

乙酰氨基半乳糖转移酶 14 多抗的制备及鉴定*

吴琛^{1**} 郭晓丹¹ 宋玉华² 张博¹ 马思思³ 邓昊¹ 葛建峰¹ 李世奇¹ 徐强¹ 康现江¹

(1 河北大学生命科学学院 保定 071002 2 青岛大学医学院附属医院 青岛 266003)

(3 河北大学药学院 保定 071002)

摘要 利用生物信息学方法分析乙酰氨基半乳糖转移酶 14(GALNT14)蛋白序列,根据亲水性、抗原性、柔韧性及表面性等指标选择一段多肽序列作为抗原用于抗体制备。将该 DNA 片段插入 pET-DsbA,构建原核表达载体 pET-DsbA-GALNT14。用 IPTG 诱导表达蛋白,经镍柱纯化蛋白后免疫新西兰大白兔,获得 GALNT14 多克隆抗血清。用免疫扩散和免疫印迹检测抗体效价及特异性。结果显示,成功表达并纯化了目的蛋白。免疫动物后获得了效价较高、特异性强的 GALNT14 多克隆抗体,GALNT14 蛋白在人乳腺癌和肾癌细胞株中均有表达。该结果为进一步研究 GALNT14 的功能及其在肿瘤发生发展的作用方面奠定了基础。

关键词 GALNT14 原核表达 多克隆抗体

中图分类号 Q819

肿瘤的发展常伴随着细胞表面糖蛋白的改变^[1],O-糖基化改变是肿瘤细胞的共性。在肿瘤细胞中经常可以观察到一些不成熟的糖蛋白糖链异常表达^[2]。糖基化的改变能引起恶性转化,影响细胞生长和癌细胞的分化、转化、黏附、侵袭及免疫原性^[3,4]。多肽:N-乙酰氨基半乳糖转移酶 (polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases, pp-GalNAc-Ts, EC 2.4.1.41) 家族是粘蛋白 O-糖基化的起始酶,负责将供体 UDP-GalNAc 上的 GalNAc 基团转移至受体蛋白多肽链特定序列中的 Ser 或 Thr 羟基上,从而合成 O-聚糖^[5,6]。该酶家族可能对发生在肿瘤中的异常糖基化负责,因此对 pp-GalNAc-Ts 的功能研究有助于揭示肿瘤发生发展机制,具有重要意义^[7]。

GALNT14 隶属于乙酰氨基半乳糖转移酶家族,为其第 14 个成员,由 Wang 等^[8]于 2003 年首次发现,其 cDNA 含有 1659 个碱基,编码 552 个氨基酸,属 II 型跨膜蛋白。目前,国内外对 GALNT14 的相关研究较少,其与肿瘤发生发展的相关性研究尚无报道。本研究旨在通过原核表达获得 GALNT14 抗原蛋白以免疫新西

兰大耳白兔,从而获得高特异性的 GALNT14 多克隆抗体,并检测该分子在肿瘤细胞中的表达,为进一步研究 GALNT14 在肿瘤组织的表达,探索其功能及在肿瘤发生发展中的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、细胞和菌株 *Escherichia coli* DH5 α , *Escherichia coli* BL21(DE3), pET-DsbA 质粒,人肾透明细胞癌 786-O 细胞,人乳腺癌细胞 MCF-7 细胞等均为本实验室保存。

1.1.2 酶及其他试剂 rTaq 酶、限制性内切酶(*Eco*R I、*Bam*H I)、T4 DNA 连接酶、Maker DL 2000、Maker DL 10000 等均购自宝生物工程(大连)有限公司。Gel Extraction Kit DNA 纯化试剂盒、Plasmid Mini Kit I 质粒提取试剂盒等购自美国 OMEGA 生物技术公司。脂质体转染试剂 Lipofetamine2000 购自美国 Invitrogen 公司。His 镍柱购自南京金斯瑞生物科技有限公司。佐剂购自 Sigma 公司。抗 GAPDH 抗体及二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司。异丙基硫代 β -D 半乳糖苷(IPTG),BCIP/NBT 显影液购自 Amresco 公司。

收稿日期:2010-08-16 修回日期:2010-09-23

* 国家自然科学基金(30800180)、河北省自然科学基金(C2009000191)、河北省教育厅科学研究计划(2008-106)、河北省科技支撑计划(07275552)资助项目

