

Galectin-7 多克隆抗体的制备与鉴定*

黄震¹, 迟秀文², 韦庆文¹, 束振华¹, 孙俊生¹, 王前³ (1. 深圳市龙岗中心医院, 广东深圳 518116; 2. 广东医学院护理学院, 广东东莞 523808; 3. 南方医科大学南方医院, 广州 510515)

摘要:目的 制备鼠抗重组半乳糖凝集素 7(Galectin-7)多克隆抗体及其在膀胱癌组织中特异性鉴定。方法 PCR 法从人包皮组织中扩增 Galectin-7 基因, 并构建到 pET28a 表达载体中, 使用 IPTG 诱导重组蛋白的表达, 通过镍柱亲和层析纯化获得 Galectin-7 蛋白。以纯化的 Galectin-7 蛋白混合福氏完全佐剂免疫 Balb/C 小鼠制备抗体, 并用 ELISA, Western blot 及免疫组织化学法检测抗体。结果 成功表达、纯化了 Galectin-7 重组蛋白, ELISA 检测 Galectin-7 蛋白免疫的小鼠血清效价为 1:32 000, Western blot 显示该抗体能与天然的 Galectin-7 特异结合, 免疫组织化学法检测结果表明该抗体识别人膀胱肿瘤组织的天然 Galectin-7。结论 通过制备重组 Galectin-7 蛋白为免疫原, 免疫家兔, 成功地制备了效价高、特异性好的抗 Galectin-7 多克隆抗体。

关键词: 半乳糖凝集素 7; 表达; 抗体; 制备

中图分类号: R392-33 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2015)04-060-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2015.04.016

Preparation and Characterization of Polyclonal Antibody of Galectin-7

HUANG Zhen¹, CHI Xiu-wen², WEI Qing-wen¹, SHU Zhen-hua¹, SUN Jun-sheng¹, WANG Qian³

(1. Longgang Central Hospital of Shenzhen, Guangdong Shenzhen 518116, China;

2. Nursing School of Guangdong Medical College, Guangdong Dongguan 523808, China;

3. Nanfang Hospital of Nanfang Medical University, Guangzhou 510515, China)

Abstract: Objective To prepare the mouse anti recombinant human Galectin-7 antibody and the antibody was characterized in bladder cancer. Methods The gene coding for Galectin-7 was amplified by PCR from the cDNA of human foreskin cells and cloned into prokaryotic expression vector pET28a. Then the recombinant plasmid pET28a/Galectin-7 was transformed into E. coli BL21 (DE3) and expressed under IPTG induction. The recombinant Galectin-7 was purified through Ni²⁺-NT agarose gel column and the purified Galectin-7 used as immunogen to immunize the mouse. The titer and specificity of the anti-Galectin-7 antibody from the mouse were analyzed by ELISA, Western blot and immunohistochemistry, respectively. Results

The recombinant Galectin-7 was successfully expressed and purified, and the polyclonal anti-Galectin-7 antibody was successfully prepared. The titer of the antiserum was 1:32 000 by ELISA. Western blot analysis showed this antibody reacted specifically with Galectin-7. Immunohistochemistry analysis showed the antibody could recognize the native Galectin-7 in the human bladder cancer tissue. Conclusion The preparation recombinant Galectin-7 protein was as immunogen in rabbits. It was successful to produce high titer and high specificity of anti Galectin-7 polyclonal antibody.

Keywords: Galectin-7; expression; antibody; preparation

半乳糖凝集素 7 是细胞膜上存在的一种能够特异性结合 β -半乳糖的蛋白, 其功能区包含有两个同源的糖识别区域^[1]。Galectin 与免疫、炎症反应、糖尿病等疾病有关。Galectin-7 其分布于各种复层上皮细胞, 因此有很多研究探讨其与肿瘤发生的相关性。有学者报道 Galectin-7 通过表达的改变调节细胞增殖、凋亡、侵袭从而在肿瘤进程中发挥作用^[2]。其中有学者在小鼠的乳腺癌细胞中验证, 过表达 Galectin-7 能够抑制肿瘤的生长^[3,4]。在胃癌患者中, 低表达 Galectin-7 的患者其生存率远低于高表达 Galectin-7 组患者^[5]。而 Galectin-7 与膀胱癌的研究报道甚少。为此, 我们纯化了 Galectin-7 重组蛋白, ELISA 检测了 Galectin-7 蛋白

