

MUC1/Y 特异表位肽在大肠杆菌中的可溶性表达及其抗体的制备

张立新* 李春海 孙丽亚 王 淼 路浩军

(军事医学科学院附属医院肿瘤分子生物室,北京 100039)

摘 要 为获得 MUC1/Y 的特异表位肽,制备抗体,用 PCR 扩增其编码序列,克隆到 pGEX-2T 中,转化 DH5 α 感受态,0.2mmol/L IPTG 诱导表达,超声破碎或 B-PER™ II 试剂处理诱导菌,亲和层析和阴离子交换纯化目的蛋白,SDS-PAGE 及 Western blotting 鉴定,免疫家兔制备多抗,初步用于免疫组化分析。结果表明,转化菌经诱导后表达融合蛋白 GST-Y30 约占菌体总蛋白的 20%,大多以可溶形式存在,与诱导温度无关。免疫家兔获得多抗,效价为 1:320 000,纯化的抗体具有特异性,可识别肿瘤细胞表面的 MUC1/Y 蛋白。所得蛋白和抗体可用于 MUC1/Y 的表达特征及其生物学功能研究。

关键词 MUC1/Y,肽,表达,纯化,抗体

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2003)03-0337-06

MUC1 粘蛋白(简称 MUC1)是一类高分子量(>205kD)I 型膜糖蛋白,因其基因在目前已发现的 15 种粘蛋白(Mucin)^[1]中第一个被克隆到而得名,表达于多种上皮性组织和血液系统的部分细胞中^[1-3]。其蛋白结构具有两个基本特征:1)多肽骨架含有 20~125 个连续重复序列(Variable numbers of tandem repeats, VNTRs),每个 VNTR 由 20 个氨基酸组成,富含 Pro、Ser 和 Thr;2)糖链占其分子量 50% 以上,主要以 O 型糖苷键与多肽骨架 VNTRs 中的 Ser/Thr 相连。2000 年,MUC1 被归类入 Cluster of differentiation(CD)分子系列,命名为 CD227。MUC1/Y 是 MUC1 的一种同种型(Isoform),在乳腺癌中的表达具有肿瘤特异性^[4,5],在卵巢癌中的表达也与肿瘤的恶性程度密切相关^[4-6]。它具有膜受体的特征,可通过 ras 信号传导通路^[7,8],使细胞发生恶性转化。动物实验表明,MUC1/Y 可使乳腺动物模型的致瘤性增加^[9]。因此,MUC1/Y 可能作为一种膜表面的重要分子参与细胞的恶性转化过程,是一种潜在的肿瘤诊断和生物学治疗的靶分子。由于目前尚无商品化的 MUC1/Y 特异性抗体,使其生物学功能的研究受到了很大的限制。我们已克隆获得 MUC1/Y 的全长 cDNA,表达获得其胞外段蛋白^[10],并筛选获

得其结合肽^[11]。但 MUC1 有多种同种型,由于通过选择性拼接而产生,大部分序列是相同的,为获得其特异性抗体,首先需要获得其特异表位序列。目前已知 MUC1/Y 的特异表位位于多肽 ATQRSS-VPSSTEKNAFNSSLEDPSTDYYQE 中^[5]。克隆表达此肽(以下称 MUC1/Y30),并制备其特异性抗体,对于进一步研究 MUC1/Y 的生物学功能和在肿瘤诊治中的作用具有重要意义。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌株、细胞及载体 大肠杆菌 DH5 α 为本室保存,乳腺癌细胞系 MCF7 为本室保存;GST 融合表达载体 pGEX-2T 为 Pharmacia 产品;pGEM-T 载体试剂盒为 Promega 产品。

1.1.2 试剂 Ex Taq 酶、BamH I、EcoR I 限制性内切酶及 DL2000 PCR markers 购自 TaKaRa 公司,蛋白标准分子量为上海西巴斯生物技术开发公司产品。DNA 及 PCR 产物纯化试剂盒购自 Promega 公司,IPTG、X-gal 和 GSH 为 Sigma 产品,B-PER™ II 细菌蛋白提取试剂、GST 亲和柱为 PIERCE 产品,ResourceQ 阴离子交换柱为 Amersham-Pharmacia 产品,

