

doi:10.3969/j.issn.1000-484X.2016.07.018

孕激素受体 A 型原核表达及单克隆抗体制备

赵小磊 翟晋豫^{①②} 刘玲玲^① 梁永波^① 牛银银^① 李三华^① 齐 华^①
(河南省食品药品审评查验中心, 郑州 450001)

中图分类号 R392.11 文献标志码 A 文章编号 1000-484X(2016)07-1013-04

[摘要] 目的:制备孕激素受体 A 型单克隆抗体,为后期应用到免疫组化实验提供支持。方法:选择无缝克隆的方法将目的基因与载体连接到一起,通过诱导表达收集蛋白,经过免疫后细胞融合获得单克隆抗体。将该单克隆抗体经免疫组化验证。结果:将融合后筛选的阳性细胞制备获得的单克隆抗体 7C7 经免疫组化验证,发现其在乳腺癌、子宫肌瘤组织中呈现阳性,在直肠癌组织、平滑肌组织中呈现阴性,符合目的抗体的要求。结论:该方法获得的孕激素受体 A 型单克隆抗体较常规方法周期短,获得的抗体在不同组织间结果符合预判,对后期研究区别 PR-A、PR-B,临床推广具有重要意义。

[关键词] 孕激素受体;原核表达;单克隆抗体

Expression of progesterone receptor a protein in prokaryotic and preparation of monoclonal antibodies to PR-A

ZHAO Xiao-Lei, ZHAI Jin-Yu, LIU Ling-Ling, LIANG Yong-Bo, NIU Yin-Yin, LI San-Hua, QI Hua. Henan Food and Drug Evaluation Identification Center, Zhengzhou 450001, China

[Abstract] **Objective:** To prepare for mAb of progesterone receptor. It would provide support for the immunohistochemistry behind. **Methods:** Target gene connected together with a carrier by seamless cloning method. The target protein that expression by inducing was collected. And with cell fusion method, the monoclonal antibodies were preparation. Then the mAb were detected by IHC. **Results:** The mAb (clone 7C7) was detected and it found positive for the breast, uterine fibroid tissue, showed negative in colorectal cancer tissue, smooth muscle tissue, the goal of the claim were achieve. **Conclusion:** Finally, we found the method that prepare for mAb was far beyond our imagination. The result of IHC on different samples about mAb (7C7) obtained compliance with anticipation. Study on the difference between the PR-A and PR-B had significance.

[Key words] Progesterone receptor; Prokaryotic expression; Monoclonal antibody

孕激素受体 (Progesterone receptor, PR) 作为乳腺癌检测中经常使用到的一项指标,对治疗乳腺癌患者起着重要的指导作用。而在有关治疗乳腺癌当中所使用到的内分泌治疗方法,常常出现有些 PR 为阳性,但内分泌疗法依然不佳的怪相。针对于此,经 Horwitz 等^[1] 研究者的研究发现,PR 主要由两种不同的亚型,即 PR-A 与 PR-B 组成。在多位学者大量的研究基础上^[2,3],揭示出它们的分泌情况往往

与乳腺癌的发生、疾病转移等有着密切的关联。目前在医院病理科免疫组化方面应用该不同亚型单克隆抗体已相当普及,但是优秀的抗体多为国外 Leica、Dako 等产品,如何准确、快速制备获得一株优异的 PR-A 单克隆抗体从经济、社会层面显得尤为重要。本研究的重点在于选择适当的实验方法,快速、准确的获得 PR-A 型单克隆抗体,为后续的研究提供物质支持。

1 材料与方法

1.1 主要原材料 PR cDNA 基因购于 Origene 公司;pET-28a 质粒载体、DH5 α 、BL-21 菌株均由河南中医学院惠赠;无缝克隆试剂盒购于上海近岸生物;PCR 引物交由上海生工生物合成;NdeI 与 XhoI 内切酶购于 TaKaRa 公司;His 纯化柱、Protein G 纯化柱为 GE 公司产品;快免佐剂为北京博奥龙产品;雌性 8 周龄 BALB/c 小鼠购于河南省动物实验中心;SP2/0 细胞株由本实验室保存;PR-A、PR-B 免疫组

①河南赛诺特生物技术有限公司,郑州市病理诊断工程技术研究中心,郑州 450001。

②通讯作者:E-mail:biozy@126.com。

作者简介:赵小磊(1965年-),女,高级工程师,主要从事医疗器械技术评审、医疗器械注册核查、医疗器械 GMP 检查、药品 GSP 认证、药品注册核查的工作,E-mail:18638775977@126.com。

