

研究简报

hNOK 抗体的制备及肺癌组织中 NOK 的表达检测

徐方¹, 李颖华¹, 王银银¹, 任芳丽¹, 刘力², 常智杰¹

1 清华大学医学院, 清华大学生物科学与技术系, 生物膜与膜生物工程国家重点实验室, 北京 100084

2 中国协和医科大学基础医学院, 中国医学科学院基础医学研究所, 北京 100005

摘要: Novel Oncogene with Kinase-domain (NOK)是一个新的肿瘤相关基因, 其结构上与受体蛋白相似, 具有一个蛋白激酶结构域。过量表达 NOK 会导致肿瘤的产生与转移。为了更进一步研究生理状态下 NOK 的功能, 需要制备 NOK 特异性的抗体。利用 GST 融合蛋白制备了人源 NOK 的多克隆抗体, 并进行了纯化。检测表明所得的抗体具有很高的滴度, 能够特异性检测 NOK 蛋白的表达。使用该抗体进行了人肺癌组织的免疫组化检测, 发现该抗体能够高效识别组织内源性表达的 NOK 蛋白, 可为肺癌的诊断提供依据。

关键词: 蛋白激酶, 多克隆抗体, NOK, 肺癌

Preparation of Anti-hNOK Antibodies and Expression Examination of NOK in the Lung Cancer Tissues

Fang Xu¹, Yinghua Li¹, Yinyin Wang¹, Fangli Ren¹, Li Liu², and Zhijie Chang¹

1 State Key Laboratory of Biomembrane and Membrane Biotechnology, School of Medicine, Department of Biological Sciences and Biotechnology, Tsinghua University, Beijing 100084, China

2 Department of Microbiology and Etiology, Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100005, China

Abstract: Novel Oncogene with Kinase-domain (NOK) is a novel tumor-related gene, coding receptor like protein with a kinase domain. Overexpression of NOK leads to tumorigenesis and metastasis. To further study NOK function in physiological condition, it is necessary to prepare the anti-NOK antibody. In this report, GST fusion protein was adopted to prepare polyclonal antibodies against hNOK. The result showed that the antibodies we generated is with a very high titration, and can be used for examination of NOK protein by Westernblot. Furthermore, the antibodies were used for immunohistochemistry in lung cancer tissues, and the results demonstrated high expression of hNOK in the tumor tissues. The antibody of hNOK we generated can serve as a diagnostic method for the lung cancer.

Keywords: kinase, polyclonal antibody, NOK, lung cancer

酪氨酸蛋白激酶受体介导着重要的信号通路。在结合特异的配体之后, 受体酪氨酸激酶(RTKs)受体活化, 通过自身磷酸化以及下游底物磷酸化而传

递细胞外信号。RTKs 能激活大多数的信号通路, 引起细胞的增殖、分化、迁移和代谢的改变等, 在胚胎发育, 代谢以及免疫系统中起着非常重要的作

Received: June 21, 2006; **Accepted:** November 14, 2007

Supported by: the National Natural Science Foundation of China (No. 30530420, 3061120522), Supporting Project (No. 2006CB910100) and Tsinghua Yu-Yuen Fund (No. 202400005-03, 202400005-06).

Corresponding author: Zhijie Chang. Tel: +86-10-62785076; Fax: +86-10-62773624; E-mail: zhijie@tsinghua.edu.cn

国家自然科学基金(No. 30530420, 3061120522), 国家支撑计划(No. 2006CB910100), 清华裕元基金(No. 202400005-03, 202400005-06)资助。

用。目前研究表明,在遗传性的和散发的肿瘤病例中,已经有超过一半的 RTKs 被发现有过量表达或者是突变的形式与恶性肿瘤相关^[1-6]。NOK 是本实验室于 2004 年首先报道有明确功能的一个新的酪氨酸蛋白激酶家族成员。本实验首先利用网上公布的 EST 序列数据库发现了 NOK 基因,随后从人类的扁桃体肿瘤组织和小鼠结肠组织中利用 RT-PCR 的方法分别克隆出了人和小鼠的 NOK 基因(GeneBank 登录号: AY563053)。这和 2003 年 Ye 等人报道的从一个高质量的人胎脑 cDNA 文库中克隆出来,因为富含丝氨酸、苏氨酸以及酪氨酸残基而命名的 STYK1 是同一个基因^[7]。