** 电子信箱:dawnwuchen@163.com

1.2 方法

1.2.1 引物设计与合成 GALNT14 基因 cDNA 序列来源于 NCBI 的 GenBank 数据库 (GenBank Accession NM_024572.2), 利用 ORF finder 软件分析该基因的开放阅读框 (ORF), 使用 Protein Workbench 4.0 软件^[9] 对 GALNT14 蛋白进行生物信息学等相关指标分析, 登录 NCBI, 用 BlastP 进行同源性比对, 最终确定亲水性强、抗原指数高、表面性及柔韧性好, 且特异性强的一段氨基酸序列, 即位于 44-99 位的 56 肽 PSDADWDDLWDQF DERRYLNAKKWRVGGDDPYKLYAFNQRESERISSNRAIP DTRHL 作为抗原肽, 利用 Swiss-model 服务器对 GALNT14 全蛋白进行三维结构预测, 得到的结果如图 1 所示, 其中标有 44 和 99 的中间部分为目的抗原肽。设计表达引物: FP: 5'-CGGGATCCCTTCGGACGCTGACT GGG-3', 带下划线部分为 *Bam*H I 酶切位点; RP: 5'-GGAATTCCTTACAGATGGCGAGTGTCCGGG-3', 带下划线部分为 *Eco*R I 酶切位点。引物均在南京金斯瑞生物科技有限公司合成。

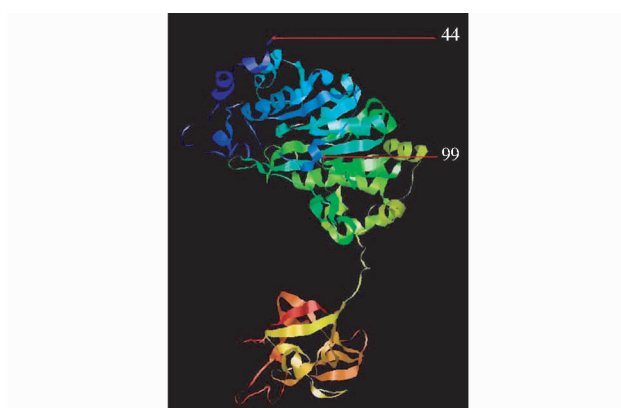


图1 预测的 GALNT14 蛋白三维结构图

Fig. 1 The predicted 3D structure of GALNT14 protein

The peptide between locus 44 and locus 99 of GALNT14 was taken as antigen for the preparation of antibody

1.2.2 载体构建 以含有人 GALNT14 cDNA 序列的 pGEM-T-GalNT14 质粒为模板, 进行 PCR 扩增。PCR 反应条件为: 94 °C, 3 min; 94 °C, 30 s, 57 °C, 30 s, 72 °C, 40 s, 25 个循环; 72 °C, 7 min。回收 PCR 产物, 经双酶切后连接到酶切过的 pET-DsbA 质粒, 转化到 *E. coli* DH5 α 感受态细胞中, 用含氨苄青霉素 LB 琼脂选择性平板筛选。挑取单克隆过夜培养, 提取质粒后经 *Eco*R I、*Bam*H I 双酶切验证, 选取阳性克隆进行序列测定。测序结果与 GenBank 中人 GALNT14 mRNA 序列进行

比对。

1.2.3 DsbA-GALNT14 融合蛋白的表达及纯化 将 pET-DsbA-GALNT14 及 pET-DsbA 空载体转化 *E. coli* BL21 (DE3), 分别挑单克隆摇菌, 待 OD_{600} 为 0.5 时, 加 IPTG 至终浓度为 100 μ g/ml, 诱导表达。分别收集菌液进行超声破碎, 破碎 1 s, 间隔 3 s, 180 次, 功率 40w。载体 pET-DsbA 带有 his 标签, 故用镍柱做纯化。优化镍柱纯化的清洗、洗脱的时间及用量, 用 SDS-PAGE 检测纯化的蛋白。得到的目的蛋白分别用 PBS 在 4 °C 透析过夜。

