①

*LRRC*4 多抗制备及在构建不同级别脑胶质瘤差异表达中的应用

李 丹,武明花,陈琼,黄 河,黄 琛,李伟松,李小玲,李桂源
(中南大学肿瘤研究所,长沙 410078)

[摘要] 目的:制备免抗脑瘤候选抑瘤基因 *LRRC*4(leucine-rich repeats containing 4)的多克隆抗体,应用该抗体检测 *LRRC*4 表达与脑胶质瘤病理分级的相关性。方法:应用 DS Gene1.1 软件分析 *LRRC*4 全长蛋白,避开跨膜结构域,选取亲水性及抗原性均好的蛋白序列。构建相应的融合表达载体 pGEX-4T-2/276 bp,转入 *E. coli* JM109 中 IPTG 诱导表达。融合蛋白经纯化后免疫新西兰兔,收集并纯化抗血清,获得免抗人 *LRRC*4 多抗,应用该抗体通过 Western 印迹和免疫组织化学检测 *LRRC*4 在正常人胚胎各器官组织中的表达及其在正常脑组织与各级脑胶质瘤中的表达差异。结果:制备了效价高、特异性好的免抗人 *LRRC*4 多抗,进一步证实了 *LRRC*4 在正常人脑组织中相对特异高表达,在脑胶质瘤中表达下调(22 例/37 例)或缺失(15 例/37 例),其表达水平与脑胶质瘤的病理分级相关。结论:免抗人 *LRRC*4 多抗效价高、特异性好,应用该抗体检测到 *LRRC*4 的表达水平与脑胶质瘤病理分级密切相关,为 *LRRC*4 后续的研究工作奠定了基础。

[关键词] *LRRC*4; 多克隆抗体; 脑胶质瘤; 病理分级
[中图分类号] R73-3;R739.4 [文献标识码] A [文章编号] 1672-7347(2007)03-0373-07

Preparation of anti-*LRRC*4 polyclonal antibody and its application in constructing expression profile of human gliomas with different pathological grades

LI Dan, WU Ming-hua, CHEN Qiong, HUANG He, HUANG Chen, LI Wei-song, LI Xiao-ling, LI Gui-yuan
(*Cancer Research Institute*, *Central South University*, *Changsha* 410078, *China*)

Abstract: Objective To prepare anti-*LRRC*4 polyclonal antibody and analyze the correlation between the expression of *LRRC*4 and pathological grades of gliomas in rabbits. **Methods** Appropriate protein sequence with good hydrophilicity and antigenicity was chosen by analyzing with DS Gene 1.1 software. The corresponding nucleic acid sequence amplified by PCR was used to construct a recombinant pGEX-4T-2/276 bp. *E. coli* JM109 transformed with the recombinant was induced by IPTG to express GST - fusion protein, and the fusion protein expressed as insoluble inclusion bodies. Then the purified inclusion body was used to immunize rabbits. Once the titer of antiserum reached $1:10^8$ by indirect ELISA, the serum was collected and purified. The expression-profile of *LRRC*4 in

①**收稿日期(Date of reception)** 2006-09-07
作者简介(Biography) 李丹(1981-),女,湖南邵阳人,博士,主要从事脑瘤候选抑瘤基因 *LRRC4* 的功能研究。
通讯作者(Corresponding author) 李桂源,E-mail:ligy@xysm.net;并列通讯作者:武明花,E-mail:wuminghua554@sohu.com
基金项目(Foundation items) 国家重大科学研究计划(2006CB910502,2006CB910504);国家自然科学基金(30600224);湖南省自然科学基金(06JJ20080);中国博士后科学基金(20060400265) This work was supported by Stat Key Science Research Program of China (2006CB910502, 2006CB910504); National Science Foundation of China (30600224); Natural Science Foundation of Human Province of China (06JJ20080); Postdoctoral Science Foundation of China (20060400265)

embryonic tissues and gliomas with various pathological grades were obtained by western blot and immunohistochemistry with the anti-*LRRC*4 polyclonal antibody. **Results** The highly specific anti-*LRRC*4 polyclonal antibody whose titer reached $1:10^8$ was prepared. The relatively specific expression of *LRRC*4 was detected in the normal brain, but reduced expression or loss of expression in gliomas was also noticed by immunohistochemistry, and there was a correlation between the expression level of *LRRC*4 and the pathological grade of gliomas. **Conclusion** The anti-*LRRC*4 polyclonal antibody with high titer and specificity has been obtained. A correlation between the expression level of *LRRC*4 and the pathological grade of gliomas is detected, which lays the foundation for advanced research of LRRC4.