NOK 和 FGF/PDFG 受体超家族显示了约 30% 的蛋白序列同源性, Northern 结果显示其在人体组织中的分布以前列腺的表达水平最高,而在脑、胎盘以及结肠中也有一定的表达水平;在小鼠的组织表达分布中, NOK 在结肠和小肠中有着高表达。在对一些细胞系的检测中,也发现 NOK 在一些肿瘤细胞中高表达,如人宫颈癌 Hela 细胞,人卵巢癌 Ho8910 细胞以及人慢性髓性白细胞瘤 K562 细胞。而在一些肿瘤细胞如人的表皮癌 A431 细胞中却检测不到 NOK 的表达,提示 NOK 可能在某些肿瘤的发生中具有重要作用^[8]。最近日本札幌医科大学 Naoki Watanabe 教授领导的小组在乳腺癌和肺癌肿瘤样本中发现了 NOK 的高表达,同时还发现 NOK 的 mRNA 在早期的肿瘤样本中就有高表达,提示对于乳腺癌和肺癌,特别是在早期用其他方式无法诊断肿瘤的恶性程度的时候, NOK 可能作为一种新的临床诊断靶基因^[9,10]。本实验室对 NOK 的功能还进行了进一步的研究。陈钺等人结合体内和体外实验验证了 NOK 蛋白上第 327 位和第 356 位酪氨酸残基对于 NOK 介导的肿瘤发生起到了关键性作用^[11]。李颖华等人还发现 NOK 的第 417 位酪氨酸残基对于 NOK 介导的信号转导起到了自主抑制作用^[12]。现阶段对于 NOK 对于肿瘤发生和迁移的机制以及自身调控等的机制研究还刚刚开始,为此,我们制备并纯化了 NOK 抗体,通过免疫组化实验发现其能高效地识别肺癌组织中的 NOK 蛋白,从而为后续进行 NOK 功能机制的研究提供了研究基础。

1 材料与方法

1.1 材料

大肠杆菌 DH5, BL21, 以及 293T 细胞, GST 融合蛋白表达载体 pGEX4T2 为本室保存, 限制性内切酶及工具酶购自 NEB 公司, DNA 纯化回收试剂盒购自 Qiagen 公司, 抗 HA 单克隆抗体为 SANTA CRUZ 公司产品, 纯化蛋白用 glutathione-Sepharose 4B Resin, 纯化抗体用 NHS-activated SepharoseTM 4 Fast Flow 购自 Pharmacia 公司。Super Signal West Pico 化学发光试剂盒购自 PIERCE 公司。曝光用底片购自 Kodak 公司。细胞培养用 DMEM 培养基, FBS(胎牛血清), NCS(新生牛血清)及转染用 Transfectin2000 购自 GIBCO BRL 公司, 转染试剂 Vigofect 购自 Vigorous 公司。雄性新西兰大白兔, 购自中科院动物所。福氏完全佐剂和不完全佐剂, 为 GIBCO 产品。

NETN 裂解液 (20 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0), 100 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 0.5% NP-40 (Nonidet P-40)); 100 mmol/L PMSF(溶于异丙醇); PBS(pH 7.3)(150 mmol/L NaCl, 16 mmol/L Na₂HPO₄, 4 mmol/L NaH₂PO₄); 洗脱缓冲液 (5 mmol/L Glutathione, 50 mmol/L Tris-Cl(pH 8.0)); Glutathione SepharoseTM 4B(Amersham Pharmacia Biotech)。