1.2.4 抗体制备及免疫扩散检测抗体效价 选取 2.5 千克左右成年健康雄性新西兰大白兔, 将 500 μ g 目的蛋白与弗氏完全佐剂等体积混匀, 分多点注射于雄性新西兰白兔背部皮下。初次免疫后分别于第 4、6、8 周末进行加强免疫, 每次用 250 μ g 融合蛋白与弗氏不完全佐剂的混合液。于末次免疫后的第 7 日经颈动脉放血, 分离血清, 分装后贮于 -70 °C 备用。免疫前取兔血样标本制备血清作为阴性对照。同时制备抗 DsbA 血清作为对照。从第三次免疫后, 每次免疫前均抽取适量血液用双向免疫扩散法进行抗体效价检测。

1.2.5 免疫印迹检测 GALNT14 多克隆抗体的特异性

利用 Western blot 检测稳定转染 GALNT14 的人乳腺癌 MCF-7 细胞及肾癌 786-O 细胞 GALNT14 的表达以确定抗体特异性。提细胞总蛋白, 进行常规 SDS-PAGE, 半干转至硝酸纤维素膜后, 5% 脱脂奶粉室温孵育 1.5 h, 依次操作: 抗 DsbA-GALNT14 和抗 DsbA 多克隆抗体为一抗孵育 2 h、TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 加碱性磷酸酶标记的羊抗兔二抗孵育 50 min、TBST 洗膜, BCIP/NBT 显影液显影。

2 结果

2.1 pET-DsbA-GALNT14 重组载体鉴定

PCR 扩增 GALNT14 编码区序列时加入了与表达载体 pET-DsbA 对应的酶切位点 *Eco*R I、*Bam*H I, 连接转化, 挑单克隆, 提取质粒, 酶切鉴定阳性克隆。双酶切鉴定结果如图 2 所示, 孔道 1 上面的条带为目的载体 pET-DsbA, 大小为 3600bp; 下面条带为目的基因 GALNT14, 大小为 168bp, 全部与预期大小相符。将酶切鉴定正确的质粒送天根生化科技 (北京) 有限公司测序, 测序结果用 BlastN 进行比对, 所插入的 GALNT14 片段与 Genebank 中公布的序列完全一致, 显示重组质粒构建正确。

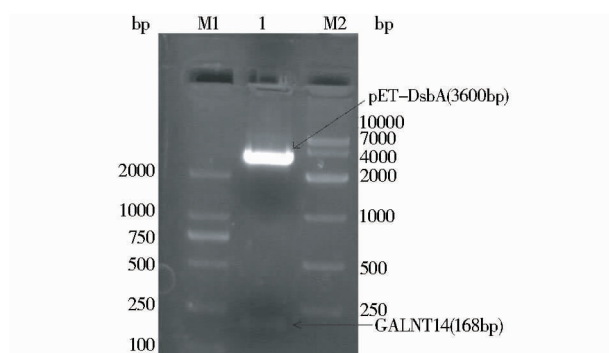


图2 pET-DsbA-GALNT14 重组质粒酶切图

Fig. 2 The restriction analysis of recombinant plasmid pET-DsbA-GALNT14

M1, M2: DNA marker; 1: pET-DsbA-GALNT14 digested by *EcoR* I/*Bam* H I

2.2 DsbA-GALNT14 融合蛋白的表达及纯化

经 IPTG 诱导后,表达产物用 SDS-PAGE 分析,以含空载体 DsbA 的菌株为对照。DsbA 蛋白分子量为 24.7kDa, DsbA-GALNT14 蛋白为 31.5kDa。结果如图 3a 所示,含有 DsbA-GALNT14 的菌株诱导后,其裂解液上清和沉淀在目的位置均有一明显诱导表达条带,说明所表达的 DsbA-GALNT14 蛋白产物以可溶形式和包涵体形式分别存在于上清和沉淀中。取上清液经镍柱纯化,透析、浓缩后,用 SDS-PAGE 分析,考马斯亮兰染色显示为单一的条带,纯度较高,见图 3b。用 Folin-酚法对蛋白进行定量,DsbA-GALNT14 和 DsbA 二者蛋白均为 1mg/ml。

2.3 抗 GALNT14 多克隆抗体免疫扩散检测

利用免疫扩散方法检测血清效价,将抗原蛋白和血清点样后,观察沉淀线。在 DsbA-GALNT14 多克隆抗体的抗体稀释度为 1:32 时,仍产生明显沉淀线,用同样方法对对照抗 DsbA 血清进行效价检测,如图 4 所示。