通讯作者及指导教师:齐华(1963年-),男,高级实验师,主要从事细胞生物学和医学遗传学的研究工作,E-mail:qihua63@163.com。

化单克隆抗体为 leica 公司克隆号分别为: 16 和 SAN27; 其他各类化学试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 目的条带 PCR 扩增 设计 PR-A 上下游引物, 由购买的 PR 全长基因, 截选 492 ~ 1 443 bp 之间的 DNA 片段, 设计上下游引物分别为: 5'-GCCTG-GTGCCGCGCGGCAGC-CATATG-ATGAGCCGGTCC-GG-3' 和 5'-GTGGTGTTGGTGGTGGTG-CTCGAG-CT-TGCAGGGCGGCGGC-3'。PCR 扩增目的条带, 选用的扩增聚合酶为 KOD 酶, 扩增程序: 94℃ 7 min 预变性, 94℃ 30 s 变性, 55℃ 退火 30 s, 68℃ 延伸 60 s, 循环次数为 30 次。PCR 结束后经 1% 核酸凝胶电泳鉴定并切胶回收备用。

1.2.2 质粒双酶切及无缝克隆构建重组质粒 将 pET-28a 依照 TaKaRa 产品说明书的要求, 在 Buffer K 缓冲液条件下, 经 Nde I 与 Xho I 内切酶在 37℃ 下酶切 2 h。后经核酸凝胶电泳回收酶切后质粒备用。将 PCR 扩增获得的目的片段与 pET-28a 双酶切载体片段按照无缝克隆试剂盒说明书的要求, 按照一定比例混合后, 加入 Buffer 与重组酶, 在 37℃ 下孵育 20 min 转入 DH5α 菌中, 后涂含抗生素平板。

1.2.3 重组质粒的鉴定与表达纯化 将 1.2.2 中挑取菌克隆扩大培养, 抽提质粒, 利用 Nde I 和 Xho I 双酶切鉴定, 同时将出现目的条带的单克隆菌送测序, 判断有无突变。将抽提质粒转入 BL-21 菌感受态细胞中, 在 IPTG 诱导后利用 PBS 缓冲液超声破碎, 鉴定目的蛋白有无表达, 蛋白为可溶性还是包涵体形式。后经过 His 柱纯化, 获得目的蛋白。

1.2.4 目的蛋白免疫与效价检测 获得的目的蛋白, 经快免佐剂免疫后, 按照 50 μg/只剂量注射入小鼠腿部肌肉, 经过两次免疫后检测小鼠抗体效价水平, 评价此免疫效果, 融合前选择最佳的一只小鼠尾部静脉冲击加强免疫目的蛋白大约 50 μg。

1.2.5 细胞融合及抗体筛选与纯化 首先观察并收集 SP2/0 细胞株, 经 1 200 r/min 离心 10 min。取小鼠脾脏经研磨器研磨, 滤网过滤后离心, 除去未完全解离部分。分别计数 SP2/0 与脾细胞的数目, 将两者按照 1:5 的比例进行混合, 1 200 r/min 离心 10 min。在 PEG1500 诱导剂的诱导下进行融合。融合后按照 10 万细胞/孔进行铺板, 在 HAT 溶液的选择性筛选作用下, 培养细胞生长至孔底约 30% 以上。包被目的蛋白(1.2.3 中所获得) 200 ng/孔至 ELISA 微孔板中, 4℃ 过夜。通过 ELISA 间接法检测融合

后的细胞株, 将阳性细胞株克隆化, 验证后培养细胞, 将细胞数目按照 50 万 ~ 200 万/只, 注射经石蜡油致敏的小鼠腹腔进行增殖, 待 10 ~ 15 d 左右采集腹水, 经过 Protein G 柱进行纯化, 获得单克隆抗体。

1.2.6 单克隆抗体初步鉴定 将可能为 PR-A 的目标性单克隆抗体分别与选取自郑州大学第一附属医院已确定的乳腺癌、子宫肌瘤癌、甲状腺癌、平滑肌瘤组织, 每个组织连续切 6 张片子, 其中 3 张片子利用 leica PR-A 抗体(克隆号 16) 鉴定, 同时对照使用自制 7C7 抗体作为对照, 统计结果。经过 leica 的 Bond III 型自动免疫组化仪进行机器自动免疫组化验证, 获取的结果进行分析, 评价上述制备获得的单克隆抗体。

2 结果

2.1 PCR 扩增目的条带及重组质粒的鉴定结果

图 1 中 PCR 目的条带位置正确, 并且由图 2 可以发现, 从 DH5α 中提取获得的质粒, 经 Nde I 和 Xho I 双酶切鉴定发现, 在 1 000 bp 以上位置处出现一条明显的目的条带, 说明构建重组的质粒正确。