Key words: *LRRC*4; polyclonal antibody; gliomas; pathological grade

[*J Cent South Univ (Med Sci)*, 2007,32(3):0373-07]

我室前期运用 EST 介导的定位候选克隆策略结合 5′-RACE 技术从多种肿瘤高频缺失区 7q31-32 克隆了一富亮氨酸重复(leucine-rich repeat, LRR)超家族新成员 *LRRC*4[1-2],GenBank 登录号为 AF 196976。前期的研究结果表明 *LRRC*4 是一个脑胶质瘤候选抑瘤基因[3-6]。本研究在前期研究的基础上,着重于 *LRRC*4 多克隆抗体的制备,并应用该抗体检测 *LRRC*4 在正常人胚胎各器官组织中的表达及其在正常脑组织与脑胶质瘤中的表达差异,探讨 *LRRC*4 与脑胶质瘤发生发展的关系,为 *LRRC*4 的深入研究提供有利的工具。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 酶及试剂 限制性内切酶 *Eco*RI, *Xho*I 及 λDNA/*Hin*dIII 购自华美生物工程公司,Pyrobest 高保真酶、T4 PNK 及 DNA Marker DL2000 购自大连宝生物工程有限公司,T4 DNA 连接酶购自 Promega公司。小量质粒抽提纯化试剂盒、小量胶回收试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司,Western 印迹检测试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒和 1-Step™ ABTS 购自 Pierce 公司,免疫组织化学染色试剂盒 SP-9001,DAB 及 AEC 显色试剂盒购自北京中杉金桥生物技术公司(本文中如未作特殊标明,均为 AEC 染色)。抗谷胱甘肽转移酶单抗及弗氏佐剂购自 Sigma 公司, Protein A Agrose 购自 Santa Cruz 公司。

1.1.2 引物 引物由大连宝生物工程有限公司合成。用于构建重组体 pGEX-4T-2/345bp 的引物:5′-TTTGAATTCTGGAGACCACGGAGATCTCGCCT-3′,含 *Eco*RI 酶切位点;5′-AAGCTCGAGTGTCT-TCGTCCACCTGGATTAT-3′,含 *Xho*I 酶切位点。用于构建缺失体 pGEX-4T-2/276 bp 的引物:5′-CG-TAAGCGGCACCAGCAGCGGAGT-3′;5′-CTTGGTGGTC TTCATGACTTCATC-3′。

1.1.3 质粒载体、菌株及细胞 pGEX-4T-2 原核表达载体购自 Amersham Pharmacia Biotech 公司,pcDNA3.1(+)/LRRC4 为我室构建保存,*E. coli* JM109 感受态细胞购自大连宝生物工程有限公司,U87 恶性胶质瘤细胞购自美国 ATCC。

1.1.4 组织标本及实验动物 正常胚胎各器官组织标本取自 6~7 月龄经水囊引产的男性胚胎,来源于湖南省妇幼保健院。脑瘤病理标本来源于中南大学湘雅医院病理科,均根据 WHO 诊断标准进行确诊。

纯种清洁级新西兰兔,雄性,3 月龄,每只 2~3 kg,共 4 只,购自上海中科院动物实验室,由中南大学动物学部代为饲养。

1.2 方法

1.2.1 重组体 pGEX-4T-2/345 bp 及缺失体 pGEX-4T-2/276 bp 的构建 以 pcDNA3.1(+)/LRRC4 为模板用 Pyrobest 高保真酶进行 PCR 扩增,构建 pGEX-4T-2/345 bp 重组体,经测序证实后采用一步 PCR 扩增法[6]构建缺失体 pGEX-4T-2/276 bp,将含插入片段的阳性克隆送往上海博亚生物技术有限公司测序。

1.2.2 融合蛋白的诱导表达、鉴定与纯化 挑取空白载体 pGEX-4T-2、缺失体 pGEX-4T-2/276 bp 单菌落分别接种至 AMP^+(100 μg/mL)的 LB 培养基中,37 ℃振荡培养过夜。按1:100 比例将过夜培养菌液分别接种至 AMP^+ LB 培养基中,37 ℃振荡培养至 $A_{600}=0.6\sim0.8$ 时,加入 IPTG 至终浓度为 1.0 mmol/L 继续培养 5 h,离心收集菌体,采用超声破碎裂解细菌蛋白进行 SDS-PAGE 分析。融合蛋白诱导成功后以抗谷胱甘肽转移酶单抗作