免疫的小鼠血清效价, Western blot 检测该抗体与天然的 Galectin-7 特异性结合, 从而通过免疫组织化学法对膀胱癌组织切片进行免疫组织化学分析验证。

1 材料和方法

1.1 材料 Balb/c 小鼠由广东医学院实验动物中心提供。手术切除的新鲜包皮组织取自广东医学院附属医院。限制性内切酶、T4 连接酶及 TaqDNA 聚合酶等分子生物学试剂购自 QiaGen 公司。HRP 标记的羊抗鼠 IgG、表达载体 pET28a 和 Ni²⁺-NTA 凝胶为 Invitrogen 公司产品。大肠埃希菌 DH5 及 BL 21(DE3) 为本实验室保存。常规试剂为分析纯。引物合成及 DNA 序列测定委

* 作者简介: 黄震(1976—), 男, 在职博士, 副主任检验师。主要从事临床免疫检验研究, Tel: 13425164068, E-mail: huangzh1976@126.com。
通讯作者: 王前(1963—), 男, 博士生导师, 主要从事临床检验教育研究。

托上海 Invitrogen 生物工程公司完成。

1.2 方法

1.2.1 Galectin-7 基因的克隆:从手术切除的包皮组织中抽提 RNA,用 RT-PCR 扩增 Galectin-7 编码区基因。引物的序列如下:P1:5'-CGG-GATCCTCCAACGTCCCCCA-3'(划线部分为 BamH I 酶切位点);P2:5'-GGAATTCCTCA-GAAGATCCTCAC-3'(划线部分为 EcoR I 酶切位点)。PCR 的条件设定为:95℃变性 30 s,59℃退火 60 s,72℃延伸 45 s,共 32 个循环后,于 72℃延伸 7 min。PCR 产物经 2 g/dl 浓度的琼脂糖凝胶电泳分析回收纯化,用 BamH I 和 EcoR I 分别对 PCR 产物和表达载体 pET28a 进行双酶切,回收酶切产物,按照摩尔数片段:质粒=5:1 比例混合使用 T4 连接酶连接,并将连接产物转化入感受态大肠埃希菌 DH5a。将转化菌液涂布于含卡那霉素(含 50 mg/L 卡那青霉素),37℃培养过夜。挑取白色菌落进行培养,提取重组质粒,以 BamH I, EcoR I 进行双酶切鉴定,将质粒命名为 pET28a/Galectin-7。将阳性克隆送上海生物工程公司进行 DNA 测序,对所得序列用 BLAST 软件进行序列同源性比对分析。

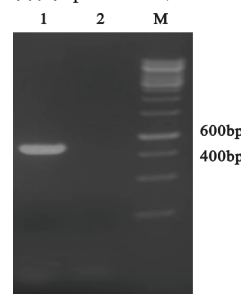
1.2.2 重组 Galectin-7 的表达与纯化:以重组质粒 pET28a/Galectin-7 转化感受态大肠埃希菌 BL21(DE3),并将转化液涂布于 LB 平板(含 100 mg/L 卡那霉素)。37℃过夜挑取菌落接种于 LB 培养液(含卡那霉素)中,于 37℃培养过夜后,按 1 ml/dl 的比例接种于新 LB 培养液中进行增菌培养。待菌液的 $A_{600\text{ nm}}$ 值达 1.0 时,加入 IPTG(终浓度为 0.8 mmol/L),于 37℃诱导表达 4 h。离心收集菌体,使用高压均质仪碎菌,经过 12 000 g 离心 10 min,收集上清,用 Ni^{2+} -NTA 凝胶柱进行亲和层析纯化,以含 200 mmol/L 咪唑的缓冲液进行洗脱纯化,行 SDS-PAGE 分析。

