

基于多肽抗原的抗人TTC36的单克隆抗体制备及其在免疫组化中的应用

刘运洪¹ 夏勇武¹ 孙炎² 张伟¹ 郭慧娟¹ 姜孝新^{1*}

(¹深圳市龙华区人民医院检验科, 深圳 518109; ²深圳市第三人民医院病理科, 深圳 518109)

摘要 为了研究人TTC36的功能, 筛选并制备抗人TTC36的单克隆抗体, 探讨其在免疫组化检测中的应用。使用化学法合成4种TTC36多肽, 将偶联KLH后的多肽免疫Balb/c小鼠, 采用杂交瘤方法筛选和制备相应单克隆抗体, 使用ELISA、Western blot对单克隆抗体的亚型、效价、特异性进行鉴定和分析, 使用免疫组化技术鉴定其性能。结果获得了5株单克隆抗体细胞株, 其分泌的抗体能结合原核细胞和真核细胞表达的TTC36蛋白, 经免疫组化技术能检测到人肝脏和肾脏中TTC36蛋白表达, 并发现肝癌和肾癌组织中的TTC36蛋白表达下降。该研究成功制备了人TTC36的单克隆抗体, 通过免疫组化检测了人肝脏和肾脏中TTC36蛋白的表达情况, 为TTC36相关疾病的研究、临床诊断、单克隆抗体药物的进一步研究提供基础。

关键词 TTC36; 多肽; 单克隆抗体; 免疫组化

Preparation of Anti-Human TTC36 Monoclonal Antibody and Its Application in Immunohistochemistry Based on Polypeptides Antigen

LIU Yunhong¹, XIA Yongwu¹, SUN Yan², ZHANG Wei¹, GUO Huijuan¹, JIANG Xiaoxin^{1*}

(¹Clinical Laboratory, People's Hospital of Longhua Shenzhen, Shenzhen 518109, China;

²Department of Pathology, Third People's Hospital of Shenzhen, Shenzhen 518109, China)

Abstract This study aimed to investigate the function of anti-TTC36 monoclonal antibodies, especially its application in immunohistochemistry. Four TTC36 polypeptides coupled with KLH were used as antigens to immunize Balb/c mice. The corresponding monoclonal antibodies were screened and prepared by hybridoma method. ELISA and Western blot were used to identify and analyze the subtype, titer and specificity of monoclonal antibodies. The application was investigated with immunohistochemical techniques. Results showed that five monoclonal antibodies recognizing human TTC36 protein were obtained, which could specifically bind to TTC36 protein expressed by prokaryotic cells and eukaryotic cells. These monoclonal antibodies could recognize TTC36 protein in human liver and kidney tissue, which also indicated that TTC36 expression decreased in liver and kidney cancer compared with normal tissue. In conclusion, monoclonal antibodies that bind to human TTC36 have been successfully prepared and can apply in immunohistochemistry, which provides the basis for the clinical diagnosis and drug research of related diseases.

Keywords TTC36; polypeptide; monoclonal antibody; immunohistochemistry

收稿日期: 2020-05-15 接受日期: 2020-08-11

深圳市龙华区科技创新资金(批准号: 2017115)和院内博士启动科研项目(批准号: 20181125)资助的课题

*通讯作者。Tel: 13662622258, E-mail: xiaoxinjiang168@126.com

Received: May 15, 2020 Accepted: August 11, 2020

This work was supported by the Science and Technology Innovation of Longhua Shenzhen District Fund Project (Grant No.2017115) and PhD Start-Up Fund of People's Hospital of Longhua Shenzhen (Grant No.20181125)

*Corresponding author. Tel: +86-13662622258, E-mail: xiaoxinjiang168@126.com

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5357>

TTC36(tetratricopeptide repeat domain 36)蛋白含有3个TRP模序(tetratricopeptide),属于TPR样结构蛋白,TPR样结构蛋白家族功能涉及广泛。在前期实验中,我们制备了针对小鼠TTC36蛋白的多克隆抗体^[1-2],并制备了TTC36基因敲除小鼠^[2],对小鼠TTC36蛋白的功能进行了一系列研究^[3],发现TTC36通过TTC36-STK33-PELI1信号通路调节酪氨酸代谢,TTC36缺失可导致高酪氨酸血症。

近期研究发现,人TTC36可能在肿瘤发生中起重要作用,JIANG等^[4]发现,肝癌细胞内TTC36基因发生杂合性丢失或启动子甲基化,TTC36在肝癌组织中表达下降,而在肝癌细胞中过表达TTC36基因,会促进肝癌细胞凋亡。为了进一步研究人TTC36蛋白的功能,在本研究中,我们制备了抗人TTC36蛋白单克隆抗体,并且通过免疫组化检测到肝脏和肾脏中TTC36蛋白的表达,为后续相关研究打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料 pGEX-4T-1质粒、pcDNA3.1质粒、大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21感受态细胞由本实验室保存;鼠骨髓瘤细胞系SP2/0(ATCC, CRL-1581)由北京华大蛋白质研究中心提供;超滤浓缩管购自Millipore公司。