2.4 抗 GALNT14 多克隆抗体特异性鉴定

提取稳定转染 GALNT14 基因的 MCF-7 细胞株和未经转染的 MCF-7 细胞以及 786-O 细胞总蛋白,利用所制备的抗 GALNT14 多克隆抗体对这 3 种蛋白提取物做 Western blot 检测,如图 5 所示,均有约 64kDa 的特异性条带,大小与理论相符。用 DsbA 抗血清作为对照未检测到任何条带,说明所制备的抗 GALNT14 多克隆抗体能特异性识别 GALNT14 蛋白,同时也表明,MCF-7 和 786-O 细胞均有内源性的 GALNT14 表达。

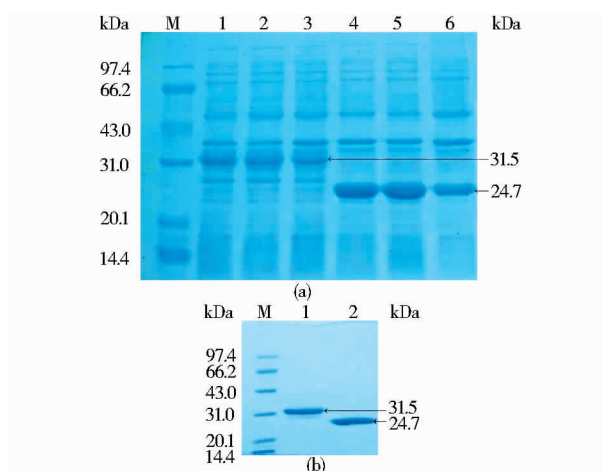


图3 融合蛋白及 DsbA 蛋白的诱导表达和纯化

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of fusion protein

DsbA-GALNT14 and DsbA

(a) M: Protein marker 1: Total protein of DsbA-GALNT14/BL21 (DE3) induced by IPTG; 2: supernatant of DsbA-GALNT14/BL21 (DE3) induced by IPTG; 3: Precipitate of DsbA-GALNT14/BL21 (DE3) induced by IPTG; 4: Total protein of DsbA/BL21 (DE3) induced by IPTG; 5: Supernatant of DsbA/BL21 (DE3) induced by IPTG; 6: Precipitate of DsbA/BL21 (DE3) induced by IPTG (b) M: Protein marker 1: Purified DsbA-GALNT14; 2: Purified DsbA



图4 免疫扩散检测抗血清效价

Fig. 4 Detecting the antibody titer by immunodiffusion testing

A: DsbA-GALNT14 protein; B: DsbA protein; 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128; The serial two-fold dilution of the rabbit serum, respectively

3 讨论

GALNT14 是目前乙酰氨基半乳糖转移酶家族中最后一个被发现的成员, Wang 等^[8] 2003 年首次发现 GALNT14 时,用实时定量 PCR 分析显示该基因在肾脏中高表达,提示 GALNT14 可能与肾脏中的糖基化密切相关。由于 GALNT14 的发现相对较晚,且对它的研究

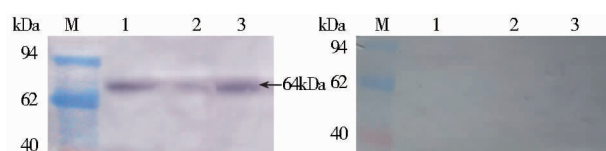


图5 Western blot 检测 GALNT14 在
乳腺癌和肾癌细胞的表达

Fig. 5 The test of expression of GALNT14 in
MCF-7 and 786-O cells by Western blot

M:Protein marker; 1:MCF-7 cell which stably
expressed GALNT14; 2: MCF-7 cell; 3: 786-O cell