1.2.3 抗 Galectin-7 抗体的制备、纯化及鉴定:将纯化的 Galectin-7 使用 3kD 超滤管离心除去咪唑、0.22 μm 滤器过滤除菌后,经过 Bradford 法测定并调整蛋白的浓度为 1 g/L,与等体积弗氏完全佐剂乳化后免疫 Balb/C 小鼠。待末次免疫完毕后 1 周,摘除小鼠眼球取血并分离血清。以纯化的重组 Galectin-7 (5 mg/L) 包被 ELISA 板,用直接 ELISA 法检测抗血清的效价。用 Western blot 鉴定抗体的特异性,即分别取未经 IPTG 诱导和经 IPTG 诱导的工程菌裂解物以及纯化的重组蛋白(Galectin-7)进行 SDS-PAGE,并使用伯乐电转仪电转至 PVDF 膜上,以脱脂奶粉(5g/L)的 TBST 封闭后,对抗体活性和特异性作进一步分析,以制

备的抗血清(1:5 000)为一抗,兔抗鼠 IgG-HRP (1:5 000)为二抗进行反应,多抗按 1:500 稀释,采用 DAB 显色。同时以正常小鼠血清作对照。

2 结果

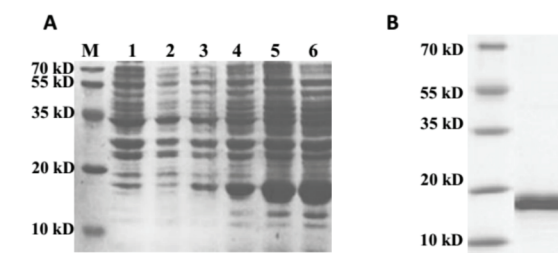
2.1 Galectin-7 编码区基因的扩增及 Galectin-7 表达载体的构建、鉴定 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳分析,结果显示在约 400 bp 与 600 bp 之间可见一条特异带,与预期扩增的目的基因片段的 438 bp 大小相符(图 1)。经 NCBI 的 BLAST 程序分析,所获取的 Galectin-7 基因序列与 GenBank 登录的序列相一致。将 PCR 扩增产物以 10 g/dl 琼脂糖凝胶电泳,所获片段大小与预期相符。采用 GateWay 技术构建表达载体,经 PCR 和测序鉴定后,阳性克隆命名为 pET28a/Galectin-7。



1:Galectin-7 基因的 RT-PCR 产物;2:无模板对照;M:marker。

图 1 PCR 获得的 Galectin-7 基因行琼脂糖凝胶电泳分析

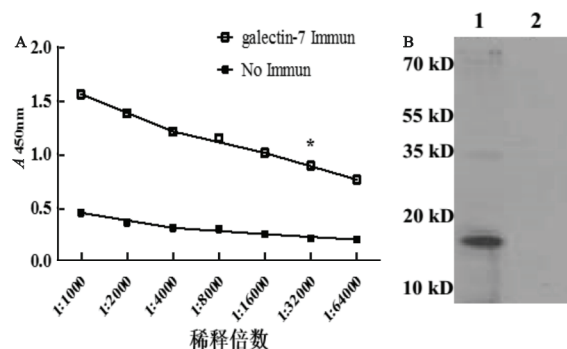
2.2 重组 Galectin-7 的表达、纯化与鉴定 以表达质粒 pET28a/Galectin-7 转化大肠埃希菌 BL21(DE3),得到含重组质粒的基因工程菌。行 12 g/dl 浓度 SDS-PAGE 分析结果显示,经 IPTG 诱导的工程菌在 M_r 约 10kD~20kD 之间有 1 条外源性高表达的蛋白条带。该融合蛋白的 M_r 同预测的大小相吻合;而未经 IPTG 诱导的工程菌未见有外源蛋白表达的条带,以 pET28a 载体转化的菌株在 IPTG 诱导后也未见有外源性蛋白表达的条带,表明 Galectin-7 在大肠埃希菌中得到高效表达。工程菌菌体裂解上清经 Ni^{2+} -NTA 凝胶柱纯化获取了重组 Galectin-7(图 2A)。经诱导表达、纯化获得的重组 Galectin-7 蛋白,扫描分析其纯度约为 97%(图 2B)。



