论著

文章编号:1000-5404(2011)11-1128-04

新耐药基因HA117多克隆抗体的制备与鉴定

陈建飞,金先庆,丁雄辉,孙艳辉,赵利华,郭振华,王士奇 (400014 重庆,重庆医科大学附属儿童医院儿童发育疾病研究省部共建教育部重点实验室)

【摘要】 **目的** 制备HA117多克隆抗体。**方法** 以HA117表达质粒pAdTrack-HA117为模板,PCR扩增HA117基因,扩增产物转入BL21(DE3)感受态细胞,进行HA117蛋白诱导表达,采用SDS-PAGE检测表达产物。纯化HA117蛋白后免疫新西兰大白兔,制备多克隆抗体。通过间接ELISA检测其效价。将转染携带HA117重组腺病毒的HEK293细胞为实验组,未转染的HEK293细胞为对照组,用细胞免疫荧光和Western blot方法检测其过表达的HA117蛋白,验证制备的HA117多克隆抗体的特异性。**结果** 成功获得HA117多克隆抗体,间接ELISA法检测显示抗HA117血清效价为1:729 000。细胞免疫荧光和Western blot检测示制备的HA117多克隆抗体可以特异性识别HA117抗原蛋白。**结论** 获得了效价和特异性较高的HA117多克隆抗体。

【关键词】 HA117;多克隆抗体;抗体制备;鉴定
【中图法分类号】 R392.11;R394-33 【文献标志码】 A

Preparation and identification of polyclonal antibodies of novel multidrug resistance gene HA117

Chen Jianfei, Jin Xianqing, Ding Xionghui, Sun Yanhui, Zhao Lihua, Guo Zhenhua, Wang Shiqi (Key Laboratory of Developmental Diseases in Childhood Cofounded by Chongqing and Ministry of Education, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400014, China)

【**Abstract**】 **Objective** To prepare polyclonal antibodies of a novel multidrug resistance gene, HA117. **Methods** pAdTrack-HA117 plasmid was used as the template to amplify the total cDNA of HA117 by using PCR. The products of PCR were transferred into BL21 (DE3) competent cells to induce the protein expression of HA117 and identified by SDS-PAGE. New Zealand rabbits were immunized with HA117 protein after been purified in order to get the polyclonal antibodies of HA117. Indirect ELISA was used to detect the titer of the polyclonal antibodies of HA117. Adenovirus vector encoding HA117 gene was transducted into HEK293. Immunofluorescence staining and Western blot analysis were used to detect the specificity of polyclonal antibodies. **Results** Polyclonal antibodies of HA117 were obtained successfully. The anti-HA117 serum titer was 1:729 000 by indirect ELISA. The polyclone antibody of HA117 identified the HA117 protein in transducted HEK293 specifically by immunofluorescence staining and Western bolt analysis. **Conclusion** Our prepared polyclonal antibodies of HA117 are of high titer and high specificity.

【**Key words**】 HA117; polyclonal antibody; preparation; identification

Supported by the National Natural Science Foundation of China (39970768). Corresponding author: Jin Xianqing, Tel: 86-23-63638834, E-mail: etzhl@163.com

全反式维甲酸(all-trans-retinoicacid,ATRA)是我国学者首先使用的白血病化疗药物及实体瘤辅助化疗药物[1]。ATRA对恶性肿瘤治疗具有广泛有效性,使用后诱导瘤细胞产生对ATRA及其他化疗药物的耐受现象,引起临床广泛关注[2-4]。本课题组在建立HL-60/ATRA耐药株的基础上成功筛选并发现一未知的耐药新基因,命名为HA117(Genebank Number:CB214920)。前期研究已成功构建携带HA117基因的重组腺病毒和其沉默质粒[5],并验证了HA117具有明显的多药耐药功能[6-11]。但是,HA117基因的编码蛋白在肿瘤组织和正常组织中,特别是肿瘤组织中的

