

用于人乳腺癌病理检测的抗人 hARD1 单克隆抗体的制备

余敏^{1*}, 王泽华^{1*}, 龚军丽¹, 马明星¹, 焦扬¹, 黄惟巍¹, 吕琦³, 李琳², 杨慧², 谭德勇¹

1 云南大学生命科学学院 生物化学与分子生物学实验室, 昆明 650091

2 云南省第一人民医院病理科, 昆明 650032

3 云南大学单抗研究中心, 昆明 650091

摘要: hARD1 蛋白是一个乙酰基转移酶, 催化蛋白质 N 末端的乙酰化。前期的研究发现 hARD1 的高表达可能作为乳腺癌的一个指标。为了制备在乳腺肿瘤组织中特异识别的抗 hARD1 的单克隆抗体, 将纯化的全长 hARD1/His tag 融合蛋白 (1~235 aa) 免疫 Balb/c 小鼠, 获得了 8 个稳定的阳性单克隆细胞株, 酶联免疫吸附测定 (ELISA) 结果表明, 所得抗体的轻链均为 κ 型, 重链为 3 种亚型: IgG1、IgG2a 和 IgG2b。在不同肿瘤组织样本中进行抗体特异性筛选, 获得一个在乳腺肿瘤组织中具有相对特异性的抗 hARD1 单克隆抗体, 为进一步将抗 hARD1 的单克隆抗体应用于乳腺癌的病理诊断奠定基础, 同时也为进一步研究 hARD1 在肿瘤发生中的作用提供了重要的工具。

关键词: hARD1, 单克隆抗体, 乳腺癌

Production of anti-recombinant human arrest defective 1 protein (hARD1) monoclonal antibodies for assaying human breast cancer tissues

Min Yu^{1*}, Zehua Wang^{1*}, Junli Gong¹, Mingxing Ma¹, Yang Jiao¹, Weiwei Huang¹, Qi Lü³, Lin Li², Hui Yang², and Deyong Tan¹

1 Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology, School of Life Science, Yunnan University, Kunming 650091, China

2 Department of Pathology, First Peoples Hospital of Yunnan Province, Kunming 650032, China

3 Monoclonal Antibody Research Center, Yunnan University, Kunming 650091, China

Abstract: Human arrest defective 1(hARD1) is an acetyltransferase catalyzing the N-terminal acetylation of proteins after translation. The high expression of hARD1 could be an indicator of the breast cancer. In current study, we produced an anti-hARD1p monoclonal antibody that could specifically recognize hARD1 in breast cancer tissues by using the immunohistochemical assay. The full-length His-tag hARD1 protein (1~235 aa) was over-expressed in *Escherichia coli*, and purified recombinant protein was injected into Balb/c mice to perform immunization procedure. Eight stable positive monoclonal cell lines were isolated. ELISA results demonstrated that all light chains of antibodies were κ , and the heavy chains displayed three subtypes IgG1, IgG2a and IgG2b,

Received: August 26, 2009; **Accepted:** November 13, 2009

Supported by: National Natural Science Foundation of China (Nos. 30760057, 30960091), Key Science and Technology Project of Yunnan Province (Nos. 2008CD069, 2008CC003), Key Science and Technology Project of Department of Education of Yunnan Province (No. 09Z0005).

Corresponding author: Deyong Tan. Tel: +86-871-5032061; Fax: +86-871-5032061; E-mail: dytan@ynu.edu.cn

*These authors contributed equally to this study.

国家自然科学基金 (Nos. 30760057, 30960091), 云南省科技厅重点项目 (Nos. 2008CD069, 2008CC003), 云南省教育厅重点项目 (No. 09Z0005) 资助。

respectively. A monoclonal antibody, which could specifically recognize hARD1 protein in breast cancer tissues, was identified by screening different cancer tissues using antibody-specificity method. Further, the specificity of the antibody was confirmed by Western blotting analysis. Our study would facilitate breast cancer diagnosis by using this ARD1 monoclonal antibody in clinic. Also, this antibody could be used as an important tool for further investigating the role of ARD1 in tumorigenesis.