为一抗应用 Western 印迹进行鉴定。按上述条件将含缺失体 pGEX-4T-2/276 bp 的菌液大量诱导后离心收集菌体,加入预冷的 PMSF 终浓度为 0.1 mmol/L 的细菌裂解缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl pH 8.5~9.0,2 mmol/L EDTA pH 8.0,100 mmol/L NaCl,0.5% TritonX-100,1 mg/mL 溶菌酶)重悬,超声破碎裂解后离心收集沉淀,沉淀经含 0.2%脱氧胆酸,1.0 mol/L 尿素的 0.1 mol/L Tris-HCl 反复洗涤后进行 SDS-PAGE 分析,观察纯化效果。

1.2.3　多克隆抗体的制备、纯化及鉴定　动物免疫前,由耳缘静脉采血,间接 ELISA 及 Western 印迹检测免疫前血清与 LRRC4 蛋白的反应性,证实免疫前兔血清中不含 LRRC4 的天然抗体,同时留取一部分作为阴性对照。用适量生理盐水重悬纯化的包涵体蛋白,与等体积弗氏佐剂充分研磨乳化后采用背部皮下多点注射免疫,初次免疫用弗氏完全佐剂,加强免疫用弗氏不完全佐剂,免疫剂量为 0.5~1.0 mg/kg。于初次免疫后第 3 周进行第 1 次加强免疫,第 6 周进行第 2 次加强免疫。每次加强免疫后 5~7 d 由耳缘静脉采血,ELISA 检测抗体效价,当效价达到预期水平时,采用颈动脉放血法收集抗血清。抗血清经硫酸铵沉淀法粗提纯、与大肠杆菌裂解液共同温育[7]、Protein A 亲和层析以及免疫吸附[8]等一系列方法纯化后,进行 Western 印迹及免疫细胞化学鉴定。

1.2.4　Western 印迹及免疫组织化学检测 *LRRC*4 在胚胎各器官组织及脑胶质瘤中的表达　抽提胚胎各器官组织总蛋白,以纯化后的多克隆抗体按1∶2 000 稀释作为一抗,Western 印迹检测 *LRRC*4 在正常胚胎各器官组织中的表达。同时将胚胎各器官组织标本制作成石蜡切片,切片经烤片、脱蜡、水化后采用高压热修复抗原,纯化后的多克隆抗体以1∶2 000 稀释作为一抗,同时以 PBS 和免疫前血清作对照,通过免疫组织化学实验检测 LRRC4在正常胚胎各器官组织中的表达及在正常脑组织与脑胶质瘤中的表达差异。

2　结　　果

2.1　生物信息学分析　运用 DS Gene1.1 软件分析 LRRC4 全长蛋白的亲水性及抗原性,根据软件分析结果(图 1),初步选取第 460~574 位氨基酸的一段蛋白序列(核苷酸长度为 345 bp,图 1 中红色和紫色部分)来制备抗体,但其中包含一段亲水性及抗原性极差的跨膜序列(第 528~550 位氨基酸,图 1 中紫色部分),考虑用这一段跨膜序列缺失后的蛋白序列(核苷酸长度为 276 bp)来制备抗体可能效果会更好,将缺失后的蛋白序列返回至蛋白数据库进行匹配,证实该序列特异性好。

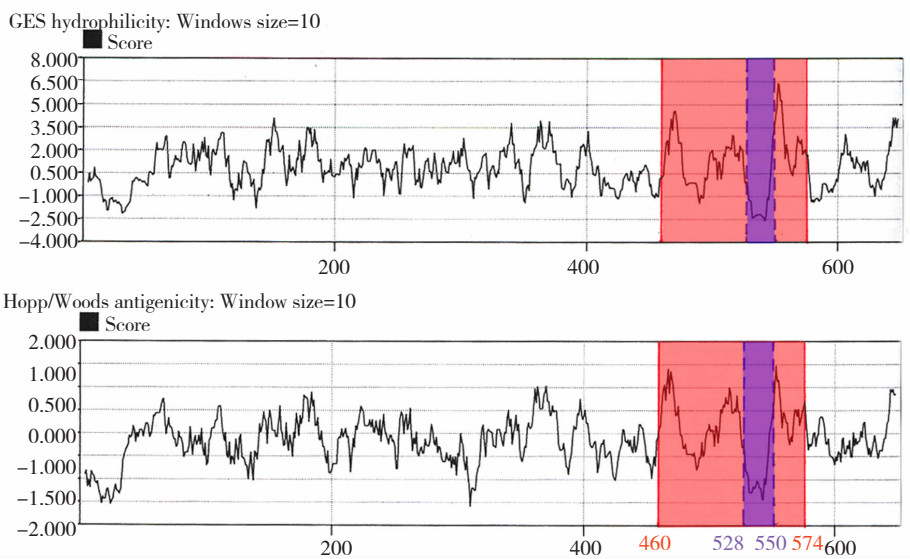

图 1　DS Gene1.1 软件分析 LRRC4 全长蛋白的亲水性及抗原性

Fig. 1 Analyzing the hydrophilicity and antigenicity of LRRC4 protein with DS Gene1.1