PicTure™-PV6000 免疫组化试剂盒为 Zymed 产品, GST 抗体为本室制备^[10]。

1.1.3 仪器: ACTA™ FPLC 蛋白纯化系统为 Amersham-Pharmacia 产品。GeneAmp PCR System 2400 为 PE 公司产品, 超声破碎仪 UP 200s 为 Dr. Hielscher GmbH 产品, 1D 凝胶成像系统为 Kodak 产品, Mini-PROTEAN II 电泳槽为 Bio-Rad 产品。

1.2 方法

1.2.1 MUC1/Y30 原核表达载体的构建: 根据 MUC1/Y cDNA 序列用 PCGENE 软件设计两条引物: 上游引物 P1: 5' CGGATCCGCTACCCAGAGAAGTTC 3', 下游引物 P2: 5' GAATTCTTACTCTTGGTAGTAGTCGG 3', 用于扩增 MUC1/Y30: 94℃, 5min; (94℃, 30s; 65℃, 30s; 72℃, 30s) × 25, 72℃, 7min。其中 P1 的 5' 端引入一 *Bam*H I 酶切位点, P2 的 5' 端引入一 *Eco*R I 酶切位点。将扩增片段连入 pGEM-T 载体, 提取质粒, *Bam*H I、*Eco*R I 双酶切, 所得片段克隆到经同样酶切处理的 pGEX-2T 中, 得到融合表达载体 pGEX-Y30 (Fig. 1)。转化大肠杆菌 DH5 α 感受态, 氨苄青霉素筛选, 酶切初步鉴定后, 阳性克隆送 TaKaRa 公司(大连)测序, 鉴定胞外段序列及构建载体的读码框架。

1.2.2 MUC1/Y30 融合蛋白的初步诱导表达: 挑取单个经 pGEX-Y30 转化的 DH5 α 菌接种 LB 培养基 (100 μ g/mL 氨苄青霉素), 37℃ 活化过夜, 按 1:10 的比例接种新鲜 LB 培养基 (100 μ g/mL 氨苄青霉素), 37℃ 培养至 A_{600} 约为 0.6~0.8, 加入 IPTG 至终浓度 0.2mmol/L, 30℃ 和 37℃ 分别进行诱导表达, 各诱导 4~5h 后, 取 100 μ L 菌液加入 20 μ L 5× 样品缓冲液, 煮沸 10min, 进行 15% SDS-PAGE。

1.2.3 菌体的破碎: 30℃ 和 37℃ 分别进行诱导表达, 诱导 4~5h 后的菌体用两种方法进行破碎。(1) 超声破碎: 诱导后的菌体用 PBS (16mmol/L Na₂HPO₄, 4mmol/L NaH₂PO₄, 150mmol/L NaCl, pH 7.4) 洗 2 次, 重悬后冰浴中超声破碎 30s × 10 次, 破碎结束后加入 Triton X-100 至终浓度 1%, 混匀, 35 000g, 4℃, 30min, 分别取上清和沉淀。(2) B-PER™ II 试剂处理: 按说明书操作后, 35 000g, 4℃ 离心 30min, 分别取上清和沉淀。对上清和沉淀进行 15% SDS-PAGE, 观察不同诱导温度和破碎菌体的方式下可溶性融合蛋白所占的比例。

1.2.4 重组融合蛋白(GST-Y30)的纯化和鉴定: 用大于 2.5 体积的 PBS (pH 7.4) 平衡 GSTrap 柱 (1mL), 取 2mL 上清, PBS (pH 7.4) 2.5 倍稀释, 1mL/min 上 GSTrap 柱, 20 体积 PBS-T (0.1% Triton X-100) 洗柱, 15mmol/L GSH, 0.1% Triton X-100, 10mmol/L Tris-HCl, pH 8.0 洗脱 2 个柱体积, 按峰接收。大于 2.5 体积的 10mmol/L PB, pH 7.4 平衡 ResourceQ 柱, 接收的 GSTrap 柱洗脱液 1mL/min 上柱, 10mmol/L PB, pH 7.4 洗 5 个柱体积, NaCl 梯度洗脱, 1mL/min, 20 个柱体积内达到 0.6mol/L, 按峰接收。15% SDS-PAGE 鉴定。Kodak 凝胶成像系统分析蛋白纯度。GST 抗体 (1:1000) 进行 Western-blotting^[12] 鉴定。