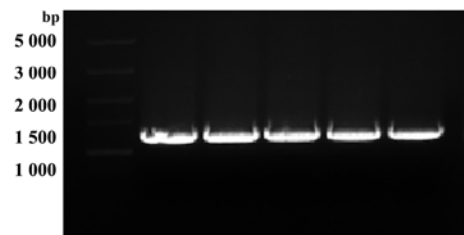


图 1 PCR 目的条带核酸电泳结果

Fig.1 Electrophoresis results of PCR (PR) nucleic acid

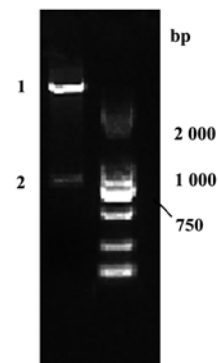


图 2 PR 双酶切鉴定结果

Fig.2 Results of PR double digestion

Note: 1. Double digested plasmid vector of pET-28a; 2. Double digestion of target band.

2.2 测序结果 经送至上海生工生物测序基因的反馈结果所示,构建至 pET-28a 上的 PR 基因序列 492 ~ 1 443 bp 序列为发现突变位点,同时由测序位点至引物两端 pET-28a 序列包含 His 标签序列段也正确,可以进行后期蛋白诱导验证及表达收集工作。

2.3 重组蛋白的表达与鉴定 重组质粒转入 BL-21 菌株中,在 IPTG 的诱导后,经过 His 标签柱纯化,纯化结果如图 3 所示。目的蛋白的大小与理论蛋白大小位置处 (35 kD) 基本相同。

2.4 单克隆抗体纯化结果 在经过细胞融合获得的阳性细胞株 7C7,注入小鼠腹腔后制备腹水,将腹水经过 Protein G 柱纯化后 SDS-PAGE 电泳鉴定如图 4 所示,结果显示:纯化后的条目的条带位置分别在大约 50 kD 与 25 kD 左右,分子量与小鼠单克隆抗体的分子量相同,目的条带正确。

2.5 单克隆抗体 IHC 鉴定 将纯化获得的单克隆抗体 7C7 分别与从郑大一附院获得的乳腺癌组织 (PR-A 强阳性、RP-B 强阳性)、直肠癌组织、平滑肌瘤组织、子宫肌瘤组织分别进行免疫组化验证。实验统计结果如表 1 所示。选取部分结果图如图

5 所示,从表 1、图 5 可知,抗体 7C7 与 RP-B 组织识别为阴性,与其余呈阳性,与子宫肌瘤呈阳性,说明本抗体基本可以达到诊断使用抗体,后续需进一步验证。

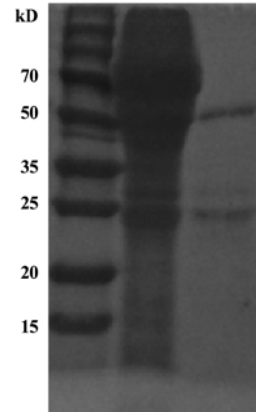


图 4 抗体 7C7 经 Protein G 纯化 SDS-PAGE 电泳鉴定结果图

Fig. 4 Antibody 7C7 purified by Protein G and electrophoresis results by SDS-PAGE

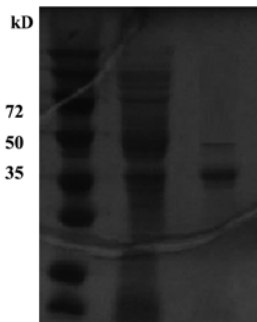


图 3 重组蛋白纯化后鉴定

Fig. 3 Recombinant protein was identified after purification

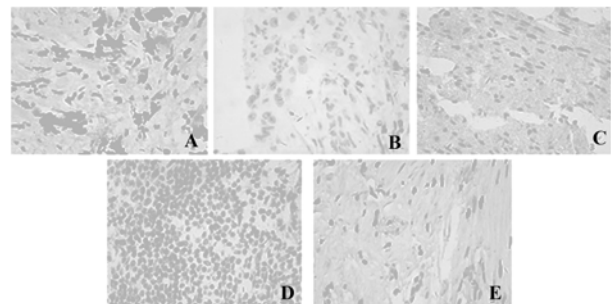


图 5 7C7 抗体各组织免疫组化结果

Fig. 5 Antibody 7C7 IHC results of organizations

Note: A. PR-A-positive breast cancer; B. PR-B positive; C. Smooth muscle tumors; D. Colorectal cancer; E. Uterine fibroid tissue.

