

SOX4 单克隆抗体的制备及其在肿瘤细胞表达分析中的应用

于鸣¹, 穆蕊², 吕明¹, 李爱玲², 郭宁¹

1 军事医学科学院基础医学研究所 细胞免疫学研究室, 北京 100850

2 国家生物医学分析中心, 北京 100850

摘要: 应用分子生物学技术, 构建了含 SOX4 编码序列的原核表达载体, 在大肠杆菌 DH5 α 中获得了 GST-SOX4 融合蛋白的可溶性表达。应用谷胱甘肽-Sepharose 4B 对重组蛋白进行了纯化, 利用纯化的融合蛋白免疫小鼠, 制备了可特异性识别 SOX4 的单克隆抗体。通过间接 ELISA 法鉴定了抗体的效价为 1×10^{-5} , Western blotting 分析证实了抗体的特异性。结果显示, 该抗体可识别细胞内外源性过表达及内源性的 SOX4 蛋白。在培养细胞系、小鼠不同组织中, SOX4 蛋白的表达存在显著的差异。本研究制备的 SOX4 单克隆抗体具有良好的特异性, 为进一步研究 SOX4 在肿瘤发生中的作用提供了重要的工具。

关键词: SOX4, 融合蛋白, 单克隆抗体, 肿瘤发生

Preparation of the monoclonal antibody against SOX4 protein and detection of SOX4 expression level in different tumor cell lines

Ming Yu¹, Rui Mu², Ming Lü¹, Ailing Li², and Ning Guo¹

1 Department of Molecular Immunology, Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China

2 National Center of Biomedical Analysis, Beijing 100850, China

Abstract: In the present study, we constructed a prokaryotic expression vector containing SOX4 protein encoding sequences. The GST-SOX4 soluble protein was expressed in *Escherichia coli* DH5 α and purified by glutathione sepharose-4B. The purified recombinant protein was used to immunize Balb/C mice and the monoclonal antibody against SOX4 was prepared by using hybridoma technique. The titer of the antibody was determined as 1×10^{-5} by indirect ELISA. The specificity of the antibody was verified by Western blotting analysis. The monoclonal antibody specifically recognized the overexpressed exogenous SOX4 protein as well as endogenous SOX4 protein. The expression level of SOX4 protein in different cell lines and mouse tissues was detected by using the antibody. Differential expression of the protein was demonstrated by Western blotting. The data indicated that the antibody was specific. The antibody can be used as an important tool for further exploration of the role of SOX4 in tumorigenesis.

Received: August 27, 2008; **Accepted:** December 3, 2008

Supported by: National High Technology Research and Development Program (863 Program) (No. 2006AA02A245), National Natural Science Foundation of China (No. 30771981), and Natural Science Foundation of Beijing (No. 7082070).

Corresponding author: Ning Guo. Tel: +86-10-68213039; E-mail: ningguo@nic.bmi.ac.cn

国家高新技术研究与发展项目(863 计划) (No. 2006AA02A245), 国家自然科学基金项目(No. 30771981), 北京市自然科学基金项目(No. 7082070) 资助。

Keywords: SOX4 protein, fusion protein, monoclonal antibody, tumorigenesis

SOX 是一类 SRY (Sex determination region of Y chromosome) 相关基因构成的控制发育的基因家族, 在不同进化地位物种中具有高度的同源性, 编码一组在结构上与 SRY 相关的转录因子。该转录因子家族所有成员的共同特点是含有一个高度保守的 HMG 盒 (High mobility group box) DNA 结合结构域, 称为 SOX (SRY-related HMG-box)。SOX4 是 SOX 家族成员之一, 在许多进化过程中发挥重要的作用, 如胚胎期心脏发育、神经系统发育和胸腺发育等。SOX4(-/-) 小鼠由于心内膜嵴发育不完全, 在胚胎期 14 天可因循环衰竭而死亡^[1]。此外, SOX4 还参与早期 B 细胞、胰腺以及骨骼^[2-6]等系统的发育过程。近年来, 越来越多的研究发现, SOX4 在许多肿瘤细胞中高表达, 包括肺癌、乳腺癌、肝癌、结肠癌、前列腺癌、膀胱癌等, 提示 SOX4 可能也参与肿瘤的生长调控过程, 与肿瘤的发生、发展以及预后相关^[7-11]。然而, SOX4 在肿瘤发生中发挥的作用至今仍未完全阐明, 其调控的靶基因以及与其相互作用的蛋白仍有待进一步发现。