肺癌组织切片, 由北京大学人民医院惠赠; 免疫组化试剂盒购自中杉金桥公司。

1.2 方法

1.2.1 PCR 扩增

以 hNOK 的 cDNA 全长为模板, 设计胞内区的特异性引物。引物序列如下。pGEX-4T-3/hNOK (49aa-422aa)引物: 引物 1, 5'-TATAAGATCTGCC ACCATGATCAGAGAACAAGAAGCTC-3'(Bgl II); 引物 2, 5'-TATAGTCGACAAGCATGCTATAGTTG TAGAAGAGG-3'(Sal I)。pGEX-4T-3/hNOK (49aa-159aa)引物: 引物 1, 5'-TATAAGATCTGCCACCATGATCAGAGAACAAGAAGCTC-3'(Bgl II); 引物 2, 5'-TATAGTCGACTTGTACCTCATGGA GC-3'(Sal I)

反应体系如下: 94°C, 30 s; 50°C, 45 s; 72°C, 1 min; 30 个循环。

1.2.2 PCR 产物的克隆以及序列测定

PCR 产物回收后用 Bgl II & Sal I 酶切, 将 pGEX4T2 载体用 BamHI 和 Sal I 酶切。连接, 转化大肠杆菌 DH5 α , 挑选有氨苄抗性的克隆进行质粒

小提并鉴定。

1.2.3 GST-hNOK(49aa-159aa)融合蛋白的诱导表达和纯化

将 pGEX-4T-3/hNOK(49aa-159aa)转入大肠杆菌 BL21, 挑取克隆接种至含氨苄青霉素的 LB 培养基, 37°C 摇床剧烈振荡培养约 10 h 后, 以 1:100 的比例接种到 200 mL 新鲜含氨苄青霉素的 LB 培养基, 37°C 摇床中 250 r/min 振荡培养, 约 3 h 后至 $OD_{600}=0.5\sim 0.6$ 时加入 IPTG 至终浓度 0.1 mmol/L, 16°C 摇床中 200 r/min 诱导培养 16 h 后, 离心收集菌体, 在沉淀中加入 40 mL NETN 裂解液, 振荡重悬, 转移至 50 mL 离心管中, 冰上超声破碎, 量程设置为 8, 以 3 s 破碎, 3 s 间歇, 30 次为一组, 超声两组。离心, 将上清用 glutathione-Sepharose 4B 亲和层析柱纯化 GST-hNOK(49aa-159aa)融合蛋白。

1.2.4 抗 hNOK 抗体的制备与纯化

将纯化的 200 μ g 蛋白采用体外振荡的方法与 2 mL 福氏完全佐剂充分混合, 混合过程应保持蛋白处于低温状态, 采用多点免疫方法, 每种蛋白免疫 2 只新西兰大白兔。2 周后每只动物以半量抗原加不完全佐剂加强免疫, 此后每半月继续免疫一次。第二次加强免疫后的第 7 天, 开始监测血清抗体滴度。其后, 每次免疫后的第 7~10 天内取血测抗体滴度: 兔耳缘取血, 配制琼脂, 铺板, 打孔, 进行免疫扩散检测, 同时以 ELISA 检测抗体滴度。当免疫扩散阳性, ELISA 效价大于 10 万, 并以免疫印迹检测其特异性后, 兔颈动脉分离, 取血, 分离血清, 部分分装冻存于 -80°C, 其他用 Flemington 实验室抗体纯化的方法来进行纯化。

1.2.5 NOK 在肺癌组织中的免疫组化

用本实验室自己制备并纯化的抗 hNOK 抗体按照稀释度 1:100 进行稀释后, 标记肺癌组织切片, 用中杉金桥公司提供的免疫组化试剂盒进行检测。

2 结果

2.1 GST 融合表达质粒的构建、诱导以及表达纯化

NOK 蛋白有 1 个跨膜结构域(26-48aa)和 1 个明显的酪氨酸蛋白激酶结构域(115-381aa)(图 1A)。为了制备抗体, 将 NOK 的整个胞内区序列构建到 pGEX-4T-3 质粒上, 获得 GST-NOK-In 融合表达质粒(图 1B)。随后转化到 BL21 菌株中, 使用 0.2