1.2.5 MUC1/Y30 抗体的制备和鉴定: 100 μ g/mL GST-Y30 免疫家兔, 间隔 3 周, 共 4 次。第 1 次免疫用福氏完全佐剂, 后 3 次均用福氏不完全佐剂。ELISA 测定抗体效价。GST 亲和柱吸附掉识别 GST 的抗体, ELISA 和 Western-blotting 鉴定吸附后抗体的特异性。

1.2.6 MUC1/Y30 抗体的免疫组化分析: 培养的 MUC1/Y 阳性细胞 MCF7 用 0.01mol/L PBS (pH 7.4) 洗 3 次, 重悬, 制备细胞涂片, 95% 乙醇室温固定 20min, 3% 过氧化氢/甲醇中室温 10min, 以阻断细胞中内源性过氧化物酶活性; 0.01mol/L PBS (pH 7.4) 洗片 5min × 3, 加 50 μ L 1:20 稀释的 MUC1/Y 抗体, 以正常兔血清 (1:20) 为阴性对照, 室温 1h; 0.01mol/L

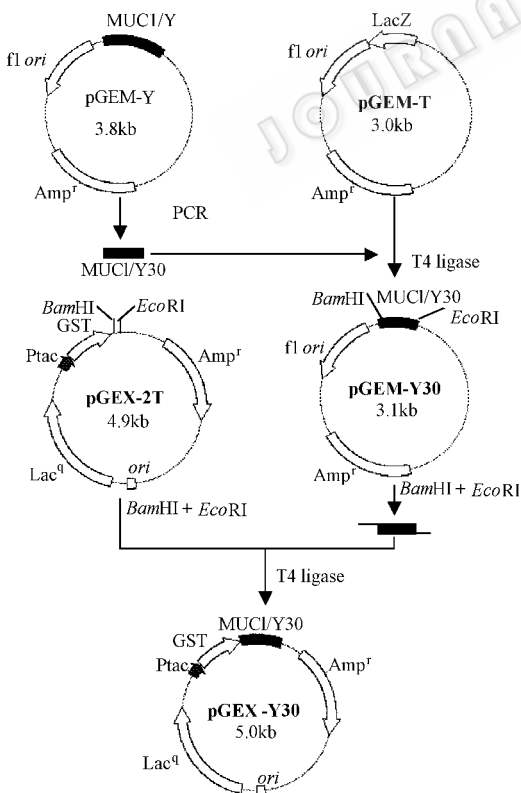


图 1 MUC1/Y30 融合表达载体 pGEX-Y30 的构建

Fig. 1 Construction of MUC1/Y30 fusion expression vector pGEX-Y30

PBS (pH 7.4) 洗片 5min × 3 ;加 1 滴 PicTure™ 试剂 , 室温 30min 。0.01mol/L PBS (pH 7.4) 洗片 5min × 3 ; 过氧化氢-DAB 显色 5min , 蒸馏水终止显色。脱水 , 透明 , 树胶封片。

2 结果

2.1 MUC1/Y30 表达载体的构建与鉴定

以 MUC1/Y 全长 cDNA 为模板 , 以 P1、P2 为引物扩增得到 108bp MUC1/Y30 DNA (Fig. 2) , 并插入 pGEM-T 载体 , 用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 酶切 , 片段经纯化后连入用同样酶切的 pGEX-2T , 获得 MUC1/Y30 融合表达载体 pGEX-Y30 , DNA 测序表明 , pGEX-Y30 中的插入序列及读码框架正确。