为探索 SOX4 在肿瘤发生发展中的分子机制, 本研究通过分子生物学技术, 构建了 GST-SOX4 融合基因, 在原核细胞中获得了融合蛋白的可溶性表达。应用谷胱甘肽-Sepharose 4B, 纯化了 GST-SOX4 融合蛋白。用纯化的融合蛋白免疫小鼠, 筛选并获得可特异性识别 SOX4 的单克隆抗体, 进一步利用该抗体检测了 SOX4 在不同肿瘤细胞系、正常小鼠的不同组织、人肺癌旁及肿瘤组织中的表达。

1 材料与方法

1.1 质粒、菌株、细胞与动物

含人源 SOX4(130~344 aa) 编码区基因的真核表达载体 pXJ40-Myc-SOX4(130~344 aa) 由本实验室克隆并保存。原核表达载体 pGEX-KG-GST、大肠杆菌 DH5 α 、小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 均由本实验室保存。雌性 4~6 周龄 SPF 级 BALB/c 小鼠由军事医学科学院动物中心提供。

1.2 生化试剂

限制性内切酶购自 NEB 公司, T4 DNA 连接酶

购自 Invitrogen 公司, PCR 回收试剂盒、质粒提取试剂盒均购自 Promega 公司, DNA 分子量标准购自 TaKaRa 公司, 蛋白质分子量标准购自 Fermentas 公司, 谷胱甘肽-Sepharose 4B-珠子购自 Amersham Pharmacia Biotech 公司。完全弗式佐剂、不完全弗式佐剂、GSH(还原型谷胱甘肽)、HAT、HT 均购自 Sigma 公司。

1.3 表达载体的构建及鉴定

用 BamH I 和 Hind III 同时双酶切质粒 pXJ40-Myc-SOX4(130~344 aa) 及原核表达载体 pGEX-KG-GST, 经琼脂糖凝胶分离、纯化目的片段, 在 T4 DNA 连接酶的作用下连接。用连接产物转化大肠杆菌 DH5 α , 提取质粒 DNA, 通过酶切鉴定重组阳性克隆 pGEX-KG-GST-SOX4(130~344 aa)。

1.4 GST-SOX4(130~344 aa) 融合蛋白的诱导表达

将 pGEX-KG-GST-SOX4(130~344 aa) 表达载体转化菌接种于 5 mL LB 培养基, 在 37°C 下用 1 mol/L IPTG 诱导。分别收集 IPTG 诱导表达前后的菌液, 裂解后用 SDS-PAGE 分离, 考马斯亮蓝染色, 分析融合蛋白的诱导表达。同时用 IPTG 诱导 pGEX-KG-GST 空载体转化的大肠杆菌 DH5 α 作对照。

1.5 GST-SOX4(130~344 aa) 融合蛋白的纯化

将 pGEX-KG-GST-SOX4(130~344 aa) 表达载体转化的 DH5 α 接种于 400 mL LB 培养基中, 用 0.1 mol/L IPTG 在 20°C 下低温诱导表达。收集菌液超声后, 用谷胱甘肽-Sepharose 4B 进行重组蛋白的纯化。纯化后的谷胱甘肽-Sepharose 4B-珠子经过 GSH 洗脱, 获得 GST-SOX4(130~344 aa) 融合蛋白。将融合蛋白真空冻干, 采用 Bradford 法进行蛋白定量。