mmol/L 的 IPTG 分别在 30°C 和 16°C 诱导表达, 结果显示所诱导的融合蛋白绝大部分以包涵体形式存在(图 2 第 4 道), 而在细胞裂解液超声后的上清中 NOK 融合蛋白的含量很少(图 2 第 3 道)。为了获得可溶性的 NOK 融合蛋白, 构建了如图 1C 中所示的 GST 融合表达质粒 GST-NOK(49-159aa)。用 16°C, 0.2 mmol/L 的 IPTG 的条件进行诱导, 所得该 NOK 融合蛋白基本为可溶形式(图 3 第 3 道)。接着, 进行了大规模诱导以获得大量的 GST-NOK(49-159aa)融合蛋白, 按照 Pharmacia 公司的操作手册进行非变性条件下融合蛋白的纯化。蛋白洗脱液最后经聚丙烯酰胺凝胶电泳分离之后用考马斯亮蓝染色, 染色的结果如图 3 所示。结果表明, 最终的蛋白洗脱液中, 存在大量可溶性的 NOK 融合蛋白, 而且纯度达到很高的水平(图 3 第 4~8 道)。

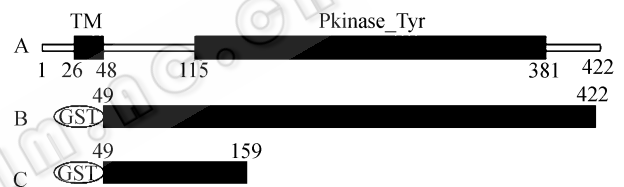


图 1 NOK 基本结构模型以及本实验中构建的 GST-NOK 融合表达质粒示意图。

Fig. 1 Structural model of NOK and map of GST-NOK fusion expression plasmid

A: the basic structural model of NOK; B, C: the two forms of GST-NOK fusion expression plasmid constructions

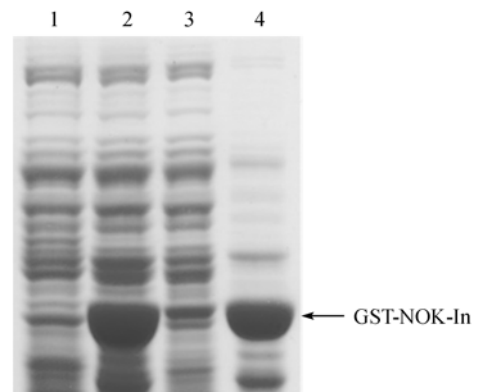


图 2 GST-NOK(49-422AA)融合蛋白的表达

Fig. 2 Expression of GST-NOK (49-422AA) fusion protein
1: total lysate of un-induced *E. coli* transformed with pGEX4T2/GST-NOK (49-422aa); 2: total lysate of induced *E. coli* transformed with pGEX4T2/GST-NOK (49-422aa); 3: supernatant of the lysate of induced *E. coli* transformed with pGEX4T2/GST-NOK (49-422aa); 4: debris of the lysate of induced *E. coli* transformed with pGEX4T2/GST-NOK (49-422aa)

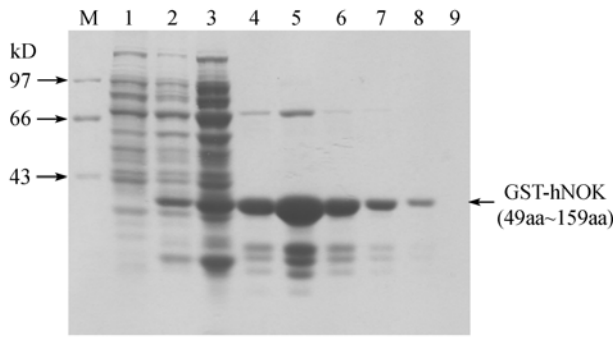


图 3 GST-NOK(49-159aa)融合蛋白的表达和纯化

Fig. 3 Expression and purification of GST-NOK (49-159aa) fusion protein

M: protein MW marker; 1: total lysate of un-induced *E. coli* transformed with pGEX4T2/GST-NOK (49-159aa); 2: total lysate of induced *E. coli* transformed with pGEX4T2/GST-NOK (49-159aa); 3: supernatant of the lysate of induced *E. coli* transformed with pGEX4T2/GST-NOK (49-159aa); 4-9: elution buffer of GST-NOK (49-159aa) protein

