

学校编码: 10384

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_\_

学号: 32620141150586

UDC \_\_\_\_\_

廈門大學

硕士学位论文

**DHX32 的原核表达、单克隆抗体的制备及其  
检测方法的建立**

**Prokaryotic expression of DHX32, preparation of  
monoclonal antibodies and the establishment of its detection  
method**

王景坤

指导教师姓名: 张忠英 教授

专业名称: 转化医学

论文提交日期: 2017 年 4 月

论文答辩时间: 2017 年 5 月

学位授予日期: 2017 年 月

答辩委员会主席: 苏文金 教授

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2017 年 05 月

DHX32 的原核表达、单克隆抗体的制备及其检测方法的建立

王景坤

指导教师

张忠英  
教授

厦门大学

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为（ 张忠英教授 ）课题（组）的研究成果，获得（ 张忠英教授 ）课题（组）经费或实验室的资助，在（ 张忠英教授 ）实验室完成。（请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。）

声明人（签名）：王景坤

2017 年 5 月 18 日

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，  
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：王景坤

2017 年 5 月 18 日

## 摘要

RNA 螺旋酶可以通过水解三磷酸腺苷 (ATP) 供能来催化 RNA 双链解螺旋, 在 RNA 代谢中发挥重要作用。DHX32 是新发现的一种 RNA 螺旋酶, 其广泛分布于体内组织, 目前发现 DHX32 存在两种转录本, 一种为 DHX32 全长, 另一种通过可变剪切产生 exon4 缺失转录本 (DHX32 $\Delta$ 4)。有研究表明, DHX32 能改变 Jurkat T 细胞对 Fas 信号的敏感性, 通过下调 c-FLIP short 的表达, 从而促进 Jurkat T 细胞凋亡。有研究表明, DHX32 在结直肠癌中上调, 且可以促进细胞生长及迁移, 而最新的研究提示, DHX32 通过  $\beta$ -catenin 信号通路促进 VEGFA 的表达, 从而促进肿瘤的生长。因此, DHX32 可望作为结直肠癌新的生物标志物与治疗靶点。目前市场上仅有通过合成多肽免疫动物后得到的抗 DHX32 多抗, 无商品化 DHX32 蛋白、抗 DHX32 单抗及检测试剂盒。因此, DHX32 相关研究难以深入开展。研制 DHX32 蛋白及单克隆抗体可为 DHX32 的相关研究奠定基础。

本研究通过原核表达系统, 将 DHX32 全长蛋白、DHX32 分段蛋白 (1-250aa, 251-403aa, 404-743aa) 进行表达和纯化; 利用纯化的 DHX32 全长蛋白免疫 BALB/c 小鼠, 通过细胞融合及细胞筛选, 得到 30 株 DHX32 单克隆抗体。通过与商品化 DHX32 多抗比较, 自制 DHX32 单抗能够到达商品化多抗的检测能力, 可用于替代商品化多抗, 且自制抗体为单抗, 具有较高的特异性。将 DHX32 单抗进行配对, 最终筛选到两个配对包被 5E6-标记 12G9、包被 8H7-标记 12G9; 在板式化学发光平台进行检测条件的优化, 成功建立 DHX32 化学发光检测方法。该 DHX32 试剂盒的灵敏度为 20pg/mL, 检测上限>20ng/mL, 且线性关系较好 ( $R^2>0.99$ ), 试剂盒的批内及批间稳定性较好。将自制 DHX32 抗体分别用于免疫组化实验和共聚焦显微镜细胞定位分析。运用蛋白质同源建模技术, 对 DHX32 蛋白结构进行预测, 发现 DHX32 的  $\beta$ -hairpin 结构域参与解螺旋, 为研究 DHX32 的结构及功能提供参考。

综上所述, 本研究成功建立了 DHX32 全长蛋白、DHX32 片段蛋白的原核表达工艺, 获得高纯度 DHX32 蛋白及三个片段; 利用 DHX32 全长蛋白制备出多

株 DHX32 特异性单抗，并筛选得到两对较好的抗体配对。建立了 DHX32 板式化学发光检测方法，具有较宽的检测范围及良好的线性。为 DHX32 相关肿瘤的研究提供自主知识产权的重要原料，为相关研究奠定基础。

