

· 论 著 ·

人类肿瘤相关蛋白 hyrdC 的原核表达、抗体制备及其在胃癌中的初步检测

唐晓军^{1*}, 毕建威¹, 黄盛东², 龚德军², 袁 扬²

(1. 第二军医大学长海医院普通外科, 上海 200433; 2. 长海医院胸心外科)

[摘要] **目的:** 制备原核表达的 hyrdC 纯化蛋白及相应单克隆抗体, 并以该抗体初步检测胃癌中 hyrdC 蛋白的表达。 **方法:** 用 RT-PCR 方法获取人 hyrdC 基因序列, 插入原核表达载体 pET32a 构建重组质粒, 纯化得到 TRX-hyrdC 融合蛋白, 将其作为抗原免疫 BALB/c 小鼠, 按常规方法制备抗 hyrdC 单克隆抗体, 以 ELISA、Western 印迹法筛选及鉴定; 采用免疫组织化学法 (SP 法) 比较胃癌组织及瘤旁正常组织中 hyrdC 抗体水平的差异。 **结果:** 测序结果显示克隆的 hyrdC ORF 与 GenBank 中登录的序列一致。所获 TRX-hyrdC 融合蛋白相对分子质量与理论计算值相符, 获得 2 株分泌抗 hyrdC 单克隆抗体的细胞株; Western 印迹法显示该抗体能特异性地结合人 hyrdC 蛋白; SP 法测定显示, hyrdC 蛋白在胃癌组织中表达明显高于正常胃组织 ($P < 0.001$)。 **结论:** 成功制备了抗 hyrdC 单克隆抗体; SP 法测定胃癌组织与瘤旁正常组织中 hyrdC 抗体水平有显著差异。

[关键词] hyrdC; 单克隆抗体; 免疫组织化学; 胃肿瘤

[中图分类号] R 735.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)06-0620-04

Human tumor-related protein hyrdC: prokaryotic expression, antibody preparation and its preliminary detection in gastric cancer

TANG Xiao-jun^{1*}, BI Jian-wei¹, HUANG Sheng-dong², GONG De-jun², YUAN Yang² (1. Department of General Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Cardiothoracic Surgery, Changhai Hospital)

[ABSTRACT] **Objective:** To prepare pure prokaryotically expressed protein of hyrdC and the monoclonal antibody against hyrdC, and to detect the hyrdC protein in gastric cancer with the prepared monoclonal antibody. **Methods:** The target DNA sequence of hyrdC was obtained by RT-PCR and subsequently inserted into prokaryotic expression vector pET32a. The TRX-hyrdC fusion protein was purified and was used to immunize 6-week-old BALB/c female mice to prepare monoclonal antibodies. The supernants of hybridoma cells were screened by enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) and identified by Western blot. The prepared monoclonal antibody was used to detect the expression of hyrdC protein in gastric cancer and adjacent normal tissues by immunohistochemical method (SP). **Results:** The sequence of hyrdC ORF was conformed to the reported in GenBank. Two lines of hybrids secreting monoclonal antibodies against hyrdC were established, both belonging to IgG2a subtype. Western blot showed that the prepared monoclonal antibodies specifically combined with human hyrdC protein. Immunohistochemistry (SP) results showed that the expression of hyrdC protein in gastric cancer was significantly higher than that in normal gastric mucous membrane ($P < 0.001$). **Conclusion:** The monoclonal antibody against hyrdC has been successfully obtained. There are significant differences in the expression of hyrdC between the gastric tumor tissues and normal tissues.

[KEY WORDS] hyrdC; monoclonal antibody; immunohistochemistry; stomach neoplasms

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(6): 620-623]

人类视网膜母细胞瘤 (retinoblastoma, RB) 基因是最早发现的肿瘤抑制基因, RB 基因的失活或缺失会导致视网膜瘤或骨肉瘤等多种人类肿瘤形成^[1,2]。视网膜母细胞瘤结合蛋白 10 (retinoblastoma binding protein, RBBP10) 是克隆到的一个新的基因, 已经证实该基因在部分人类肿瘤高表达^[3,4]。在研究 RBBP10 相关蛋白的前期过程中, 本研究组和复旦大学遗传所协作, 利用酵母双杂交技术克隆到一条新基因——hyrdC, 其表达的蛋白与 RBBP10 蛋白相互作用, 并且与肿瘤相关, 通过基因芯片和 RT-PCR 初步证实了其在胃肠肿瘤中特异性高表

