

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.01034

抗 PIWIL2 蛋白多克隆抗体的制备、鉴定及初步应用

朱风尚¹, 黄志刚¹, 胡 莺², 张小燕², 陈锡美¹, 孟 逊², 郜恒骏^{1,2*}

1. 同济大学附属同济医院消化内科, 上海 200065

2. 生物芯片上海国家工程研究中心, 上海 201203

[摘要] 目的: 制备兔抗人 PIWIL2(P-element-induced wimpy testis like 2, 或称 HIWI2) 的多克隆抗体, 并鉴定其特异性, 初步探讨其在人正常及肿瘤组织中的分布。方法: 人工合成特异性 PIWIL2 多肽, 以马来酰胺活化匙孔血蓝蛋白(Keyhole limpet hemocyanin, KLH) 为载体构建多肽免疫原, 致敏大白兔, 制备兔抗人 PIWIL2 多克隆抗体。亲和层析法纯化抗体, ELISA 和 Western 印迹鉴定特异性, 人组织芯片行 PIWIL2 的免疫组化研究。结果: 通过构建 PIWIL2 多肽-KLH 载体复合物致敏大白兔, 制备出兔抗人 PIWIL2 蛋白多克隆抗体。ELISA 及 Western 印迹证实兔抗人 PIWIL2 抗体可特异性识别 PIWIL2 多肽。人组织芯片免疫组化染色显示, PIWIL2 在肿瘤细胞的表达具有组织特异性, 大多数正常和癌组织的平滑肌细胞胞质中呈阳性染色。结论: 成功制备出兔抗人 PIWIL2 多克隆抗体, 为后续研究奠定了基础。

[关键词] PIWIL2 蛋白; 多克隆抗体; 组织芯片**[中图分类号]** R 349.83 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)09-1034-04

Preparation, identification and application of polyclonal antibodies against human PIWIL2 protein

ZHU Feng-shang¹, HUANG Zhi-gang¹, HU Ying², ZHANG Xiao-yan², CHEN Xi-mei¹, MENG Xun², GAO Heng-jun^{1,2*}

1. Department of Gastroenterology, Tongji Hospital, Tongji University, Shanghai 200065, China

2. National Engineering Center For BioChip in Shanghai, Shanghai 201203

[ABSTRACT] **Objective:** To prepare rabbit polyclonal antibody against human P-element-induced wimpy testis like 2 (HIWI2) protein, identify its properties and investigate its distribution in normal and tumor tissues by means of tissue chip. **Methods:** PIWIL2 peptide was synthesized chemically and conjugated to Keyhole limpet hemocyanin (KLH) as an immunogen. Then the PIWIL2-KLH conjugation was injected into rabbits subcutaneously to produce polyclonal antibodies. The specificity and sensitivity of antibodies were identified by ELISA and Western blotting after purification by affinity chromatography. PIWIL2 was then immuno-stained on the tissue chip to study its distribution in the normal and tumor tissues. **Results:** Rabbit's antibodies against human PIWIL2 were prepared after the injection of PIWIL2-KLH conjugation subcutaneously. These antibodies were identified as PIWIL2 peptides by ELISA and Western blotting assay. PIWIL2 protein expression was tissue-specific in tumor tissues, with PIWIL2 protein found in the cytoplasm of smooth muscle cells of most normal and tumor tissues. **Conclusion:** The polyclonal antibodies against human PIWIL2 protein have been successfully prepared, which provides a basis for further study on the role of PIWIL2 in the pathway of miRNA/RNA.

[KEY WORDS] PIWIL2 protein; polyclonal antibody; tissue chip

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(9):1034-1037]

随着小干扰 RNA (short interfering RNAs, siRNAs) 及微小 RNA (microRNAs, miRNA) 的发现, 人们逐渐认识到, RNA 调控基因表达的功能在生命过程中的扮演角色可能远比我们设想的要重

要。这些由 21~30 个核苷酸组成非编码的小 RNA 在染色体构建到干细胞分化、肿瘤发生中可能发挥着巨大的作用^[1]。RNA 诱导沉默复合体 (RNA-induced silencing complex, RISC) 是介导 miRNA 抑

[收稿日期] 2008-02-11 **[接受日期]** 2008-07-10**[基金项目]** 国家高技术研究发展计划("863"计划)(2002AA2Z2021). Supported by the National High Technology Research and Development Program of China("863" Program, 2002AA2Z2021).**[作者简介]** 朱风尚, 博士生, 主治医师. E-mail: zhufengshang@medmail.com.cn