**关键词：**RNA 螺旋酶 DHX32 单克隆抗体 诊断 结构预测 同源建模

厦门大学博硕士论文摘要库

## Abstract

RNA helicase can catalyze RNA double-stranded unwind by hydrolyzing adenosine triphosphate (ATP) to play an important role in RNA metabolism. RNA helicase share 8 highly conserved sequences (I, Ia, Ib, II-VI), which are divided into DHX helicase and DDX helicase according to the amino acid sequence of conserved sequence II. DHX32 is a newly discovered RNA helicase, which is widely distributed in vivo tissue. It is found that DHX32 has two transcripts, one for DHX32 full length and the other by variable shear to produce exon4 deletion transcripts. Studies have shown that DHX32 can alter the sensitivity of Jurkat T cell to Fas signaling by down-regulating the expression of c-FLIP short, thereby promoting Jurkat T cell apoptosis. Previous studies showed that DHX32 is up-regulated in colorectal cancer and contributes to colorectal cancer proliferation, migration, apoptosis and invasion. The latest study showed that DHX32 promoted expression of VEGFA through  $\beta$ -catenin signaling pathway, which promoted tumor growth. Therefore, DHX32 is expected to be a new biomarker and therapeutic targets for colorectal cancer. Currently only through the synthesis of peptide immune animals obtained after anti-DHX32 resistance. No commercial DHX32 protein, anti-DHX32 monoclonal antibody and detection kit. Therefore, DHX32 related research difficult to carry out in depth. Development of DHX32 protein and monoclonal antibody can lay the foundation for DHX32 related research.

In this study, DHX32 full-length protein, DHX32 fragment protein (1-250aa, 251-403aa, 404-743aa) were expressed and purified by prokaryotic expression system. BALB/c mice were immunized with purified DHX32 full-length protein. 30 anti-DHX32 monoclonal antibodies were obtained by cell fusion and cell selection. Compared with commercial DHX32, homemade DHX32 monoclonal antibody can reach the commercial polyclonal antibody detection ability, can be used to replace the commercial polyclonal antibody, and homemade monoclonal antibody, with high

specificity. The DHX32 monoclonal antibody was matched and the two pairs of 5E6-labeled 12G9 were screened and coated with 8H7-labeled 12G9. The DHX32 chemiluminescence detection method was successfully established on the plate chemiluminescence platform. The sensitivity of the DHX32 kit was 20pg / mL, the upper limit of detection was > 20ng / mL, and the linear relationship was good ( $R^2 > 0.99$ ). The stability of the kit is good, suggesting that the results of testing kit had a good repeatability. The DHX32 antibody was used for immunohistochemistry; for confocal microscopy cell localization analysis. Using the protein homology modeling technique to predict the DHX32 protein structure, we found that the  $\beta$ -hairpin domain of DHX32 was involved in the dissolution of the helix, and provided a reference for studying the structure and function of DHX32.

In this study, DHX32 full-length protein and DHX32 fragment protein were successfully constructed and the high purity DHX32 protein and three fragments were obtained. DHX32 specific monoclonal antibody was prepared by DHX32 full length protein and screened, get two pairs of good antibody pairing. The DHX32 plate chemiluminescence detection method was established, which had good detection range and good linearity. For DHX32-related tumor research to provide an important material of independent property rights, lay the foundation for related research.

**Keywords:** RNA helicase; DHX32; Monoclonal antibody; Diagnostics; Structure prediction; Homology modeling



# 目 录

摘 要 .....	I
Abstract .....	III
<b>第一章 前言 .....</b>	<b>1</b>
1.1 结直肠癌 .....	1
1.2 RNA 螺旋酶及 DHX32 .....	2
1.3 原核表达及蛋白纯化 .....	4
1.3.1 原核表达系统 .....	4
1.3.2 蛋白纯化 .....	7
1.4 单克隆抗体研究现状及应用 .....	7
1.4.1 单克隆抗体制备原理及方法 .....	7
1.4.2 单克隆抗体在临床上的应用 .....	9
1.5 蛋白质结构预测 .....	9
1.6 研究的内容和意义 .....	11
<b>第二章 材料与amp;方法 .....</b>	<b>12</b>
2.1 主要仪器 .....	12
2.2 主要耗材 .....	13
2.3 主要试剂及实验动物 .....	13
2.4 临床标本 .....	14
2.5 常用溶液配制 .....	14
2.6 主要实验方法 .....	19
<b>第三章 实验结果 .....</b>	<b>32</b>
3.1 DHX32 重组蛋白原核表达及活性鉴定 .....	32
3.1.1 获取 DHX32 基因序列 .....	32
3.1.2 DHX32 重组表达质粒的构建 .....	32
3.1.3 重组蛋白的纯化及鉴定 .....	35

3.2 DHX32 单克隆抗体的筛选及制备 .....	37
3.3 DHX32 板式化学发光检测的初步建立 .....	40
3.3.1 ELISA 平台筛选双抗体夹心法配对 .....	40
3.3.2 抗体配对在板式化学发光平台的优化 .....	42
3.3.3 板式化学发光平台配对的灵敏度及线性评价 .....	43
3.3.4 板式化学发光平台配对的精密度评价 .....	45
3.4 结直肠癌组织中 DHX32 的检测 .....	45
3.5 DHX32 蛋白结构预测 .....	46
3.5.1 DHX32 蛋白保守区分析及功能预测 .....	46
3.5.2 二级结构预测 .....	48
3.5.3 三级结构预测 .....	50
3.5.4 同源建模结果评价 .....	53
<b>第四章 讨论 .....</b>	<b>56</b>
4.1 影响原核表达的因素 .....	56
4.2 影响单克隆抗体制备的因素 .....	57
4.3 DHX32 单抗在临床检测的初步应用分析 .....	58
4.4 DHX32 蛋白结构预测的分析 .....	59
4.5 展望 .....	59
<b>结 论 .....</b>	<b>61</b>
<b>参 考 文 献 .....</b>	<b>62</b>
<b>致 谢 .....</b>	<b>69</b>