表 1 各类组织中 leica PR-A 与 7C7 比较结果统计

Tab. 1 Results of statistical that leica PR-A comparison with 7C7 in all kinds of organizations

		Breast tissue		Breast tissue PR (-)	Colorectal cancer tissue	Leiomyoma	Uterine fibroid tissue
		PR-A	PR-B				
Leica	1	+++	-	-	-	-	+++
	2	+++	-	-	-	-	+++
	3	+++	-	-	-	-	+++
	4	+++	-	-	-	-	+++
7C7	5	+++	-	-	-	-	+++
	6	+++	-	-	-	-	+++

3 讨论

有研究结果结合目前临床的统计值指出^[4]:在浸润性乳腺癌的患者病例当中,约有一半 PR-A、PR-B 失去共表达的特点,结果中约有 80% 以上为 PR-A 过表达。在正常乳腺组织当中 PR-A 与 PR-B 为共表达,在不典型增生、DCIS 和多数浸润性乳腺癌中的 PR-A、PR-B 均为非共表达。那么,可以揭示出 PR-A、PR-B 对指导乳腺癌的发生及其类型有着重要意义。同时,因为 PR-A 的表达与 ER 呈正相关而 PR-B 则没有,在浸润性导管癌中 PR 亚型的表达与肿瘤组织学分级相关,但是与淋巴结状态、肿瘤大小、患者预后无关^[5]。因此,制备 PR-A 单克隆抗体在免疫组化实验中的应用价值就有着突出重要的意义。

目前受限于免疫组化当中组织样本预先处理的影响,在免疫组化石蜡组织中,需要对已经变性的抗原进行修复,在制备单克隆抗体的过程当中对于抗原的选择考虑可以通过原核来进行解决,其蛋白的有关结构特点可能会源自一些保守的蛋白序列位置,基于此考虑,选择 492 ~ 1 443 bp 碱基处的序列得到的蛋白进行免疫,并制备获得单克隆抗体。在抗原制备方面,选择无缝克隆的重组方式,可更快、更高效的获得重组质粒。并且结合快免佐剂的特点,整个抗体制备周期可以大大缩减。可以降低由购自国外抗体产生的较高成本,为有能力完成上述

实验的实验室提供借鉴意义。通过结果验证,发现制备出的 PR-A 克隆号 7C7 单克隆抗体不与 PR-B 存在交叉,且在乳腺癌、子宫肌瘤组织中呈现阳性,在甲状腺癌组织、平滑肌组织中呈现阴性,符合免疫组化当中评价抗体的原则,受限于获得样本的数量有限,后期针对该抗体的亲和力、与其他组织的验证实验需进一步完善。

参考文献:

- [1] Horwitz KB, Alexander PS. In situ photolinked nuclear progesterone receptors of human breast cancer cells: subunit molecular weights after transformation and translocation [J]. *Endocrinology*, 1983, 113 (6) :2195-2201.
- [2] 黎佩怡,李粉霞,孙敏英,等. 广东汉族女性 TAP2 基因单核苷酸多态性与散发性乳腺癌相关性研究 [J]. *中国免疫学杂志*, 2011, 27 (11) :997-1001.
- [3] 卢小梅,陈书媛,黄受方,等. 乳腺癌石蜡切片中显示雌、孕激素受体方法和阳性结果判断标准的探讨 [J]. *中华病理学杂志*, 1996, 26 (6) :329-331.
- [4] Mote PA, Bartow S, Tran N, et al. Loss of co-ordinate expression of progesterone receptors A and B is an early event in breast carcinogenesis [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2002, 72 (2) :163-172.
- [5] Ariga N, Suzuki T, Moriya T, et al. Progesterone receptor A and B isoforms in the human breast and its disorders [J]. *Jpn J Cancer Res*, 2001, 92 (3) :302-308.

[收稿 2015-11-30 修回 2016-04-25]

(编辑 许四平)

• 消息 •

《中国免疫学杂志》被国际著名检索机构收录通知

根据国际检索机构给中国科学技术期刊编辑学会国际交流工作委员会、中国高校科技期刊研究会对外联络委员会发来的电子邮件及其附件统计整理《中国免疫学杂志》被以下八种国际重要检索系统列为来源期刊:

- 1) 美国《化学文摘(网络版)》(CA);
- 2) 美国《剑桥科学文摘(自然科学)》(CSA(NS), Cambridge Scientific Abstracts(Natural Science));
- 3) 波兰《哥白尼索引》(IC, Index of Copernicus);
- 4) 《日本科学技术振兴机构(中国文献数据库)》(JST, Japan Science & Technology Agency (Chinese Bibliographic Database));
- 5) 美国《乌利希期刊指南(网络版)》(UPD, Ulrich's Periodicals Directory);
- 6) 英国《国际农业与生物科学研究中心》(CABI, Centre for Agriculture and Bioscience International);
- 7) WHO 西太平洋地区医学索引(Western Pacific Region Index Medicus, WPRIM);
- 8) 英国《公共健康研究数据库》(Global Health)。

《中国免疫学杂志》编辑部