Keywords: human arrest defective 1 protein, monoclonal antibody, breast cancer

ARD1 (Arrest defective 1) 最初在酵母细胞中发现, 是 N-乙酰基转移酶 NatA 的一个亚基, 另一个亚基是 Nat1^[1-2]。NAT1 和 ARD1 中任何一个亚基的缺失都使 NatA 活性丧失, 导致酵母表现出多种异常表型, 包括结合型决定座位 (HML) 的重组抑制, 在贫营养状态下不能进入 G0 期, 以及染色体不稳定^[3-5]。进一步的研究发现, 在哺乳动物细胞中 ARD1 可以独立作为乙酰基转移酶发挥作用^[6]。人 *ARD1* (*hARD1*) 基因与酵母的 *ARD1* 基因具有高度同源性, 已有的研究发现, hARD1 与肿瘤的发生有关。通过 RNAi 技术干扰 *hARD1* 基因表达能诱导 Hela 细胞凋亡^[7]。在肺癌细胞中, hARD1 可能通过激活 β -catenin 的活性, 从而增强 β -catenin 与转录因子 TCF4 的结合, 增强 *ClyclinD1* 的转录活性, 进而促进细胞的增殖^[8]。

本研究小组在前期的研究中制备了抗 ARD1 的多克隆抗体, 检测 hARD1 蛋白在不同肿瘤中的表达, 发现 hARD1 蛋白在乳腺肿瘤、前列腺癌以及肺癌中有较高频率的表达, 其中乳腺肿瘤中的表达频率最高, 提示 ARD1 可能也参与肿瘤的生长调控过程, 与肿瘤的发生、发展以及预后相关^[9]。然而, ARD1 在肿瘤发生中发挥的作用至今仍未完全阐明, 其调控的靶基因以及与其相互作用的蛋白仍有待进一步发现。

本研究利用前期工作中已获得的纯化的原核表达重组 hARD1 蛋白免疫小鼠, 筛选并获得在乳腺癌组织中具有较特异的单克隆抗体细胞株, 为 hARD1 在肿瘤病理诊断的应用研究以及探索 ARD1 在肿瘤发生发展中的分子机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 重组 hARD1 原核表达蛋白的制备

将已构建的 pET28b-hARD1 表达质粒^[9]转化大

肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞, 涂布于含 50 mg/L 卡那霉素的 LB 平板上, 37℃ 培养过夜。次日挑选菌落, 通过 PCR 检测获得阳性克隆。将阳性克隆接种于 5 mL 含 50 mg/L 卡那霉素的 LB 培养基中, 37℃、200 r/min 振荡培养过夜。次日分别按 1:100 的比例接种于 400 mL 含有 50 mg/L 卡那霉素的 LB 液体培养基中, 37℃、200 r/min 振荡培养至 OD_{600} 0.6~0.8, 加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 诱导表达 6 h, 取 5 mL 培养菌液按常规方法制备蛋白样品, 选用 12% 的分离胶进行 SDS-PAGE 电泳, 经考马斯亮蓝染色, 用凝胶图像分析系统检测诱导表达蛋白。

1.2 包涵体的分离和纯化

将诱导后的菌液离心, 收集菌体, 悬浮于 PBS 磷酸缓冲液中, 置于冰上进行超声破碎。将菌体裂解液离心 5 min, 保留上清, 沉淀用 10 mL 盐酸胍 (2 mol/L) 洗涤, 10 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 沉淀再用 9 倍体积缓冲液 B (2 mol/L 盐酸胍、0.5% TritonX-100 和 10 mmol/L EDTA) 洗涤, 10 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 沉淀用缓冲液 C (8 mol/L 尿素, 10 mmol/L 咪唑, 0.1 mol/L 磷酸钠, 300 mmol/L NaCl) 溶解后 10 000 r/min 离心 10 min, 上清即为分离溶解后的包涵体。将溶解的包涵体蛋白用镍离子螯合 (His-bind) 层析柱纯化, 用不同浓度的咪唑缓冲液洗 Ni 柱, 收集洗脱液, 获得纯化的 hARD1 蛋白质。将纯化蛋白进行 12% SDS-PAGE 分析, 检测纯化效果并进行蛋白浓度测定, 纯化蛋白经质谱鉴定确定为人 ARD1 蛋白序列。

