

• 基础实验研究论著 •

兔抗人 KiSS-1 抗体的制备与鉴定

刘晓峰, 陈雪礼, 涂 艳

(九江市第一人民医院/南昌大学附属九江医院检验科, 江西九江 332000)

摘 要:目的 制备兔抗人 KiSS-1 多克隆抗体。方法 聚合酶链反应(PCR)法扩增出 KiSS-1 基因, 将其克隆入原核表达载体 pET28 中, 转化大肠埃希菌 BL21(DE3)。采用异丙基-D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导重组蛋白的表达, 采用镍离子螯合琼脂糖凝胶(Ni^{2+} -NTA)亲和层析法纯化重组蛋白, 以之为免疫原免疫家兔, 制备多克隆抗体, 并用酶联免疫吸附测定(ELISA)、Western blot 及免疫组织化学法检测抗体。结果 成功构建了 KiSS-1 原核表达载体 pET28/ KiSS-1, 高效表达并纯化 KiSS-1 蛋白, 间接 ELISA 检测所制备抗体的效价为 1 : 6 400。Western blot 鉴定制备的抗体与 KiSS-1 蛋白能特异性结合, 免疫组织化学法检测结果表明该抗体识别人卵巢癌组织中的天然 KiSS-1。结论 成功制备了效价高、特异性较强的兔抗人 KiSS-1 抗体, 为进一步探讨 KiSS-1 在卵巢癌的发生、发展过程中的作用奠定了基础。

关键词:卵巢癌; 抗体; 制备; 基因, KiSS-1

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.21.007

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)21-2803-03

Preparation and identification of rabbit anti-human KiSS-1 antibody

Liu Xiaofeng, Chen Xueli, Tu Yan

(Department of Clinical Laboratory, the First People's Hospital of Jiujiang/Jiujiang Hospital
Affiliated to Nanchang University, Jiujiang, Jiangxi 332000, China)

Abstract: Objective To prepare rabbit anti-human KiSS-1 polyclonal antibody. **Methods** Polymerase chain reaction(PCR) was employed to amplified KiSS-1 gene fragments and cloned into prokaryotic expression vector pET28 and transformed into *E. coli* BL21 (DE3). Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside(IPTG) was used to induce the recombinant protein expression, nickel-chelating agarose gel(Ni^{2+} -NTA) affinity chromatography was employed to purified the recombinant protein which served as immunogen to immunize the rabbit. The polyclonal antibody was prepared and enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA), Western blot and immunohistochemical were adopted to detect the antibody. **Results** The recombinant KiSS-1 prokaryotic expression vector pET28/ KiSS-1 was successfully constructed and KiSS-1 protein was expressed and purified efficiently. The prepared antibody titer was 1 : 6 400 by indirect ELISA detection. Western blot analysis showed that the prepared antibody combined specifically with KiSS- protein. Immunohistochemistry assay showed that the antibody recognized natural KiSS-1 in human ovarian cancer tissue. **Conclusion** Rabbit anti-human KiSS-1 polyclonal antibody with high titer and specificity has been prepared successfully which lay the foundation for further research on role of KiSS in the occurrence, development of ovarian cancer.

Key words: ovarian cancer; antibodies; preparation; gene, KiSS-1

卵巢癌的发病率居妇科恶性肿瘤的第 3 位, 低于宫颈癌和子宫内膜癌, 但其病死率却超过宫颈癌及子宫内膜癌之和, 高居妇科癌症首位, 是严重威胁妇女健康的疾患。卵巢恶性肿瘤患者早期没有症状, 不易发现, 就诊时多为中、晚期, 5 年生存率很低。卵巢癌的浸润和转移机制的研究, 已成为研究的热点。近年来研究发现, KiSS-1 缺失表达与胃癌、胰腺癌、甲状腺癌、膀胱癌、卵巢癌等多种恶性肿瘤的侵袭、转移密切相关。卵巢癌组织 KiSS-1 mRNA 呈低表达, 并且与临床分期、组织分型及淋巴转移有密切关系^[1]。卵巢癌中 KiSS-1 表达的临床意义及其相关性的研究少见报道^[2]。笔者通过利用基因工程技术对人 KiSS-1 基因进行克隆, 表达其重组蛋白, 制备其特异性抗体, 提出了用酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)方法检测和评估卵巢癌患者血清 KiSS-1 抗体的效价, 为深入研究 KiSS-1 基因的表达与卵巢癌侵袭、转移及预后的关系奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与方法 卵巢癌组织来自江西省九江市第一人民医院妇科。大肠埃希菌 DH5 α 、大肠埃希菌 DL21(DE3)为本室保