1.6 SOX4 单克隆抗体的制备

将 100 μ g GST-SOX4(130~344 aa) 融合蛋白与弗氏完全佐剂充分乳化, 皮下注射 4~6 周龄 BALB/c 雌性小鼠。首次免疫 4 周后, 将 100 μ g GST-SOX4(130~344 aa) 融合蛋白与弗氏不完全佐剂充分乳化, 对 BALB/c 小鼠进行第 2 次皮下注射。4 周后, 进行第 3 次皮下注射。于第 3 次免疫后的第 15 天, 经尾静脉采血, 用 ELISA 法测定血清抗体

的效价。于第 3 次免疫 4 周后, 实施加强免疫。加强免疫 3 d 后, 取脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞株 SP2/0 细胞按常规方法融合。用间接 ELISA 法筛选, 有限稀释法克隆化, 并按常规方法制备鼠单抗。

1.7 SOX4 单克隆抗体的鉴定

采用间接 ELISA 法测定单克隆抗体的效价; 通过 Western blotting 鉴定抗体的特异性。用 pXJ40-Myc 空载体和 pXJ40-Myc-SOX4 分别转染 293T 细胞, 转染 48 h 后裂解细胞。应用 SDS-PAGE 分离细胞裂解液, 转印至硝酸纤维素膜, Western blotting 分析抗体对 SOX4 蛋白的识别。一抗分别采用抗 Myc 单克隆抗体及 SOX4 单克隆抗体, 二抗为辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG, ECL 显色。

1.8 SOX4 蛋白在不同肿瘤细胞系中的表达分析

检测的细胞包括: 肝癌细胞 HepG2、乳腺癌细胞 ZR-75-1、MDA-231 和 MCF-7、肺癌细胞 H460、结肠癌细胞 HCT116、骨肉瘤细胞 U2OS、人胚肾细胞 HEK293 及 293T 细胞。通过 Western blotting 分析, 检测 SOX4 蛋白在不同细胞系中的表达。

1.9 SOX4 蛋白在不同小鼠组织和人肿瘤组织中的表达分析

分别取 4~6 周龄 BALB/c 小鼠的生殖腺、胸腺、脑等组织, 制备组织匀浆, 通过 Western blotting 分析, 检测 SOX4 蛋白在小鼠不同组织中的表达。同时采集 3 对人肺癌及癌旁组织样品, 通过 Western blotting 分析, 检测人癌旁及肿瘤组织中 SOX4 蛋白的表达。

2 结果

2.1 pGEX-KG-GST-SOX4(130~344 aa)原核表达载体的构建及鉴定

将构建的 pGEX-KG-GST-SOX4(130~344 aa) 原核表达载体用 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切, 经琼脂糖凝胶电泳分析, 可见酶切反应产物中出现大小约为 640 bp 的片段, 表明目的片段已成功地插入表达载体(图 1)。经核酸序列测定, 证实插入片段为 SOX4 编码序列, 且序列完全正确。用该表达载体转化大肠杆菌 DH5 α , 经 IPTG 诱导重组蛋白表达, 超声裂解全菌后, 通过 SDS-PAGE 鉴定, 在约 49 kD 处可见预期分子量大小的条带, 证实 GST-SOX4

(130~344 aa) 融合蛋白在转化菌中表达成功, 而用 IPTG 诱导 pGEX-KG-GST 空载体转化菌则未见此条带(图 2)。进一步通过对转化菌超声后的上清及沉淀进行分析, 发现表达产物存在于转化菌超声上清中, 表明重组蛋白以可溶性形式表达。

2.2 重组蛋白的纯化

在小量诱导表达的基础上, 将 pGEX-KG-GST-SOX4(130~344 aa) 表达载体转化的 DH5 α 接种于 400 mL 培养基, IPTG 诱导后收集转化菌超声上清, 用谷胱甘肽-Sepharose 4B-珠子纯化 GST-SOX4 (130~344 aa) 融合蛋白, SDS-PAGE 分析结果见图 3。通过洗脱、冻干后获得了纯化的 GST-SOX4 (130~344 aa) 重组蛋白。