2.2 NOK 抗体的制备和 Western 检测

用上述制备的 NOK 融合蛋白免疫雄性新西兰大白兔。第一次加强免疫后的一周后, 取少量抗血清, 通过免疫印迹的方法来检测 NOK 抗体的产生状况。如图 4 所示, 抗血清按照 1:5000 的稀释度可以明显检测到外源过量表达的 NOK 蛋白条带, 通过和特异的抗 HA 的抗体(1:1000 稀释)免疫印迹结果进行比较, 发现该抗血清具有较高的特异性(图 4 箭头所示)。

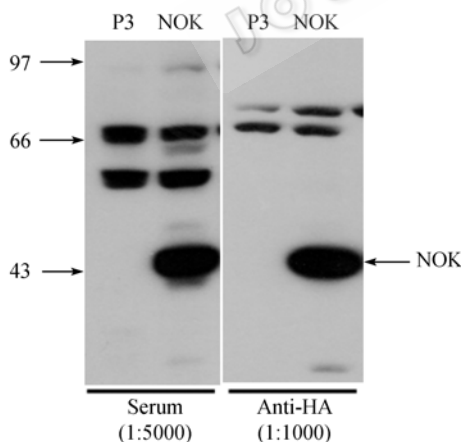


图 4 NOK 多克隆抗体的制备以及检测

Fig. 4 Preparation and detection of anti-NOK polyclonal antibody

Empty vector and NOK expression plasmid with HA Tag were transfected into HEK293T cells. After 24 h, small amounts of cell lysates were separated by electrophoresis, and then probed with rabbit antiserum in 1: 5000 dilution. The anti-HA antibody was used as a positive control. The arrowhead indicates NOK band

2.3 NOK 抗体的纯化, 效价的检测

如图 4, 初步制备的 NOK 抗体除了识别 NOK

蛋白条带之外, 还识别其它非特异性条带。为了获得纯度更高的 NOK 抗体, 参考了 Flemington 实验室抗体纯化的方法对 NOK 抗血清进行了纯化。用过量的 GST 蛋白耦联葡聚糖颗粒除去抗血清中抗 GST 的免疫球蛋白, 然后再用 GST-NOK(49-159aa)耦联的葡聚糖颗粒纯化出特异性的抗 NOK 的 IgG 成分。最后通过免疫印迹的方法来检测抗体的纯化效果。如图 5 所示, 经过 GST-NOK(49-159aa)耦联的葡聚糖颗粒纯化之后, 抗体的特异性明显增强。

对于纯化后的抗体进行了效价检测。使用不同稀释浓度的 NOK 抗体对一定量的过表达表达的 NOK 蛋白采用免疫印迹的方法进行了检测。实验结果显示, 纯化的 NOK 抗体具有较好的滴度, 1:9000 的稀释度仍然能特异性检测到 NOK 蛋白条带的存在(图 6)。

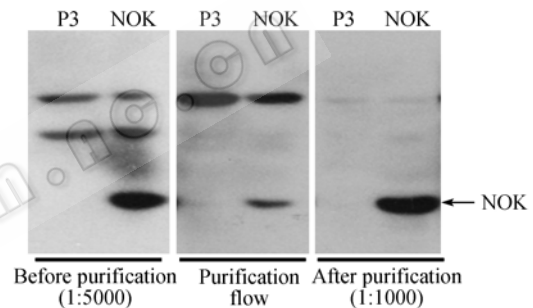


图 5 NOK 多克隆抗体的纯化

Fig. 5 Purification of anti-NOK polyclonal antibody

Anti-serum before purification, affinity purification flow through, and affinity purification were immunoblotted in the same way as in Fig. 4. The arrowhead indicates the NOK expression band