2.2　重组体 pGEX-4T-2/345 bp 及缺失体 pGEX-4T-2/276 bp 的构建　以 pcDNA3.1(+)/LRRC4 为模板采用定向克隆法构建重组体 pGEX-4T-2/345 bp,经 *Eco*RI 和 *Xho*I 双酶切鉴定,其酶切产物分别在 4.9 kb 和 345 bp 处出现条带,经测序证实后以其为模板采用一步 PCR 法构建缺失体 pGEX-4T-2/276 bp,酶切鉴定结果显示其产物分别在 4.9 kb 和 276 bp 处出现条带(图 2),并经测

序进一步证实。

2.3 GST 融合蛋白的诱导表达、鉴定与纯化 缺失体 pGEX-4T-2/276 bp 转化菌株经 IPTG 诱导后与空白载体 pGEX-4T-2 转化菌株诱导组比较,其细菌裂解液中有一明显的新生蛋白条带(36 kD,与理论预测值一致),且该蛋白在上清中分布很少,主要以包涵体形式存在(图 3A),经 Western 印迹检测证实该新生蛋白条带为 GST 融合蛋白(图 3B)。包涵体沉淀经含 0.2% 脱氧胆酸,1.0 mol/L 尿素的 0.1 mol/L Tris-HCl 反复洗涤后获得较高浓度的融合蛋白,灰度扫描显示纯度高达 80% 以上(图 3C)。

2.4 多克隆抗体效价的测定 以洗涤纯化后的包涵体蛋白为抗原免疫新西兰兔,于第 2 次加强免疫后 5 ~ 7 d 由耳缘静脉采血,经间接 ELISA 检测抗体效价为1∶10^8 以上(图 4)。

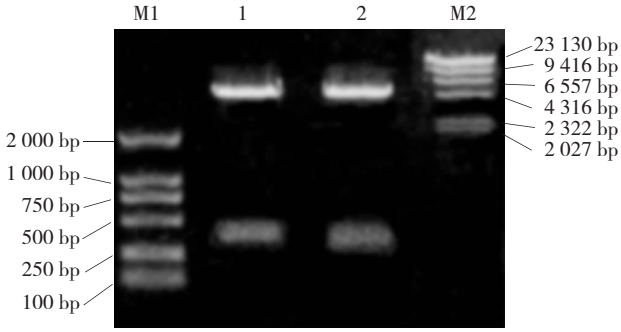

图 2 重组质粒 pGEX-4T-2/345 bp 和 pGEX-4T-2/276 bp 的鉴定

Fig. 2 Identification of pGEX-4T-2/345 bp and pGEX-4T-2/276 bp M1: DNA marker (DL2000); M2: DNA marker (λDNA/*Hin*d III); 1: pGEX-4T-2/345 bp digested by *Eco*RI and *Xho*I; 2: pGEX-4T-2/276 bp digested by *Eco*RI and *Xho*I