1.3 hARD1 单克隆抗体的制备

纯化 hARD1 蛋白经透析除盐, 50 μ g 纯化的 hARD1 蛋白 (每只) 与等体积弗氏完全佐剂充分乳化, 皮下注射 3 只 6~8 周龄的 Balb/c 雌性小鼠。首次免疫 4 周后, 用同样的蛋白量与弗氏不完全佐剂充分乳化, 进行第 2 次免疫, 采用腹腔注射。10 d

后,进行第3次腹腔注射。于第3次免疫后的第7天,断尾采血,用ELISA法测定血清抗体的效价。于融合前4天,用50 μ g溶于PBS中的抗原加强免疫。4 d后,取脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞株 Sp2/0-Ag14 细胞,按常规方法融合。用间接ELISA法筛选,有限稀释法克隆,并按常规方法制备鼠单抗。

1.4 单抗类别鉴定

单克隆抗体的重链和轻链的类型通过ELISA方法鉴定,分别用辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗鼠IgG、IgG-1、IgG-2a、IgG-2b、IgG-3、IgM、IgA以及 κ 、 λ 轻链型的HRP标记抗体作为二抗替代HRP标记的羊抗鼠IgG进行单抗类别鉴定。

1.5 单克隆抗体的制备及鉴定

利用rProteinA一步法纯化杂交瘤细胞腹水产品,将腹水用固定用缓冲液做倍比稀释、过滤后直接上柱,再用洗脱液洗脱,并收集抗体峰,洗脱的抗体溶液于PBS中透析后,加0.1% NaN_3 ,分装, -20°C 保存。利用BCA法测定抗体溶液中的总蛋白浓度,SDS-PAGE检测抗体的纯度和分子量。

1.6 乳腺组织样本的收集和总蛋白的提取

所有肿瘤组织样品均来自云南省第一人民医院的病理科,手术切除后,组织样本被放在 -80°C 保存,样本的临床资料从医院记录中获得。肿瘤组织蛋白的处理如下:取1 g癌组织,切碎,加入1 mL蛋白裂解液(20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 137 mmol/L NaCl, 1 mmol/L MgCl_2 , 10% glycerol, 1% Nonidet P-40, 100 mg/mL benzamidine, 1 mmol/L phenyl-methylsulphonyl-fluoride (PMSF), 100 mmol/L Na_3VO_4),置于冰上碾磨, 4°C 下10 000 r/min离心,取上清,加入等体积的2 \times 上样缓冲液,沸水浴煮10 min,进行SDS-PAGE和Western blotting分析。

1.7 肿瘤组织 Western blotting 检测和免疫化学分析

将提取的肿瘤组织蛋白进行SDS-PAGE电泳,转PVDF膜。将一抗稀释400倍,采用ABC(AP)试剂盒按说明书进行Western blotting分析。肿瘤组织石蜡切片由云南省第一人民医院病理科进行鉴定,按病理免疫组织化学检测要求制片,用SP试剂盒检测,一抗稀释200倍,操作步骤参照试剂盒说明书

进行。免疫组织化学结果由病理学专业人员按病理学判断标准进行结果判断。

2 结果

2.1 杂交瘤细胞株的筛选和抗体类型鉴定

在大肠杆菌中表达的全长 hARD1/His-tag 融合蛋白(1~235 aa)经镍柱纯化后进行SDS-PAGE检测和质谱(MS)鉴定。用纯化的重组hARD1蛋白免疫3只Balb/c小鼠。免疫反应完成后,用梯度稀释法检测抗血清的效价。3只免疫小鼠均产生较高效价的抗体(图1),效价达到 10^6 。将免疫小鼠杀死,分离脾脏细胞,经过细胞融合,用间接ELISA方法筛选阳性杂交瘤细胞。平板上获得8个阳性孔,将阳性细胞用有限稀释法克隆,获得8个稳定的hARD1单克隆细胞株(表1)。将杂交瘤细胞株的培养上清液用间接ELISA法检测单克隆抗体亚类,发现所有的杂交瘤细胞株的轻链是 κ 型的,重链有3种类型:IgG-1、IgG-2a和IgG-2b(见表2)。抗体蛋白利用rProteinA柱进行纯化,并进行SDS-PAGE检测,所有抗体免疫球蛋白组成的分子量见图2。

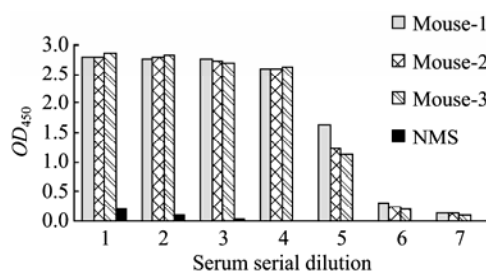


图1 免疫小鼠血清效价测定

Fig. 1 Antibody titers of sera from immunized mice.

