000 DNA Marker; 1: 转录模板 DNA; 2: 体外转录 mRNA

2.5 体外转录 MAGE-A3 mRNA 在 NIH/3T3 细胞中的表达 将体外转录 MAGE-A3 mRNA 转染到 NIH/3T3 细胞后培养 48 h, 提取对照组 NIH/3T3 细胞及转染 MAGE-A3 mRNA 的 NIH/3T3 细胞总蛋白。图 5 结果表明 MAGE-A3 mRNA 成功转染到 NIH/3T3 细胞中, 对照组与转染组之间 MAGE-A3 的表达存在差异, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

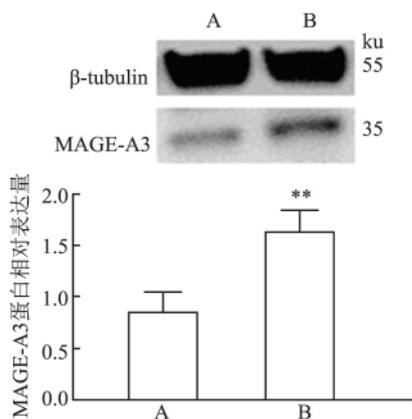


图 5 Western blot 法检测 MAGE-A3 蛋白的表达

A: 对照组; B: 转染 MAGE-A3 mRNA 组; 与对照组比较: ** $P < 0.01$

3 讨论

mRNA 在革新疫苗、替代蛋白疗法和遗传性疾病的治疗等方面表现出巨大潜力^[5]。在肿瘤治疗研究方面, 有将 mRNA 直接注射到淋巴结内, 在淋巴结内启动幼稚 T 细胞, 能有效诱导 T 细胞免疫应答^[6]; 也有将 mRNA 瘤内注射, 直接作用于经树突状细胞活化、迁移并浸润肿瘤的肿瘤浸润 T 细胞, 以及利用 mRNA 编码的免疫调节因子在肿瘤内的表达, 去改善抑制性的肿瘤微环境^[7-8]; 此外, 瘤内注射编码肿瘤抗原的 mRNA 可以直接活化已经负载死亡肿瘤细胞释放的肿瘤抗原、驻留肿瘤的树突状细胞^[9]。自 2008 年起, 大量的 mRNA 肿瘤疫苗进入临床试验^[6]。因此, 本研究构建编码肿瘤特异性抗原 MAGE-A3 的体外转录 mRNA, 在哺乳动物细胞中证实体外转录 MAGE-A3 mRNA 能正常翻译表达, 为后续动物实验研究 MAGE-A3 mRNA 疫苗的抗肿瘤效果奠定了基础。

mRNA 应用于治疗, 它的可翻译性、稳定性以及免疫刺激活性是关键因素, 通常针对这几点进行优化改进^[10]。mRNA 5' 端帽子会影响翻译起始因子 eIF4E 的识别, 对帽子结构进行修饰, 可抑制 RNA 去帽和增强 mRNA 抵抗酶降解的能力, 进而提高 mRNA 的翻译效率^[11]。目前帽类似物中使用 AR-CA 用于合成体外转录 mRNA, 可提高 mRNA 的翻译效率^[12]。RNA 碱基的化学修饰可增强 mRNA 的免疫刺激活性, 在 mRNA 疫苗设计中很重要^[13]。Poly(A) 尾, 将其长度增加至约 120 个 A, 可提高 mRNA 的稳定性和蛋白质表达量^[6]。最适翻译的体外转录 mRNA 的合成, 通常以线性 DNA 为模板, 使用 T7 噬菌体 RNA 聚合酶进行体外合成^[14], 合成得到的 mRNA 分子包含 5' 帽子结构、目的基因的完整开放阅读框、3' Poly(A) 尾^[13]。本研究体外转录合成的就是含 5' ARCA 帽、3' Poly(A) 尾的修饰的 MAGE-A3 mRNA。

Kozak 序列是一段位于真核生物基因翻译起始密码子周围的核酸序列, 在翻译起始中发挥重要的识别作用。脊椎动物 mRNA 的 Kozak 序列多数为 GCC R CC AUG G (此处 R 为 A/G)。起始密码子 AUG 的 A 为 +1, 其上游的 C 为 -1。已证实 -3 位为嘌呤碱基 A 时, +4 位为 G 对上调蛋白表达起关键作用^[15]。因此, 在 MAGE-A3 mRNA 5' 端设计了 GCCACCAUGG 序列以增强 MAGE-A3 mRNA 翻译效率。

本研究设计的体外转录 MAGE-A3 mRNA 能在哺乳动物细胞中成功表达肿瘤特异性抗原 MAGE-A3 蛋白,为后续研究该 mRNA 疫苗的免疫效果奠定了基础。