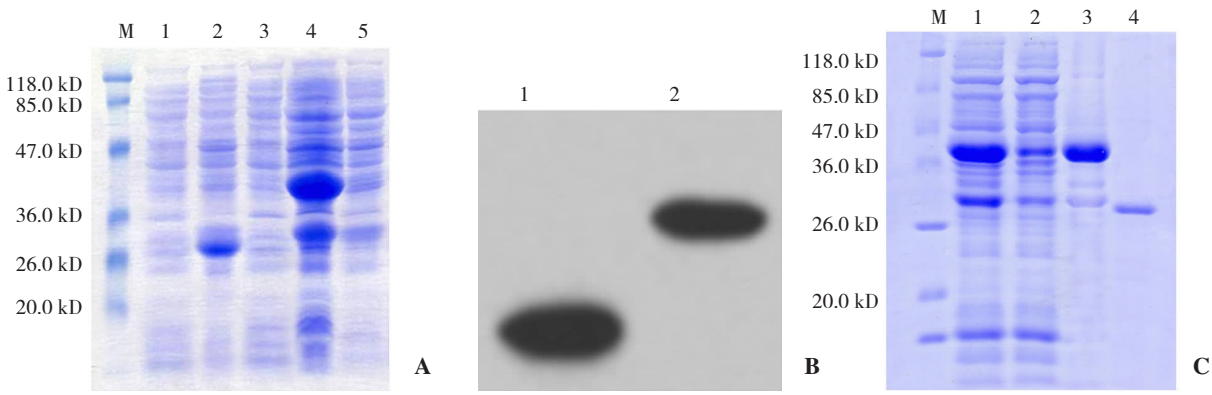

图 3 融合蛋白的诱导表达、鉴定与纯化 A:SDS-PAGE 胶分析 GST 融合蛋白的表达;B: Western 印迹分析 GST 融合蛋白的表达;C: GST 融合蛋白的纯化

Fig. 3 Induction, identification, and purification of GST-fusion protein A: SDS-PAGE analysis of GST-fusion protein expression M: Protein marker; 1: pGEX-4T-2 expressed in *E. coli* JM109 before IPTG induction; 2: pGEX-4T-2 expression after induction; 3: pGEX-4T-2/276 bp expression before induction; 4: pGEX-4T-2/276 bp expression after induction; 5: Dissoluble pGEX-4T-2/276 bp expression after induction; B: Western blot analysis of GST-fusion protein; 1: GST protein; 2: GST-fusion protein; C: Purification of GST-fusion protein; M: Protein marker; 1: pGEX-4T-2/276 bp expression after induction; 2: Dissoluble pGEX-4T-2/276 bp expression after induction; 3: Purified GST protein; 4: Purified GST-fusion protein

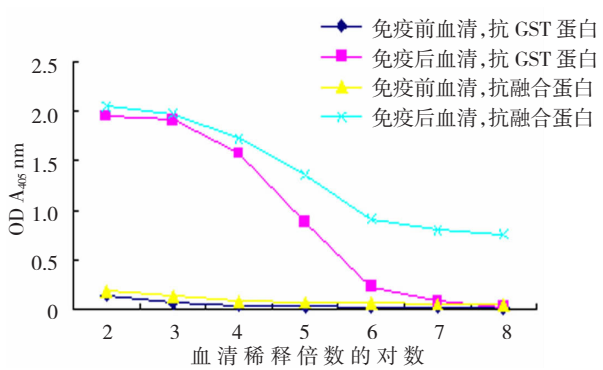

图 4 间接 ELISA 检测抗 *LRRC4* 多克隆抗体的效价

Fig. 4 Titer analysis of antiserum by indirect ELISA

2.5 *LRRC4* 多克隆抗体的鉴定 以纯化后的多抗 1∶2 000 稀释通过 Western 印迹检测其与 GST 蛋白、融合蛋白、转染了质粒 pcDNA3.1(+)/LRRC4的 U87 细胞的总蛋白及胎脑组织匀浆上清的反应性,结果显示纯化后的多抗不能与 GST 蛋白结合,但仍能识别融合蛋白,也能在转染了 pcDNA3.1(+)/LRRC4 的 U87 细胞的总蛋白和胎脑组织匀浆上清中检测出 LRRC4 蛋白。将转染了质粒 pcDNA3.1(+)/LRRC4 的 U87 细胞和未转染质粒 pcDNA3.1(+)/LRRC4 的 U87 细胞分别制成细胞爬片,以自制的抗体1∶2 000 稀释作为一

抗,应用免疫细胞化学实验进一步验证该抗体的实用性(图 5)。

2.6　应用 *LRRC*4 多克隆抗体免疫组织化学检测 LRRC4 在正常胚胎各器官组织中的表达　结果显示,LRRC4 在正常脑组织中相对特异高表达,而在心、肝、肺、食管、小肠、肾、膀胱、睾丸、胸腺、胰腺、肾上腺、皮肤等组织中未检测到表达(图 6)。

2.7　LRRC4 在各级脑胶质瘤中的表达及其与脑胶质瘤病理分级的关系　应用免疫组织化学方法检测 LRRC4 在各级脑胶质瘤中的表达(data unpublished),结果显示,LRRC4 在星形胶质细胞瘤 I 级中表达下调,在星形胶质细胞瘤 II 级中表达下调或缺失(10 例表达下调,4 例表达缺失),在星形胶质细胞瘤 III 级中表达缺失[9]。