* 通讯作者 (Corresponding author). Tel: 021-51320278, E-mail: hengjun-gao@shbiochip.com

制基因表达及 RNAi 效应的最为关键环节^[2]。而 Argonaute 蛋白家族 (proteins of the Argonaute family) 是 RISC 的主要组成成分,被认为是 miRNA/RNAi 的“效应器”^[3]。Argonaute 家族是一类相对分子质量约为 100 000 的序列高度保守的蛋白质,主要包含 PAZ (piwi-argonaute-zwille) 和 PIWI (P-element-induced wimpy testis) 2 个结构域。PAZ 和 PIWI 对于 siRNA 和目标 mRNA 相互作用是必不可少的,可导致目标 mRNA 的切割或者翻译抑制^[4-5]。研制其相关抗体,并对 Argonaute 家族的生化及遗传学性质进行研究,可能有利于揭示这些通路参与人类诸多疾病的基本生物学机制,故本研究制备人 Argonaute 家族中 PIWIL2 蛋白的特异性抗体,利用人组织芯片检测 PIWIL2 蛋白在人体部分正常和肿瘤组织中的分布,并初步探讨其在相关疾病发病中的作用。

1 材料和方法

1.1 主要材料及试剂 马来酰胺活化匙孔血蓝蛋白 (KLH 蛋白), SMCC, SulfoLink Coupling Gel 购自美国 Pierce 公司; 弗氏佐剂、四甲基联苯胺 (TMB) 为 Sigma 公司产品; P10 柱、550 酶标仪、422 型电洗脱装置为 Bio-Rad 公司产品; HRP 标记的抗兔 IgG 抗体购于 RockLand 公司; ECL 化学发光试剂盒购于 Amersham 公司。40 点人多种类型肿瘤和正常组织芯片由上海芯超生物科技有限公司提供。免疫用雄性新西兰大白兔, 体质量约 2.4 kg, 购自中国科学院上海实验动物中心。

1.2 PIWIL2 抗原表位分析 采用公共核酸与蛋白质序列数据库 (Ensembl 数据库) 及抗体设计筛查软件 (Dragonfly, USA) 选择 PIWIL2 蛋白特异的片段。

1.3 PIWIL2 多肽的合成、纯化和交联 PIWIL2 多肽片段由上海再创生物科技有限公司 (C-Strong 公司) 合成, 获得的多肽经常规 C₁₈ 的 RP-HPLC 柱进行纯化。PIWIL2 多肽与 KLH 偶联方法参照试剂盒实验步骤进行, 构建半抗原-载体偶联物。多肽与活化凝胶的连接步骤: 取 10 mg PIWIL2 多肽, 以连接缓冲液 2 ml (50 mmol/L Tris, 5 mmol/L EDTA, pH 8.5) 溶解后与 2 ml SulfoLink Coupling Gel 混合 30 min 后, 以封闭缓冲液 (50 mmol/L Cysteine, pH 8.5) 封闭 30 min。

1.4 兔抗 PIWIL2 多肽抗体的制备 按 100 μg 多肽/次剂量的多肽-KLH 偶联物与等量的弗氏佐剂

充分乳化后, 于兔背部皮下多点注射, 每隔 2 周背部皮下多点免疫 1 次, 共 4 次。其中, 首次采用完全弗氏佐剂乳化后免疫, 第 2~4 次采用不完全弗氏佐剂乳化后免疫。在第 8 周, 经耳缘静脉采血测定抗体的效价, 符合要求时, 立即颈动脉取血, 分离血清后, 无菌分装保存于 -20℃。

1.5 PIWIL2 多肽抗体的纯化 采用亲和层析法。抗血清以 40% 硫酸铵沉淀后, 经 PBS 透析, 与相应肽连接凝胶混合过夜 (4℃)。装入 P10 柱, 以 0.1 mol/L 甘氨酸溶液 (pH 3.0) 洗脱 2 次, 收集洗脱液, 用紫外分光光度计测光密度 (D_{280}) 值, 测定蛋白浓度, 纯化抗体再次 PBS 透析后, 4℃ 保存。用 12.5% 凝胶进行还原型电泳分析, 上样量为 5 μg, 行 SDS-PAGE 检测纯化后的抗体纯度。

