

# 人类天冬酰胺酰基 $\beta$ -羟化酶的表达及其单克隆抗体的制备

呼延霆, 尹大川, 王伟, 宋凯, 王燕, 卢慧蕙, 杨慧, 薛小平

西北工业大学生命学院, 西安 710072

**摘要:** 旨在深入研究人类天冬酰胺酰基  $\beta$ -羟化酶 (HAAH) 在肿瘤早期诊断中的作用机制。应用 RT-PCR 方法从肝癌组织中获得人类天冬酰胺酰基  $\beta$ -羟化酶 HAAH 编码基因, 并在原核表达载体 pBV-IL1 中进行融合表达, 将 Ni 柱纯化的融合蛋白免疫 Balb/c 小鼠, 获得了 3 株稳定的阳性单克隆细胞株 (H<sub>3</sub>/E<sub>10</sub>、E<sub>4</sub>/F<sub>12</sub>、G<sub>4</sub>/D<sub>8</sub>), 间接 ELISA 和 Western blotting 鉴定单抗的特异性和灵敏度, 以单抗 H<sub>3</sub>/E<sub>10</sub> 介导的间接免疫荧光检测 HAAH 在各种肿瘤细胞系中的表达, 可见特异的荧光。试验中成功构建了可表达 HAAH 基因的原核表达载体 pBV-IL1-HAAH, 并制备了 3 株抗 HAAH 的单克隆抗体, 为 HAAH 的结构和功能的研究奠定了基础, 同时也为进一步将该抗体应用于肿瘤的早期诊断以及研究 HAAH 在肿瘤发生转移中的机理提供了重要工具。

**关键词:** 人类天冬酰胺酰基  $\beta$ -羟化酶, pBV-IL1, 原核表达, 单克隆抗体

## Expression of human aspartyl $\beta$ -hydroxylase and preparation of its monoclonal antibody

Ting Huyan, Dachuan Yin, Wei Wang, Kai Song, Yan Wang, Huimeng Lu, Hui Yang, and Xiaoping Xue

Faculty of Life Science, Northwestern Polytechnical University, Xi'an 710072, China

**Abstract:** We investigated the mechanism of human aspartyl  $\beta$ -hydroxylase (HAAH) in early diagnosis of tumors. The encoding gene of HAAH was cloned from the hepatic carcinoma by RT-PCR and expressed as a fused protein in the prokaryotic vector pBV-IL1. The expressed HAAH was purified by Ni<sup>2+</sup>-NTA purification column and the purified protein was then used to immunize Balb/c mice. Three hybridoma cell lines (respectively designated H<sub>3</sub>/E<sub>10</sub>, E<sub>4</sub>/F<sub>12</sub> and G<sub>4</sub>/D<sub>8</sub>) stably expressing the monoclonal antibody specific to HAAH fusion protein were obtained. The specificity and sensitivity of the monoclonal antibody were assessed by indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and Western blot analysis. Finally, the monoclonal antibody expressed by H<sub>3</sub>/E<sub>10</sub> cell line was used to detect the expression of HAAH in several tumor cell lines by indirect immuno-fluorescence, and the specific fluorescence was observed. In conclusion, this study successfully constructed the recombinant prokaryotic vector pBV-IL1-HAAH and prepared HAAH-specific monoclonal antibody for further study of the structure and function of the protein. The

**Received:** July 21, 2010; **Accepted:** October 28, 2010

**Supported by:** Doctorate Foundation of Northwestern Polytechnical University (No. CX201023), Basic Scientific Research Foundation of Northwestern Polytechnical University (No. 003).

**Corresponding author:** Xiaoping Xue. Tel/Fax: +86-29-88460541; E-mail: Xiaoping@fmmu.edu.cn  
西北工业大学博士论文创新基金 (No. CX201023), 西北工业大学基础科研基金 (No. 003) 资助。

result may also lay solid foundation for the research of the molecular mechanism of HAAH in early diagnosis of tumors.

**Keywords:** human aspartyl  $\beta$ -hydroxylase, pBV-IL1, prokaryotic expression, monoclonal antibody

人类天冬酰胺基  $\beta$ -羟化酶 (Human Aspartyl/Asparaginyl  $\beta$ -hydroxylase, HAAH) 是胚胎期即存在于细胞内的一种酶, 属于依赖  $\alpha$ -酮戊二酸双加氧酶家族, 可催化特定蛋白中表皮生长因子 (EGF) 受体样结构域的天冬氨酸或天冬酰胺残基上的  $\beta$ -碳原子羟化<sup>[1]</sup>。10 余年的研究表明 HAAH 在肿瘤细胞表面的高表达, 使得瘤细胞的运动性和扩散性显著增加, 并通过血管和淋巴管扩散到临近的正常组织, 最终引起肿瘤的恶性转化和肿瘤病灶的形成, 但其作用机制尚不明确。因此它可能是体内调节肿瘤细胞生长的重要靶点, 被认为是一种新型恶性肿瘤高特异性的分子标记物<sup>[2]</sup>。