1.1.2 主要试剂 Taq聚合酶、各种限制性内切酶和T4 DNA连接酶购自New England Biolabs公司;凝胶DNA回收纯化试剂盒购自QIAGEN公司;完全弗氏佐剂(complete freund's adjuvant)、不完全弗氏佐剂(incomplete freund's adjuvant)、聚乙二醇、次黄嘌呤-氨基蝶呤-胸腺嘧啶核苷(hypoxanthine-aminopterin-thymidine, HAT)和次黄嘌呤-胸腺嘧啶核苷(hypoxanthine-thymidine, HT)购自Sigma公司;DMEM培养基、RPMI1640培养基、胎牛血清、青霉素和链霉素均购自Gibco公司;小鼠单克隆抗体亚型鉴定试剂盒购自Southern Biotech公司;ELISA酶标反应板购自Thermo Fisher Scientific公司;抗6His抗体、抗人TTC36多克隆抗体(阳性对照)购自Abcam公司;其余试剂均为进口分装或国产分析纯。

1.1.3 实验动物与病理组织 实验动物为6~8周龄雌性BALB/c小鼠,购自斯贝福(北京)生物技术有限公司(实验动物生产饲养许可批号:11401500031105),由北京华大蛋白质研究中心(SPF

级)饲养。肝肾病理标本来自深圳市龙华区人民医院中心实验室临床标本库。本研究经深圳市龙华区人民医院伦理委员会批准,动物实验过程符合动物伦理学要求,涉及人体标本的实验除通过伦理审批外,在中国临床试验注册中心也有登记(编号:ChiCTR2000032381)。

1.2 方法

1.2.1 免疫抗原制备 对人TTC36蛋白的二级结构、亲疏水性、抗原性、表面可及性等进行分析,选取4个位置的短肽作为抗体结合靶点,即pep1(87~104 aa: AYNNAQARRLQGDVAGAC)、pep2(112~124 aa: VELSGGRGRAARQC)、pep3(134~151 aa: RLQGRDDDARRDFERAARC)、pep4(180~189 aa: CGQLRRPRDSR)。使用固相合成法合成4种短肽后,用马来酰亚胺法将其分别与钥孔血蓝蛋白(keyhole limpet hemocyanin, KLH)和牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)进行偶联(委托北京华大蛋白研究中心合成)。其中KLH偶联的短肽用于动物免疫,BSA偶联的短肽用于免疫血清效价测定和单克隆细胞株筛选。

1.2.2 人TTC36原核融合表达 全长人TTC36基因由华大基因公司根据cDNA编码序列进行全基因合成,克隆到表达载体pGEX-4T-1中,构建成融合蛋白表达载体pGEX-Ttc36。将测序验证正确的质粒转化BL21感受态细菌,挑取单克隆于LB培养基中,37 °C振荡培养至 D_{600} 为0.6~0.8时,加入诱导剂异丙基硫代半乳糖苷(isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside, IPTG)至终浓度为0.5 mmol/L,20 °C条件下诱导表达16 h后,4 °C、12 000 r/min离心5 min,收集菌体,加入细菌裂解液(含溶菌酶1 mg/mL、苯甲基磺酰氟1 mmol/L、0.5%的Triton X-100)悬浮菌体,冰上放置30 min,然后置冰上间歇超声裂解(25 kHz,每超声3 s暂停6 s),至菌液透亮不黏稠,然后于4 °C、12 000 r/min条件下离心10 min,取上清将细菌裂解蛋白用SDS-PAGE和考马斯亮蓝染色,观察融合蛋白的诱导表达情况,选择表达量高的克隆进行扩大表达,经谷胱甘肽琼脂糖凝胶亲和层析纯化而得到的GST-TTC36融合蛋白,用于抗体检测。

1.2.3 人TTC36蛋白真核细胞表达 全长人TTC36基因由华大基因公司根据cDNA编码序列进行全基因合成,尾部加上6His标签后,将其克隆到表达载体pcDNA3.1中,构建成真核表达载体pcDNA-

Ttc36-6His, 转染HEK293细胞, 72 h后弃去培养基, 收集细胞, 用免疫沉淀裂解液进行裂解, 裂解后在4 °C、12 000 °C条件下离心30 min, 取上清用于酶联免疫反应(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测。

1.2.4 小鼠免疫与杂交瘤细胞株的建立 在免疫前, 取小鼠眼内眦静脉血, 将分离的血清置于-80 °C冰箱保存, 作为后续实验的阴性对照样本。将KLH偶联的4种短肽抗原分别混合完全弗氏佐剂, 按60 μg蛋白/只小鼠的量, 皮下注射免疫雌性BALB/c小鼠, 每2周加强免疫1次(不完全弗氏佐剂), 共3次; 最后一次免疫后的第14天, 取小鼠眼内眦静脉血, 分离血清用ELISA法测定血清抗体效价, 选择血清抗体效价最高的小鼠, 按50 μg蛋白/只小鼠的量, 进行腹腔注射免疫。3天后, 无菌操作, 分别取小鼠脾脏和胸腺制备细胞悬液, 每只小鼠的胸腺细胞用2 mL的HAT和2 mL HT悬浮, 脾脏细胞用无血清的IMDM悬浮, 在50% PEG1500的介导下, 将脾细胞与SP2/0骨髓瘤细胞按5:1的比例进行融合, 静止1 min, 融合后缓慢加入无血清IMDM培养基, 1 000 r/min离心5 min, 弃上清, 加入血清, 轻柔地将细胞吹匀, 加入胸腺细胞和半固体培养基, 充分混匀, 然后均匀倒入细胞培养皿中, 于37 °C孵箱中培养。培养10天左右, 于显微镜下观察单个细胞克隆是否形成, 并挑单个细胞单克隆培养于含HAT和胸腺细胞的96孔板(100 μL/孔)中, 于37 °C孵箱中培养。培养3天后, 收集含有分泌抗体的培养基上清, 用ELISA进行筛选, 其中以BSA偶联的短肽包板进行阳性筛选, 以KLH包板进行阴性筛选。