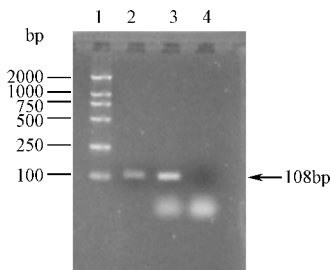


图 2 MUC1/Y30 DNA 片段的扩增和纯化

Fig. 2 Amplification and purification of MUC1/Y30 DNA fragment
1. DL2000 markers ; 2. Purified MUC1/Y30 ; 3. PCR product ; 4. Negative control

2.2 GST-Y30 蛋白的诱导表达

将 pGEX-Y30 转化大肠杆菌 DH5 α , 用 0.2mmol/L

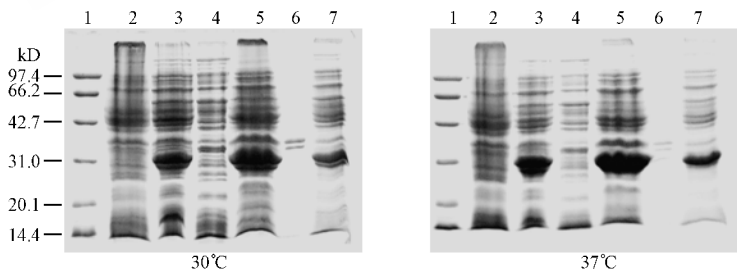


图 3 转化菌 pGEX-Y30/DH5 α 的诱导表达

Fig. 3 Induction of expression of pGEX-Y30/DH5 α

1. Protein markers ; 2. pGEX-Y30/DH5 α without induction ; 3. Induced pGEX-Y30/DH5 α
4. Inclusion body after B-PER II treatment ; 5. Soluble proteins after B-PER II treatment ;
6. Inclusion body after ultrasonic treatment ; 7. Soluble proteins after ultrasonic treatment

2.5 MUC1/Y30 抗体的免疫组化分析

免疫组化结果显示 , 表达 MUC1/Y 的 MCF7 细胞可被 MUC1/Y30 抗体着色 (Fig. 7B) , 而正常兔血清作用后无明显着色 (Fig. 7A) , 表明所制备的抗体可识别肿瘤细胞所表达的 MUC1/Y 蛋白。

的 IPTG 分别在 30°C 和 37°C 诱导 4 ~ 5h , 取菌液行 15% SDS-PAGE 电泳 , 结果表明 , pGEX-Y30 转化的菌株在约 31kD 处出现一条蛋白条带 , 与预期结果一致。分别取超声破碎和 B-PER™ II 试剂处理后的诱导菌液上清和沉淀进行 SDS-PAGE 分析。结果表明 (Fig. 3) , 经 KODAK 1D 成像系统扫描分析 , 融合蛋白约占菌体总蛋白 20% , 绝大部分以可溶的形式存在。两种诱导温度下融合蛋白的表达量无显著差别。

2.3 GST-Y30 蛋白纯化与鉴定

超声破碎和 B-PER™ II 试剂处理后的菌液上清首先经 GSTrap 纯化 , 收集洗脱液 , 再用 ResourceQ 纯化 , 收集 GST-Y30 蛋白洗脱峰 , 15% SDS-PAGE 分析蛋白表观分子量约 31kD (Fig. 4A) 。进一步用 Kodak 1D 成像系统扫描分析 , 纯度约为 94% 。 Western blotting 分析结果表明 , 纯化所得蛋白可被 GST 抗体识别 (Fig. 4B) 。

2.4 MUC1/Y30 抗体的制备和鉴定

免疫家兔制备的抗血清经 ELISA 分析 , 效价为 1:320 000。用 GST 亲和柱吸附掉识别 GST 的抗体后 , ELISA 分析表明 , 吸附后 (Fig. 5B) 与吸附前 (Fig. 5A) 比较 , 抗体可识别 GST-Y30 , 而不识别 GST。进一步用吸附后的抗体进行 Western-blotting (Fig. 6) 分析 , 结果表明 , 所得抗体可识别 GST-Y30 , 而不识别 GST。说明所制备的抗体具有较高的 MUC1/Y30 识别特异性。