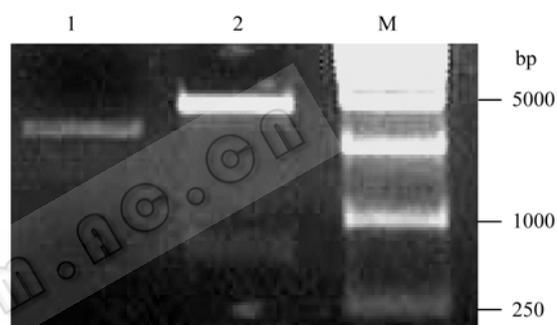


图 1 质粒 pGEX-KG-SOX4(130~344 aa)的酶切鉴定

Fig. 1 Identification of the recombinant vector. pGEX-KG-SOX4(130~344 aa) by restriction enzyme digestion. 1: before digestion; 2: after digestion; M: marker.

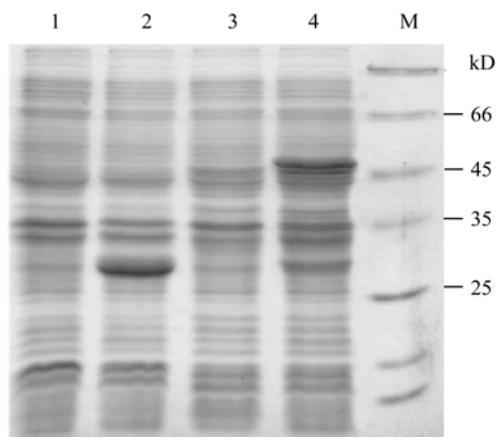


图 2 融合蛋白的小量诱导表达

Fig. 2 Expression of the fusion protein at a small scale by induction. 1: before induction for pGEX-KG; 2: after induction for pGEX-KG; 3: before induction for pGEX-KG-SOX4 (130~344 aa); 4: after induction for pGEX-KG-SOX4 (130~344 aa); M: marker.

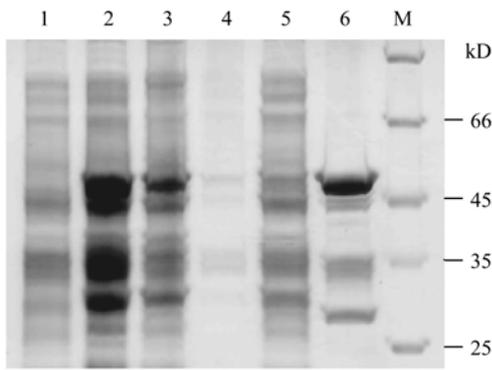


图3 重组蛋白的大量诱导表达及纯化

Fig. 3 Expression of the recombinant protein at a large scale by induction. 1: before induction for pGEX-KG-SOX4 (133~344 aa); 2: total protein after induction for pGEX-KG-SOX4 (133~344 aa); 3: the supernatant after sonication; 4: the pellet after sonication; 5: the supernatant through glutathione-Sepharose 4B beads; 6: the glutathione-Sepharose 4B beads; M: marker.

2.3 SOX4 单克隆抗体特性的鉴定

用纯化的重组蛋白免疫动物, 3次免疫后分离脾细胞, 经过细胞融合、筛选及克隆化, 获得2株能稳定分泌SOX4单抗的杂交瘤细胞株(20#、21#)。应用间接ELISA法检测, 证实抗体的效价均为 1×10^{-5} 。

进一步用含SOX4编码序列的真核表达载体pXJ40-Myc-SOX4转染293T细胞, 应用抗Myc抗体及抗SOX4抗体检测外源转染的SOX4蛋白在转染细胞中的表达, 以鉴定抗体的特异性。结果如图4所示, 用抗Myc抗体可在转染的293T细胞中检测到带Myc标签的外源性SOX4蛋白; 用抗SOX4单抗检测亦可见相应分子量大小的蛋白条带, 而在转染pXJ40-Myc空载体的细胞中未检测到任何条带(图4)。结果表明, 本实验制备的SOX4单克隆抗体能特异性地识别SOX4蛋白。