存。雄性新西兰大白兔由南昌大学医学院实验动物中心提供。克隆载体 pGEM-T、反转录试剂盒为 Takara 公司产品。RNA 提取试剂、表达载体 pET28 和镍离子螯合琼脂糖(Ni^{2+} -NTA)凝胶为 Invitrogen 公司产品。Taq 酶和限制性内切酶为 Takara 公司产品。PCR 产物回收、质粒纯化试剂盒为 Takara 公司产品。异丙基-D-硫代半乳糖苷(isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside, IPTG)及二氨基联苯胺(3, 3'-diaminobenzidine, DAB)购自上海生物工程有限公司。辣根过氧化物酶(horse-radish peroxidase, HRP)标记的羊抗兔 IgG 为 Sigma 公司产品。聚偏氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜为美国 Milipore 公司产品。常规试剂为国产分析纯。聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)引物合成及 DNA 序列测定由上海生物工程公司完成。

1.2 方法

1.2.1 RT-PCR 扩增目的片段 KiSS-1 基因 (1)将离体 30 min 内的卵巢癌组织剪成拇指甲大小, 抽提卵巢癌组织总 RNA 及反转录。(2)PCR 扩增目的片段 KiSS-1 基因, 根据 GenBank 中 KiSS-1 cDNA 序列, 设计一对特异引物, 引物 1 上

游:5'-GGC CGG CCA GGA TCC ATG AAC CAC TGG-3';引物 2 下游:5'-GCT CGA AGA CTC GAG TCA CTG CCC-3'。PCR 反应条件:94 ℃ 预变性 5 min 后,进入 PCR 循环;KiSS-1 反应条件为:94 ℃ 变性 45 s,57 ℃ 退火 45 s,72 ℃ 延伸 45 s,共 30 个循环;用焦碳酸二乙酯(diethylpyrocarbonate,DEPC)水代替 cDNA 作为阴性对照。PCR 产物经 10 g/L 的琼脂糖凝胶电泳分析并回收纯化。(3)将纯化的 PCR 产物与 pGEM-T 载体连接,转化大肠埃希菌 DH5 α 感受态宿主菌。转化菌液涂布于含氨苄青霉素、X-gal 和 IPTG 的 LB 琼脂培养板上,37 ℃ 培养过夜,从平板上挑取若干单克隆菌落接种至含有相应抗性的液体 LB 培养基中培养,用质粒小提试剂盒提取质粒,利用引入目的基因片段两端的限制性酶切位点进行双酶切鉴定,经琼脂糖凝胶电泳分离后获得相对分子质量大小相同的片段,将阳性克隆的质粒进行 DNA 测序,测序结果与 GenBank 中的 DNA 序列进行同源性比对,将质粒命名为 pGEM-T/KiSS-1。

1.2.2 原核表达载体的构建 用 *Nco* I 和 *Xho* I 对 pGEM-T/KiSS-1 质粒双酶切后,插入 pET28 载体,转化 DH5 α 感受态宿主菌,37 ℃ 培养过夜。从生长的单克隆菌落中挑取若干,接种到相应抗性的 LB 培养基中放置 37 ℃ 恒温摇床振荡培养过夜。次日收集菌液提取质粒,筛选阳性表达克隆,进一步用 PCR 和测序进行鉴定,命名为 pET28/KiSS-1。

1.2.3 KiSS-1 在大肠埃希菌中的表达 将经 PCR 筛选及测序鉴定的 pET28/KiSS-1 质粒转化大肠埃希菌 BL21(DE3),37 ℃ 恒温摇床振荡培养过夜,1:100 的比例接种到 LB 液体培养基(含 50 mg/L 卡那霉素)中,培养至菌液的波长 600 nm 处吸光度(absorbance, A)值到 0.5 时,加入 IPTG(终浓度为 1 mmol/L),37 ℃ 诱导表达 6 h,4 ℃ 离心收集菌体,菌体用磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffered solution,PBS)重悬,冰浴超声破碎后,分别取细菌裂解上清液、沉淀及菌总蛋白进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)分析,未经诱导的重组菌为对照。