本研究利用温度诱导的原核表达载体 pBV-IL1<sup>[3]</sup> 重组表达了 HAAH 蛋白, 经纯化后用重组蛋白免疫小鼠, 筛选并获得了抗 HAAH 特异的单克隆抗体细胞株, 为 HAAH 的结构和功能的研究奠定了基础, 同时也为进一步将该抗体应用于肿瘤的早期诊断以及研究 HAAH 在肿瘤发生转移中的机理提供了重要工具。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

肝癌组织: 由第四军医大学西京医院消化病医院赵青川教授提供, 样品的取得均遵守现行的道德规范准则, 并正式得到所有参与者和该研究各方的同意, 该组织标本经病理检验确诊为肝细胞肝癌, 保存在液氮中。肿瘤细胞系: 人肾腺癌细胞 ACHN、人膀胱癌细胞 BIU-87、人乳腺癌细胞 MCF-7、人肝癌细胞 SMMC-7721、人喉癌细胞 Hep-2、人宫颈癌细胞 HeLa、人卵巢癌细胞 SKOV、人正常肝细胞 L02 均购自中国科学院武汉细胞所。细胞培养基 DMEM 购自美国 GIBCO 公司, 新生牛血清购自杭

州四季青公司。所有细胞培养于含有 100 mL/L 新生牛血清、100 mg/L 青霉素及  $1 \times 10^4$  U/L 链霉素的 DMEM 培养液中。*E. coli* DH5 $\alpha$ 、HB101 等菌株由本室保存。

pBV-IL1 载体由本室保存; pGEMT-easy 载体购自 Promega 公司。*E. coli* DH5 $\alpha$  等菌株由本室保存; 各种限制性内切酶、T4 DNA 连接酶和 RNA 反转录试剂盒为 TaKaRa 公司产品; DNA 凝胶回收试剂盒购自 AXYGEM 公司; 鼠单克隆抗体亚型鉴定试剂盒购自 Sigma 公司; DNA Marker 和蛋白 Marker 为 Hybigen 公司和百泰克生物技术公司产品; 针对 His 的鼠源性单克隆抗体 (Catalog No.:70796-4) 为美国 Merck 公司产品, IRDye 800CW Goat Anti-Mouse IgG 荧光二抗购自美国 Li-Cor 生物技术公司。PCR 所用引物及产物测序均由上海生工生物工程有限公司合成。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 模板的制备

取液氮中的肝癌肿瘤组织约 100 mg, 依照 Trizol 法提取组织总 RNA, 使用 PrimeScript RT-PCR Kit (TaKaRa) 合成 cDNA 第一链。

#### 1.2.2 HAAH 基因的克隆

根据 GenBank 发表的 HAAH 的 cDNA 序列 (GI: 14589865), 综合利用 Primer5 和 Oligo6 引物设计软件设计 HAAH 的全长引物 (表 1)。引物 Forward 包含 *Xho* I 酶切位点及 His 标签序列; 引物 Reverse 包含 *Spe* I 酶切位点及终止码。

表 1 HAAH 克隆引物序列

Table 1 Cloning primer sequences of HAAH

Primer name	Primer sequence (5'-3')
Forward	GCCTCGAGATGCATCATCATCATCATCAT ATGGTGATTGCATTGCTG
Reverse	CGACTAGTTTATGTTTCTGGTGGTACTTC

以反转录得到的 HAAH cDNA 为模板, 经 PCR 扩增得到 HAAH 基因片段, PCR 产物电泳后回收目的片段, 通过 T4 DNA 连接酶将目的基因克隆到 pGEMT-easy 载体中, 连接产物转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞, 涂布于含氨苄青霉素 (100 mg/mL Amp) 的 LB 平板, 挑取单克隆进行酶切、测序鉴定获得阳性克隆。

### 1.2.3 pBV-IL1 原核表达载体的构建

将测序鉴定正确的阳性克隆载体 pGEMT/HAAH, 经 *Xho* I/*Spe* I 酶切后得到 HAAH 基因片段, 插入到同时经 *Xho* I/*Xba* I 酶切的 pBV-IL1 载体中, 连接转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞, 涂布于含 Amp 抗性的 LB 平板, 挑取单克隆提取质粒后进行酶切鉴定, 获得重组载体 pBV-IL1-HAAH。