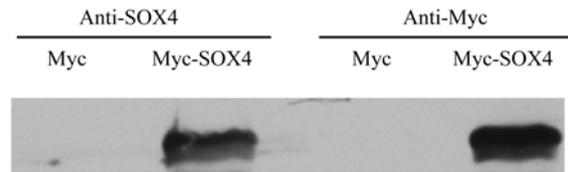


图4 应用抗SOX4单克隆抗体及Western blotting鉴定外源性SOX4蛋白的表达

Fig. 4 Expression of exogenous SOX4 protein identified by using anti-SOX4 monoclonal antibody and Western blotting.

2.4 SOX4 蛋白在不同培养细胞系中的表达

应用抗SOX4抗体通过Western blotting检测了不同培养细胞系中内源性SOX4蛋白的表达, 选择了人的肿瘤细胞系和正常细胞株, 包括肝癌细胞HepG2、乳腺癌细胞ZR-75-1、MDA-231、MCF-7、肺癌细胞H460、结肠癌细胞HCT116、骨肉瘤细胞U2OS、人胚肾细胞HEK293和293T细胞。结果显示, SOX4在MCF-7、HCT116和293T细胞中表达水平较高, 在其他细胞系中未检测到SOX4的表达, 表明在不同的细胞系中SOX4蛋白的表达存在显著的差异(图5)。

2.5 SOX4 蛋白在不同小鼠组织和人肿瘤组织中的表达

进一步应用抗SOX4蛋白的单克隆抗体及Western blotting, 检测分析了小鼠不同组织中(包括脑、生殖腺、肺、肝、肾等组织)SOX4蛋白的表达谱。结果显示, SOX4蛋白在小鼠的生殖腺、胸腺、脑等组织表达水平较高。此结果与文献报道的SOX4组织特异性表达部位基本一致^[2-6](图6)。又采集了3对人肺癌及癌旁组织样品, 应用已制备的抗SOX4抗体检测了SOX4蛋白在人肿瘤及癌旁组织中的表达。结果显示, 此抗体既可识别人源组织中的SOX4蛋白, 又可识别鼠源SOX4蛋白(图7)。

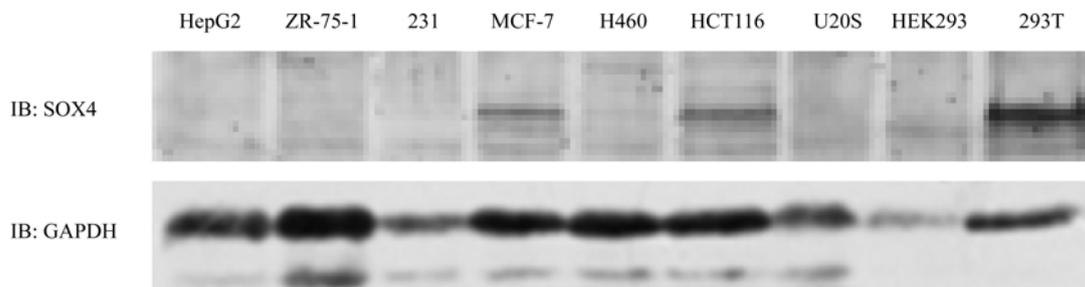


图5 不同细胞系中SOX4蛋白的表达

Fig. 5 Expression of SOX4 protein in various cell lines.