【基金项目】 国家自然科学基金面上项目(39970768)
【通信作者】 金先庆,电话:(023)63638834,E-mail:etzhl@163.com

表达水平和分布规律尚不清楚,明显限制了 HA117 基因在临床中的进一步应用和推广,严重制约了ATRA 临床使用中的耐药机制研究。本研究应用前期研究成功构建的 HA117 表达质粒为模板制备 HA117 编码蛋白的多克隆抗体,为进一步研究 HA117 编码蛋白在肿瘤组织和正常组织中的分布特点和表达水平提供工具。

1 材料与方法

1.1 材料

限制性内切酶购于 TaKaRa 公司,T_4 DNA Ligase、DH5a 感受态细胞、高纯度质粒小提 Kit 均购于 CWBIO 公司,pET-28(a+)购于 Novagen 公司,HA117 表达质粒 pAdTrack-HA117 和携带 HA117 基因的重组腺病毒 Ad-HA117 由本实验室构建并保存,IPTG 为 AMRESCO 公司产品,免疫荧光试剂盒购于凯基生物公司,Western blot 试剂盒购于 beyotime 公司。新西兰大耳白兔 2 只,每只约 2 kg,动物编号:CWR0422,CWR0423,由北京市海淀区兴隆实验动物养殖厂提供。HEK293 细胞购自 ATCC 公司并保存于本实验室。

1.2 方法

1.2.1 引物设计及 PCR 扩增 根据 HA117 基因测序序列设计并合成引物。上游加上 *Eco*R Ⅰ酶切位点,下游加 *Bam*H Ⅰ酶切位点。HA117-F:5′-CGCGGATCCTTGCTGGCGCGG-GATCTGCACTG-3′,HA117-R:5′-CCGGAATTCGCGCTTCTCCA-CAGGCTG-3′。以 pAdTrack-HA117 质粒为模板,pAdTrack-HA117 质粒中 HA117 目的蛋白基因序列约为 1 100 bp,分别以 HA117-F、HA117-R 为上下游引物,用 LAmp DNA 聚合酶进行 PCR 反应。94 ℃ 3 min 预变性后,94 ℃ 30 s、55 ℃ 30 s、72 ℃ 1 min 20 s 共 30 个循环. 最后 1 轮循环完成后再 72 ℃ 延伸 10 min。

1.2.2 HA117 基因原核表达载体的构建 将回收的 PCR 产物(HA117 目的片段)用 *Eco*R Ⅰ和 *Bam*H Ⅰ双酶切并回收酶切产物中的 HA117 基因片段。再用 *Eco*R Ⅰ和 *Bam*H Ⅰ双酶切 PET28a 质粒,回收 PET28a 片段。用 T_4 DNA Ligase 将两双酶切回收产物于 22 ℃连接 2 h,连接产物为 PET-HA117。将连接产物转化 DH5a 感受态细胞,并进行菌落 PCR 和 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定连接结果并测序[12]。

1.2.3 HA117 蛋白的诱导表达与纯化 将重组质粒 pET-HA117 转化入 BL21(DE3)感受态细胞后涂 LB 平板,37 ℃过夜培养。次日挑单克隆于 LB 培养液中,37 ℃培养过夜,第 3 天按照 2% 比例接种到 LB 培养液中放大培养,37 ℃ 3 h 后,取出 2 ml 菌液不诱导作阴性对照,其余菌液加入终浓度 0.4 mmol/L 的 IPTG,37 ℃培养 3 h。取诱导前和诱导后菌液各 1 ml 做对照,样品上清用 SDS-PAGE 检测诱导表达情况。12 000 r/min 离心 10 min 收集诱导表达后的菌体。加入细菌裂解液超声破碎菌体,超声后 12 000 r/min 离心 10 min,分别取超声后上清和沉淀 SDS-PAGE 检测。用 Ni-Agarose His 标签蛋白纯化试剂盒进行目的蛋白的纯化,纯化后蛋白 SDS-PAGE 检测纯度。