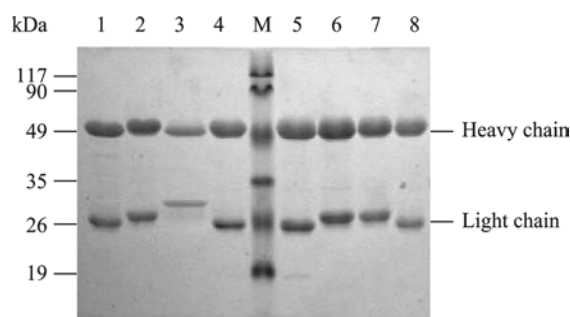


图2 8个单克隆抗体重链和轻链分子量

Fig. 2 Heavy and light chain molecular weight of eight monoclonal antibody.

表1 杂交瘤筛选结果

Table 1 Data obtained in hybridomas screening

Mouse No.	Number of hybridomas	Number positives in ELISA	Number stable positives through limiting dilution
M-1	262	10	5
M-2	102	6	0
M-3	168	6	3

表2 抗hARD1蛋白的单克隆抗体的类型鉴定

Table 2 Identification of subclass of the monoclonal antibodies to hARD1 protein

Mouse No.	Hybridoma	McAb's subclass
M1	1E11	IgG-1, κ
M1	2A9	IgG-1, κ
M1	2B9	IgG-2a, κ
M1	2G5	IgG-2b, κ
M1	3D2	IgG-2b, κ
M3	4H4	IgG-2b, κ
M3	8B3	IgG-2b, κ
M3	8H2	IgG-2b, κ

2.2 单克隆抗体在乳腺癌组织中的灵敏性和特异性筛选

为筛选在乳腺癌组织中特异识别 hARD1 蛋白的抗体，从 20 个乳腺癌组织中选出 1 个 hARD1 蛋白表达适中的组织样本。从杂交瘤细胞中获得的 8 个抗体分别与该组织样本进行免疫组织化学检测，根据免疫组织化学染色的强度筛选，发现 1 号、3 号、7 号和 8 号抗体有较强的反应，并被作为候选

的特异性抗体 (图 3)。

将选出的候选特异性抗体分别与 33 个肿瘤组织样本，包括腺癌、纤维腺瘤、鳞癌进行免疫组织化学染色检测，结果发现源于 2G5 号细胞株的 3 号抗体在乳腺肿瘤组织中显示出较强的显色特异性，而在其他肿瘤组织中没有显色或显色较弱，其他抗体株的特异性相对 3 号较差 (表 3)。

为了进一步鉴定 3 号抗体的特异性，进行了乳腺癌肿瘤组织的 Western blotting 分析，选取了 10 个乳腺癌组织进行 Western blotting 检测，结果出现一条 26 kDa 的单一一条带 (图 4)，说明 3 号抗体具有较强的特异性。

3 讨论

实验中获得 8 个抗体株中，虽然每个抗体克隆都能识别 hARD1 蛋白，但它们存在着不同的特异性和灵敏性。对于同一个肿瘤样本，1、3、7 和 8 号抗体对 hARD1 蛋白有较高的反应灵敏性，对于不同的肿瘤样本，在纤维腺瘤和乳腺导管癌中 3 号抗体的显色信号远强于其他肿瘤类型，表明了 3 号抗体在乳腺癌中的免疫组化染色是特异的。