1.2.5 单克隆抗体的免疫学特性分析 (1) 小鼠腹水抗体的制备及纯化。选取6周龄雌性BALB/c小鼠, 腹腔注射0.5 mL灭菌液状石蜡。一周后小鼠腹腔接种杂交瘤细胞(1×10^6 个/只), 待小鼠腹部明显膨大时收集腹水。用抗体纯化的偶联缓冲液以1:3稀释腹水, 12 000 r/min、4 °C离心5 min, 0.22 μm滤膜过滤, 除去脂肪、细胞残渣及小颗粒物。用5~10倍柱体积的相应偶联缓冲液平衡Protein A/G亲和层析介质柱子。用注射器把样品注入柱子上端接口, 收集流出液于50 mL离心管中。用5倍柱体积的偶联缓冲液过柱; 取中和液加入EP管; 滴加洗脱液到1 mL, 混匀后检测pH值。根据结果调整中和液的量, 使中和结果pH为7.0。用5倍柱体积洗脱缓冲液洗脱抗体, 收集于上述EP管中, 然后用超滤浓缩管进行浓缩。

(2) 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测抗体特异性和结合能力。GST-TTC36蛋白作为检测样本, 以稳定分泌单克隆抗体的细胞上清液或者纯化的抗体为一抗(1:1 000稀释), 4 °C孵育过夜, 以HRP标记的羊抗小鼠IgG作为二抗(1:3 000稀释), 检测单克隆抗体的结合特异性; 兔抗人TTC36为阳性对照, 用HRP-羊抗兔IgG作为二抗(1:3 000稀释)。

(3) 酶联免疫反应(ELISA)检测抗体特异性和结合能力。分别用GST-TTC36蛋白包被的ELISA板检测原核表达抗原; 用真核细胞表达TTC36蛋白(细胞裂解上清)包被的ELISA板检测真核表达抗原, 以稳定分泌单克隆抗体的细胞上清液或者纯化的单克隆抗体为一抗(不同比例稀释), 室温孵育2 h, 以HRP标记的羊抗小鼠IgG作为二抗(1:5 000稀释), 检测单克隆抗体的结合特异性和初步效价, 使用酶标仪读取450 nm波长吸光度(D)值。

(4) 亚型鉴定。使用小鼠单克隆抗体亚型鉴定试剂盒, 按照试剂盒说明书对阳性的杂交瘤细胞株进行重链和轻链的亚型鉴定。

1.2.6 免疫组化检测 将人肝癌组织、肾癌组织石蜡切片用柠檬酸钠抗原修复, 用3% H₂O₂除去本底, 5%羊血清封闭组织切片, 室温孵育1 h, 防止非特异性结合, 以纯化的TTC36单克隆抗体(1:500稀释)为一抗, 室温孵育2 h, 再以HRP-羊抗鼠IgG(1:2 000稀释)为二抗, 室温孵育1 h, 最后使用DAB显色, 苏木素复染。用中性树脂封片后, 检测结果于显微镜下拍照记录。

1.2.7 数据处理 采用DNASTAR和Geneious软件对蛋白质二级结构、亲疏水性、抗原性、表面可及性等进行分析。ELISA检测数据采用Microsoft Excel 2007软件进行分析, 减去反应孔吸光度值本底后, 取3个复孔的平均值, 实验数据以平均值加标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 作直方图进行对比。

2 结果

2.1 对人TTC36蛋白的抗原靶点分析

对人TTC36蛋白的二级结构、亲疏水性、抗原性、表面可及性等进行分析, 选取了亲水性高、抗原性高和表面可及性高的部位, 结果显示, 有5处位点的疏水性、抗原指数比较高, 但最靠近TTC36蛋白N-端的一个多肽序列在不同物种间同源程度高, 可能会因免疫耐受而导致被免疫小鼠不易产生抗体。最后选

取的4个位点分别是: pep1(87~104 aa: AYNRAQA-RRLQGDVAGAC)、pep2(112~124 aa: VELSGR-GRAARQC)、pep3(134~151 aa: RLQGRDDDARRD-FERAARC)和pep4(180~189 aa: CGQLRRPRDSR), 具体位置见图1。

2.2 融合蛋白的表达和蛋白纯化

TTC36原核融合蛋白表达载体以及真核表达载体均经测序鉴定, 与参考序列(GenBank: BC146916) 比对相同。GST-TTC36原核表达产物经SDS-PAGE

和考马斯亮蓝染色, 结果显示, 转化表达载体的细菌, 诱导表达后, 在46 kDa处有特异条带, 与理论值相符。用谷胱甘肽琼脂糖凝胶亲和层析纯化之后, 在46 kDa处有特异条带, 纯度达90%以上, 但有少量降解或截短表达的融合蛋白(图2)。