1.2.4 重组 KiSS-1 蛋白的纯化 采用 Ni²⁺-NTA 凝胶亲和层析法纯化重组蛋白。将 pET28/KiSS-1 质粒的阳性克隆接种至 500 mL LB 液体培养基中进行诱导表达,离心收集细菌,沉淀用 50 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0)洗涤,重复洗 2 次,加入溶菌酶和 DNase I 后,置冰浴中超声破菌,15 000 $\times$ g 离心收集沉淀,洗涤后,离心获取沉淀,溶于 10 mL 裂解缓冲液(8 mol/L 尿素,20 mmol/L 磷酸盐缓冲液,pH 7.8)中,上样至 Ni²⁺-NTA 凝胶柱,洗脱目的蛋白。

1.2.5 多克隆抗体的制备及鉴定 取体质量 3 kg 的雄性新西兰兔 4 只,免疫前 2 天耳缘静脉取血分离血清作为阴性对照。用完全弗氏佐剂乳化重组蛋白,浓度为 1 g/L 免疫家兔。免疫完毕,经颈总动脉插管放血,离心收集血清。用间接 ELISA 法检测抗体效价,用 Western blot 对抗体特异性进行鉴定^[3]。对抗体的活性和特异性作进一步的分析,用小鼠肠组织作免疫组织化学检测,多克隆抗体按 1:300 稀释,采用 DAB 显色,以正常家兔血清作对照。

2 结 果

2.1 KiSS-1 编码区基因的扩增 1 g/L 琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 扩增产物显示,在 450 bp 上方附近有一条特异条带,与预期的目的片段大小相符,经测序鉴定,得到 KiSS-1 基因片段为 452 bp,碱基序无突变,阅读框正确,阳性克隆命名为 pGEM-T/KiSS-1,见图 1。

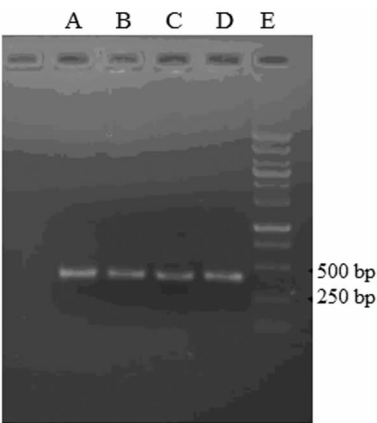


图 1 琼脂糖凝胶电泳分析 KiSS-1 PCR 扩增产物

2.2 表达载体的构建与鉴定 表达载体质粒 pET28 和克隆质粒 pGEM-T/KiSS-1 经 *Nco* I 和 *Xho* I 双酶切后,分别回收目的片段,用连接酶连接后,构建表达载体 pET28/KiSS-1。经 DNA 测序,证实目的片段大小为 452 bp 的 KiSS-1 编码区基因片段正确插入了 pET28,可用于下一步的诱导表达。

2.3 重组蛋白的诱导表达、纯化与鉴定 最佳诱导条件确定为:在 28 ℃ 条件下加入的 IPTG 终浓度应为 0.5 mmol/L,最佳诱导时间为 5 h。诱导表达的 KiSS-1 融合蛋白 SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定结果见图 2。在相对分子质量约 52 000 处有一条高表达的外源蛋白条带,与预测目的蛋白的相对分子质量相吻合,从 500 mL 细菌培养液中纯化得到约 3 mg 蛋白,经凝胶扫描分析显示,所得的蛋白纯度为 93%,纯度较高。

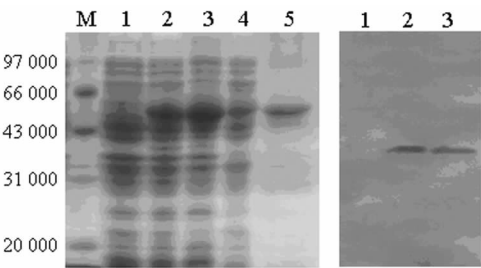


图 2 KiSS-1 重组蛋白的 SDS-PAGE(左图)和抗体特异性的 Western blot 鉴定分析(右图)