1.6 抗血清特性的鉴定

1.6.1 抗血清效价和结合能力的检测 采用间接 ELISA 法。多肽偶联物以 0.5 μg/孔浓度包被 96 孔酶标板。每孔 100 μl, 4℃ 孵育过夜后, 用 10% 的牛血清封闭, 每孔 200 μl, 37℃ 2 h 后洗涤备用。抗体以封闭缓冲液稀释至 1 μg/ml, 再倍比稀释 9 个梯度, 以检测纯化抗体对相应多肽的结合能力。同时, 取出包被好的检测板, 每孔加入抗血清 100 μl (以 0.5 μg/ml 无关兔 IgG 作为阴性对照), 37℃ 孵育 30 min, 洗涤 3 次, 后每孔加入 1 : 5 000 稀释的 HRP 标记的羊抗兔 IgG 100 μl, 37℃ 孵育 15 min。洗涤 3 次后进行 TMB 显色, 37℃ 孵育 15 min, 终止反应后, 用酶标仪测定样品 D_{450} 。反应孔 D 值与阴性对照的 D 比值 ≥ 2 判为阳性, 以阳性最大稀释倍数作为抗血清的最终效价。

1.6.2 PIWIL2 多克隆抗体的检测 采用 Western 印迹法。提取宫颈癌 HeLa 细胞、转染腺病毒 E1A 基因的人肾上皮细胞 293 系和人红白血病 K562 细胞这 3 种细胞株的总蛋白。每样本 60 μg 蛋白上样, 进行 SDS-PAGE, 后经 160 mA 恒流转膜 60 min (0.4 μmol/L 硝酸纤维素膜)。用含 50 g/L 脱脂奶粉的 TBST 封闭液室温振荡封闭 2 h, 以 TBST 洗膜后, 依次滴加 1 : 500 的 PIWIL2 多克隆抗体血清, 4℃ 孵育过夜, 洗膜 4 次, 每次 10 min。1 : 2 000 的 HRP 标记的羊抗兔 IgG 室温振荡反应 45 min, 室温洗膜。用 ECL 化学发光试剂盒显色处理 5 min 后, 于暗室曝光到 X 线胶片上, 显影、定影。

1.6.3 多克隆抗体的组织芯片免疫组化染色 采

用 S-P 法进行免疫组化染色。采用 40 点消化组织芯片(上海芯超生物科技有限公司),滴加 5%BSA,室温下封闭 20 min,加入按 1:100 稀释的兔抗人 PIWIL2 多肽抗体,4℃ 孵育过夜。PBS 洗片后加入羊抗兔 IgG-HRP,37℃ 孵育 20 min,PBS 洗片后进行 DAB 显色,苏木精复染,返蓝后,脱水、透明、封片,镜检,放大 200 或 400 倍拍照记录结果。细胞质染色强度表示法为:淡黄+、黄(++)、棕黄(+++)

2 结 果

2.1 多肽序列选择 根据亲水性、柔韧性、抗原性及表面性 4 个参数预测的结果综合考虑 PIWIL2 多肽(相对分子质量 109 800)片段,确定其 345~356 位 12 个氨基酸作为拟合成的多肽(序列为:DPT-SAMVLQQHR)。并在 C 末端加上半胱氨酸用于肽片段与载体的连接。

2.2 PIWIL2 多肽抗原的合成与纯化 获得的多肽经质谱分析均与多肽的理论相对分子质量一致,HPLC 检测纯度 95% 以上,可以作为抗原免疫动物。

2.3 抗血清效价分析 ELISA 方法检测免疫两次后抗血清的效价以判断动物对多肽抗原的应答,并检测末次免疫后收获的抗血清的效价。结果,两次免疫后抗血清效价为 1:10 000,末次抗血清效价为 1:20 000,可检测多肽抗原最低限度为 8 ng/ml。

2.4 纯化抗体对相应多肽的结合能力 ELISA 法检测了纯化抗体对相应多肽的结合能力。结果表明经多肽偶联的凝胶亲和层析所纯化的抗体,在 9 个倍比稀释点(500~1.95 ng/ml),相应 D₄₅₀ 均较高(0.52~0.85),显示了较好的特异结合能力。

2.5 纯化抗体 SDS-PAGE 分析 12.5% 还原型电泳分析表明,主要蛋白条带在 50 000 位置,符合兔 IgG 的基本特征,同时抗体的纯度可达 80% 以上。