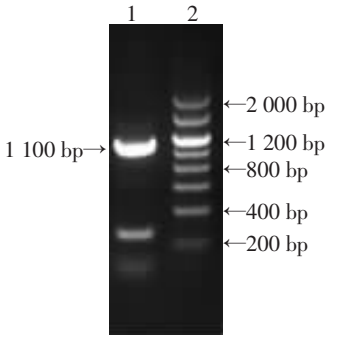
1.2.4 兔抗 HA117 蛋白多克隆抗体的制备 抗原为纯化的 HA117 蛋白,初次免疫用 600 μg 抗原溶液加等体积弗氏完全佐剂乳化后皮下多点注射于新西兰大耳白兔。3 周后进行加强免疫,用 400 μg HA117 蛋白溶液加等体积弗氏完全佐剂乳化后皮下多点注射于新西兰大耳白兔,1 个月后再免疫 1 次,共 3 次。兔子耳缘静脉取血,分离抗血清。ProteinA 亲和纯化抗血清中总 IgG,SDS-PAGE 检测纯化后抗体纯度[13-14]。

1.2.5 HA117 多克隆抗体的鉴定 ①效价测定:间接 ELISA 法测定免疫后抗血清效价,取免疫前血清作为对照,分别以不同稀释倍数的免疫前和免疫后血清作为一抗检测效价。②特异性检测:将携带 HA117 基因的腺病毒转染 HEK293 细胞作为实验组,流式细胞法测试转染率。用免疫荧光法和 Western blot 法进行转染前后 HA117 蛋白表达情况检测,查看 HA117 多克隆抗体对 HA117 蛋白是否能特异性结合。

2 结果

2.1 HA117 基因的扩增与鉴定

PCR 扩增 HA117 基因,用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测,得到相对分子质量为 1 100 bp 大小的片段(图 1)。通过切胶回收目的片段,即可得到 HA117 目的基因。

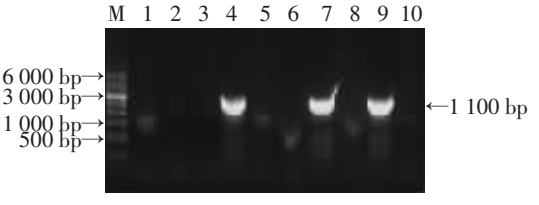


1:HA117 基因 PCR 产物;2:DNA 标准

图 1 HA117 基因扩增结果

2.2 原核表达载体构建

菌落 PCR 试剂盒扩增连接于 PET28a 载体的连接产物 pET-HA117,扩增产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测得到相对分子质量为 1 100 bp 的目的片段(图 2)。

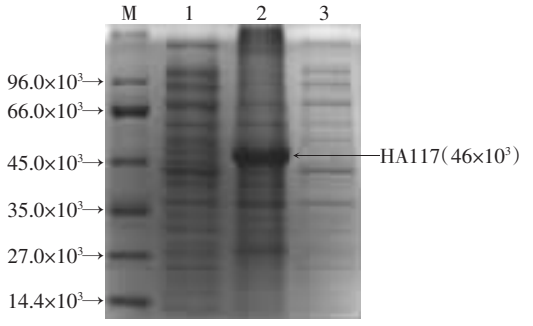


M:标准;1~3、5~6、8、10:未克隆出目的产物;4、7、9:HA117 克隆产物

图 2 菌落 PCR 检测 pET-HA117 连接克隆产物

2.3 HA117 融合蛋白在大肠杆菌中的表达

将重组质粒 pET-HA117 转化入 BL21(DE3)感受态细胞后涂 LB 平板培养,诱导后进行 SDS-PAGE 检测,获得分子质量约为 46×10^3 的 HA117 蛋白(图 3)。