尚未得到广泛重视,因此其相关报道较少。Wagner 等^[10]研究了胰腺癌细胞、非小细胞肺癌细胞及黑色素瘤细胞对肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体/凋亡素 2 配体 (TRAIL/Apo2L) 的敏感性及其与 GALNT14 表达的相关性,认为其呈正相关性。并且该研究证实 TRAIL/Apo2L 会通过启动预凋亡信号受体 DR4 和 DR5 促进癌细胞凋亡,而在胰腺癌组织中表达的 GALNT14 mRNA 与 TRAIL/Apo2L 的敏感度密切相关,因此 GALNT14 可能作为一个对 TRAIL/Apo2L 治疗是否敏感的分子标志物。Wu 等^[11]发现 GALNT14 是胰岛素样生长因子结合蛋白 3 (IGFBP-3) 的一个新的相互作用蛋白,并推测 GALNT14 可能参与 IGFBP-3 诱导的凋亡效应。随后利用 RNAi 技术敲低内源性 GALNT14 在 786-O 细胞内的表达,同时检测 GALNT14 低表达后对过表达的 IGFBP-3 促细胞凋亡功能的影响。结果发现 GALNT14 在 IGFBP-3 诱导的细胞凋亡过程中发挥一定作用^[12],但该分子与肿瘤发生发展的相关性以及在肿瘤发生发展中的作用仍有待阐明。

高特异性的抗体对基因功能研究具有重要作用。本研究中,为了深入探讨 GALNT14 的功能,我们制备了 GALNT14 多克隆抗体。鉴于前期的实验基础,欲利用原核表达获得可溶性的全长 GALNT14 蛋白十分困难,因而本文从抗原性、可塑性和二级结构等方面初步分析了该蛋白的抗原表位,通过生物信息学技术预测,最终确定以亲水性强、抗原指数高、表面性及柔韧性好的区域(即 44~99 位 56 个氨基酸)作为 GALNT14 的抗原决定簇。由于小分子多肽的免疫原性较弱,因此我们选择 pET-DsbA 载体作为原核表达载体,将目的基因与分子伴侣 DsbA 融合表达,这样可增强其免疫原性,并延长其在体内的半衰期。该载体带有 His 标签,位于 DsbA 编码区 5' 端的上游,可利用金属螯合亲和层

析纯化目的蛋白^[13]。由于 DsbA 是存在于大肠杆菌周质胞腔内的一种参与新生蛋白质折叠过程中催化二硫键形成的折叠酶,与人源化蛋白亲缘关系较远,产生抗体交叉反应的几率很低。但为了排除其可能的影响,我们同时制备了抗 DsbA 抗体作为对照。本实验中用所制备的 GALNT14 多抗和对照 DsbA 多抗分别对细胞进行免疫印迹,前者能产生特异性免疫反应,而后者无免疫反应,说明我们制备的抗体是高度特异性的。

本实验中,我们发现, GALNT14 在乳腺癌细胞和肾癌细胞中均有表达,预示其在癌症发生发展中可能发挥一定作用。最近我们对 100 余例乳腺癌及正常乳腺标本进行了免疫组化分析,结果显示,相对于正常乳腺组织, GALNT14 在乳腺癌组织中异常表达,且 GALNT14 的表达随着组织学分级的升高表达有下调趋势,即组织学分级 I 级(高分化)呈强阳性表达,组织学分级 II 级(中分化)呈中等阳性表达,组织学分级 III 级(低分化)呈弱阳性表达^[14],认为该分子可能影响乳腺癌的侵袭转移,并可作为乳腺癌诊断的免疫组化分子标记物。这些研究结果初步显示, GALNT14 与肿瘤的发生发展及侵袭转移可能存在着密切的关系。究竟哪些因素诱发了 GALNT14 表达量的变化,其在肿瘤发生发展及侵袭转移中如何发挥作用,它在临床诊断和治疗中的意义如何都是今后需要我们阐明的,仍需要深入研究。

参考文献

- [1] Brockhausen I. Pathway of O-glycan biosynthesis in cancer cells. *Biochem Biophys Acta*, 1999, 1473(1): 67-95.
- [2] Burchell J M, Mungul A, Taylor-Papadimitriou J. O-linked glycosylation in the mammary gland: changes that occur during malignancy. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2001, 6(3): 355-364.
- [3] Baldus S E, Engelmann K, Hanisch F G. MUC1 and the MUCs: a family of human mucins with impact in cancer biology. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2004, 41(2): 189-231.
- [4] Pegram M D, Borges V, Ibrahim N, et al. Phase I dose escalation pharmacokinetic assessment of intravenous humanized anti-MUC1 antibody AS1402 in patients with advanced breast cancer. *Breast Cancer Res*, 2009, 11(5): R73.
- [5] Perrine C L, Ganguli A, Wu P, et al. The glycopeptide preferring polypeptide-GalNAc transferase-10 (ppGalNAc T10), involved in mucin type-o-glycosylation, has a unique GalNAc-O-SER/THR binding site in its catalytic domain not found in

