

酪氨酸磷酸酶 PRL-3 单抗的制备及特性鉴定

王 莉, 杨艳丽, 宋子博, 廖世秀, 黄飞飞

Preparation and Characterization of Monoclonal Antibody against Protein Tyrosine Phosphatase PRL-3

WANG Li, YANG Yan-li, SONG Zi-bo, LIAO Shi-xiu, HUANG Fei-fei

Medical Genetic Institute of He'nan Provincial People's Hospital, Zhengzhou 450003, China

Abstract: Objective To prepare and identify specific Phosphatase of Regenerating Liver-3 (PRL-3) monoclonal antibodies for clinical detection and for further therapeutic intervention. **Methods** Hybridoma technology was used to prepare PRL-3 monoclonal antibodies (MAbs), and the specificities of MAbs against PRL-3 were evaluated by Western blot and immunoprecipitation. Six truncations of PRL-3 were cloned and expressed in prokaryotic cell for identifying the approximate epitope. The binding abilities of MAbs were analyzed by Western blot. **Results** Among 9 hybridoma clones obtained, 6 (9D8, 9E2, 9F4, 11B2, 4D3 and 4D10) could specifically bind to PRL-3, and 4 could react to PRL-3 protein in eukaryotic cells. Clone 9D8, 9E2, 9F4 and 11B2 could bind to the COOH-terminal of PRL-3, and clone 4D3 and 4D10 could bind to 69~95 amino acids. **Conclusion** MAbs 9D8, 9E2, 9F4, 11B2, 4D3 and 4D10 can react only to PRL-3, which provides potential applications in clinical diagnosis and in future study.

Key words: Phosphatases; PRL-3; Monoclonal; Antibodies

摘要:目的 制备并鉴定抗肝再生磷酸酶-3(Phosphatase of Regenerating Liver-3, PRL-3)单克隆抗体,为临床检测和以 PRL-3 为靶点的肿瘤治疗提供可能。**方法** 运用杂交瘤融合技术制备 PRL-3 单克隆抗体,通过 Western blot 检测和免疫沉淀鉴定其与原核及真核 PRL-3 蛋白的反应性;重组并诱导表达 PRL-3 的 6 个截短体,Western blot 分析单抗结合的大致抗原表位。**结果** 共得到 9 株单抗,3 株与 PRL-1、PRL-2 和 PRL-3 均反应,6 株(9D8、9E2、9F4、11B2、4D3 和 4D10)只与 PRL-3 反应,其中 4 株特异性单抗可以与哺乳动物细胞表达的 PRL-3 反应;单抗 9D8、9E2、9F4 和 11B2 可以和 PRL-3 羧基末端(162-173 位氨基酸)的短肽结合;4D3 和 4D10 与中间部分(69~95 位氨基酸)的短肽结合。**结论** 抗体 9D8、9E2、9F4、11B2、4D3 和 4D10 特异性强、亲和力高,为临床检测提供了可靠工具,并为进一步的功能研究奠定了基础。

关键词: 磷酸酶; PRL-3; 单克隆; 抗体

中图分类号: R73-37 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2009)11-0901-04

0 引言

肝再生磷酸酶-3(Phosphatase of Regenerating Liver-3, PRL-3 或 PTP4A3)是近年来发现的参与肿瘤转移的小分子酪氨酸磷酸酶,分子量大约为 22 kD。*prl-3* 定位于染色体 8q24.3,与 *prls* 家族的另两个成员 *prl-1* 和 *prl-2* 分别有 78% 和 75% 的同源^[1]。2001 年, Saha 等^[2] 通过 SAGE (Serial Analysis of Gene Expression) 方法在转移的大肠癌肿瘤细胞中检测到 PRL-3 的表达。随后在胃癌和卵巢癌也发现了 PRL-3 的异常表达^[3-4]。由于目前没有商品化的

PRL-3 单克隆抗体,而多克隆抗体又与家族其他成员的高度同源性而影响特异性。因此本研究采用传统的融合技术制备单抗,结合 Western blot 鉴定抗体特异性,并分析了抗体结合的大致抗原表位,为以后的研究和临床检测提供了有利的工具。