3 讨论

MUC1 基因定位于人染色体 1q21 , 含有 7 个外显子 , 转录产物可发生选择性拼接 , 形成不同的同种型 , 目前已知有 A、B、C、D、X、Y、Z、REP 和 SEC 等^[6]。其中 , MUC1-Y 缺失了 MUC1 基因的第 2 外显子的

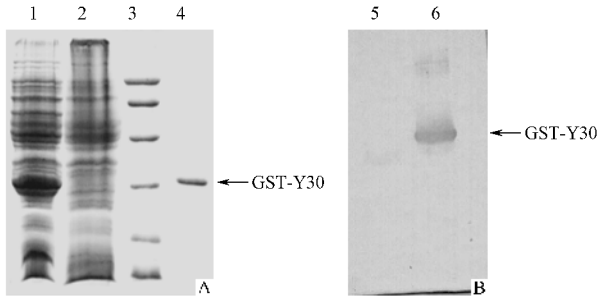


图 4 GST-Y30 蛋白的纯化和鉴定

Fig.4 Purification and identification of GST-Y30 protein

- 1. Induced pGEX-Y30/DH5α ; 2 , pGEX-Y30/DH5α without induction ;
- 3. Protein markers ; 4. Purified GST-Y30 ; 5. GST ; 6. GST-Y30



图 6 纯化后 MUC1/Y30 抗体的 Western blotting 分析

Fig.6 Western blotting analysis of MUC1/Y30 antibody

- after GST column absorption
- 1. GST protein ; 2. GST-Y30 protein

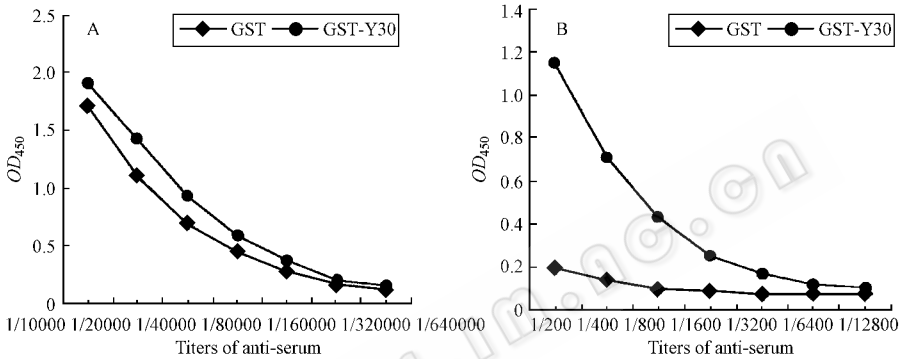


图 5 GST 柱纯化前后 MUC1/Y30 抗血清的稀释曲线

Fig.5 ELISA analysis of MUC1/Y30 antibody before and after GST column absorption

- A. Before GST column absorption ; B. After GST column absorption

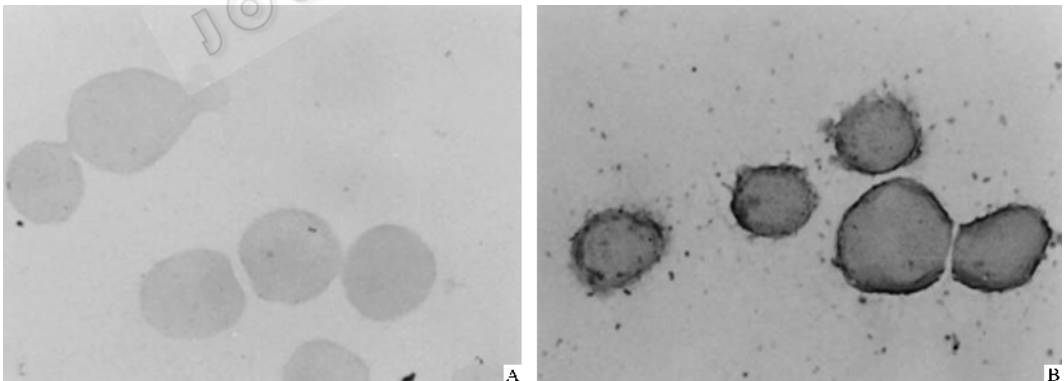


图 7 MCF7 细胞的免疫组化分析(PicTure 法 ,600 ×)