### 1.2.4 HAAH 重组蛋白的诱导表达鉴定、可溶性分析及其纯化

将重组 pBV-IL1-HAAH 原核表达载体转化入 HB101 宿主菌, 过夜菌 1:50 转接入含 Amp 的 LB 培养基中, 30  $^{\circ}$ C 摇菌 4 h, 再调节培养温度至 42  $^{\circ}$ C 诱导目的蛋白表达, 诱导培养时间 5 h。同时设空载体对照组 (培养条件同实验组) 和非诱导培养对照组 (30  $^{\circ}$ C 培养)。

4 000 r/min、4  $^{\circ}$ C 离心 30 min, 收集得到菌体后, 取少量菌液与 2 $\times$ 上样缓冲液混合, 95  $^{\circ}$ C、10 min 裂解菌体后, 进行 SDS-PAGE 和 Western blotting 鉴定目的蛋白的表达。以抗 His 标签的单抗作为一抗, 以羊抗鼠荧光抗体 (Goat anti mouse IRdye 800) 为二抗, 最后采用 Odyssey 红外发光显色法鉴定目的蛋白的表达; 其余大部分菌体使用超声破碎, 4 000 r/min、4  $^{\circ}$ C 离心 30 min, 分别收集上清和沉淀, 进行其可溶性分析。

收集 2 L 诱导表达菌, 10 000 r/min 离心 30 min 收集菌体沉淀, 用 100 mL 平衡液重悬后, 超声波处理 30 min, 4  $^{\circ}$ C、10 000 r/min 离心 30 min, 收集裂解上清。采用 Ni<sup>2+</sup>NTA 亲和柱纯化重组蛋白, 并备样进行 SDS-PAGE 分析。

### 1.2.5 抗 HAAH 单克隆抗体的制备及鉴定

用纯化的 HAAH 重组蛋白作为抗原对 6~8 周龄 Balb/c 小鼠进行免疫。初次免疫, 50  $\mu$ g 抗原 (溶于 100  $\mu$ L PBS) 以 1:1 (V/V) 的比例加入福氏完全佐剂, 充分混合制成乳液, 分多点注射于 Balb/c 小鼠颈背部皮下。间隔 2 周追加免疫 1 次, 方法为腹腔注射 100  $\mu$ g/只抗原 (溶于 100  $\mu$ L PBS, 不加福氏佐剂), 共追加免疫 2 次。每次免疫后 1 周尾静脉采血, 分离血清, 非竞争间接 ELISA 法测定免疫效果。细胞融合采用 PEG 融合法, 有限稀释法进行阳性克隆筛选, 阳性杂交瘤细胞以  $5 \times 10^5$ /mL 的细胞密度, 注射 Balb/c 小鼠制备腹水, 腹水的纯化按辛酸-硫酸铵法进行。

采用 Western blotting 对单克隆抗体特异性进行鉴定。单克隆抗体亚型鉴定采用间接 ELISA 法, 检测试剂盒 (Sigma 公司), 操作按使用说明进行。

非竞争酶免疫法测定抗体亲和力, 抗原以 20  $\mu$ g/mL、10  $\mu$ g/mL 和 5  $\mu$ g/mL 三个浓度分别包被 ELISA 板条, 纯化的 mAb 稀释成 11 种浓度: 4、2、1、0.5、0.25、0.13、0.06、0.03、0.02、0.01、0  $\mu$ g/mL, 分别加入不同包被量的反应孔中, 反应后依次加入 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 和底物 TMB 显色, 测 OD<sub>450</sub>。根据抗原抗体结合的 S 形曲线, 求解不同抗原浓度下半数吸光值的抗体浓度, 代入公式

$$K_a = (n-1)/(nAb'-Ab)$$

计算亲和常数, 式中 Ab 和 Ab' 分别表示当抗原浓度为 Ag 和 Ag' 时, 产生半数吸光值的抗体浓度 (mol/L),  $n=Ag/Ag'$ 。当  $n=2$  时, 可得 3 个  $K_a$  值, 以 3 个  $K_a$  值的均数作为最终结果。

### 1.2.6 抗 HAAH 单克隆抗体在肿瘤细胞系中检测 HAAH 的应用

培养人肾腺癌细胞 ACHN、人膀胱癌细胞 BIU-87、人乳腺癌细胞 MCF-7、人肝癌细胞 SMMC-7721、人喉癌细胞 Hep-2、人宫颈癌细胞 HeLa、人卵巢癌细胞 SKOV、人正常肝细胞 L02,

制备细胞爬片。以本实验获得的抗 HAAH 单克隆抗体为一抗, FITC 标记羊抗小鼠 IgG 为二抗, 并用 Hoechst33258 染核按常规方法进行间接细胞免疫荧光检测 HAAH 的表达分布。