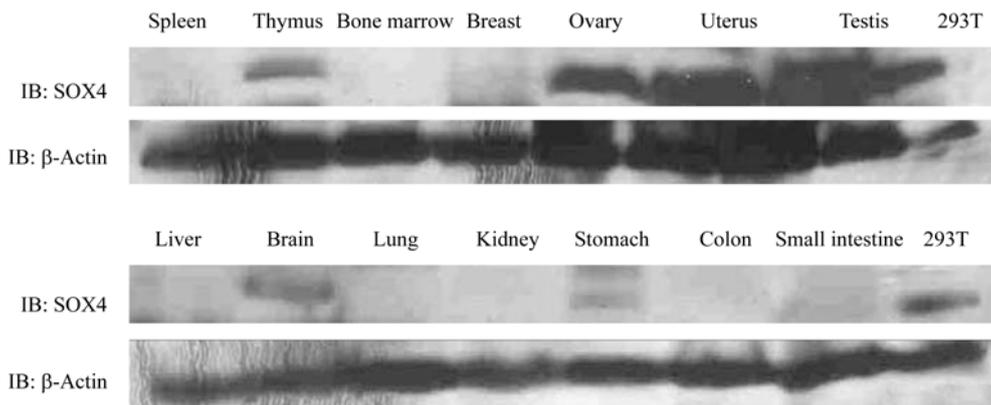


图 6 SOX4 蛋白在不同组织中的表达

Fig. 6 Expression of SOX4 protein in various tissues.

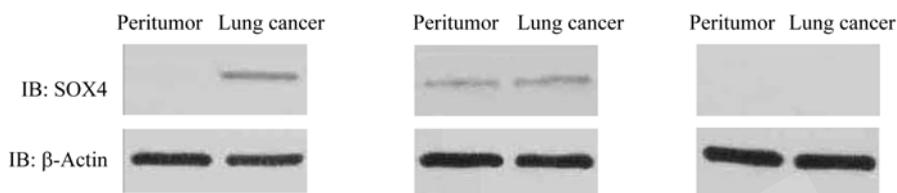


图 7 肺癌组织中 SOX4 蛋白的表达

Fig. 7 Expression of SOX4 protein in lung cancer tissues.

3 讨论

SOX4 的复杂功能已越来越受关注,它在肿瘤发生中的作用远未被人们所认知。SOX4 的特异性单克隆抗体对于深入研究 SOX4 的功能、它的相互作用蛋白以及解析其在肿瘤调控中的作用是不可或缺的,而目前尚无商品化的 SOX4 单克隆抗体。本研究应用分子克隆技术构建了含 SOX4 编码序列的原核表达载体,在大肠杆菌 DH5 α 中成功地获得了 GST-SOX4 重组蛋白的可溶性表达。利用纯化的融合蛋白免疫小鼠,通过细胞融合技术制备了可特异性识别 SOX4 的单克隆抗体。通过间接 ELISA 法鉴定了抗体的效价,应用 Western blotting 分析了抗体的特异性,证实本实验制备的抗 SOX4 单抗可识别外源性 SOX4 蛋白。应用 SOX4 单抗对多种不同的培养细胞系及小鼠不同组织进行 Western blotting 分析证实,该抗体亦可识别内源性表达的 SOX4 蛋白。检测结果亦显示,在不同的培养细胞系以及小鼠不同组织中,SOX4 蛋白的表达存在显著的差异。对不同肺癌及癌旁组织样品的 Western blotting 分析结果显示,此抗体亦可识别人组织中的 SOX4 蛋白。据文献报道^[7-11],SOX4 在多种肿瘤

细胞中高表达。Liao 等^[12]通过 RT-PCR 的方法,检测了 6 种肝癌细胞中 SOX4 的 mRNA 含量,发现各种不同的肝癌细胞中 SOX4 mRNA 表达水平亦不相同,但均高于正常成人肝组织。应用抗 SOX4 抗体初步检测了人肺癌及癌旁组织中 SOX4 蛋白的表达,在 3 例人肺癌样品中有 2 例呈阳性反应。为进一步验证 SOX4 在癌组织中的表达特征,尚需收集大量癌组织、癌旁组织及正常组织进行分析。总之,SOX4 特异性单克隆抗体的制备为在蛋白水平上研究 SOX4 在肿瘤组织中的表达特征以及在细胞分化、肿瘤发生等生命过程中的作用提供了重要的工具。