2.3 杂交瘤细胞株的建立及亚型鉴定

BALB/c小鼠经4次免疫后, 取脾细胞与鼠骨髓瘤细胞进行细胞杂交融合, 用间接ELISA法筛选出阳性杂交瘤细胞(分别以BSA偶联短肽和KLH包板

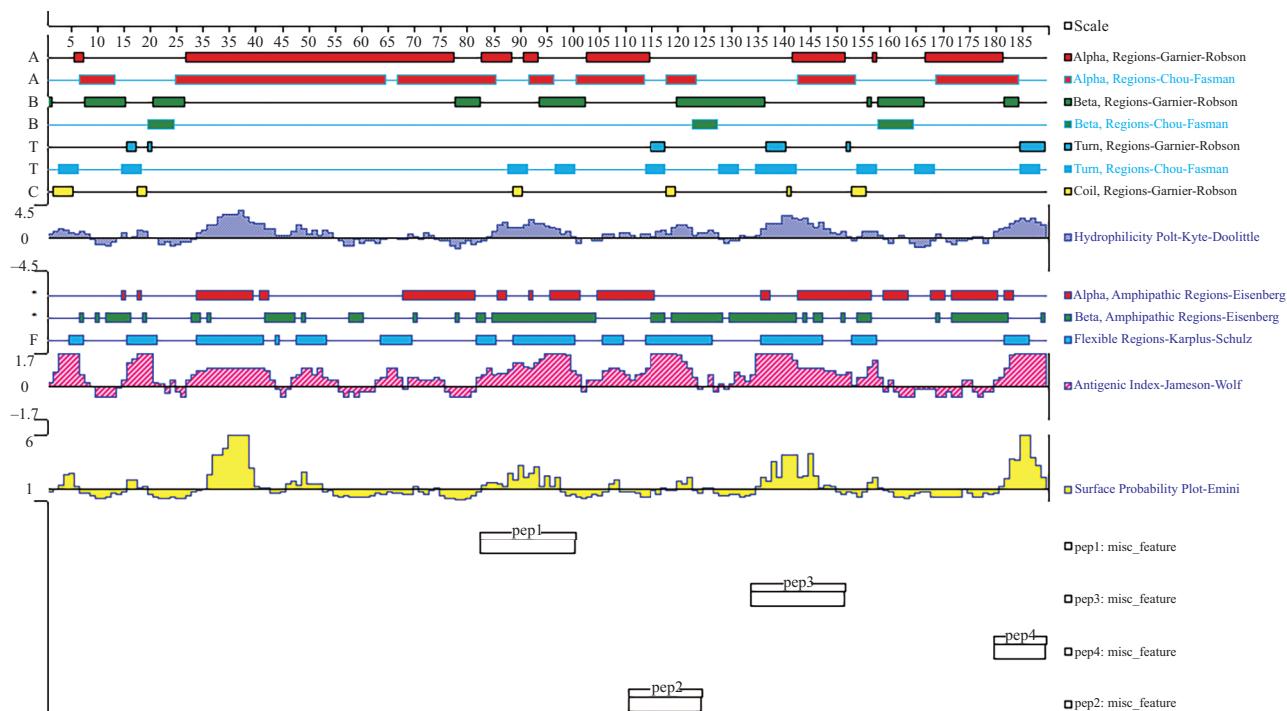
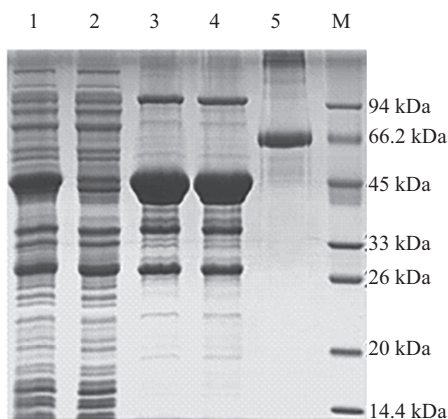


图1 TTC36蛋白的二级结构、亲疏水性、抗原性、表面可及性分析

Fig.1 Analysis of secondary structure, hydrophobicity, antigen, surface reach of the TTC36 protein



1: IPTG诱导(BL21); 2: 未诱导对照(BL21); 3~4: 纯化蛋白; 5: 0.5 mg/mL BSA; M: Marker。

1: IPTG induction (BL21); 2: uninduced control (BL21); 3-4: purified protein; 5: 0.5 mg/mL BSA; M: Marker.

图2 GST-TTC36融合蛋白表达及纯化SDS-PAGE分析图

Fig.2 SDS-PAGE analysis of expression and purification of GST-TTC36 fusion protein

表1 杂交瘤细胞株的建立及亚型鉴定结果

Table 1 Establishment of hybridoma cell lines and results of subtype identification