## 2 结果

### 2.1 HAAH 基因克隆的鉴定

1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 结果获得约 750 bp 的片段, 与预期目的片段相符 (图 1)。

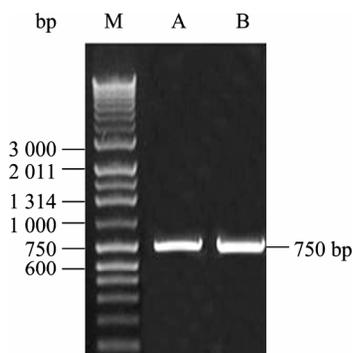


图 1 PCR 扩增得到的 HAAH 基因

Fig. 1 HAAH gene isolated by PCR. M: DNA marker (HBI 1.0 kb Plus); A,B: PCR products of HAAH gene.

用 *Xho* I 与 *Spe* I 双酶切鉴定 pGEMT-HAAH, 其中阳性克隆 A、B、D、F 切出 3.1 kb 和 750 bp 两条片段, 与预期目的片段相符 (图 2), 表明 HAAH 基因已连接到 pGEMT-easy 载体, 并将阳性克隆 A、B、D、F 测序以证明其与预期序列一致。

### 2.2 重组原核表达载体 pBV-IL1-HAAH 的鉴定

用 *Xho* I 与 *Spe* I 双酶切鉴定重组载体 pBV-IL1-HAAH, 阳性克隆切出 3.6 kb 和 750 bp 两条片段, 与预期结果相符 (图 3), 表明 HAAH 基因已成功连接到原核表达载体 pBV-IL1。

### 2.3 重组蛋白的诱导表达鉴定、可溶性分析及纯化

42 °C 诱导后, SDS-PAGE 检测融合蛋白 HAAH 的诱导表达, 结果表明目的蛋白 HAAH 获得了表达, 电泳条带经灰度扫描分析显示, 表达的融合蛋白约占菌体总蛋白的 25% (图 4), 而在 30 °C 下诱导的阴

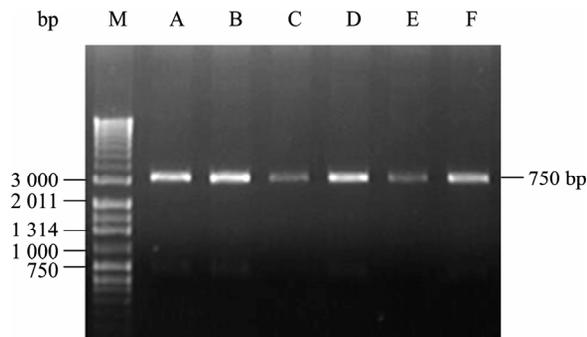


图 2 *Xho* I/*Spe* I 双酶切鉴定 pGEMT-HAAH 质粒

Fig. 2 pGEMT-HAAH digested with *Xho* I and *Spe* I. M: DNA marker (HBI 1.0 kb Plus); A,B,D,F (positive clone): plasmid of GEMT-easy (3.1 kb), HAAH segment (750 bp); C,E: negative clone.

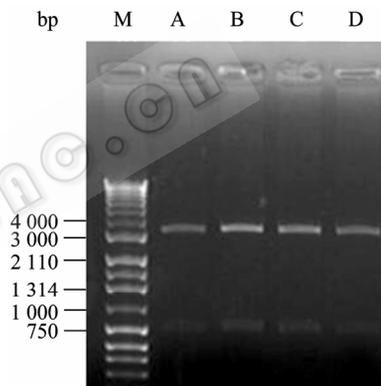


图 3 *Xho* I/*Spe* I 双酶切鉴定 pBV-IL1-HAAH

Fig. 3 pBV-IL1-HAAH digested with *Xho* I and *Spe* I. M: DNA marker (HBI 1.0 kb Plus); A-D (positive clone): pBV-IL1 (3.6 kb) HAAH segment (750 bp).

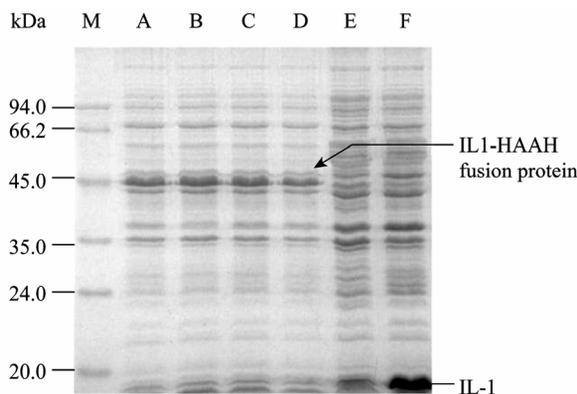


图 4 重组蛋白在 HB101 中的诱导表达

Fig. 4 Expression of recombinant protein His-HAAH in HB101. M: protein marker; A-D: product of the fusion protein induced in 42 °C; E: negative control induced in 30 °C; F: the blank positive control induced in 42 °C.