1 材料与方法

1.1 材料

细胞株 SP2/0、COS-7、大肠杆菌 BL21-DE3 为本室保存,表达质粒 pGEX-4T1-PRL-1、-PRL-2 和 PRL-3 及 pcDNA3-PRL-3,为彭丽蓉博士惠赠。雌性 Balb/c 小鼠(6~8 周龄)购自中国医学科学院实验动物中心。异丙基硫代-β-D-半乳糖苷(IPTG)、单抗制备用试剂和抗体类和亚类检测试剂盒购自 Sigma 公司。Taq 酶、各种限制性内切酶和 DNA 连

收稿日期:2009-03-11;修回日期:2009-09-01

基金项目:河南省医学科技创新人才工程资助项目(200585)

作者单位:450003 郑州,河南省人民医院医学遗传研究所

作者简介:王莉(1976-),女,博士,助理研究员,主要从事肿瘤转移机制的研究

接酶为 NEB 公司产品。Protein A-Sepharose、Glutathione-Sepharose-4B 和 ECL 试剂盒为 Amersham 产品。Lipofectamin 2000 为 Invitrogen 公司产品。酶标二抗为北京中杉公司产品。

1.2 方法

1.2.1 GST-PRLs 融合蛋白的表达、纯化 将 pGEX-4T-1-PRLs 转化大肠杆菌 BL21-DE3 后,培养至 A_{600 nm} 为 0.8 左右时,加入 0.5mM 的 IPTG 于 30 °C 诱导表达过夜。低温超声裂解,离心后取上清液,用 Glutathione-Sepharose-4B 珠子反复吸附、PBS 轻洗后洗脱。洗脱后的融合蛋白进行 SDS-PAGE 电泳和染色,鉴定其纯度及含量,-70 °C 保存。

1.2.2 免疫、融合与筛选 采用常规免疫和融合技术,ELISA 筛选只与 GST-PRL-3 反应阳性或与 GST-PRLs 反应阳性而与 GST-无关小肽反应阴性的细胞克隆。

1.2.3 抗体的类和亚类分析及纯化 参照试剂盒说明对单抗类和亚类进行分析。将杂交瘤细胞接种于降殖烷处理后小鼠腹腔制备腹水,两周后取腹水,用 Pharmacia purifier 仪进行纯化。

1.2.4 抗体的 Western blot 鉴定 将等量的原核表达产物 GST-PRL-1、GST-PRL-2 和 GST-PRL-3 行 12% 的 SDS-PAGE 电泳和转膜后,以杂交瘤上清液为一抗,室温孵育 1 h,PBS 清洗;二抗室温孵育 45 min,PBS 清洗后,ECL 发光。同时用 Lipofectamin 2000 将真核表达质粒 pcDNA3-PRL-3 瞬时转染 COS-7。48 h 后收集细胞并在 4 °C 用 RIPA 裂解细胞,煮沸上样,进行上述检测。

1.2.5 免疫沉淀鉴定 将转染 PRL-3 的 COS-7 细胞裂解液用 50 μl Protein A-Sepharose 珠子 4 °C 预吸附后,加入不同的杂交瘤上清液或正常鼠 IgG,4 °C 振荡过夜;次日分别加入 Protein A-Sepharose 珠子 4 °C 振荡 4 h,离心弃上清液,0.05% Tween-PBS 轻洗 2 次后煮沸上样,进行 Western 检测。

1.2.6 PRL-3 不同截短体的重组和表达 根据抗原性分析软件得到 PRL-3 的可能抗原表位及其与 PRL-1、PRL-2 氨基酸序列的差异,直接合成两个特异性肽段(77~98 位氨基酸,162~173 位氨基酸,分别简称为 P77 和 P162)相应的核苷酸序列,并 PCR 扩增中间大片段(45~145 位氨基酸,简称为 P45)及 3 个短片段(1~69、1~95、1~120 位氨基酸,分别简称为 P69、P95 和 P120)编码的核苷酸序列,见图 1。所有的上游引物和下游引物分别引入 BamHI 和 EcoRI 酶切位点,并在特异肽段中引入 EcoRV 位点用以鉴定。特异肽段 P77 相应核苷酸