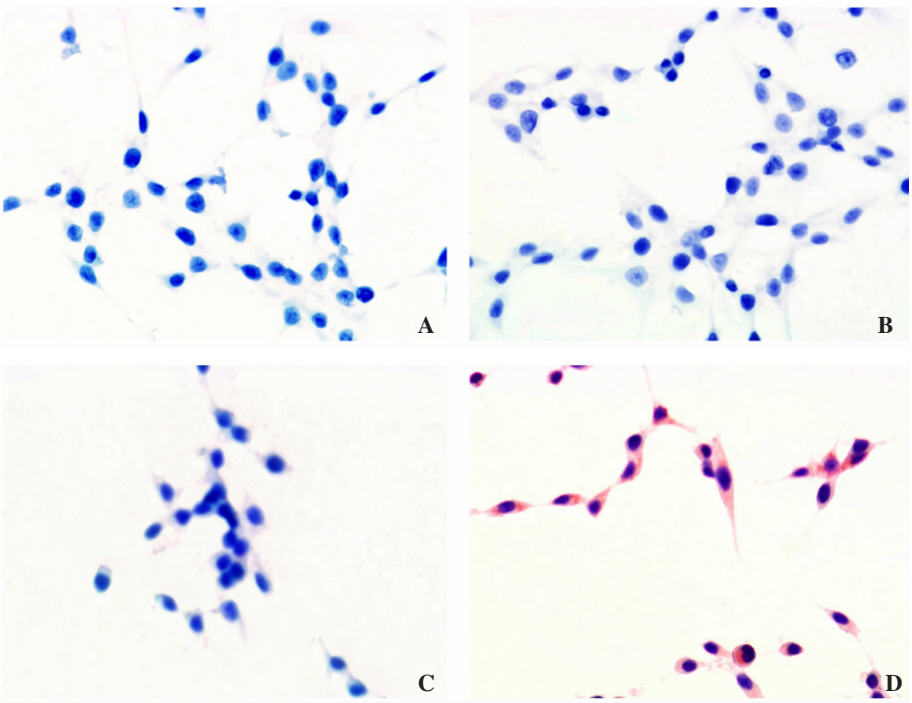

图 5　免疫细胞化学实验检测自制的多抗(×40)　A:U87 细胞,对照组(PBS 为一抗);B:U87 细胞,实验组 LRRC4 表达阴性;C:U87/LRRC4,对照组(PBS 为一抗);D:U87/LRRC4,实验组,LRRC4 表达阳性,阳性信号位于胞浆

Fig. 5 Identification of anti-*LRRC*4 polyclonal antibody by immunocytochemistry(×40)　A: U87 cells not acted by anti-*LRRC*4 antibody, negative staining; B: U87 cells acted by anti-*LRRC*4 antibody, negative staining; C: U87 cells transfected with pcDNA3.1(+)/LRRC4 not acted by anti-*LRRC*4 antibody, negative staining; D: U87 cells transfected with pcDNA3.1(+)/LRRC4 acted by anti-*LRRC*4 antibody, positive staining of LRRC4 protein in cytoplasm

3　讨　　论

对于一个完全抗原而言,它必须同时具备免疫原性和免疫反应性。并非所有肽段都能形成有效的抗原决定簇,只有暴露于分子表面并形成一定空间构象的肽段才能作为功能性表位,刺激抗体产生。通常暴露于分子表面的肽段由亲水性氨基酸组成,而深藏于分子内部的肽段由疏水性氨基酸组成,因此在选择用于制备多克隆抗体的蛋白序列时较为常见的是选择亲水性及抗原性较强的部分,尽量避免跨膜序列。由此,我们运用 DS Gene 1.1 软件对 LRRC4 全长蛋白进行分析,选取其中一段亲水性及抗原性相对较好的蛋白序列用以制备多抗。

实验中发现 ITPG 诱导的 GST 融合蛋白主要以包涵体形式存在,且在 37 ℃ 诱导 5 h 后,其蛋白表达量最高。曾采用降低诱导温度、降低 IPTG 浓度及更换菌株等方法,均未能增加融合蛋白的可溶性。包涵体的形成对于重组蛋白的产生具有以下优势[10]:(1)可溶性外源蛋白在菌体内易受蛋白酶的攻击,而包涵体的形成可以避免蛋白酶对外源蛋白的降解,且对于一些有毒性的蛋白产物而言,包涵体的形成可保护宿主细胞;(2)包涵体的形成使得菌体内可溶性融合蛋白的浓度降低,有利于重组蛋白表达量的提高;(3)包涵体中杂蛋白含量低,有利于分离纯化;(4)包涵体的形成增加了重组蛋白的免疫原性。基于包涵体的上述优点,采用经洗涤纯化的包涵体蛋白免疫新西兰兔获得多克隆抗体。