M:标准 1:pET-HA117 诱导裂解液上清 2:pET-HA117 诱导裂解沉淀 3:HA117-未诱导全菌裂解液

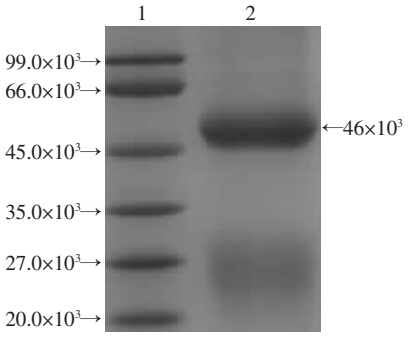
图3 HA117 抗原蛋白诱导表达后12% SDS-PAGE 检测

2.4 HA117 融合表达蛋白的纯化

用 Ni-Agarose His 标签蛋白纯化试剂盒进行目的蛋白的纯化。纯化后蛋白 SDS-PAGE 检测纯度,获得纯度较高的 HA117 蛋白。

2.5 HA117 多克隆抗体纯化

ProteinA 亲和纯化抗血清中总 IgG,SDS-PAGE 检测纯化后抗体纯度(图4)。

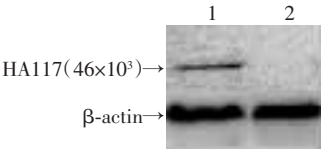


1:蛋白标准 2:纯化后 HA117 多克隆抗体

图4 SDS-PAGE 检测纯化后抗体

2.6 HA117 多克隆抗体的鉴定

用 HA117 蛋白作为抗原,间接 ELISA 法检测 HA117 多克隆抗体效价,结果显示其效价为 1∶729 000。用含 HA117 基因的腺病毒转染 HEK293 细胞为实验组,流式细胞法测试转染率为 59.7%。48 h 后用 HA117 多克隆抗体作为一抗检测,在相同抗体稀释浓度及曝光时间下,实验组表达明显强于对照组(红色荧光)(图5)。提取转染 HA117 基因的 HEK293 细胞蛋白,用 HA117 多克隆抗体检测过表达的 HA117 蛋白,发现目的条带,对照组无条带显示(图6)。