的正义链序列为:5'-GATCCCCCGGCAAGGTA GT-GGAAGACTGGCTGAGCCTGGTGAAGGCCAAG TC TGTGAGGCCCCCGGCAGCTGAGATATCG -3';反义链序列为:5'-TCGACGATATCTCAGCTGCCGGGGGC CTCACAGAACTTGGCCTTCACCAGGCTCAGCCAG TCTTCCACTACCTTGCCGGGG-3'。特异肽段 P162 相应核苷酸的正义链序列为:5'-GATCCGA CCCACA CACGCACAAGACCCGGTGCTGCGTTATGTGAGAT ATCG-3';反义链序列为:5'-TCGACGATATC TCA-CATAACGCAGCACCCGGTCTTGTGCGTGTGTGGG TCG-3'。正反义链混匀变性后缓慢退火至室温。其余片段的引物序列及退火温度,见表 1。以质粒 pGEX-4T1-PRL-3 为 PCR 模板,扩增 30~35 个循环。片段和 pGEX-4T1 质粒经 BamHI 和 EcoRI 酶切后回收,连接过夜后 CaCl₂ 转化。挑取单个克隆培养,提取质粒,以 EcoRV 酶切鉴定特异肽段,以 BamHI 和 EcoRI 酶切鉴定其余片段,并送测序。测序正确后,挑取新鲜菌,加入 IPTG 至终浓度为 0.2 mM~0.5 mM,30 °C 诱导 6 h。超声后,SDS-PAGE 电泳染色鉴定结果。将表达样品进行电泳转膜和 Western blot 检测。

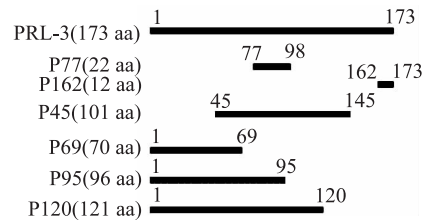


图 1 PRL-3 截短体示意图

Figure 1 The truncations of PRL-3

表 1 PRL-3 截短体的引物序列

Table 1 The primer sequence of the truncations

Primer	Annealing temperature (°C)	Sequence (from 5' to 3')
P45-145 上游		TCGCGGATCCGTGTGTGAA GTGACCTATGAC
P45-145 下游	64	TCCGGAATTCTTACTGCTT GCTGTTGATGGCTC
P1 上游		TCGCGGATCCATGGCTCGG ATGAACCGC
P69 下游	60	TCCGGAATTCTTACGGCCA GTCCACAACG
P95 下游	60	TCCGGAATTCTTAGGCCTC ACAGAACTTG
P120 下游	63	TCCGGAATTCTTAAATAA GCGCCAGCGC

Underlines show restriction enzymes

2 结果

2.1 抗体的 ELISA 鉴定、亚类分析和纯化

在适量的 IPTG 诱导下, GST-PRLs 蛋白能可溶性表达, 纯化后蛋白纯度高。经常规融合和三次亚克隆后, 从最初的 2 000 多个克隆最终得到 9 株能分泌 PRL-3 抗体的杂交瘤细胞, 见图 2。其中抗体 4D3、4D10、9D8、9E2、9F4 和 11B2 为 PRL-3 特异性单抗, 抗体 D1、D5 和 B12 与 PRLs 均反应。抗体类和亚类分析实验显示抗体 4D3、4D10 和 9D8 属于 IgG2b; 抗体 9E2、11B2、D1、D5 和 B12 属于 IgG1; 抗体 9F4 属于 IgM 类。抗体经纯化后, 蛋白电泳显示抗体的纯度高, 无杂蛋白。BSA 定量和 A₂₈₀ nm 波长下检测抗体的浓度约为 0.5 μg/μl。

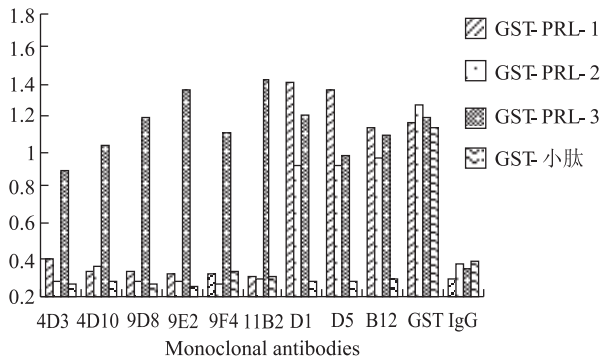


图 2 单抗的 ELISA 鉴定

Figure 2 The detection of mAbs by ELISA

2.2 抗体的 Western blot 检测

为进一步分析抗体的特异性, 将等量的 PRL-1、PRL-2 和 PRL-3 的融合蛋白电泳转膜。如图 3 所示, 抗体 4D3、4D10、9D8、9E2、9F4 和 11B2 只与 PRL-3 反应, 而抗体 D1、D5 和 B12 与 PRLs 均有反应。由于抗体结合真核蛋白和原核蛋白的能力可能会有差别, 我们将 PRL-3 真核表达质粒瞬时转染 COS-7 后, 也进行了 Western blot 检测。结果表明抗体 4D3、4D10、9D8、9E2、D1、D5 和 B12 和真核状态的 PRL-3 反应较强, 而抗体 9F4 和 11B2 不反应, 见图 3。