性对照 (E) 并无特异表达的条带, 42 °C 诱导的空载体阳性对照中 (F) 在 18 kDa 处有一特异表达条带, 该表达带是 pBV-IL1 空载体诱导的 IL1 蛋白<sup>[3]</sup>。Western blotting 鉴定结果进一步表明该 His-HAAH 融合蛋白能与抗 His 单抗发生特异反应, 并得到了预期表达 (图 5)。

经超声裂解后的菌体分为上清和沉淀, 可溶性分析表明目的蛋白主要存在于菌体裂解上清中 (图 6)。将裂解上清经  $\text{Ni}^{2+}$ NTA 亲和柱层析后, 得到了纯化的融合蛋白 His-HAAH (图 7)。

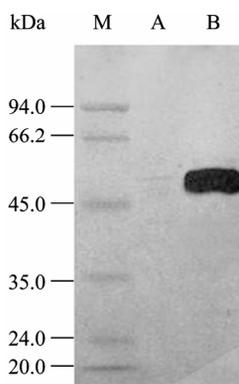


图 5 重组蛋白的 Western blotting 分析结果  
Fig. 5 Western blotting analysis of fusion protein. M: protein marker; A: negative control; B: induction of fusion protein.

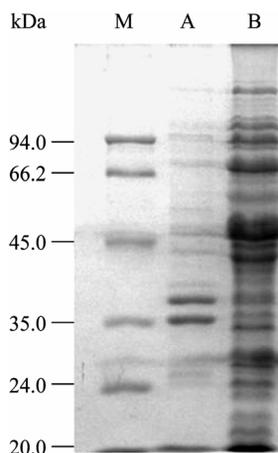


图 6 融合蛋白表达菌体裂解液的可溶性分析  
Fig. 6 Solubility analysis of expression fusion protein. M: protein marker; A: precipitate of induced pBVIL1-HAAH; B: supernatant of induced pBVIL1-HAAH.

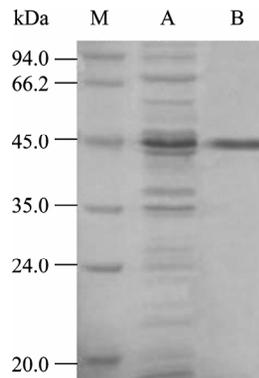


图 7 融合蛋白的纯化  
Fig. 7 Purification of fusion protein. M: protein marker; A: expression of fusion protein without purification; B: purified fusion protein.

## 2.4 单克隆抗体的制备

小鼠经 3 次免疫后, 尾静脉采血, 间接 ELISA 检测其效价均超过  $1:10^4$ 。取免疫小鼠的脾细胞与骨髓瘤细胞 SP2/0 进行 PEG 融合后, ELISA 检测确定阳性孔并进行了 3 次克隆化筛选得到了 H<sub>3</sub>/E<sub>10</sub>、E<sub>4</sub>/F<sub>12</sub>、G<sub>4</sub>/D<sub>8</sub> 三株可稳定分泌抗 HAAH 抗体的单克隆杂交瘤细胞株, 取其中的 H<sub>3</sub>/E<sub>10</sub> 株注射小鼠腹部制备腹水并进行纯化 (图 8)。

## 2.5 单克隆抗体的鉴定

### 2.5.1 Western blotting 单抗特异性鉴定

用 H<sub>3</sub>/E<sub>10</sub> 单抗检测表达的 HAAH 蛋白, Western blotting 分析结果显示, 所制备的单克隆抗体能特异地与 HAAH 蛋白反应 (图 9), 而与空载体经温度诱导后产生的 IL-1 片段无特异性结合反应。

### 2.5.2 单抗的亚类鉴定

Ig 亚类测定: 经间接 ELISA 试剂盒鉴定亚类, 所制备的 mAb 为 IgG1,  $\kappa$  轻链。

### 2.5.3 单抗的亲合力测定

以非竞争性 ELISA 对初步纯化后的单克隆抗体做亲和力常数的测定。单克隆抗体的亲和常数为  $5 \times 10^8$ , 图 10 是对不同浓度包被的抗原结合的反应曲线。

## 2.6 在肿瘤细胞系中检测 HAAH 的初步应用

在各种肿瘤细胞系中以本实验制备的单抗

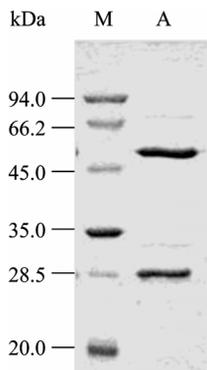


图 8 H3/E10 单克隆抗体的纯化

Fig. 8 Purification of monoclonal antibody H<sub>3</sub>/E<sub>10</sub>. M: protein marker; A: purified antibody.