虽然实验中获得 8 个抗体株都是识别 hARD1 蛋白的抗体，但不同组织中可能存在不同的蛋白，某些蛋白中可能有某些抗原表位与 hARD1 蛋白相似，因此

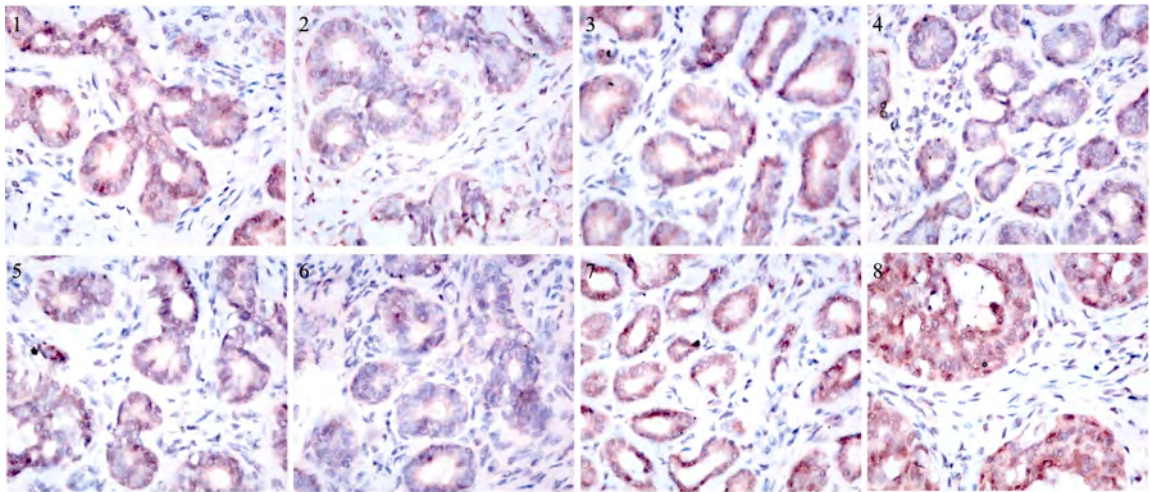


图3 8个单克隆抗体株在同一个乳腺肿瘤组织中的显色信号

Fig. 3 Eight monoclonal cell lines expression in a breast cancer tissues. 1-8: different monoclonal cell lines.

表3 不同的抗体株在肿瘤组织中的反应
Table 3 Reaction of different antibody with tumor tissues

Sample No.	Tissues	Antibody 1	Antibody3	Antibody 7	Antibody 8
1	Rectal mucus adenocacinoma	+	—	—	+
2	Adenocarcinoma of colon	+	—	—	—
3	Adenocarcinoma of colon	—	—	—	—
4	Adenocarcinoma of colon	—	—	—	—
5	Adenocarcinoma of colon	++	—	—	+
6	Adenocarcinoma of colon II-III	—	—	—	—
7	Adenocarcinoma of colon II-III	+	—	—	—
8	Adenocarcinoma of colon II	—	+	+	—
9	Adenocarcinoma of colon II	+	—	+	++
10	Ileocecum II	+	—	+	++
11	Fibroadenoma of breast	—	—	—	—
12	Fibroadenoma of breast	+	—	—	—
13	Fibroadenoma of breast	+	+	+	—
14	Fibroadenoma of breast	+	++	++	+
15	Infiltrating ductal carcinoma of breast	+	++	++	+
16	Fibroadenoma of breast	+	—	—	+
17	Fibroadenoma of breast	+	—	—	+
18	Liparomphalus of back	—	—	—	—
19	Fibromyoma uteri	—	—	—	—
20	Fibromyoma uteri	—	—	—	—
21	Fibromyoma uteri	—	—	—	—
22	Fibromyoma uteri	—	—	—	—
23	Liparomphalus of blood vessel	—	—	—	—
24	Squamous papilloma of esophago	—	—	—	—
25	Squamous papilloma of skin	—	—	—	—
26	Poorly differentiated squamous-cell carcinoma of esophago	+	—	—	+
27	Differentiation epithelioma of ear	—	—	—	—
28	Papillary adenocarcinoma of kidney	—	—	—	+
29	Adenoid cystic carcinoma of lung	—	—	—	—
30	Thyroid cancer lymphatic metastasis	—	—	—	—
31	Papillary adenocarcinoma of kidney	—	—	—	—
32	Mucinous adenocarcinoma of pancreatic gland	+	—	—	+
33	Infiltrating ductal carcinoma of breast	—	++	+	+

Notes: “+” positive; “—” negative.