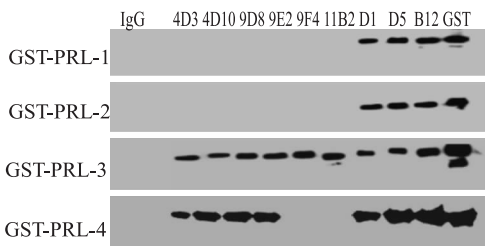


图 3 抗体的 Western blot 鉴定

Figure 3 The detection of mAbs by Western blot

2.3 抗体的免疫沉淀鉴定

为证实抗体是否能用于免疫沉淀实验, 将 PRL-3 特异性抗体、瞬时转染的 COS-7 细胞裂解液和 protein A 珠子共孵育后, Western blot 检测鉴定。抗体 4D3、4D10、9E2 和 11B2 可用于哺乳动物细胞表达 PRL-3 蛋白的免疫沉淀, 见图 4。

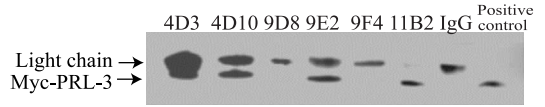
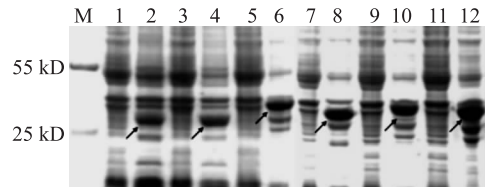


图 4 抗体的免疫沉淀鉴定

Figure 4 The detection of mAbs by immunoprecipitation

2.4 抗体与抗原结合部位的鉴定

酶切鉴定和测序结果表明 PRL-3 的 6 个截短体质粒构建正确。在适当的 IPTG 浓度和温度下, 融合蛋白可以表达, 分子量正确, 见图 5。将表达阳性的样品进行 Western blot 检测鉴定。抗体 9D8、9E2、9F4 和 11B2 可以和 PRL-3 羧基末端的截短体 P162 结合, 而不与其他截短体结合; 抗体 4D3 和 4D10 可以和截短体 P45、P95 及 P120 结合, 而不能与截短体 P69 和 P162 结合; 没有抗体和截短体 P77 结合, 如图 6 所示。结果提示有 4 株单抗的结合部位在 PRL-3 的羧基末端, 而抗体 4D3 和 4D10 的结合部位位于 69~95 位氨基酸之间。



M: Marker; 1,3,5,7,9 and 11: Non-induced bacteria of P77, P162, P45, P69, P95 and P120, respectively; 2,4,6,8,10 and 12: Induced bacteria of P77, P162, P45, P69, P95 and P120, respectively (arrowheads show target protein)

图 5 截短体的诱导表达

Figure 5 The induction expression of the truncations

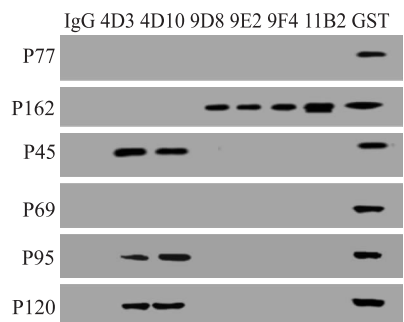


图 6 抗体与 PRL-3 截短体的反应

Figure 6 The mAbs reaction against the truncations

3 讨论

研究证实 PRL-3 参与了多种肿瘤的转移,如胃癌的淋巴结转移、大肠癌几乎所有的转移灶及卵巢癌的恶性进展;在乳腺癌血管内皮细胞中均可发现 PRL-3 mRNA 的高表达^[5];在不同肿瘤患者的染色体 8q24.3 中发现 PRL-3 的多个拷贝所形成的扩增子^[6]。目前对于 PRL-3 参与肿瘤转移的分子机制并不清楚。研究表明稳定表达 PRL-3 的中国仓鼠卵巢细胞 CHO 具有更强的运动和迁移能力,而表达 PRL-3-C104S(无酶活性突变体)细胞的运动能力没有改变,提示 PRL-3 在肿瘤中的作用依赖于磷酸酶活性^[7]。Peng 等^[8]证实 PRL-3 可以和整合素- $\alpha 1$ 分子结合,并能调节整合素- $\beta 1$ 及 Erk1/2 的磷酸化水平。