2.6 Western 印迹检测 PIWIL2 抗体特异性 3 株细胞总蛋白杂交阳性条带均约在相对分子质量 100 000 处,说明 PIWIL2 抗体特异性较强(图 1)。

2.7 组织芯片的免疫组织化学检测 在正常食管、胃黏膜组织中,本抗体对平滑肌细胞显示出明显的特异性,呈现不同程度的阳性染色。食管癌、胃癌肿瘤细胞上阴性表达,但在相应组织的平滑肌上仍有阳性表达;在听神经瘤、纤维脑膜瘤肿瘤细胞胞质内也呈明显阳性表达(图 2)。结果提示该多抗可能在某些肿

瘤细胞、平滑肌细胞的分化调控中起重要作用。

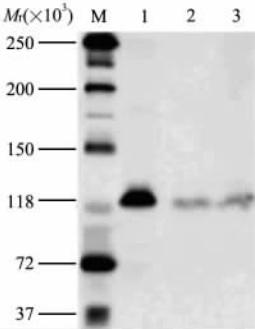


图 1 3 种细胞株 Western 印迹验证结果

Fig 1 Purified antibody was validated by Western blotting in different cell strains
M:Marker; 1:HeLa cell; 2:293 cell; 3:K562 cell

3 讨 论

miRNA 主要功能是调节生物体内在的与机体生长、发育、疾病发生过程有关的基因表达,而且这种小分子可能调节着人类 1/3 的基因^[6],与肿瘤的发生也关系密切^[7]。对作为 RISC“效应器”的 Argonaute 蛋白家族成员研究具有重要意义,尤其是对 PIWI 蛋白亚家族的研究渐成为热点^[8]。目前关于 PIWIL2 蛋白功能的研究很少。2004 年 Pillai 等^[9]发现 PIWIL2 可能与目标 mRNA 结合而抑制蛋白合成。PIWIL2(亦称 HIWI2 或 EIF2C3)与 AGO1、AGO4 均位于 1p,这一区域在 Wilms 瘤、原发神经外胚层瘤及许多其他恶性肿瘤中常发生缺失^[10],提示 PIWIL2 可能在肿瘤形成中起重要作用。

本研究根据 Ensembl 数据库获得人 PIWIL2 蛋白序列,由于 Argonaute 蛋白家族的序列同源性高,因此使用能区分 AGO 蛋白成员、且与人蛋白组其余部分不同的多肽序列非常重要。本研究采用抗体设计师内部多肽选择数据库(Dragonfly, USA)来选择最佳多肽免疫原,有效地避免了 AGO 蛋白之间的抗原交叉性,用于人 AGO 蛋白抗体的生产。合成多肽制备抗体是目前广泛使用的抗体制备方法,通常选用疏水性弱、抗原性强、长度为 10~30 个氨基酸的多肽作为免疫原来生产抗体^[11]。本研究采用的多肽选择数据库考虑到了多肽的序列独特性(该独特性是基于与所有人蛋白序列比较后的数据得到的)、抗原性(Hopp-Woods 评分)、合成难度和溶解性。该数据库可为覆盖整个蛋白序列的重叠多肽以及选定的用于抗体生产的最佳肽段打分。