REFERENCES

- [1] Schilham MW, Oosterwegel MA, Moerer P, *et al.* Defects in cardiac outflow tract formation and pro-B-lymphocyte expansion in mice lacking Sox-4. *Nature*, 1996, **380**(6576): 711-714.
- [2] Schilham MW, Clevers H. HMG box containing transcription factors in lymphocyte differentiation. *Semin Immunol*, 1998, **10**(2): 127-132.
- [3] Schilham MW, Moerer P, Cumano A, *et al.* Sox-4 facilitates thymocyte differentiation. *Eur J Immunol*, 1997, **27**(5): 1292-1295.
- [4] Potzner MR, Griffel C, Lütjen-Drecoll E, *et al.* Prolonged

- SoX4 expression in oligodendrocytes interferes with normal myelination in the central nervous system. *Mol Cell Biol*, 2007, **27**(15): 5316–5326.
- [5] Wilson ME, Yang KY, Kalousova A, *et al.* The HMG box transcription factor SoX4 contributes to the development of the endocrine pancreas. *Diabetes*, 2005, **54**(12): 3402–3409.
- [6] Nissen-Meyer LS, Jemtland R, Gautvik VT, *et al.* Osteopenia decreased bone formation and impaired osteoblast development in SoX4 heterozygous mice. *J Cell Sci*, 2007, **120**(16): 2785–2795.
- [7] Yokota N, Mainprize TG, Taylor MD, *et al.* Identification of differentially expressed and developmentally regulated genes in medulloblastoma using suppression subtraction hybridization. *Oncogene*, 2004, **23**(19): 3444–3453.
- [8] Bangur CS, Switzer A, Fan L, *et al.* Identification of genes over-expressed in small cell lung carcinoma using suppression subtractive hybridization and cDNA microarray expression analysis. *Oncogene*, 2002, **21**(23): 3814–3825.
- [9] McGowan EM, Clarke CL. Effect of overexpression of progesterone receptor A on endogenous progestin-sensitive endpoints in breast cancer cells. *Mol Endocrinol*, 1999, **13**(10): 1657–1671.
- [10] Liu P, Ramachandran S, Ali Seyed M, *et al.* Sex-determining region Y box 4 is a transforming oncogene in human prostate cancer cells. *Cancer Res*, 2006, **66**(8): 4011–4019.
- [11] Aaboe M, Birkenkamp-Demtroder K, Wiuf C, *et al.* SOX4 expression in bladder carcinoma: clinical aspects and *in vitro* functional characterization. *Cancer Res*, 2006, **66**(7): 3434–3442.
- [12] Liao YL, Sun YM, Chau GY, *et al.* Identification of SOX4 target genes using phylogenetic footprinting-based prediction from expression microarrays suggests that overexpression of SOX4 potentiates metastasis in hepatocellular carcinoma. *Oncogene*, 2008, **27**(42): 5578–5589.

科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介

中药材生物多样性及核酸分析技术

赵树进 主编 陈念 严萍 副主编

978-7-03-022016-5 ¥48.00 2008年12月出版

本书是作者多年来从事中药材生物多样性及其核酸分子鉴定研究经验的总结，不仅介绍中药材核酸分析常用的基本分子生物学理论和技术，还汇集了当前国内外中药材物种鉴定领域的最新研究成果，以及在技术上的一些经典的极具代表性的实例。全书分为三篇共十二章。第一篇立足于生物多样性与遗传资源的基本概念，和相关理论知识，对中药材资源保护的背景和意义进行了详细地介绍。同时结合遗传多样性研究的基本方法对物种遗传变异和物种鉴定研究的关系进行了分析。第二篇介绍了中药材常用的核酸提取分析方法。第三篇简要介绍了应用于中药材核酸分析的各种分子技术的基本概念，原理以及各种技术在中药材鉴定及遗传多样性研究中的应用。

本书可供从事中医药、生物学和农林科学等相关领域的科技工作者、大专院校的师生和其他所有感兴趣的爱好者参考使用。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书（免邮费）

邮购地址：北京东黄城根北街16号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编：100717

联系人：阮芯 联系电话：010-64034622（带传真）

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>