既然 PRL-3 参与了肿瘤的转移,就可能会成为临床检测指标和治疗靶点。那么制备针对 PRL-3 的特异性抗体,尤其是能抑制酶活性的抗体,对于以后的研究和临床应用有重要意义。由于 PRLs 家族成员的高度同源性,抗 PRL-3 的多抗可能会与 PRL-1 和 PRL-2 有交叉反应。本研究通过对 GST-无关小肽、-PRL-1、-PRL-2 和 -PRL-3 的 ELISA 筛选,得到了高度特异的抗体,并在 Western blot 检测中得到证实。抗体 4D3、4D10、9D8、9E2、9F4 和 11B2 只与 PRL-3 反应,而与 PRL-1 和 PRL-2 不反应。真核表达蛋白有多种原核蛋白所没有的翻译后修饰,抗体结合原核和真核蛋白的能力可能存在差异。本实验证实抗体 4D3、4D10、9D8 和 9E2 与真核蛋白具有强反应性。同时抗体 4D3、4D10、9E2 和 11B2 可以用于免疫沉淀实验。

双抗夹心法是一种敏感度高,适于检测微量抗原的方法,但需要识别不同抗原决定簇的抗体。我们制备的抗体 4D3 和 4D10 可以识别 PRL-3 的中间肽段(69~95 位氨基酸),而其余 4 株抗体可以识别 PRL-3 羧基末端的短肽。利用软件分析 PRL-3 抗原性,显示这两个位置的抗原性强,与本实验结果

一致。VHC(X)5R(P-LOOP)是磷酸酶特有的酶活性结构,PRL-3 的 P-LOOP 位于 103~111 位氨基酸。由于 PRL-3 在肿瘤中的作用依赖于磷酸酶活性,因此可以通过阻断磷酸酶活性而抑制 PRL-3 在肿瘤转移中的功能。抗体 4D3 和 4D10 结合 PRL-3 的位置(69~95 位氨基酸)距离 P-LOOP 较远,但是该片段形成的 α -螺旋距 P-LOOP 空间位置较近。这两种抗体能否阻止 PRL-3 与底物的结合,仍需进一步研究证实。

总之,本研究制备的 PRL-3 单抗特异性强,亲和力和力高,可以识别不同的抗原决定簇,为以后 PRL-3 的理论研究和临床检测提供了有利的工具,也为探讨以 PRL-3 为靶点的肿瘤治疗提供了可能的方法。

参考文献:

- [1] Stephens B J, Han H Y, Gokhale V, et al. PRL phosphatases a potential molecular targets in cancer[J]. *Mol Cancer Ther*, 2005, 4(11): 1653-1661.
- [2] Saha S, Bardelli A, Buckhaults P, et al. A phosphatase associated with metastasis of colorectal cancer[J]. *Science*, 2001, 294(5545): 1343-1346.
- [3] Miskad UA, Semba S, Kato H, et al. Expression of PRL-3 phosphatase in human gastric carcinomas; close correlation with invasion and metastasis[J]. *Pathobiology*, 2004, 71(4): 176-184.
- [4] Polato F, Codegoni A, Fruscio R, et al. PRL-3 phosphatase is implicated in ovarian cancer growth [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(19): 6835-6839.
- [5] Parker B S, Argani P, Cook BP, et al. Alterations in vascular gene expression in invasive breast carcinoma[J]. *Cancer Res*, 2004, 64(21): 7857-7866.
- [6] Buffart TE, Coffa J, Hermesen MA, et al. DNA copy number changes at 8q11-24 in metastasized colorectal cancer[J]. *Cell Oncol*, 2005, 27(1): 57-65.
- [7] Zeng Q, Dong J M, Guo K, et al. PRL-3 and PRL-1 promote cell migration, invasion, and metastasis [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(11): 2716-2722.
- [8] Peng LR, Jin GL, Wang L, et al. Identification of integrin $\alpha 1$ as an interacting protein of protein tyrosine phosphatase PRL-3 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 342(1): 179-183.

[编辑:周永红;校对:杨 卉]