在不同的组织中其特异性存在差别。本研究中，免疫组织化学检测结果显示，3 号抗体在乳腺癌组织中的染色信号最强，而在其他组织中的信号相对较弱，Western blotting 检测在乳腺癌中只有一条特异蛋白条带，这意味着 3 号抗体只识别 ARD1 蛋白。而其他抗体在乳腺癌组织和其他组织中均有染色信

号，可能有非特异性的识别。

乳腺癌是妇女中最常见的肿瘤之一，占有所有肿瘤的 23%^[10]。据世界范围内的统计，乳腺癌的发病率每年仍按 0.5% 的速度增长。尽管乳腺癌的诊断治疗水平在不断提高，但仍有 1/4 患者死亡^[11]。因此，及早诊断对乳腺癌的治疗具有重要的意义。生物标

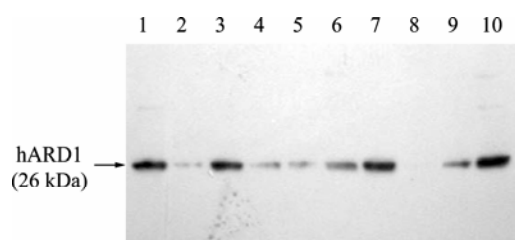


图4 3号抗体在乳腺肿瘤组织中的Western blotting检测

Fig. 4 Western blotting analysis in the breast cancer tissues with No. 3 antibody. 1-10: different breast cancer tissues.

志物检测是肿瘤诊断的一种重要方法。研究表明ARD1的高表达与乳腺癌的发生有关,它可以作为乳腺癌临床诊断的一个生物标志物^[9]。在蛋白标志物的病理诊断中,获得一个好的单克隆抗体是非常重要的。虽然有商业化的抗ARD1抗体,但它的特性不确定,就难以在病理诊断中应用。本研究获得了一个在乳腺癌组织中特异识别ARD1蛋白的杂交瘤细胞株,这为进一步将抗hARD1的单克隆抗体应用于乳腺癌的病理诊断奠定了基础,同时也为进一步研究ARD1在肿瘤发生中的作用提供了重要的工具。

REFERENCES

- [1] Whiteway M, Szostak JW. The ARD1 gene of yeast functions in the switch between the mitotic cell cycle and alternative developmental pathways. *Cell*, 1985, **43**: 483-492.
- [2] Parke EC, Szostak JW. ARD1 and NAT1 proteins form a complex that has N-terminal acetyl-transferase activity. *EMBO J*, 2000, **11**: 2087-2093.
- [3] Mullen JR, Kayne PS, Moerschell RP, *et al.* Identification and characterization of genes and mutants for an N-terminal acetyltransferase from yeast. *EMBO J*, 1989, **8**(7): 2067-2075.
- [4] Whiteway M, Freedman R, Van Arsdell S, *et al.* The yeast ARD1 gene product is required for repression of cryptic mating-type information at the HML locus. *Mol Cell Biol*, 1987, **7**: 3713-3722.
- [5] Lee FJ, Lin LW, Smith JA. N-acetylation is required for normal growth and mating of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*, 1989, **171**: 5795-5802.
- [6] Sugiura N, Adams SM, Corriveau RA. An evolutionarily conserved N-terminal acetyltransferase complex associated with neuronal development. *J Biol Chem*, 2003, **278**(41): 40113-40120.
- [7] Arnesen T, Gromyko D, Pendino F, *et al.* Induction of apoptosis in human cells by RNAi-mediated knockdown of hARD1 and NATH, components of the protein N-alpha-acetyltransferase complex. *Oncogene*, 2006, **25**(31): 435-4360.
- [8] Lim JH, Park JW, Chun YS. Human arrest defective 1 acetylates and activates beta-catenin, promoting lung cancer cell proliferation. *Cancer Res*, 2006, **66**(22): 10677-10682.
- [9] Yu M, Huang C, Xiang MJ, *et al.* hARD1 antiserum preparation and primary immunohistochemical analysis of hARD1 in tumor tissues. *Chin J Biotech*, 2008, **24**(7): 1155-1161.
- [10] Jemal A, Siegel R, Ward E, *et al.* Cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, 2006, **56**(2): 106-130.
- [11] Parkin DM, Bray F, Ferlay J, *et al.* Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*, 2005, **55**(2): 74-108.

余敏, 黄超, 向明钧, 等. 抗ARD1抗血清制备及其初步肿瘤免疫组化分析. 生物工程学报, 2008, **24**(7): 1155-1161.