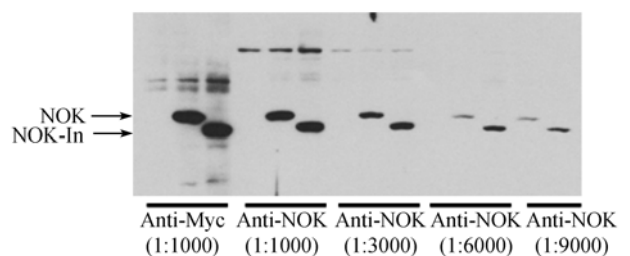


图 6 NOK 多克隆抗体的效价检测

Fig. 6 Titer detection of anti-NOK polyclonal antibodies

Different dilutions of purified antibody were adopted to probe the same amounts of NOK protein and cytoplasmic NOK protein.

Anti-Myc antibody was adopted as a positive control

2.4 NOK 在肺癌组织中的检测

为了验证所纯化的抗体能否检测内源性 NOK 蛋白, 将抗体按照 1:100 的稀释度稀释(以 PBS 作为参照), 进行肺癌组织的免疫组化实验, 用中杉金桥公司的免疫组化试剂盒进行检测。运用该抗体, 我们观察到了 NOK 的特异染色(图 7)。如图, 肿瘤组

织的细胞比较密集, NOK 染色较深, 且在胞浆和胞核中均有分布; 而癌旁组织的细胞密度相对较小, NOK 在胞浆中几乎没有分布, 在胞核中有少量分布。非常明显的是, 在癌旁组织, 我们可以看到阳性细胞(图 7, 开放箭头所示)和阴性细胞(图 7, 实心箭头所示)。这表明了我们制备的抗体能够特异地进行组化染色。Naoki Watanabe 教授领导的小组通过 RT-PCR 的方法证明了 NOK 可能作为早期肺癌诊断的一个标志, 而免疫染色作为检测手段则更为直观和快捷。我们从组化实验证实了 NOK 在肺癌中的高表达。

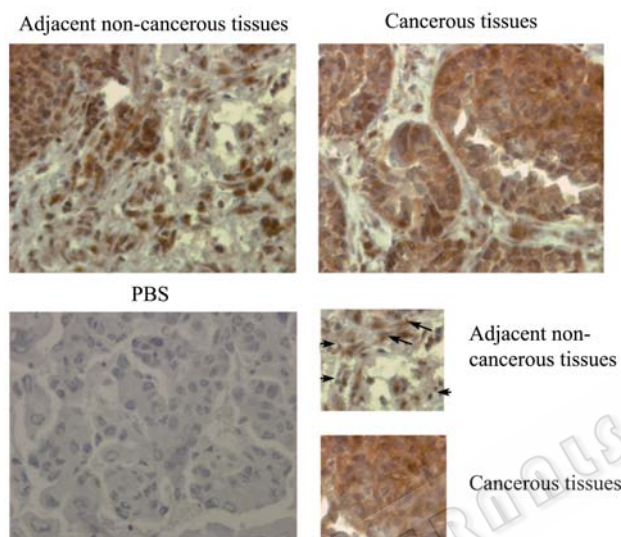


图 7 NOK 在肺癌病人肿瘤组织和癌旁组织中的分布 (400×)

Fig. 7 Expression of NOK in cancerous and adjacent non-cancerous tissues from lung cancer patients

Immunohistochemical analysis on lung section from lung cancer patients ($\times 400$ magnification). The lung section was probed with rabbit anti-NOK antibody or PBS (as reference), and subsequently detected with Zhongshan Goldenbridge Immunohistochemistry Kit. The expression level of NOK is much lower in the non-cancerous tissue than in the cancerous tissue. In the cancerous tissue, NOK is expressed in both cytoplasm and nucleus. While in the adjacent non-cancerous tissue, both NOK positive cells (open arrows) and negative cells (solid arrows) can be seen