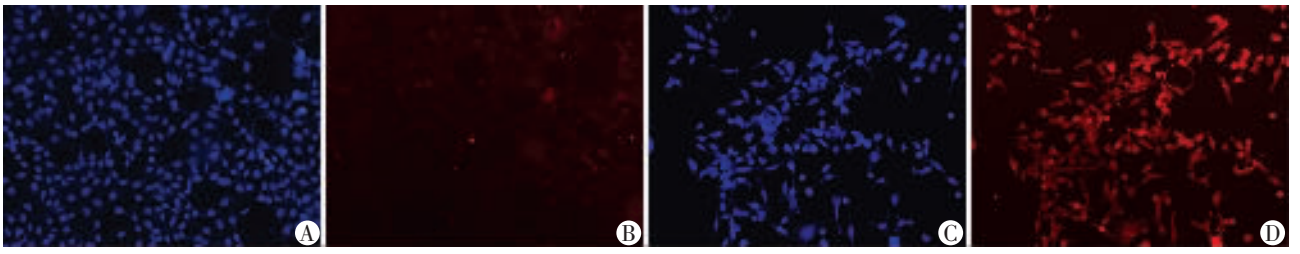


1:转染 HA117 基因的 HEK293 细胞裂解液 2:未转染 HA117 基因的 HEK293 细胞裂解液

图6 Western blot 检测 HEK293 细胞中过表达的 HA117 蛋白

3 讨论

恶性肿瘤是一种全身性、异质性疾病。目前化疗在防止恶性肿瘤转移和复发以达到最终根治恶性肿瘤的综合治疗中起着不可替代的作用,特别是在白血病的治疗中有着举足轻重的地位[15-17]。1986 年我国学者率先应用 ATRA 治疗急性早幼粒细胞白血病(APL)取得成功,对世界医学做出了重要贡献。但是,近几年国内外研究相继证实了 ATRA 使用后可继发瘤细胞产生对 ATRA 本身及其他多种化疗药物的耐受。经 ATRA 治疗后复发的患者由于对 ATRA 及其他化疗药物产生了耐受,化疗效果受到巨大的影响。但是,对于 ATRA 诱导细胞多药耐药产生的机制仍然不清楚[18-20]。为探讨 ATRA 导致耐药的机制,近年来,在国家自然科学基金资助下,本课题组在已知耐药相关基因中进行一一探索的实验基础上,从基因差异表达角度入手,以诱导分化汇总最经典、最常用的髓系白血病细胞株 HL-60 为研究对象,就可能参与调控 HL-60/ATRA 继发多药耐药长生的基因进行一次横向、大范围的筛选,用抑制消减杂交方法建立 HL-60/ATRA 的消减文库,并挑选出了 12 个在 HL-60/ATRA 曾高强度差异表达的基因克隆进行序列测定,发现克隆号为 117 的序列是未知序列,在 GenBank 中登录(登录号 CB214920),本课题组将其命名为 HA117。通过 cDNA 末端快速扩增(RACE)技术,成功克隆了本课题组发现的新基因 HA117 的 cDNA 全长并采用重组腺病毒和



A:HEK293 细胞核染色结果 B:HEK293 细胞蛋白表达情况 C:转染 HA117 基因的 HEK293 细胞核染色结果 D:转染 HA117 基因的 HEK293 细胞蛋白表达情况

图5 免疫荧光检测 HA117 多克隆抗体特异性 (荧光显微镜×200)

RNA干扰技术初步证实,ATRA使用后能诱导新基因HA117高表达,ATRA引起肿瘤细胞株多药耐药性产生与HA117基因有关,初步证实其耐药机制有别于经典的多药耐药基因(MDR1)途径[8-9,13]。该新基因的发现为揭示ATRA诱导瘤细胞产生多药耐药的分子机制提供了实验依据。

为进一步研究HA117基因多药耐药功能以及HA117编码蛋白在正常组织和肿瘤组织的表达水平,特别是白血病细胞中的表达水平,为白血病及实体肿瘤选择敏感化疗药物提供依据,本课题组在前期研究成果的前提下,制备了HA117多克隆抗体。多克隆抗体具有简单、快速、效果好的优点。本研究制备HA117多克隆抗体,用间接ELISA检测其效价,结果显示效价高达1∶729 000,完全可以达到检测抗原的目的。我们将携带HA117基因的重组腺病毒转染HA117细胞,转染率高达57.96%,已经达到可以检测的要求。细胞免疫荧光法检测显示,携带HA117基因腺病毒转染的HEK293细胞相对未转染的细胞,有明显的较强的荧光显示,说明制备的HA117多克隆抗体有特异性识别HA117表达蛋白的能力,可以在以后用于检测白血病及各种实体肿瘤及正常组织中HA117编码蛋白的表达水平。提取转染前后的HEK293细胞蛋白,Western blot法检测发现实验组在目的位置有明显条带,而对照组未见条带。说明制备的多克隆抗体可以检测到过表达的HA117编码蛋白,并可以和它特异性结合,说明可以定量检测白血病及各种实体肿瘤中HA117编码蛋白。

由抗原-抗体相互作用的一系列技术,如免疫组织化学、Western blot检测等方法在蛋白质的检测和功能研究中都有着广泛的作用。本研究制备的HA117多克隆抗体,具有效价高和特异性良好的特点,可用于Western blot检测及免疫组织化学的研究,为继续深入研究HA117编码蛋白的组织分布表达水平奠定了良好的基础。

参考文献:

[1] Huang M E, Ye Y C, Chen S R, *et al*. Use of all-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia[J]. Blood, 1988, 72(2):567-572.