- ppGalNAc T1 or T2. *J Biol Chem*, 2009, 284 (30): 20387-20397.
- [6] Ten Hagen K G, Fritz T A, Tabak L A. All in the family: the UDP-GalNAc: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases. *Glycobiology*, 2003, 13(1): 1R-16R.
- [7] 郭晓丹, 吴琛, 康现江, 等. UDP-GalNAc:多肽 N-乙酰氨基半乳糖转移酶-14. *生命的化学*, 2010, 30(1): 27-32.
- Guo X D, Wu C, Kang X J. *Chemistry of Life*, 2010, 30(1): 27-32.
- [8] Wang H, Tachibana K, Zhang Y, et al. Cloning and characterization of a novel UDP-GalNAc: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase, pp-GalNAc-T14. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 300(3): 738-744.
- [9] 任艳敏, 黄蓓, 魏浩, 等. LKB1 (Thr336) 磷酸化多克隆抗体的制备及在细胞中表达的检测. *中国生物制品杂志*, 2008, 21(11): 1-5.
- Ren Y M, Huang B, Wei H, et al. *Chin J Biological*, 2008, 21(11): 1-5.
- [10] Wagner K W, Punnoose E A, Januario T, et al. Death-receptor O-glycosylation controls tumor-cell sensitivity to the proapoptotic ligand Apo2L/TRAIL. *Articles*, 2007, 13(9): 1070-1077.
- [11] Wu C, Yao G Y, Zou M J, et al. N-acetylgalactosaminyltransferase-14, a novel insulin-like growth factor binding protein-3 binding partner. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 357(2): 360-365.
- [12] Wu C, Shan Y J, Liu X X, et al. GalNAc-T14 may be involved in regulating the apoptotic action of IGFBP-3. *J Biosci*, 2009, 34(3): 389-395.
- [13] 朱惠明, 杨俊文, 蔡筱彦, 等. 凋亡素原核表达载体的构建和表达. *广东医学杂志*, 2003, 24(10): 1058-1060.
- Zhu H M, Yang J W, Cai X Y, et al. *Guangdong Medical Journal*, 2003, 24(10): 1058-1060.
- [14] Wu C, Guo X D, Wang W N, et al. N-Acetylgalactosaminyltransferase-14 as a potential biomarker for breast cancer by immunohistochemistry. *BMC Cancer*, 2010, 10: 123.

Preparation and Identification of Polyclonal Antibody Against Polypeptide N-Acetylgalactosaminyltransferase 14 (GALNT14)

WU Chen¹ GUO Xiao-dan¹ SONG Yu-hua² ZHANG Bo¹ MA Si-si³ DENG Hao¹ GE Jian-feng¹
LI Shi-qi¹ XU Qiang¹ KANG Xian-jiang¹

(1 College of Life Sciences, Hebei University, Baoding 071002, China)

(2 Department of Oncology, The Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, Qingdao 26600, China)

(3 College of Pharmaceutical Sciences, Hebei University, Baoding 071002, China)

Abstract The sequence of polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 14 (GALNT14) was analyzed using bioinformatics. A peptide sequence was selected according to hydrophilicity, antigenicity, flexibility and accessibility. The cDNA of interest was subcloned into a eukaryotic expression vector pET-DsbA to construct pET-DsbA-GALNT14. The expression of recombinant fusion protein was induced by IPTG, then purified by Ni-IDA Resin. Polyclonal antibody against GALNT14 was prepared from immunized New Zealand white rabbit. The titer and specificity of the prepared antibody were analyzed by immunodiffusion and Western blot. The result showed that the fusion protein was expressed successfully, and the interest protein with high purity was obtained. The generated antibody was specific. Both of MCF-7 and 786-O cell expressed GALNT14. A good foundation for further study on the function of GALNT14 and its role of tumorigenesis and development was laid.

Key words GALNT14 Prokaryotic expression Polyclonal antibody