克隆编号 Clone number	免疫抗原序列 Amino acid sequence of antigen	D_{450}	重链亚型 Subtypes of heavy chain	轻链亚型 Subtypes of light chain
Pep1-1	pep1 (87-104 aa: AYNNRAQARRLQGDVAGAC)	0.573	G1	κ
Pep1-5	pep1 (87-104 aa: AYNNRAQARRLQGDVAGAC)	0.483	G1	κ
Pep1-6	pep1 (87-104 aa: AYNNRAQARRLQGDVAGAC)	0.836	G2a	λ
Pep1-7	pep1 (87-104 aa: AYNNRAQARRLQGDVAGAC)	1.041	G2a	κ
Pep1-9	pep1 (87-104 aa: AYNNRAQARRLQGDVAGAC)	0.869	G2b	κ
Pep2-4	pep2 (112-124 aa: VELSGGRGRAARQC)	0.894	G1	κ
Pep2-10	pep2 (112-124 aa: VELSGGRGRAARQC)	1.132	G2a	κ
Pep2-12	pep2 (112-124 aa: VELSGGRGRAARQC)	0.902	G1	κ
Pep2-13	pep2 (112-124 aa: VELSGGRGRAARQC)	0.942	G1	κ
Pep2-17	pep2 (112-124 aa: VELSGGRGRAARQC)	0.894	G1	κ
Pep2-19	pep2 (112-124 aa: VELSGGRGRAARQC)	1.202	G2b	κ
Pep2-23	pep2 (112-124 aa: VELSGGRGRAARQC)	0.882	G1	λ
Pep2-24	pep2 (112-124 aa: VELSGGRGRAARQC)	0.929	G1	λ
Pep3-2	pep3 (134-151 aa: RLQGRDDDARRDFERAARC)	1.079	G1	κ
Pep3-4	pep3 (134-151 aa: RLQGRDDDARRDFERAARC)	0.901	G1	κ
Pep3-5	pep3 (134-151 aa: RLQGRDDDARRDFERAARC)	1.006	G1	κ
Pep3-8	pep3 (134-151 aa: RLQGRDDDARRDFERAARC)	0.324	G1	λ
Pep3-9	pep3 (134-151 aa: RLQGRDDDARRDFERAARC)	1.331	G2a	κ
Pep3-12	pep3 (134-151 aa: RLQGRDDDARRDFERAARC)	0.932	G1	λ
Pep3-14	pep3 (134-151 aa: RLQGRDDDARRDFERAARC)	1.039	G3	κ
Pep3-15	pep3 (134-151 aa: RLQGRDDDARRDFERAARC)	0.563	G1	κ
Pep3-19	pep3 (134-151 aa: RLQGRDDDARRDFERAARC)	1.059	G2a	κ

进行正向和负向筛选), 再经过3次亚克隆培养, 制备出能分泌TTC36抗体的杂交瘤细胞株26株。将细胞株分泌的抗体进行亚型鉴定, 最后获得22株IgG类型阳性杂交瘤细胞株。其中pep1短肽制备出5株单抗, pep2短肽制备出8株单抗, pep3短肽制备出9株单抗, pep4短肽未制备出有效单抗(表1)。

2.4 单克隆抗体的抗原结合特异性

2.4.1 检测原核表达抗原 以原核表达的GST-TTC36融合蛋白为抗原, Western blot检测显示, 22株单克隆抗体细胞株中, 只有7株单克隆抗体细胞株分泌的抗体有结合活性, 检测结果显示, 在46 kDa左右有结合条带, 与阳性对照相符(市售的抗TTC36多克隆抗体), 说明这7株单克隆抗体均能被用于Western blot检测, 分别是Pep1-1、Pep1-5、Pep1-6、Pep1-7、Pep1-9、Pep3-5和Pep3-14(图3)。

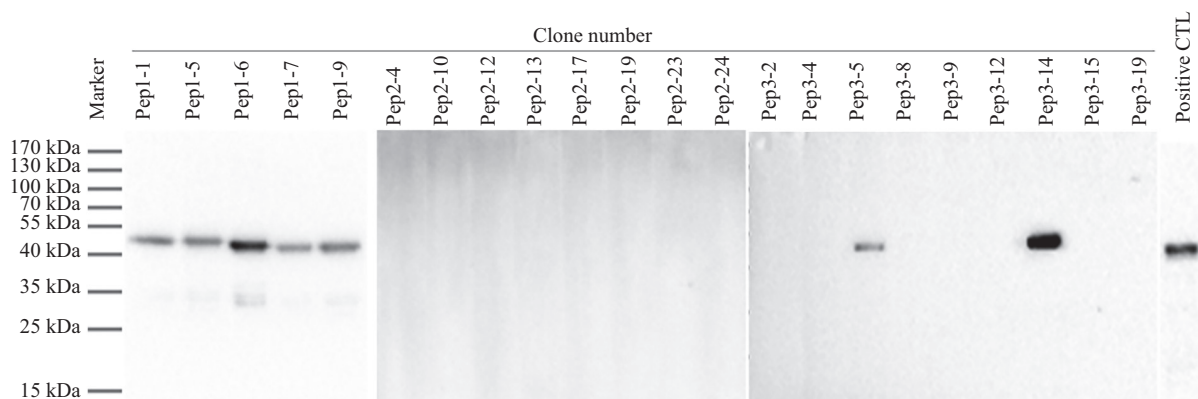
2.4.2 检测真核表达的抗原 为了验证在细胞水平上, 单克隆抗体是否能结合真核表达的TTC36, 用

真核蛋白表达系统HEK293细胞表达含TTC36的细胞裂解液包被ELISA板, 对单克隆抗体进行检测, ELISA结果显示, 22株抗体中有5株能结合真核细胞表达的人TTC36, 分别是Pep1-1、Pep1-5、Pep1-6、Pep1-7和Pep3-14(图4)。

2.4.3 检测组织中的抗原 以Pep1-1多肽来源的单克隆抗体为一抗, 进行免疫组化(immunohistochemistry, IHC)检测。单克隆抗体检测结果显示, 在肝脏组织中TTC36主要表达于肝实质细胞, 肝肿瘤组织表达明显减少(图5)。在肾脏组织中, TTC36主要表达于肾近端小管和肾小球外囊, 肾肿瘤组织表达明显减少(图6)。在正常组织中, TTC36表达定位与阳性对照及数据库结果相同, 说明本研究制备的单克隆抗体可与肝、肾组织内的TTC36蛋白特异结合。