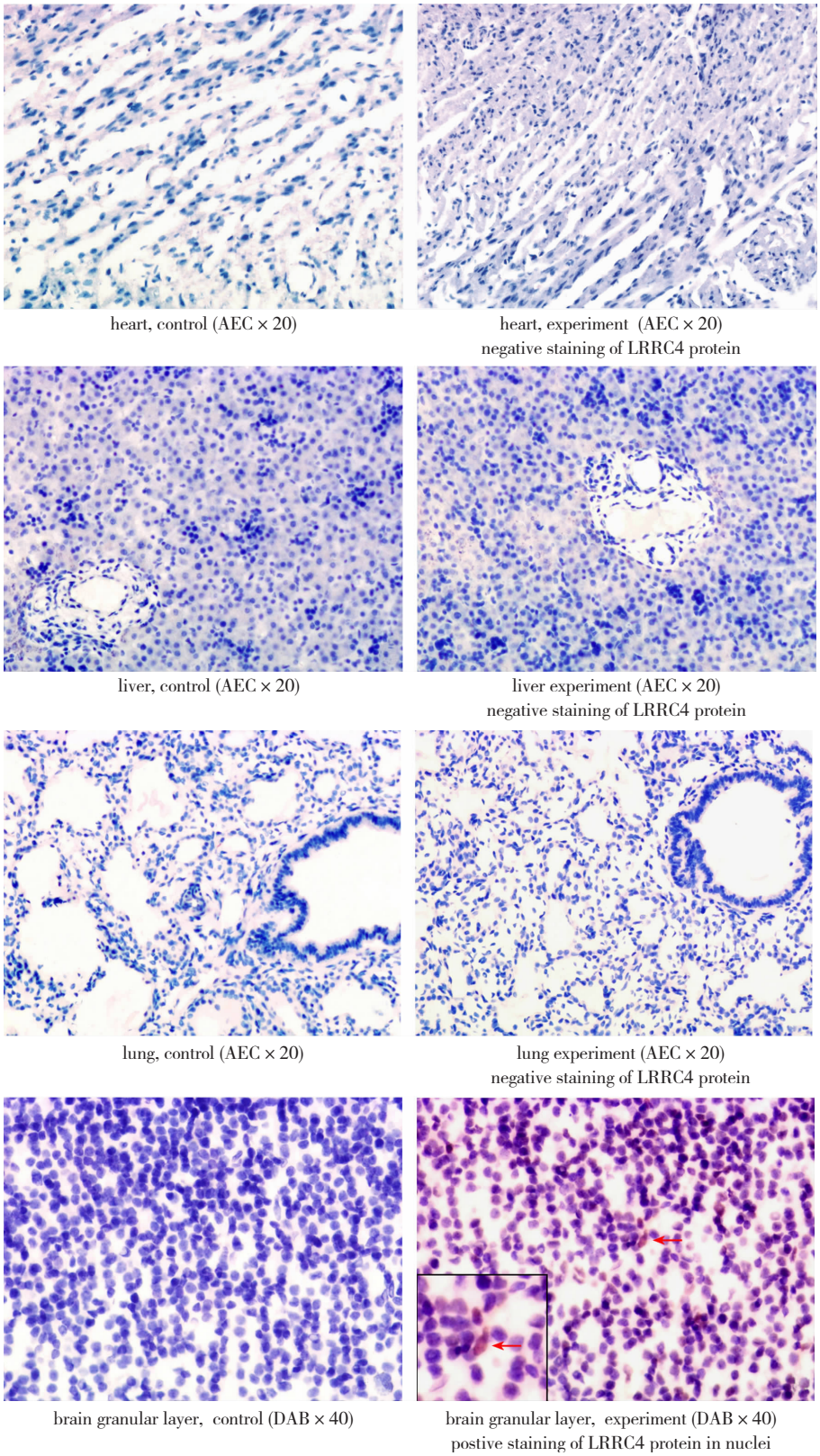

图6 免疫组织化学检测 LRRC4 在胚胎组织中的表达

Fig. 6 Immunochemistry analysis of LRRC4 expression in embryonic tissues with anti-*LRRC*4 antibody

本研究成功获得了效价高、特异性好的抗 LRRC4 多克隆抗体,能以1∶2 000 稀释用于 Western blot 及免疫组织化学实验,从而为疏水性极强的蛋白质的抗体制备提供了较好的范例。应用该抗体