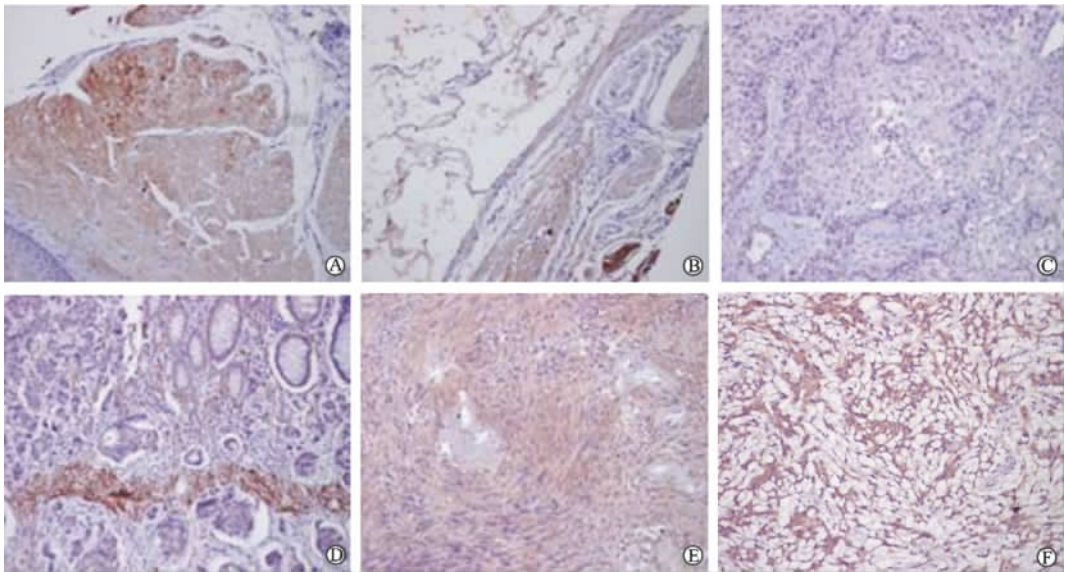


图 2 人 PIWIL2 免疫组化定位结果

Fig 2 Immunohistochemical location of human PIWIL2 proteins in normal and tumor tissues

A: Positive staining in endochylema of smooth muscle cells from esophageal mucosa;B: Positive staining in lamina muscularis mucosae from gastric mucosa;C: Positive staining in endochylema of vascular smooth muscle cell, but negative staining in tumor cells from esophageal squamous carcinoma tissue;D: Positive staining in endochylema of muscle fiber, muscular layer in vessel wall, fibrocyte surrounding glandular body, but negative staining in tumor cells from gastric carcinoma tissue;E: Positive staining in acoustic neurinoma tissue;F: Positive staining in fibrinous meningioma tissue. Original magnification: A(×400);B-F(×200)

针对 PIWIL2,本研究合成出多肽并将其与 KLH 结合用于免疫。在兔体内免疫 3 次之后,该多肽显示出强免疫反应,且在 96 孔板上用固定化免疫原肽段进行 ELISA 检测时显示出了高滴度。同时经过纯化抗体的 SDS-PAGE 分析、蛋白杂交等验证,明确显示所制备抗体符合 PIWIL2 特性。通过该抗体对正常黏膜和癌组织进行组织芯片免疫组化染色发现,本实验制备的 PIWIL2 在人听神经瘤、纤维脑膜瘤肿瘤细胞胞质内明显阳性表达,但在食管癌、胃癌组织中未见阳性表达,提示 PIWIL2 在肿瘤组织中的表达可能具有组织和细胞特异性。有趣的是,无论正常的食管、胃黏膜还是食管癌和胃癌组织中,PIWIL2 在相应组织平滑肌细胞胞质中均阳性表达。该结果提示,除了我们常关注的 PIWIL2 与肿瘤发生发展的关系外,PIWIL2 是否具有调控平滑肌的分化、增殖和凋亡等功能,值得进一步研究。

总之,本抗体的成功制备为进一步研究 Argonaute 蛋白家族在 miRNA/RNAi 通路中的作用及在人类其他疾病中的意义提供了重要工具。

[参考文献]

[1] Tsang J, Zhu J, van Oudenaarden A. MicroRNA-mediated feed-

back and feedforward loops are recurrent network motifs in mammals[J]. Mol Cell, 2007, 26: 753-767.

[2] Carmell M A, Xuan Z, Zhang M Q, Hannon G J. The argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis[J]. Genes Dev, 2002, 16: 2733-2742.

[3] Gregory R I, Chendrimada T P, Cooch N, Shiekhattar R. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing[J]. Cell, 2005, 123: 631-640.

[4] Martinez J, Patkaniowska A, Urlaub H, Lührmann R, Tuschl T. Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi[J]. Cell, 2002, 110: 563-574.

[5] Doench J G, Sharp P A. Specificity of microRNA target selection in translational repression [J]. Genes Dev, 2004, 18: 504-511.

[6] Rhoades M W, Reinhart B J, Lim L P, Burge C B, Bartel B, Bartel D P. Prediction of plant microRNA targets[J]. Cell, 2002, 110: 513-520.

[7] Lu J, Getz G, Miska E A, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers[J]. Nature, 2005, 435: 834-838.

[8] Seto A G, Kingston R E, Lau N C. The coming of age for Piwi proteins[J]. Mol Cell, 2007, 26: 603-609.

[9] Pillai R S, Artus C G, Filipowicz W. Tethering of human Ago proteins to mRNA mimics the miRNA-mediated repression of protein synthesis[J]. RNA, 2004, 10: 1518-1525

[10] Dome J S, Coppes M J. Recent advances in Wilms tumor genetics[J]. Curr Opin Pediatr, 2002, 14: 5-11.

[11] Zafir-Lavie I, Michaeli Y, Reiter Y. Novel antibodies as anticancer agents[J]. Oncogene, 2007, 26: 3714-3733.