3 讨论

TTC36蛋白含有3个TRP模序(tetratricopeptide),

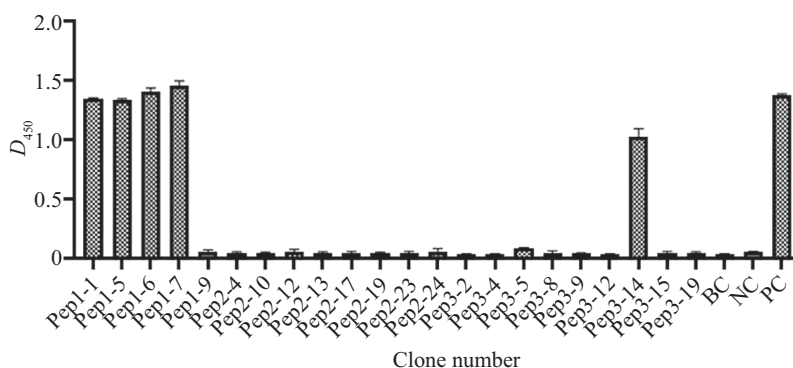


Marker: 蛋白分子量标准; Clone number: 单克隆抗体编号; Positive CTL: 阳性对照(兔抗TTC36多克隆抗体)。

Marker: protein molecular weight standard; Clone number: monoclonal antibody number; Positive CTL: positive control (rabbit anti-TTC36 polyclonal antibody).

图3 单克隆抗体的Western blot鉴定

Fig.3 Western blot identification of monoclonal antibodies



Clone number: 单克隆抗体编号; BC: 空白对照(PBS缓冲液); NC: 阴性对照(免疫前小鼠血清); PC: 阳性对照(阳性血清)。

Clone number: monoclonal antibody number; BC: blank control (PBS buffer); NC: negative control (pre-immune mouse serum); PC: positive control (positive serum).

图4 单克隆抗体的ELISA鉴定

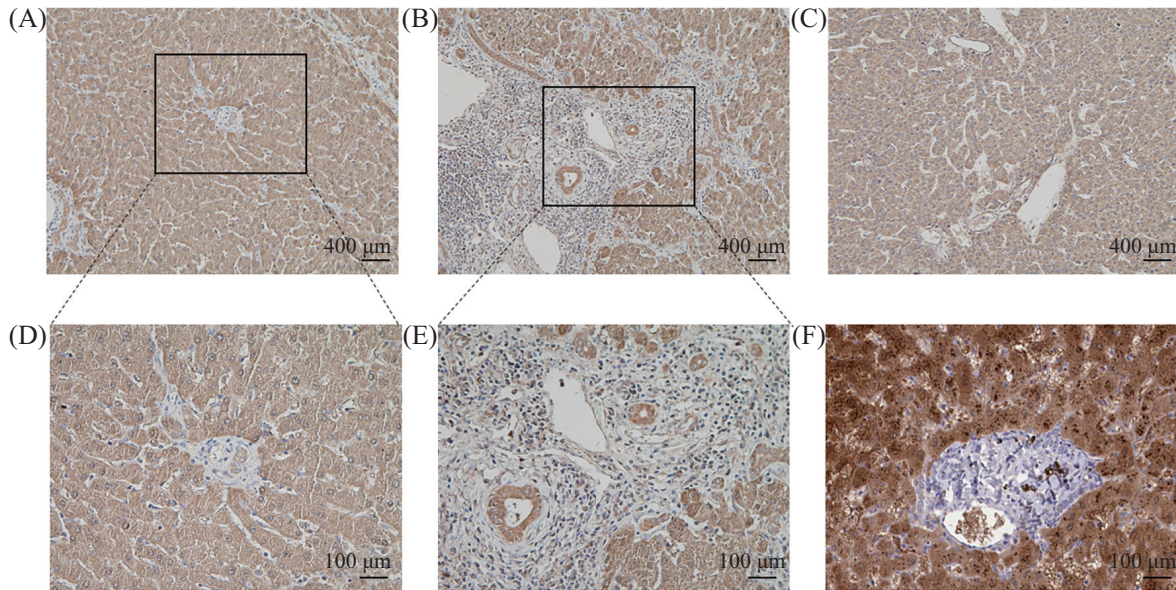
Fig.4 ELISA identification of monoclonal antibodies

TPR样结构使蛋白具有可调节蛋白之间相互作用以及大分子蛋白复合物聚合的功能^[5]。带有TPR样结构的各种蛋白参与了多种细胞内的生命活动^[6-10]。因为TPR样结构蛋白在不同物种内比较保守^[5], 不易起免疫反应, 通过软件分析可以选择或者避免保守区域, 提高抗体制备成功率^[11]。本研究在制备抗体之前, 对人TTC36蛋白的二级结构、亲疏水性、抗原性、表面可及性等进行了分析, 发现有5个多肽区域是亲水性高的区域, 因最靠近其N-端区域的多肽序列与小鼠同源性比较高而没有被选用, 故而选取了其他4个多肽区域作为免疫原。实验结果显示, 只有Pep4多肽未获得对应的抗体。

前期研究中, 我们用TALEN(transcription activator-like effector nuclease)技术构建了TTC36敲除小鼠模型^[2], TTC36基因全敲(即纯合突变)小鼠出现酪氨酸