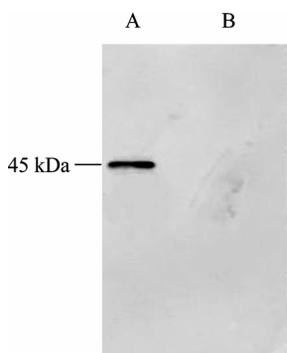


图 9 Western blotting 鉴定单抗的特异性

Fig. 9 Specificity test of monoclonal antibody by Western blotting. A: purified fusion protein; B: the blank positive control.

H<sub>3</sub>/E<sub>10</sub> 为一抗进行 HAAH 的间接免疫荧光分析结果如图 11 所示, 蓝色荧光是 Hoechst 所激发, 标记结构为细胞核。各种肿瘤细胞膜和细胞胞质区域有绿色荧光, 为 FITC 所激发, 证明在各种肿瘤细胞膜和细胞胞质区有抗原 HAAH 存在, 而在正常肝细胞 L02 中只有蓝色荧光并未有特异绿色荧光, 表明在正常细胞 L02 中未检测到 HAAH 表达。

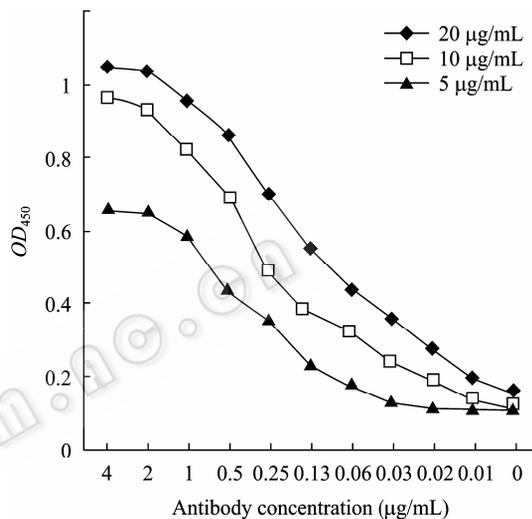


图 10 单克隆抗体对抗原的 ELISA 反应曲线

Fig. 10 Experimental ELISA curve for mAb with different antigen coating concentrations. (Antigen coating concentrations: 20 μg/mL, 10 μg/mL, 5 μg/mL).

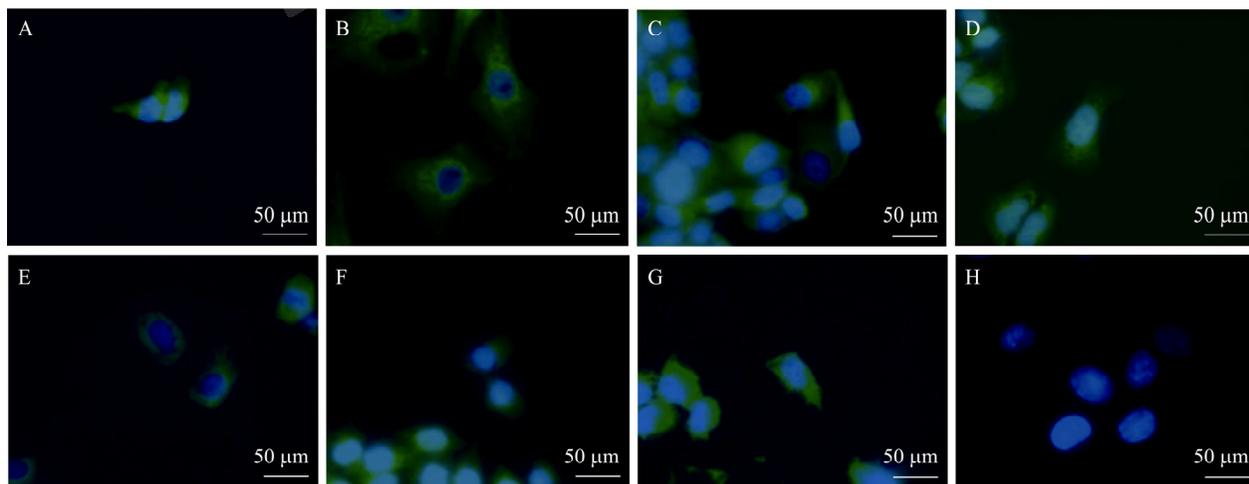


图 11 间接免疫荧光检测结果

Fig. 11 Results of indirect cellular immuno-fluorescence. (A) ACHN. (B) BIU-87. (C) MCF-7. (D) SMMC-7721. (E) Hep-2. (F) HeLa. (G) SKOV. (H) L02 (×40).