Fig.7 Immunohistochemistry analysis of MCF7(PicTure method , 600 ×)

- A. Negative control ; B. MCF7 stained with MUC1/Y30 Ab

大部分编码序列,因此其多肽骨架不含 VNTR 区^[4]。由于 MUC1/Y 的表达与肿瘤恶性程度有明显的相关性,因此,对其生物学功能的深入研究具有重要意义。由于尚无它的特异性抗体,目前对其在肿瘤中表达特征的检测主要用 RT-PCR 检测其基因的转录情况,无法从蛋白水平进行系统的研究,对其功能的

研究也受到了限制。为此,本文在已有工作基础上,克隆表达了 MUC1/Y 的特异表位肽,并进一步制备了多抗。

本文所选用的融合表达载体 pGEX-2T^[13,14],是 pGEX 系列表达载体中的一种,可实现蛋白的高效可溶性表达且便于纯化和鉴定。但用此载体表达获

得的不同融合蛋白的可溶性差别较大,这可能既与目的蛋白的性质和结构有关,也与诱导温度、宿主菌的类型、诱导时菌体的密度、诱导时间等因素有关^[15,16]。我们曾用此载体表达并纯化了 MUC1/Y 的胞外段蛋白,表达获得的融合蛋白(GST-Y_{ex})的可溶性与诱导温度密切相关,在不同诱导温度条件下,可溶性蛋白所占的比例依次为 30℃ > 25℃ > 37℃^[10]。而本文表达获得的融合蛋白 GST-Y30,在 30℃ 和 37℃ 的诱导温度下绝大部分均以可溶性的形式存在。这可能与 GST 融合表达的 MUC1/Y 特异表位肽的长度较短有关。因为包涵体往往是由于菌体合成的外源多肽不能正确折叠而与菌体自身蛋白聚集而形成^[16],当外源肽长度较短时,可能不存在合成后折叠的问题,而以线性方式存在,因此,不易形成包涵体。

我们破碎菌体采取了两种方式:超声破碎和 B-PER™ II 试剂。超声破碎是目前破碎菌体常用的方法,而 B-PER™ II 试剂是 PIERCE 开发的产品,用于蛋白纯化前裂解菌体^[17]。它的主要成分是 n-辛基-β-D-硫葡萄糖吡喃糖苷(n-octyl-beta-d-thioglucopyranoside)^[18],是一种非离子型去污剂,可以较柔和的方式裂解菌体,减少蛋白变性,且使蛋白处于浓缩状态,便于进一步的鉴定和分析。本文结果表明,两种方法均有效地破碎了菌体,用 B-PER™ II 试剂操作更方便,较适合于实验室制备和分析用,特别是在无超声设备的情况下。

GSTrap 亲和柱可纯化蛋白,由于与胶颗粒连接的是 GST 的配体,因此也可起到初步鉴定融合蛋白的作用。虽然用亲和柱一步纯化可去掉大部分的宿主菌体蛋白,但往往达不到预期的纯度。因此,进一步用阴离子交换柱进行纯化,获得了具有较高纯度的蛋白,并用 Western blotting 进行了进一步鉴定。

免疫家兔制备的多抗具有较高的效价,为去除抗血清的抗 GST 的抗体,本实验进一步用 GST 柱吸附去掉识别 GST 的抗体,ELISA 和 Western blotting 鉴定表明,获得了具有较高 MUC1/Y 特异性的抗体,并可与 MUC1/Y 阳性乳腺癌细胞系结合,因此,可用于进一步的相关实验研究。目前正在制备 MUC1/Y30 的单抗。

上述研究为下一步进行 MUC1/Y 功能和在肿瘤生物学治疗中应用的研究创造了良好条件。

REFERENCES (参考文献)