血症, 补充外源TTC36蛋白(尾静脉高压注射TTC36蛋白表达载体)后, 酪氨酸血症部分恢复。研究发现, TTC36与酪氨酸代谢的关键酶4-羟基苯丙酮酸双加氧酶(4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase, HPD)存在直接的相互作用, 进一步研究发现, TTC36通过TTC36-STK33-PEL11信号通路调节后者的细胞浓度^[3]。此外, NATHAN^[12]研究发现, 在细胞水平上与K-48聚合泛素链(polyubiquitin chains)结合的一些蛋白中有TTC36蛋白, 而K-48聚合泛素链的功能是在细胞内介导靶蛋白转运到蛋白酶体降解, 这些研究提示, TTC36可能参与细胞内蛋白的泛素化过程。因此, 人TTC36功能值得进一步深入研究。

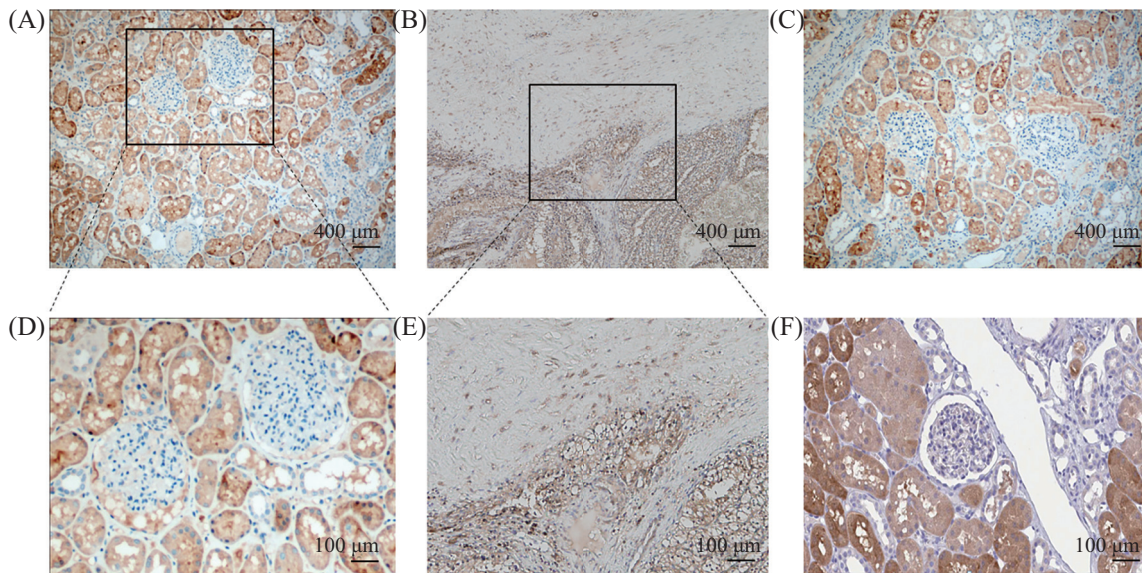
抗体是研究蛋白功能的重要工具。在没有使用TTC36抗体条件下, 2008年, LIU等^[13]用酵母双杂交系统和GST pull-down实验(原核系统)发现, TTC36



A、D: 肝脏癌旁组织不同放大倍数的免疫组化结果; B、E: 肝癌组织不同放大倍数免疫组化结果; C: 阳性对照; F: 来源于数据库(<https://www.proteinatlas.org>)。D、E: 分别为A、B中黑框的放大图。
A,D: para-cancer tissue in liver; B,E: liver cancer tissue; C: positive control; F: from the database (<https://www.proteinatlas.org>). D,E: the enlarged images of the black boxes in A and B, respectively.

图5 单克隆抗体在肝及其肿瘤组织的免疫组化鉴定

Fig.5 IHC identification of monoclonal antibody in liver and liver cancer tissues



A、D: 肾癌旁组织不同放大倍数的免疫组化结果; B、E: 分别为肾癌组织不同放大倍数免疫组化结果; C: 阳性对照; F来源于数据库(<https://www.proteinatlas.org>)。D、E: 分别为A、B中黑框的放大图。
A,D: para-cancer tissue in kidney; B,E: kidney cancer tissue; C: positive control; F: from the database (<https://www.proteinatlas.org>). D,E: the enlarged images of the black boxes in A and B, respectively.

图6 单克隆抗体在肾及其肿瘤组织的免疫组化鉴定

Fig.6 IHC identification of monoclonal antibody in kidney and kidney cancer tissues

的TRP结构域与热休克蛋白70(heat shock protein, Hsp70)的C末端EEVD模序存在相互作用,可能参与抑制肿瘤增殖和转移的过程。在使用多克隆抗体的条件下,2015年,JIANG等^[4]研究发现,TTC36蛋白在

人肝癌组织标本中表达下调,进一步研究发现,这主要是因为肝癌细胞内TTC36基因发生杂合性丢失或启动子甲基化。另外,如果在肝癌细胞中过表达TTC36基因,可以抑制HSP70和BAX的相互作用,使

细胞质到线粒体的BAX转运增加, 继而增加细胞色素C从线粒体释放到细胞质的水平, 从而促进肝癌细胞凋亡。这说明人类TTC36基因的突变会导致某些疾病发生。本研究也用单克隆抗体验证了肝癌组织的TTC36表达要低于癌旁正常组织, 与JIANG等^[4]报道的多克隆抗体检测结果一致。本研究还发现, 肾癌组织的TTC36表达要低于癌旁正常组织, 目前尚无相关报道, 根据肝癌组织中TTC36表达下降主要是肿瘤细胞中TTC36基因突变导致, 推测肾癌组织中TTC36蛋白表达下降的原因可能相似, 更清楚的原因有待后续研究。