达。但它在肿瘤组织中的蛋白表达是否具有诊断价值, 目前罕见研究报道。本研究通过 hyrdC 原核表达和目的蛋白纯化, 并制备鼠抗单克隆抗体, 对胃癌组织及瘤旁正常组织中 hyrdC 蛋白表达水平进行研究, 初步探讨其在胃癌中的临床意义。

[基金项目] 国家自然科学基金 (30371403). Supported by General Program of National Natural Science Foundation of China (30371403)

[作者简介] 唐晓军, 硕士, 主治医师。

* Corresponding author. E-mail: txj9743@163.com

1 材料和方法

1.1 研究对象 收集长海医院病理科 2001 年 1 月至 2004 年 1 月确诊的 79 例胃癌标本归档蜡块。男性 50 例,女性 29 例。平均年龄 45.96 岁(20~72 岁),病理类型均为腺癌,术前未行放疗和化疗,68 例用作正常对照的胃黏膜组织取自远离肿瘤组织 5 cm 以外部位(均经病理证实)。

1.2 主要试剂 逆转录试剂盒(Clontech 公司); pET32a 表达质粒(Novagen 公司); PCR 试剂(TaKaRa 公司); SP2/0 骨髓瘤细胞(复旦大学遗传所提供); 辣根过氧化物酶标记羊抗鼠 IgG(Calbiochem 公司); BALB/c 雌性小鼠 6 周龄(上海斯莱克实验动物有限公司)。

1.3 PCR 扩增引物 根据 GenBank hyrdC 基因序列(基因序列号:AY172561)设计引物(上海生工生物工程技术服务有限公司合成)正向引物:5'-CAG AAT TCA TGA GGC CAC TGT GCG TGA C-3', 反向引物:5'-GAA AGC TTT TAG TGG AAT GTT GGG GT-3'。

1.4 hyrdC 基因克隆 采用 TRIzol 法抽提人脾脏组织总 RNA,按 CloneTech 公司逆转录试剂盒说明书的操作步骤,合成、扩增目的 DNA 片段。

1.5 pET32a 重组表达载体的构建 将扩增获得 PCR 产物和原核表达载体 pET32a 用 *EcoR* I、*Hind* III 两种限制酶消化,经双酶切鉴定证实有相应大小的外源片段插入,挑阳性克隆抽提质粒作测序分析。

1.6 目的基因的诱导表达 重组质粒 pET32a. hyrdC 转化入大肠杆菌 BL21(DE3),IPTG 诱导表达,取上样液 SDS-PAGE 电泳,考马斯亮蓝 G-250 染色,观察蛋白条带。

1.7 蛋白纯化 离心收集 IPTG 诱导 4 h 的细菌,蛋白电泳确定目的蛋白。B-PER™ 抽提细菌蛋白,采用金属螯合亲和层析进行蛋白纯化。首先,次氨基三乙酸(NTA)与 Ni^{2+} 发生螯合作用,将金属离子牢固地结合在介质上。随后, Ni^{2+} 与重组 hyrdC 蛋白的 6×His tag 结合,将目的蛋白吸附在介质上。加入咪唑作为竞争试剂,洗脱 hyrdC 蛋白,SDS-PAGE 蛋白电泳鉴定蛋白纯度。

1.8 抗 hyrdC 单克隆抗体的制备及鉴定 抗原蛋白免疫 BALB/c 雌性小鼠、小鼠脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞融合、单克隆瘤株筛选以及抗体效价测定等均采用冷泉港实验室单克隆抗体制备方法^[5]进行。以分泌抗 hyrdC 抗体杂交瘤株细胞的培养上清

对表达的重组蛋白进行 Western 印迹检测。同时以该上清分别对人 hyrdC 蛋白及血清蛋白进行 ELISA 检测。

1.9 免疫组织化学染色对胃癌组织和正常胃黏膜中 hyrdC 蛋白分析 免疫组化染色按试剂盒说明进行,工作浓度 1:100,以 PBS 缓冲液替代一抗作为对照。hyrdC 染色阳性细胞为胞质呈棕黄色,以同一切片阳性细胞 <25% 为阴性,25%~50% 为阳性(+),51%~75% 为中等阳性(++) , ≥75% 为强阳性(+++)。