通过 Western 印迹、免疫组织化学实验进一步证实了 LRRC4 为脑组织相对特异性表达基因,其在正常脑组织中高表达,在脑瘤组织中表达下调或缺失,与前期通过 RT-PCR 和 Northern 印迹检测的结果一致[2]。同时发现 LRRC4 的表达水平与脑胶质瘤的病理分级呈负相关亦与 RT-PCR 和 Northern 印迹检测结果一致[6],进一步证实了 LRRC4 在脑胶质瘤发生发展过程中发挥重要作用,其表达缺失参与了脑胶质瘤进程中的晚期事件,从而提示 *LRRC*4 是一个胶质瘤抑制性基因。抗 *LRRC*4 多抗的制备将为深入研究 *LRRC*4 的功能提供有利的工具,从而为今后脑胶质瘤的临床诊断与治疗提供重要的理论基础与实验依据。

参考文献:

[1] 王洁如,宾亮华,钱骏,等. 一个定位于 7q31-32 的鼻咽癌负相关新基因的初步研究[J]. 癌症,2001,20(7):688-691.
WANG Jie-ru, BIN Liang-hua, Qian Jun, et al. Preliminary study of a novel gene negatively associated with nasopharyngeal carcinoma on 7q31-32 [J]. Chinese Journal of Cancer, 2001,20(7):688-691.

[2] 王洁如,钱骏,董利,等. 富亮氨酸重复超家族新成员 LRRC4 的克隆与在脑瘤中的表达分析[J]. 生物化学与生物物理进展,2002,29(2):233-239.
WANG Jie-ru, QIAN Jun, DONG Li, et al. Identification of LRRC4, a novel member of leucine - rich repeat (LRR) superfamily, and its expression—analysis in brain tumor[J]. Prog Biochem Biophys, 2002,29(2):233-239.

[3] 王洁如,李小玲,范松清,等. *LRRC*4 基因表达能降低胶质母细胞瘤细胞系 U251 的生长和成瘤潜能[J]. 癌症,2003,22(9):897-902.
WANG Jie-ru, LI Xiao-ling, FAN Song-qing, et al. Expression of LRRC4 has the potential to decrease the growth rate and tumorigenesis of glioblastoma cell line U251[J]. Chinese Journal of Cancer, 2003,22(9):897-902.

[4] Zhang Q, Wang J, Fan S, et al. Expression and functional characterization of LRRC4, a novel brain-specific member of the LRR superfamily[J]. FEBS Lett, 2005, 579(17): 3674-3682.

[5] Zhang Q H, Wang L L, Cao L, et al. Study of a novel brain relatively specific gene LRRC4 involved in glioma tumorigenesis suppression using the Tet-on system[J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2005,37(8):532-540.

[6] Wu M, Huang C, Gan K, et al. LRRC4, a putative tumor suppressor gene, requires a functional leucine-rich repeat cassette domain to inhibit proliferation of glioma cells in vitro by modulating the extracellular signal-regulated kinase/protein kinase B/nuclear factor-kappaB pathway[J]. Mol Biol Cell, 2006,17(8):3534-3542.

[7] J. 萨姆布鲁克, D. W. 拉塞尔. 分子克隆实验指南[M]. 第 3 版. 北京:科学出版社,2002:1192-1194.
Sam Brook J, Russell D W. Translated by HUANG Peitang. Molecular Cloning: A Laboratory Manual[M]. 3rd, Beijing: Science Press, 2002:1192-1194.

[8] Xiao B, Fan S, Zeng Z, et al. Purification of novel UBAP1 protein and its decreased expression on nasopharyngeal carcinoma tissue microarray[J]. Protein Expr Purif, 2006,47(1): 60-67.

[9] Minghua Wu, Qiong Chen, Dan Li, et al. LRRC4 Inhibits Human Glioblastoma Cells Proliferation, Invasion, and proMMP-2 Activation by Reducing SDF-1α/CXCR4-Mediated ERK1/2 and AKT Signaling Pathways[J]. J Cell Biochem, 2007, Jun 4, [Epub ahead of print]

[10] 吉清. 包涵体复性的研究进展[J]. 国外医学・临床生物化学与检验学分册,2004,25(6):516-518.
JI Qing. Research progress on refolding of inclusion bodies [J]. Foreign Medical Sciences・Section of Clinical Biochemistry and Laboratory Medicine, 2004,25(6):516-518.

(本文编辑　陈丽文)