A. M:蛋白 marker;1:无 IPTG 诱导的 BL21(pET28a/Galectin-7);2: IPTG 诱导的 BL21(pET28a);3,4,5,6: IPTG 分别诱导 1,2,3,4 h 的 BL21(pET28a/Galectin-7);3. IPTG 诱导的 BL21(pET28a);B. 纯化后的 Galectin-7 蛋白。

图 2 Galectin-7 诱导表达后的 SDS-PAGE 鉴定及 WB 鉴定

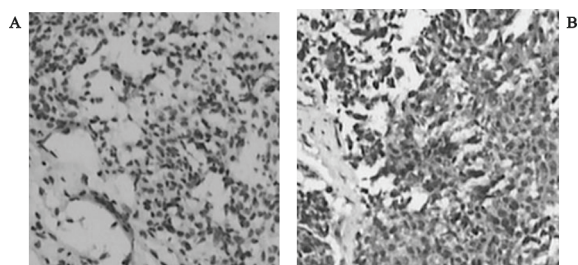
2.3 鼠抗人 Galectin-7 抗体效价测定 ELISA 法检测抗 Galectin-7 血清,以未经 Galectin-7 免疫的小鼠血清为阴性对照,血清按照 1:1 000,1:2 000,1:4 000,1:8 000,1:16 000,1:32 000,1:64 000,1:128 000 稀释,免疫血清测得 $A_{450\text{nm}}$ /未免疫血清测得的 $A_{450\text{nm}}$ 最大值的稀释度为其效价。发现在 1:32 000 时, $A_{\text{immu}}/A_{\text{unimmu}}$ 为 6.78,即鼠抗人 Galectin-7 血清效价为 1:32 000 (图 3A);经纯化的 WB 鉴定,发现制备的抗体能够与纯化的 Galectin-7 特异性结合 (图 3B)。



(A) *:在血清稀释度同为 1:64 000 时,免疫小鼠血清测得的 A 值/未免疫小鼠血清测得的 A 值最大;(B) 1:pET28a/ Galectin-7 诱导、纯化的 Galectin-7 经免疫血清行 WB 鉴定;2:pET28a/ Galectin-7 未诱导经纯化产物经免疫血清行 WB 鉴定。

图 3 鼠抗 Galectin-7 血清效价的测定及特异性验证

2.4 鼠抗人 Galectin-7 抗体在膀胱癌免疫组化中的表达 人膀胱癌组织石蜡切片免疫组织化学染色结果显示,制备的抗体作为一抗有明显的阳性着色,而应用正常家小鼠血清为一抗则无阳性着色,说明所制备的鼠抗人 Galectin-7 抗体可特异识别天然状态下的 Galectin-7 分子,抗体具有良好的活性和高特异性。且膀胱癌组织 Galectin-7 表达远低于癌旁组织 (图 4A 和 4B)。



A. 膀胱癌组织中 Galectin-7 表达极少;B. 正常膀胱组织中 Galectin-7 高表达。

图 4 制备抗人 Galectin-7 在膀胱免疫组化中的应用

3 讨论 Galectin-7 在肿瘤的发生发展中发挥重要作用,有研究发现, Galectin-7 对某些类型的肿瘤生长有抑制作用^[6];但是也有报道 Galectin-7 上调 MMP-9,从而对某些类型肿瘤的生长有促进作用^[7]。诸多研究显示 Galectin-7 参与肿瘤的发生发展中。

膀胱癌是泌尿系统常见的恶性肿瘤,其在男性

和女性实体肿瘤的发病率中分别排第 4 位和第 7 位,男女患病率比约为 3:1^[1]。它可以通过血道、淋巴系统或者直接侵袭到邻近器官,从而对机体造成严重后果。近几年我国部分城市膀胱癌的发病率呈现稳中有升的趋势。本研究用 RT-PCR 技术从手术切除的人包皮组织中获取了人 Galectin-7 编码基因,并用 pET28 质粒构建了其原核表达载体,经 DNA 序列测定表明所得序列正确,碱基无突变。经 IPTG 诱导,在大肠埃希菌中高效诱导表达了其重组蛋白。在重组蛋白的制备过程中,发现重组人 Galectin-7 以可溶性的形式存在,用 Ni-NTA 进行亲和纯化,用 250 mmol/L 咪唑洗脱,效果良好。以纯化的重组蛋白为免疫原免疫 Balb/c 小鼠,制备了效价高、特异性好的多克隆抗体,免疫组织化学染色检测显示该抗体能识别天然的人 Galectin-7 分子,具有良好的活性。本研究进一步探讨了 Galectin-7 蛋白在膀胱癌组织中的表达。结果显示, Galectin-7 在癌组织中表达低于癌旁组织,并且该蛋白主要定位于非癌细胞的包膜和胞浆,而癌细胞的表面无或仅有少量表达。这与现有报道一致^[8,9]。