参考文献

- [1] Bialkowski L, Van Der Jeught K, Renmans D, et al. Adjuvant-Enhanced mRNA Vaccines[J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1499: 179–91.
- [2] Iavarone C, O'hagan DT, Yu D, et al. Mechanism of action of mRNA-based vaccines[J]. *Expert Rev Vaccines*, 2017, 16(9): 871–81.
- [3] Weissman D. mRNA transcript therapy [J]. *Expert Rev Vaccines*, 2015, 14(2): 265–81.
- [4] Esfandiary A, Ghafouri-Fard S. MAGE-A3: an immunogenic target used in clinical practice [J]. *Immunotherapy*, 2015, 7(6): 683–704.
- [5] Kowalski PS, Rudra A, Miao L, et al. Delivering the messenger: advances in technologies for therapeutic mRNA delivery [J]. *Mol Ther*, 2019, 27(4): 710–28.
- [6] Grunwitz C, Kranz L M. mRNA cancer vaccines—messages that prevail [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2017, 405: 145–64.
- [7] Van Der Jeught K, Bialkowski L, Daszkiewicz L, et al. Targeting the tumor microenvironment to enhance antitumor immune responses [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(3): 1359–81.
- [8] Van Der Jeught K, Van Lint S, Thielemans K, et al. Intratumoral delivery of mRNA: overcoming obstacles for effective immunotherapy [J]. *Oncoimmunology*, 2015, 4(5): e1005504.
- [9] Van Lint S, Renmans D, Broos K, et al. Intratumoral delivery of TriMix mRNA results in T-cell activation by cross-presenting dendritic cells [J]. *Cancer Immunol Res*, 2016, 4(2): 146–56.
- [10] Granot Y, Peer D. Delivering the right message: Challenges and opportunities in lipid nanoparticles-mediated modified mRNA therapeutics—An innate immune system standpoint [J]. *Semin Immunol*, 2017, 34: 68–77.
- [11] Wojtczak B A, Sikorski P J, Fac-Dabrowska K, et al. 5'-Phosphorothiolate dinucleotide cap analogues: reagents for messenger RNA modification and potent small-molecular inhibitors of decapping enzymes [J]. *J Am Chem Soc*, 2018, 140(18): 5987–99.
- [12] Koecik I, Pieczyk K, Rudzinska M, et al. Modified ARCA analogs providing enhanced translational properties of capped mRNAs [J]. *Cell Cycle*, 2018, 17(13): 1624–36.
- [13] Pardi N, Hogan MJ, Porter FW, et al. mRNA vaccines – a new era in vaccinology [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2018, 17(4): 261–79.
- [14] Grier A E, Burleigh S, Sahni J, et al. pEVL: A linear plasmid for generating mRNA IVT templates with extended encoded Poly (A) sequences [J]. *Mol Ther Nucleic Acids* 2016 5(4): e306.
- [15] Hernández G, Osnaya VG, Pérez-Martínez X. Conservation and variability of the AUG initiation codon context in eukaryotes [J]. *Trends Biochem Sci*, 2019, 44(12): 1009–21.

Expression of *in vitro* transcribed MAGE – A3 mRNA in NIH/3T3 cells

Chen Hedan^{1 2}, Lin Xuan^{1 2}, Xie Ying^{1 2}, et al

(¹Dept of Biotechnology, School of Biology and Engineering; ²Key Laboratory of Biology and Medical Engineering/Immune Cells and Antibody Engineering Research Center of Guizhou Province/Engineering Research Center of Medical Biotechnology, Guizhou Medical University, Guiyang 550025)

Abstract Objective To construct eukaryotic expression plasmid encoding MAGE-A3, prepare *in vitro* transcribed mRNA and express MAGE-A3 protein in NIH/3T3 cells. **Methods** The whole gene of MAGE-A3 was amplified by RT-PCR and cloned into pcDNA3.1(+) expression vector to build pcDNA3.1-MAGE. Subsequently, the template DNA for transcription *in vitro* was prepared by PCR. Then, the template DNA was transcribed into MAGE-A3 RNAs using MEGAscript T7 transcription kit. The transcripts were added a poly(A) tail to the 3' termini and purified by using transcription clean-up kit. After transfection of the purified MAGE-A3 mRNA into NIH/3T3 cells, Western blot analysis was used to confirm the expression of MAGE-A3 protein. **Results** The gene inserted into the recombinant vector was proven to be completely identical with the sequence of the MAGE-A3 gene in online database. The ratio of A₂₆₀/A₂₈₀ of the purified mRNA was 1.92, and the concentration was 872.3 ng/μl. The length of MAGE-A3 mRNA was about 500 bp. After MAGE-A3 mRNA transfected into NIH/3T3 cells, MAGE-A3 protein could be produced in cells and the size of protein was 35 ku. **Conclusion** Eukaryotic expression plasmid encoding MAGE-A3 is successfully constructed and the high-purity MAGE-A3 mRNA is obtained *in vitro*. The mRNA can be translated into MAGE-A3 protein in NIH/3T3 cells.

Key words MAGE-A3; *in vitro* transcribed mRNA; protein expression