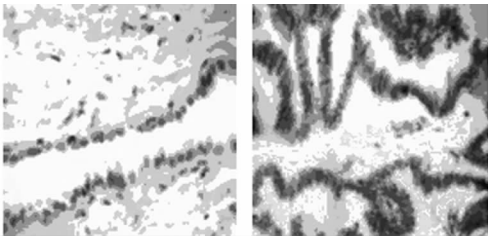


图 3 兔抗人 KiSS-1 抗血清特异性的免疫组织化学分析

2.4 抗血清的效价及特异性的鉴定 利用纯化的 KiSS-1 蛋白为抗原免疫家兔,获得兔抗人 KiSS-1 抗体,ELISA 检测抗体效价为 1:6 400。以制备的兔抗人 KiSS-1 血清作为一抗,进行 Western blot 检测,结果显示,诱导表达菌蛋白及纯化蛋白出现了特异反应条带,而在未加诱导剂的菌体蛋白中未见有反应条带,表明所制备的抗体与 KiSS-1 蛋白特异性结合。应用所制备的抗体检测人卵巢癌组织石蜡切片,免疫组织化学染色结果显示,制备的抗体作为一抗有明显的阳性着色,每批染色均用已知阳性切片做阳性对照,PBS 代替一抗作为阴性对照,以细胞质或细胞核内出现棕黄色颗粒为阳性细胞。而应用正

常家兔血清为一抗则无阳性着色,见图 3,说明所制备的兔抗人 KiSS-1 抗体可特异性识别天然状态下的 KiSS-1 分子,抗体具有高特异性及良好的活性。

3 讨 论

卵巢癌在妇科恶性肿瘤中的病死率居首位,尽管目前手术、化疗和放疗技术不断改进,但 5 年生存率仍无明显提高。若能提高早期卵巢癌的诊断率,即可明显提高卵巢癌的总体治疗效果。因此,目前国内、外许多有关肿瘤标记物,免疫组织化学水平,基因水平的癌基因与抑癌基因的研究正在进行^[4]。

本实验采用手术切除的卵巢癌组织提取总 RNA,所用组织选择合理,用 RT-PCR 技术扩增出 452 bp 的 KiSS-1 编码区基因片段,序列与 GenBank 上登录序列完全一致。为便于纯化,本实验选用了含 6×His 的 pET28 载体。通过 Ni²⁺-NTA 凝胶亲和层析,获得纯化的目的蛋白,经凝胶扫描分析显示,所得的蛋白纯度为 93%,纯度较高,能用于进一步的相关研究工作。

KiSS-1 蛋白可与 Src 癌蛋白结合,从而抑制肿瘤转移。KiSS-1 基因还可与 GPR54 结合,激活 PLC,PLC 的激活引起细胞内钙离子的增加从而抑制肿瘤细胞增生,诱导肿瘤细胞分化和凋亡^[5]。国内、外研究发现, KiSS-1 的缺失是淋巴结转移的重要指标^[6-9]。目前,有多种学说可以解释 KiSS-1 抑制肿瘤转移的现象,但更多学者认为 KiSS-1 可能对基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)-9 的表达存在着明显的负调控作用,后者可以降解细胞外基质和基底膜上的胶原、层黏连蛋白和纤维结合蛋白等主要结构。但在卵巢癌发生、发展中 KiSS-1 基因的表达机制还未阐明,因此,深入研究 KiSS-1 基因的表达与卵巢癌的侵袭、转移及预后的关系具有重要意义。

肿瘤的发生、发展是多基因、多因素的综合作用,而每种基因在肿瘤中的作用表型亦受多个因素的调控,从而表现出组织特异性。目前研究认为, KiSS-1 基因的表达缺失与 6q16-q23 区杂合性缺失(LOH)有关^[10],该项检测在临床上的研究也还未广泛展开。因此,笔者下一步的研究工作,一方面着手构建 KiSS-1 真核表达质粒,将质粒转染至卵巢癌细胞株,探讨 KiSS-1 基因在卵巢癌发生、发展和淋巴结转移中的机制;另一