3 讨论

NOK 是一个新的受体蛋白激酶家族的成员, 最早由本实验室发现并且克隆出来, 据后续的研究发现它能够转化 NIH3T3 细胞和小鼠前 B 细胞 BaF3, 并且在裸鼠中注射表达 NOK 的 BaF3 细胞能够引起肿瘤的发生和迁移现象。据 Naoki Watanabe 教授实验室的研究表明, 在乳腺癌和肺癌的早期肿瘤标本中, NOK 的 mRNA 就具有较高水平, 说明 NOK 可能

可以作为恶性肿瘤早期诊断的一个标志。因此, 研究 NOK 具有重要的生理学和医学上的意义。本实验室关于 NOK 的功能的研究, 已经发现 NOK 的 327 和 356 两个酪氨酸位点对于 NOK 介导的肿瘤发生起到了关键性作用, 而 NOK 的 417 酪氨酸位点对于 NOK 介导的信号转导起到了自抑制作用。但是对于 NOK 引起肿瘤发生和迁移的机制, 以及 NOK 自身调控等机制还不是很明确。NOK 特异性抗体的制备, 对于检测内源 NOK 在不同正常或者病变组织中蛋白水平的分布, 以及研究 NOK 胞内定位以及信号转导复合物等的研究中起到重要的作用。本研究中制备的 NOK 多克隆抗体具有非常高的特异性和滴度, 即使在稀释度达到 1:9000 的时候也能够特异性的识别 NOK 蛋白条带。肺癌组织中免疫组化的结果表明, NOK 在肿瘤组织中高表达, 而在癌旁组织中则表达量很低。该抗体的制备有助于进一步揭示 NOK 的作用机制。

REFERENCES

- [1] Blume-Jensen P, Hunter T. Oncogenic kinase signalling. *Nature*, 2001, **411**: 355–365.
- [2] Burley SK. Cancer and kinases: reports from the front line. *Genome Biol*, 2006, **7**: 314.
- [3] Paul MK, Mukhopadhyay AK. Tyrosine kinase-role and significance in cancer. *Int J Med Sci*, 2004, **1**: 101–115.
- [4] Futreal PA, Coin L, Marshall M, et al. A census of human cancer genes. *Nat Rev Cancer*, 2004, **4**: 177–183.
- [5] Bardelli A, Parsons DW, Silliman N, et al. Mutational analysis of the tyrosine kinome in colorectal cancers. *Science*, 2003, **300**: 949.
- [6] Greenman C, Stephens P, Smith R, et al. Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature*, 2007, **446**: 153–158.
- [7] Ye X, Ji C, Huang Q, et al. Isolation and characterization of a human putative receptor protein kinase cDNA STYK1. *Mol Biol Rep*, 2003, **30**: 91–96.
- [8] Liu L, Yu XZ, Li TS, et al. A novel protein tyrosine kinase NOK that shares homology with platelet-derived growth factor/fibroblast growth factor receptors induces tumorigenesis and metastasis in nude mice. *Cancer Res*, 2004, **64**: 3491–3499.
- [9] Moriai R, Kobayashi D, Amachika T, et al. Diagnostic relevance of overexpressed NOK mRNA in breast cancer. *Anticancer Res*, 2006, **26**: 4969–4973.
- [10] Amachika T, Kobayashi D, Moriai R, et al. Diagnostic relevance of overexpressed mRNA of novel oncogene with kinase-domain (NOK) in lung cancers. *Lung Cancer*, 2007, **56**: 337–340.
- [11] Chen Y, Li YH, Chen XP, et al. Point mutation at single tyrosine residue of novel oncogene NOK abrogates tumorigenesis in nude mice. *Cancer Res*, 2005, **65**: 10838–10846.
- [12] Li YH, Zhong S, Rong ZL, et al. The carboxyl terminal tyrosine 417 residue of NOK has an autoinhibitory effect on NOK-mediated signaling transductions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2007, **356**: 444–449.