1.10 统计学处理 应用 SPSS 11.5 软件包,计数资料用 χ^2 检验;以 $P < 0.05$ 认为有显著性差异。

2 结果

2.1 hyrdC cDNA 的获取及序列测定 对 RT-PCR 扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳分析。可见在 840 bp 处有高度特异性的 DNA 条带(图 1);重组质粒(pET32a. hyrdC)经双酶切及测序(图 2),与 GenBank 报道一致。

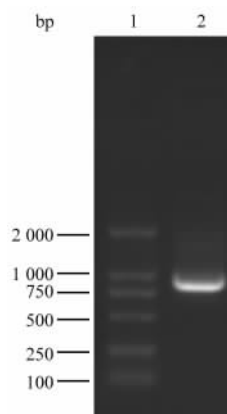


图 1 hyrdC 的 PCR 扩增

Fig 1 Proliferation of hyrdC cDNA by RT-PCR

1: DNA marker; 2: hyrdC ORF

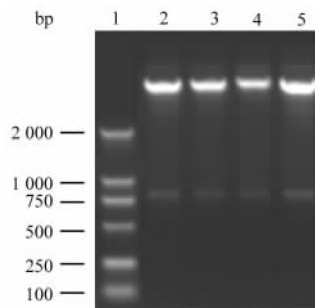


图 2 重组质粒 pET32a. hyrdC 的 *EcoR* I、*Hind* III 酶切鉴定

Fig 2 Identification of recombinant pET32a. hyrdC

1: DNA marker; 2-5: pET32a. hyrdC

2.2 hyrdC 目的蛋白表达及纯化 收获诱导表达 hyrdC 蛋白的细菌,对菌体蛋白进行 SDS-PAGE,可见相对分子质量 45 000 处有特异性的条带,与理论推算 TRX-hyrdC 融合蛋白相对分子质量值相符(hyrdC 蛋白约 31 000,载体所表达的 TRX 约 14 000)。表达量占细菌总蛋白 30%左右,经金属螯合柱纯化后目的蛋白纯度>90%(图 3)。

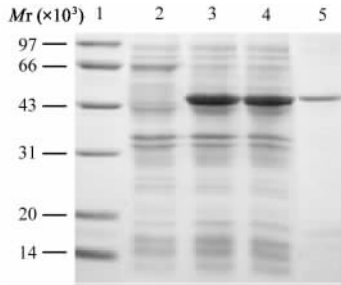


图 3 重组 hyrdC 蛋白电泳结果

Fig 3 SDS-PAGE of recombinant protein of hyrdC

1: Protein marker;2: Total cell protein of uninduced sample;3: Total cell protein of induced sample at 3 h;4: Total cell protein of induced sample at 4 h;5: Purified hyrdC protein

2.3 单克隆抗体的特异性 Western 印迹结果显示,目的蛋白在相对分子质量 45 000 处出现特异性显色条带(图 4)。ELISA 检测结果显示,所获目的

抗体能特异性结合天然 hyrdC 蛋白,而与人白蛋白不结合。

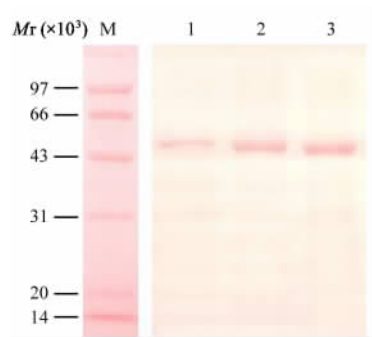


图 4 重组 hyrdC 蛋白 Western 印迹结果

Fig 4 Western blot of recombinant protein of hyrdC

M: Protein marker;1: Total cell protein of uninduced sample;2: Total cell protein of induced sample;3: Purified hyrdC protein