### 3 讨论

人们对 HAAH 的研究已有 10 多年的历史, 早在 1996 年, Laurent 等以肝癌细胞株 FOCUS 的细胞提取物为免疫原制备了针对肝癌细胞系的一系列单克隆抗体, 用以鉴定人肝细胞癌变时的上调表达基因。结果发现单克隆抗体 FB-50 可与其中一种膜蛋白发生特异性结合反应, 该蛋白在肝癌和胆管癌组织中高表达, 并在多种变异的非正常细胞株中高表达, 而在正常肝细胞和非新生上皮细胞不表达或低表达, 在正常人体组织中只在胎盘滋养层细胞和肾上腺细胞高表达。后用 RT-PCR 法从 HepG2 人肝癌细胞系中分离出该蛋白的全序列 cDNA, 并最终鉴定该蛋白为 HAAH。编码基因长度为 2 277 bp<sup>[1]</sup>。随后, 研究发现受 HAAH 催化的含有表皮生长因子样结构域的蛋白 (如 Notch 及其配体) 与细胞分化有关, 特别是其胞内区与致瘤性密切相关<sup>[2]</sup>, 因此 HAAH 与肿瘤的关系引起了科学家的关注, 初期的研究表明 HAAH 可在胆管癌、肝癌、乳腺癌和结肠癌中高表达<sup>[4-8]</sup>, 而正常组织细胞中不表达或仅仅是弥散性弱表达。近年来研究显示 HAAH 是受胰岛素和胰岛素样生长因子-1 调节的基因, Erk MAPK 和 AKT/PKB 通路均参与对其表达的调节<sup>[9]</sup>。HAAH 的作用机制目前还不清楚, 但作为一种肿瘤相关抗原, HAAH 与恶性肿瘤细胞的形成具有显著相关性, 已越来越受到关注。

本研究所利用的 pBV-IL1 表达载体是在 pBV220 表达载体的基础上改构而得到的载体。它保留了 pBV220 上的抗性基因、启动子  $P_{RPL}$  以及温度诱导系统。在重组质粒 pBV220-IL1 中插入 *Xho* I 和 *Xba* I 酶切位点, 不改变起始密码子和终止密码子前后的结构。本课题组研究发现 HAAH 在其他原核表达载体中很难获得高效表达 (数据未列出), 因此将 HAAH 基因克隆至 pBV-IL1 载体, pBV-IL1 载体上的 IL-1 序列对融合蛋白的表达具有促进作用, 表达

的蛋白虽然是有 IL-1 存在的融合蛋白, 但是这并不影响作为抗体制备中免疫抗原的性质<sup>[3]</sup>。胡刚等<sup>[10]</sup>在应用 pBV-L1 载体表达 HCV 核心蛋白的研究中发现, IL-1 对目的基因的表达产生上调的作用, 融合蛋白中的 IL-1 并不影响目的蛋白的抗原活性; 载体的改构者宋晓国等在研究中<sup>[11]</sup>, 曾对 IL-1 $\beta$  的晶体构象进行分析, 选择了位于分子表面的 g 环作为克隆酶切位点的插入部位, 使得插入基因能呈现在 IL-1 的表面, 这样更有利于目的蛋白抗原位点的暴露, 表达的抗原具有较好的免疫原性和反应原性。IL1 具有免疫增强活性, 可起到免疫佐剂的作用, 有报道用细胞因子和免疫原融合表达以达到增强免疫的作用<sup>[12]</sup>。

所制备的单抗 H3/E10 在 Western blotting 检测中只与表达出来的重组融合蛋白产生特异性结合反应, 而与空载体经温度诱导后产生的 18 kDa 蛋白 (IL-1 片段) 无特异性结合反应, 说明制备的单抗所识别的抗原决定簇存在于 HAAH 上而非 IL-1, 所制备的抗 HAAH mAb 具有很好的特异性。mAb 经亚类测定, 为 IgG1 型, 所以选择了辛酸-硫酸铵沉淀法纯化抗体, 纯化出的抗体纯度高于 80%, 达到了后续实验的纯度要求。以间接细胞免疫荧光染色法对 7 株肿瘤传代细胞作 HAAH 抗原检测, 结果都呈阳性, HAAH 主要定位于肿瘤细胞的胞浆和细胞膜上, 这与 HAAH N-末端有锚定序列, 并锚定于内质网膜相关<sup>[13]</sup>。