方面利用已经制备的抗人 KiSS-1 抗体,为进一步建立 KiSS-1 的 ELISA 检测方法奠定了坚实的基础,为卵巢癌的免疫学诊断提供理论依据。

参考文献

- [1] Jemal A, Murray T, Ward E, et al. Cancer Statistics, 2005[J]. CA Cancer J Clin, 2005, 55(1): 10-30.
- [2] Schmid K, Wang X, Haitel A, et al. KISS-1 overexpression as an independent prognostic marker in hepatocellular carcinoma: an immunohistochemical study[J]. Virchows Arch, 2007, 450(2): 143-149.
- [3] 陈章权, 何素辉, 陆田田, 等. 兔抗人肥大细胞羧肽酶抗体的制备与鉴定[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2007, 23(9): 859-861.
- [4] Lee JH, Miele ME, Hicks DJ, et al. KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene [J]. J Natl Cancer Inst, 1996, 88(23): 1731-1737.
- [5] Young LS, Searle PF, Onion D, et al. Viral gene therapy strategies: from basic science to clinical application[J]. J Pathol, 2006, 208(2): 299-318.
- [6] Dhar DK, Naora H, Kubota H, et al. Downregulation of KISS-1 expression is responsible for tumor invasion and worse prognosis in gastric carcinoma[J]. Int J Cancer, 2007, 111(6): 868-872.
- [7] 王春晖, 乔宪, 戴显伟, 等. 人胰腺癌 KiSS-1 基因 mRNA 表达及其临床意义[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2006, 13(3): 207-210.
- [8] Sanchez-Carbayo M, Capodiceci P, Cordon-Cardo C. Tumor suppressor role of KiSS-1 in bladder cancer; loss of KiSS-1 expression is associated with bladder cancer progression and clinical outcome [J]. Am J Pathol, 2003, 162(2): 609-617.
- [9] 崔国忠, 张志刚, 戴殿禄, 等. KiSS-1 MMP-9 在乳腺癌组织中的表达及临床意义[J]. 中国肿瘤杂志, 2008, 35(18): 1054-1056.
- [10] Ohtaki T, Shintani Y, Honda S, et al. Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor[J]. Nature, 2001, 411(6837): 613-617.

(收稿日期: 2013-07-20)

(上接第 2802 页)

- [5] 窦德强, 靳玲, 陈英杰. 人参的化学成分及药理活性的研究进展与展望[J]. 沈阳药科大学学报, 1999, 16(2): 151.
- [6] 程慧, 宋新波, 张丽娟. 人参皂苷 Rg3 与 Rh2 的研究进展[J]. 药物评价研究, 2010, 33(4): 307-311.
- [7] Yun TK, Lee YS, Lee YH, et al. Anticarcinogenic effect of Panax ginseng C. A. Meyer and identification of active compounds [J]. J Korean Med Sci, 2001, 16 Suppl: S6-18.
- [8] 张晓平, 马大龙, 陈新梅. 人参皂苷 Rg3 抗肿瘤及其作用机制研究进展[J]. 中国执业药师, 2012, 9(11): 52-56.
- [9] 张翔, 叶宝东, 陈丹, 等. 人参皂苷 Rg3 抗肿瘤机制研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2013, 31(2): 328-330.
- [10] 熊明华. 人参皂苷 Rg3 对人宫颈癌 Hela 细胞凋亡及 Bcl-2/bax 基因 mRNA 表达的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2012, 22(3): 34-36.
- [11] 罗涛, 石孟琼, 刘雄, 等. 薤白总皂苷对人宫颈癌 HeLa 细胞增殖

- 与凋亡作用的影响[J]. 疑难病杂志, 2012, 11(10): 762-765.
- [12] 牛珂, 鲁永鲜, 李宁, 等. 人参皂苷 Rg3 对人宫颈癌 Hela 细胞的诱导凋亡作用[J]. 现代肿瘤医学, 2012, 20(7): 1345-1347.
- [13] He BC, Gao JL, Luo X, et al. Ginsenoside Rg3 inhibits colorectal tumor growth through the down-regulation of Wnt/ β -catenin signaling[J]. Int J Oncol, 2011, 38(2): 437-445.
- [14] Kim BJ, Nah SY, Jeon JH, et al. Transient receptor potential melastatin 7 channels are involved in ginsenoside Rg3-induced apoptosis in gastric Cancer cells[J]. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2011, 109(4): 233-239.
- [15] Chwikowska A, Kulbacka J, Saczko J. Death of tumor cells. Photodynamic reaction in apoptosis induction in cancer cells[J]. Pol Merkur Lekarski, 2011, 30(175): 45-48.

(收稿日期: 2013-05-24)