[2] Tomiyama N, Matzno S, Kitada C, *et al*. The possibility of simvastatin as a chemotherapeutic agent for all-trans retinoic acid-resistant promyelocytic leukemia[J]. Biol Pharm Bull, 2008, 31(3):369-374.

[3] Aribi A, Kantarjian H M, Estey E H, *et al*. Combination therapy with arsenic trioxide, all-trans retinoic acid, and gemtuzumab ozogamicin in recurrent acute promyelocytic leukemia[J]. Cancer, 2007, 109(7):1355-1359.

[4] Warrell R P Jr, Frankel S R, Miller W H Jr, *et al*. Differentiation therapy of acute promyelocytic leukemia with tretinoin (all-trans-retinoic acid)[J]. N Engl J Med, 1991, 324(20):1385-1393.

[5] 郑改焕, 金先庆, 罗庆, 等. 新基因HA117最佳siRNA的筛选及重组腺病毒构建[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(7):641-643.

[6] Zheng G H, Fu J R, Xu Y H, *et al*. Screening and cloning of multidrug resistant genes in HL-60/MDR cells[J]. Leuk Res, 2009, 33(8):1120-1123.

[7] 郑改焕, 金先庆, 郭玉霞, 等. 新基因HA117在淋巴瘤细胞中的耐药相关功能研究[J]. 肿瘤, 2009, 29(4):315-318.

[8] 车艳, 徐西华, 郑改焕, 等. 新基因HA117在儿童急性白血病中的表达及其临床意义[J]. 四川大学学报:医学版, 2009, 40(5):873-876.

[9] Guo Y, Zheng G, Jin X, *et al*. HA117 gene increased the multidrug resistance of K562 cells in vitro: an investigation to the function of a novel gene related to drug resistance[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2009, 28:63.

[10] Zhao L, Jin X, Xu Y, *et al*. Functional study of the novel multidrug resistance gene HA117 and its comparison to multidrug resistance gene 1[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2010, 29:98.

[11] 郭玉霞, 金先庆, 罗庆, 等. 腺病毒介导的新基因HA117对Jurkat细胞多药耐药功能的影响[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(16):1556-1558.

[12] 蒋朋飞, 曹金锁, 柳超, 等. 猪新基因BCL-G_L的克隆与原核表达及其多克隆抗体的制备[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2010, 26(12):1238-1240, 1245.

[13] 张迎春, 蒋磊, 魏玲, 等. 人CTCF N端融合蛋白的表达、抗体制备及鉴定[J]. 生物医学工程学杂志, 2010, 27(2):379-383.

[14] 朱继. 大鼠神经球蛋白的原核表达及多克隆抗体制备[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(4):326-328.

[15] King M E, Rowe J M. Recent developments in acute myelogenous leukemia therapy[J]. Oncologist, 2007, 12(Suppl 2):14 21.

[16] Stavrovskaya A A. Cellular mechanisms of multidrug resistance of tumor cells[J]. Biochemistry (Mosc), 2000, 65(1):95-106.

[17] Trock B J, Leonessa F, Clarke R. Multidrug resistance in breast cancer: a meta-analysis of MDR1/gp170 expression and its possible functional significance[J]. J Natl Cancer Inst, 1997, 89(13):917-931.

[18] Bellos F, Mahlknecht U. Valproic acid and all-trans retinoic acid: meta-analysis of a palliative treatment regimen in AML and MDS patients[J]. Onkologie, 2008, 31(11):629-633.

[19] Tabe Y, Konopleva M, Contractor R, *et al*. Up-regulation of MDR1 and induction of doxorubicin resistance by histone deacetylase inhibitor depsipeptide (FK228) and ATRA in acute promyelocytic leukemia cells[J]. Blood, 2006, 107(4):1546-1554.

[20] 李成荣, 付劲蓉. 维甲酸导致多药耐药的机制初探[J]. 中华肿瘤杂志, 2001, 23(6):441-443.

(收稿 2010-10-29 修回 2011-01-05)

(编辑 龙 亮)