Galectin-7 与肿瘤的发生密切相关,因此有学者对其在参与肿瘤发生的机制加以研究。发现 Galectin-7 可以通过 mutant p35, CEBP β -2, JUNK, MMP-9 跟肿瘤发生发展有关^[10,11]。而 Galectin-7 在膀胱癌中是如何发挥作用的,至今少见报道。其存在的生物学意义有待进一步提示。这也是本研究在下一步将致力于的研究方向。我们在本研究中制备了鼠抗人 Galectin-7 多克隆抗体,为进一步建立人 Galectin-7 分子的 ELISA 检测方法和下一步研究探讨 Galectin-7 分子在膀胱癌发病作用研究奠定了良好基础。

参考文献:

- [1] Saussez S, Kiss R. Galectin-7[J]. Cell Mol Life Sci, 2006, 63(6):686-697.
- [2] Ueda S, Kuwabara I, Fu L. Suppression of tumor growth by galectin-7 gene transfer[J]. Cancer Res, 2004, 64(16):5672-5676.
- [3] Demers M, Biron-Pain K, Hébert J, et al. Galectin-7 in lymphoma: elevated expression in human lymphoid malignancies and decreased lymphoma dissemination by antisense strategies in experimental model[J]. Cancer Res, 2007, 67(6):2824-2829.
- [4] Demers M, Couillard J, Giglia-Mari G, et al. Increased galectin-7 gene expression in lymphoma cells is under the control of DNA methylation[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 387(3):425-429.
- [5] Kim SJ, Hwang JA, Ro JY, et al. Galectin-7 is epigenetically-regulated tumor suppressor in gastric cancer[J]. Oncotarget, 2013, 4(9):1461-1471. (下转 66 页)

(上接 62 页)

- [6] Cai J, Ma H, Huang F, et al. Low expression of RSK4 predicts poor prognosis in patients with colorectal cancer[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(8): 4959-4970.
- [7] Demers M, Magnaldo T, St-Pierre Y. A novel function for galectin-7: promoting tumorigenesis by up-regulating MMP-9 gene expression[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(12): 5205-5210.
- [8] 朱红, 刘利, 刘欢, 等. Galectin-7 和 S100A9 表达与宫颈鳞癌发生发展的相关性[J]. *中南大学学报(医学版)*, 2013, 38(9): 888-895.
Zhu H, Liu L, Liu H, et al. Expression of galectin-7 and S100A9 and development of cervical squamous carcinoma[J]. *J Cent South Univ(Med Sci)*, 2013, 38(9): 888-895.

- [9] 雒真龙, 周鸿敏, 徐立, 等. Galectin-7 蛋白在人非小细胞肺癌中的表达及临床意义[J]. *实用医学杂志*, 2013, 29(21): 3466-3468.
Luo ZL, Zhou HM, Xu L, et al. Expression and clinical significance of galectin-7 in human non-small cell lung cancer[J]. *Prac Med*, 2013, 29(21): 3466-3468.
- [10] Kopitz J, André S, von Reitzenstein C, et al. Homodimeric galectin-7(p53-induced gene 1) is a negative growth regulator for human neuroblastoma cells[J]. *Oncogene*, 2003, 22(40): 6277-6288.
- [11] Barkan B, Cox AD, Kloog Y. Ras inhibition boosts galectin-7 at the expense of galectin-1 to sensitize cells to apoptosis[J]. *Oncotarget*, 2013, 4(2): 256-268.

收稿日期: 2014-12-22

修回日期: 2015-01-25