[1] Moniaux N, Escande F, Porchet N, Aubert J P, Batra S K. Struc-

tural organization and classification of the human mucin genes. *Front Biosci*, 2001, **6**: D1192 - 1206

- [2] ZHANG L X (张立新), LI C H (李春海). Immunological function and its application in cancer biotherapy of MUC1. *Chin J Cancer Biotherapy* (中国肿瘤生物治疗杂志), 2000, **7**(3): 165 - 170
- [3] Taylor-Papadimitriou J, Finn O J. Biology, biochemistry and immunology of carcinoma-associated mucins. *Immunology Today*, 1997, **18**(3): 105 - 107
- [4] Zrihan-licht S, Vos H L, Baruch A, Elroy-stein O, Sagiv D, Keydar I, Hilkins J, Wreschner D H. Characterization and molecular cloning of a novel MUC1 protein, devoid of tandem repeats, expressed in human breast cancer tissue. *Eur J Biochem*, 1994, **224**(2): 787 - 795
- [5] Hartman M, Baruch A, Ron I, Aderet Y, Yoeli M, Saggi-Assif O, Greenstein S, Stadler Y, Weiss M, Yaakubovits M, Keydar I, Smorodinsky N I, Wreschner D H. MUC1 isoform specific monoclonal antibody 6E6/2 detects preferential expression of the novel MUC1/Y protein in breast and ovarian cancer. *Int J Cancer*, 1999, **82**(2): 256 - 267
- [6] Obermair A, Schmid B C, Packer L M, Leodolter S, Birner P, Ward B G, Crandon A J, McGuckin M A, Zeillinger R. Expression of MUC1 splice variants in benign and malignant ovarian tumours. *Int J Cancer* 2002, **100**(2): 166 - 171
- [7] Zrihan-licht S, Baruch A, Elroy-stein O, Keydar I, Wreschner D H. Tyrosine phosphorylation of MUC1 breast cancer membrane proteins-cytokine receptor-like molecules. *FEBS Lett*, 1994, **356**(1): 130 - 136
- [8] Pandey P, Kharbada S, Kufe D. Association of the DF3/MUC1 breast cancer antigen with Grb2 and Sos/Ras exchange protein. *Cancer Res*, 1995, **55**(18): 4000 - 4003
- [9] Baruch A, Hartman M, Zrihan-licht S, Greenstein S, Burstein M, Keydar I, Weiss M, Smorodinsky N I, Wreschner D H. Preferential expression of novel MUC1 tumor antigen isoforms in human epithelial tumors and their tumor potentiating function. *Int J Cancer*, 1997, **71**(5): 741 - 749
- [10] ZHANG L X (张立新), LI C H (李春海), SUN L Y (孙丽亚). Molecular cloning of MUC1/Y and soluble expression of its extra-cellular fragment in *E. coli*. *Chin J Biochem Mol Biol* (中国生物化学与分子生物学报), 2001, **17**(5): 579 - 584
- [11] ZHANG L X (张立新), LI C H (李春海), SUN L Y (孙丽亚), YUE W (岳文). MUC1/Y-binding peptides generated by biopanning a phage display library. *Chin J Cancer Biotherapy* (中国肿瘤生物治疗杂志), 2001, **8**(3): 196 - 200
- [12] Bollag D M, Edelman S J. *Protein Methods*. A John Wiley & Sons, Inc. Publication. 1991, pp182 - 203
- [13] Smith D B, Johnson K S. Single step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene*, 1988, **67**(1): 31 - 40
- [14] Frangioni J V, Neel B G. Solubilization and purification of enzymatically active glutathione S-transferase (pGEX) fusion protein. *Anal Biochem*, 1993, **210**(1): 179 - 187
- [15] Saluta M, Bell P A. Troubleshooting GST-fusion protein expression in *E. coli*. *Life Science News*, 1997, issue 1, <http://www.apbiotech.com/product/publication/lsn/lsn-1-7/lsn-1-7.htm>
- [16] Carrio M M, Villaverde A. Construction and deconstruction of bacte-