2.4 免疫组织化学染色结果 hyrdC 蛋白主要分布于胞质,68 例正常胃黏膜上皮内 hyrdC 蛋白的表达 24 例为阴性(-),38 例为阳性(+),6 例为中等阳性(++),无强阳性(图 5A、5B)。79 例胃癌组织中 3 例为阴性(-),9 例为阳性(+),29 例为中等强度阳性(++),38 例为强阳性(++)(图 5C、5D)。以(-)、(+)为低表达组,(++),(++)为高表达组进行比较,两者间差异有显著性($\chi^2=84.4059, P<0.001$)。

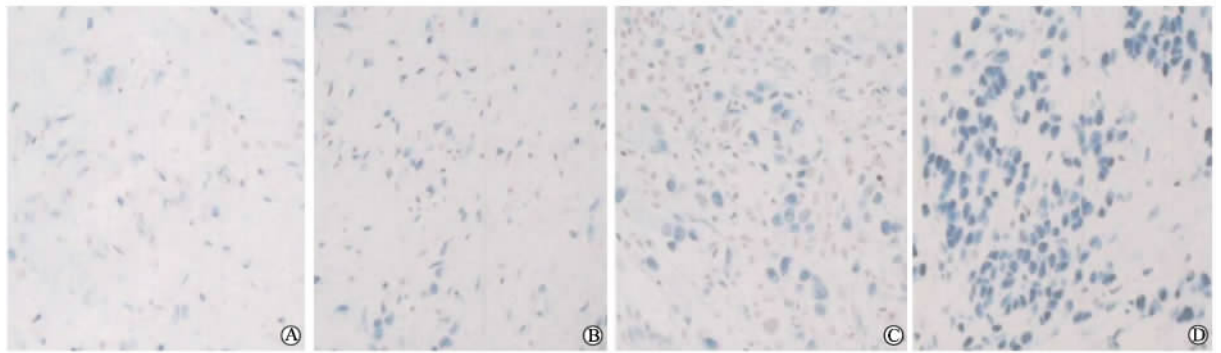


图 5 癌旁正常胃组织和胃癌组织中 hyrdC 的表达

Fig 5 Expression of hyrdC protein in normal gastric tissues and gastric cancer($\times 400$)

A: Negative expression of hyrdC protein in normal gastric tissues;B: Positive(+) expression of hyrdC protein in normal gastric tissues;C: Positive(++) expression of hyrdC protein in gastric cancer;D: Positive(+++) expression of hyrdC protein in gastric cancer

3 讨论

随着人类基因组计划的开展,一些肿瘤相关基因的表达蛋白被作为肿瘤标志物用于临床诊断,而且对其功能研究有助于了解肿瘤的发生发展机制。通过杂交克隆获得的这一新的 hyrdC 基因,目前报

道甚少,研究发现该基因编码由 279 个氨基酸组成的开放读码框,全长 840 bp,位于人类染色体 1p34.2,跨度为 5.2 kb 基因序列,其中包含 5 个外显子和 4 个内含子,且外显子和内含子的界限遵循 AG-GT 原则^[6]。Teplova 等^[7]认为 hyrdC 基因在细菌到人类高度保守,在细菌和酵母中功能研究提

示其与核酸结合和蛋白质结合有关,突变后蛋白质合成下降。最近研究认为 hyrdC 蛋白与细胞内核糖体的发生有关,实验表明细胞内缺乏 hyrdC 基因,将引起 RNaseE、RNaseG 的活力下降,无法在 5' 末端对 16S rRNA 的前体即 17S rRNA 进行切割,导致 17S rRNA 的大量堆积,从而延缓 30S 小亚基的装配,影响核糖体的成熟^[8,9]。我们通过基因克隆、原核表达、分离纯化,已得到高纯度的 hyrdC 蛋白及相应的单克隆抗体,为进一步弄清这一基因及表达蛋白的功能和与肿瘤的发生、发展的相互关系奠定了实验基础。

Chen 等^[6]通过 Northern 印迹法、RT-PCR 研究表明人类 hyrdC 蛋白在人类组织中普遍存在,尤其在胃肠等消化道肿瘤组织中的转录量较高,提示了人类 hyrdC 可能是机体里的管家基因 (house-keeping gene),与基因转录及蛋白质合成有关。我们应用已建立的 SP 法对胃癌组织及癌旁正常组织中 hyrdC 抗体水平进行检测亦证实了其观点。初步结果显示,hyrdC 蛋白在正常胃组织中普遍存在,但大部分转录量较低,只有极少部分为中等程度阳性。而在胃癌细胞内转录量高,绝大部分表达中等程度以上阳性,明显高于正常胃组织。证实 hyrdC 与胃癌的发生有着密切的关系,hyrdC 与胃癌生物学行为的具体关系以及能否将这一新的技术过渡于临床应用,还有待于进一步扩大样本检测和在方法学质量控制上深入研究。