多肽一般需要被偶联到载体蛋白上才能成为免疫原, 常用的载体蛋白有KLH和BSA^[14-15]。因为KLH偶联蛋白能产生更强免疫性^[16], 本研究中将KLH偶联多肽用于免疫, BSA偶联多肽用于筛选, 在保证免疫性前提下, 提高了抗体特异性。通过先后使用原核融合表达和真核细胞表达的TTC36进行ELISA筛选, 最后获得了5株能结合真核细胞来源TTC36的特异性单克隆抗体细胞株, 并且均能用于免疫组化检测。在抗体制备过程中, 使用真核来源的蛋白进行筛选, 筛选出来的抗体更能识别临床标本中的靶蛋白, 从而提高其被应用于临床诊断方面的可行性^[17], 尤其是在基于原核系统的噬菌体库的方法中, 以真核来源的蛋白进行抗体筛选能提高其临床应用性^[18]。

综上, 本研究获得了多株TTC36单克隆抗体细胞株, 采用ELISA和Western blot验证单克隆抗体的特性, 证实了其可被应用于免疫组化检测。后续我们将基于这些单克隆抗体, 对肾癌组织TTC36表达量下降的机制进行深入研究; 制备基于单克隆抗体的ELISA检测试剂盒, 以期为肝肾损伤的诊断及预后评估提供新的参考。

参考文献 (References)

- [1] ZHOU Y R, HE Q L, CHEN J H, et al. The expression patterns of tetratricopeptide repeat domain 36 (Ttc36) [J]. *Gene Expr Patterns*, 2016, 22(2): 37-45.
- [2] LIU Y, LÜ X, TAN R, et al. A modified TALEN-based strategy for rapidly and efficiently generating knockout mice for kidney development studies [J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e84893.
- [3] XIE Y, LÜ X, NI D, et al. HPD degradation regulated by the TTC36-STK33-PELI1 signaling axis induces tyrosinemia and neurological damage [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 4266.
- [4] JIANG L, KWONG D L, LI Y, et al. HBP21, a chaperone of heat shock protein 70, functions as a tumor suppressor in hepatocellular carcinoma [J]. *Carcinogenesis*, 2015, 36 (10): 1111-20.
- [5] BLATCH G L, LASSLE M. The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interactions [J]. *Bioessays*, 1999, 21(11): 932-9.
- [6] HEINNICHEL M, KIM R G, WITTKOPP T M, et al. Tetratricopeptide repeat protein protects photosystem I from oxidative disruption during assembly [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113 (10): 2774-9.
- [7] LIEN R, LIN Y F, LAI M W, et al. Novel mutations of the tetratricopeptide repeat domain 7A gene and phenotype/genotype comparison [J]. *Front Immunol*, 2017, 8: 1066.
- [8] EL-DAHER M T, CAGNARD N, GIL M, et al. Tetratricopeptide repeat domain 7A is a nuclear factor that modulates transcription and chromatin structure [J]. *Cell Discov*, 2018, 4: 61.
- [9] YADAV R P, BOYD K, YU L, et al. Interaction of the tetratricopeptide repeat domain of aryl hydrocarbon receptor-interacting protein-like 1 with the regulatory Pgamma subunit of phosphodiesterase 6 [J]. *J Biol Chem*, 2019, 294(43): 15795-807.
- [10] MIKELSAAR A V, SUNTER A, MIKELSAAR R, et al. Epitope of titin A-band-specific monoclonal antibody Tit1 5 H1.1 is highly conserved in several Fn3 domains of the titin molecule. Centriole staining in human, mouse and zebrafish cells [J]. *Cell Div*, 2012, 7(1): 21.
- [11] CHOONG Y S, LEE Y V, SOONG J X, et al. Computer-aided antibody design: an overview [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2017, 1053: 221-43.
- [12] NATHAN J A, KIM H T, TING L, et al. Why do cellular proteins linked to K63-polyubiquitin chains not associate with proteasomes [J]? *EMBO J*, 2013, 32(4): 552-65.
- [13] LIU Q, GAO J, CHEN X, et al. HBP21: a novel member of TPR motif family, as a potential chaperone of heat shock protein 70 in proliferative vitreoretinopathy (PVR) and breast cancer [J]. *Mol Biotechnol*, 2008, 40(3): 231-40.
- [14] MELLADO S G, LAZARO J J, AVILA S, et al. Development of functional antibodies directed to human dialyzable leukocyte extract (Transferrin(R)) [J]. *J Immunol Res*, 2019, doi: 10.1155/2019/2754920.
- [15] JIN N, LING S, YANG C, et al. Preparation and identification of monoclonal antibody against Citreoviridin and development of detection by Ic-ELISA [J]. *Toxicon*, 2014, 90: 226-36.
- [16] MORA D S O, SALMAN M D, MYRICK C A, et al. Evaluation of antibody response to an adjuvanted hapten-protein vaccine as a potential inhibitor of sexual maturation for farmed Atlantic salmon [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2017, 71: 255-63.
- [17] FELLOUSE F A, LI B, COMPANN D M, et al. Molecular recognition by a binary code [J]. *J Mol Biol*, 2005, 348(5): 1153-62.
- [18] SCHOLL I, WIEDERMANN U, FORSTER-WALDL E, et al. Phage-displayed Bet mim 1, a mimotope of the major birch pollen allergen Bet v 1, induces B cell responses to the natural antigen using bystander T cell help [J]. *Clin Exp Allergy*, 2002, 32(11): 1583-8.