本研究成功地构建了高效表达 HAAH 的原核载体 pBV-IL1-HAAH, 并将纯化的融合蛋白免疫 Balb/c 小鼠, 获得了 3 个稳定的阳性单克隆细胞株, 初步利用制备的单抗来介导间接免疫荧光检测 HAAH 在各种肿瘤细胞系中的表达。获得的抗 HAAH 单克隆抗体为 HAAH 的结构和功能的研究奠定了基础, 同时也为进一步将该抗体应用于肿瘤的早期诊断以及研究 HAAH 在肿瘤发生转移中的机理提供了重要工具。

## REFERENCES

- [1] Lavaissiere L, Jia S, Nishiyama M, et al. Overexpression of human aspartyl (asparaginyl)  $\beta$ -hydroxylase in hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma. *J Clin Invest*, 1996, 98(6): 1313–1323.
- [2] Jones LR, Zhang L, Sanborn K, et al. Purification, primary structure, and immunological characterization of the 26-kDa calsequestrin binding protein (junctin) from cardiac junctional sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 1995, 270(51): 30787–30796.
- [3] Song XG, Lin SG, Zhang HQ, et al. Construction of prokaryotic expression vector (pBVIL1) and using it in the expression of antigens of HCV. *J Cellular Mol Immunol*, 2001, 17(3): 231–235.  
宋晓国, 凌世淦, 张贺秋, 等. 高效原核融合表达载体 (pBV-IL1) 的构建及在 HCV 抗原表达中的应用. *细胞与分子免疫学杂志*, 2001, 17(3): 231–235.
- [4] Ince N, de la Monte SM, and Wands JR. Overexpression of human aspartyl (asparaginyl)  $\beta$ -hydroxylase is associated with malignant transformation. *Cancer Res*, 2000, 60(5): 1261–1266.
- [5] Maeda T, Sepe P, Lahousse S, et al. Antisense oligodeoxynucleotides directed against aspartyl (asparaginyl)  $\beta$ -hydroxylase suppress migration of cholangiocarcinoma cells. *J Hepatol*, 2003, 38(5): 615–622.
- [6] Takashi M, Ken-ichi T, Shin-ichi A, et al. Clinicopathological correlates of aspartyl (asparaginyl)  $\beta$ -hydroxylase over-expression in cholangiocarcinoma. *Cancer Detect Prevent*, 2004, 28(5): 313–318.
- [7] Feldmann G, Nattermann J, Nischalke HD, et al. Detection of human aspartyl (asparaginyl)  $\beta$ -hydroxylase and homeobox B7 mRNA in brush cytology specimens from patients with bile duct cancer. *Endoscopy*, 2006, 38(6): 604–609.
- [8] Palumbo KS, Wands JR, Safran H, et al. Human aspartyl (asparaginyl)  $\beta$ -hydroxylase monoclonal antibodies: potential biomarkers for pancreatic carcinoma. *Pancreas*, 2002, 25(1): 39–44.
- [9] De la Monte SM, Tamaki S, Cantarini MC, et al. Aspartyl-(asparaginyl)- $\beta$ -hydroxylase regulates hepatocellular carcinoma invasiveness. *J Hepatol*, 2006, 44(5): 971–983.
- [10] Hu G, Dong XH, Xue XX, et al. Cloning of the truncated gene of hepatitis C virus core and expression in *E. coli*. *J Xi'an Jiaotong Univ: Med Sci*, 2005, 26(4): 320–326.  
胡刚, 董晓慧, 薛小平, 等. 丙型肝炎病毒 C 区截短型基因原核表达载体的构建及在大肠杆菌中的表达. *西安交通大学学报: 医学版*, 2005, 26(4): 320–326.
- [11] Guo FK, Lin SG, Song XG, et al. Molecular cloning and expression of IL-1 $\beta$  and its mutants. *Bull Acad Milit Med Sci*, 1999, 23(3): 238–239.  
郭甫坤, 凌世淦, 宋晓国, 等. 人白介素-1 $\beta$  及其突变体的克隆、表达与活性研究. *军事医学科学院院刊*, 1999, 23(3): 238–239.
- [12] Lee SW, Cho JH, Sung YC. Optimal induction of hepatitis C virus envelope-specific immunity by bicistronic plasmid DNA inoculation with the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene. *J Virol*, 1998, 72(10): 8430–8436.
- [13] Dinchuk JE, Henderson NL, Burn TC, et al. Aspartyl beta-hydroxylase (Asph) and an evolutionarily conserved isoform of Asph missing the catalytic domain share exons with junctin. *J Biol Chem*, 2000, 275(50): 39543–39554.