[参考文献]

- [1] Claudio PP, Tonini T, Giordano A. The retinoblastoma family: twins or distant cousins[J]? *Genome Biol*, 2002, 3: 3012.
- [2] Helt AM, Galloway DA. Mechanisms by which DNA tumor virus oncoproteins target the Rb family of pocket proteins[J]. *Carcinogenesis*, 2003, 24:159-169.
- [3] Classon M, Harlow E. The retinoblastoma tumour suppressor in development and cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2:910-917.
- [4] Chen JZ, Yang QS, Wang S, et al. Cloning and expression of a novel tinoblastoma binding protein cDNA, RBBP10[J]. *Biochem Genet*, 2002, 40(7-8):273-282.
- [5] Harlow E, David L. *Antibodies: a laboratory manual*[M]. New York: Cold Spring Harbor Lab Press, 1998:139-244.
- [6] Chen J, Ji C, Gu S, et al. Isolation and identification of a novel cDNA that encodes human hyrdC protein[J]. *J Hum Genet*, 2003, 48:164-169.
- [7] Teplova M, Tereshko V, Sanishvili R, et al. The structure of the yrdC gene product from *Escherichia coli* reveals a new fold and suggests a role in RNA binding [J]. *Protein Sci*, 2000, 9: 2557-2566.
- [8] Kaczanowska M, Ryden-Aulin M. The hyrdC protein-a putative ribosome maturation factor [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1727:87-96.
- [9] Kaczanowska M, Ryden-Aulin M. Temperature sensitivity caused by mutant release factor 1 is suppressed by mutations that affect 16S rRNA maturation [J]. *J Bacteriol*, 2004, 186: 3046-3055.

[收稿日期] 2006-02-27

[修回日期] 2006-04-29

[本文编辑] 曹 静

Efficient new method for extraction and isolation of three flavonoids from *Patrinia villosa* Juss. by supercritical fluid extraction and high-speed counter-current chromatography

Peng J, Fan G, Chai Y, Wu Y (Shanghai Key Laboratory for Pharmaceutical Metabolite Research, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] Supercritical fluid extraction (SFE) of orotinin, orotinin-5-methyl ether and licoagrochalcone B from *Patrinia villosa* was performed. The optimization of parameters including pressure, temperature, modifier and sample particle size on yield was carried out using an analytical-scale SFE system. The process was then scaled up by 100 times using a preparative SFE system under the optimized conditions of 25 MPa, 45 degrees C, a sample particle size 40-60 mesh and modified CO₂ with 20% methanol. The yield of the preparative SFE was 2.82% (crude extract I) and the combined yield of orotinin, orotinin-5-methyl ether and licoagrochalcone B was 0.82 mg/g of dry sample mass. Then the crude extract I was re-dissolved in methanol and methanol soluble fraction (crude extract II, 0.17%) was obtained, which was successfully isolated and separated by a preparative high-speed counter-current chromatography (HSCCC) with a two-phase solvent system composed of n-hexane-ethyl acetate-methanol-water (5:6:6:6, V/V/V/V) by increasing the flow-rate of the mobile phase stepwise from 1.0 to 2.0 ml/min after 3 h. The target compounds isolated and purified by HSCCC were analyzed by high performance liquid chromatography. The separation produced total of 38.2 mg of orotinin at 99.2% purity, 19.8 mg of orotinin-5-methyl ether at 98.5% purity and 21.5 mg of licoagrochalcone B at 97.6% purity from 400 mg of the crude extract in a one-step separation. The recoveries of orotinin, orotinin-5-methyl ether and licoagrochalcone B were 91.1, 91.6 and 90.3%, respectively, and the chemical structure identification was carried out by UV, IR, MS, ¹H NMR and ¹³C NMR.

[J Chromatogr A, 2006, 1102:44-50]