## Table of contents

<b>Abstract in Chinese.....</b>	<b>I</b>
<b>Abstract in English.....</b>	<b>III</b>
<b>Chapter 1 Introduction.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Colorectal cancer.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 RNA helicase and DHX32.....</b>	<b>2</b>
<b>1.3 Prokaryotic expression and protein purification.....</b>	<b>4</b>
1.3.1 Prokaryotic expression system.....	4
1.3.2 Protein purification.....	7
<b>1.4 Research Status and Application of Monoclonal Antibody .....</b>	<b>7</b>
1.4.1 Preparation principle and method of monoclonal antibody.....	7
1.4.2 Application of monoclonal antibody in clinical practice.....	9
<b>1.5 Protein structure prediction.....</b>	<b>9</b>
<b>1.6 The content and significance of the study.....</b>	<b>11</b>
<b>Chapter 2 Materials and methods.....</b>	<b>12</b>
<b>2.1 Instrument.....</b>	<b>12</b>
<b>2.2 Supplies.....</b>	<b>13</b>
<b>2.3 Reagents and animals.....</b>	<b>13</b>
<b>2.4 Clinical specimens.....</b>	<b>14</b>
<b>2.5 Solution preparation.....</b>	<b>14</b>
<b>2.6 Methods.....</b>	<b>19</b>
<b>Chapter 3 Results.....</b>	<b>32</b>
<b>3.1 Prokaryotic expression and activity identification of DHX32 recombinant protein.....</b>	<b>32</b>
3.1.1 Get the DHX32 gene.....	32
3.1.2 Construction of recombinant expression plasmids.....	32

3.1.3 Purification and identification of recombinant protein.....	35
<b>3.2 Preparation of anti-DHX32 monoclonal antibody.....</b>	<b>37</b>
<b>3.3 Preliminary establishment of DHX32 plate chemiluminescence detection.</b>	<b>40</b>
3.3.1 Screening of double antibody sandwich pairs on ELISA platform.....	40
3.3.2 Optimization of antibody pairing on plate chemiluminescence platform...	42
3.3.3 Evaluation of antibody pairing sensitivity and linearity on plate chemiluminescence platform.....	43
3.3.4 Precision evaluation on plate chemiluminescence platform.....	45
<b>3.4 Detection of DHX32 in colorectal carcinoma tissue.....</b>	<b>45</b>
<b>3.5 DHX32 protein structure prediction.....</b>	<b>46</b>
3.5.1 Conservative region analysis and functional prediction of DHX32.....	46
3.5.2 Secondary structure prediction.....	48
3.5.3 3-dimensional structure prediction.....	50
3.5.4 Evaluation of homology modeling.....	53
<b>Chapter 4 Discussion.....</b>	<b>56</b>
<b>4.1 Influencing factors in prokaryotic expression system.....</b>	<b>56</b>
<b>4.2 Influencing factors in preparation of monoclonal antibody.....</b>	<b>57</b>
<b>4.3 Preliminary application of DHX32 monoclonal antibody.....</b>	<b>58</b>
<b>4.4 Analysis of DHX32 protein structure prediction.....</b>	<b>59</b>
<b>4.5 Prospect .....</b>	<b>59</b>
<b>Conclusion.....</b>	<b>61</b>
<b>Reference.....</b>	<b>62</b>
<b>Acknowledgement.....</b>	<b>69</b>

## 第一章 前言

### 1.1 结直肠癌

恶性肿瘤已经成为全球的主要死亡原因,2012年约有1410万新发肿瘤病例,有820万人死于癌症,占慢性疾病病例死亡的22%,且这个数字每年仍不断增长<sup>[1]</sup>。2012年全球常见恶性肿瘤前五位,男性是肺癌、前列腺癌、结直肠癌、胃癌和肝癌;女性为乳腺癌、结直肠癌、肺癌、子宫颈癌和胃癌<sup>[1]</sup>。2015年中国新发恶性肿瘤病例约430万,其中主要为肺癌,胃癌、食管癌、肝癌和结直肠癌<sup>[2]</sup>。中国每年约280万人死于恶性肿瘤,其中前五位死因为肺癌、胃癌、肝癌、食管癌和结直肠癌<sup>[2]</sup>。

结直肠癌是消化道常见的恶性肿瘤,位列世界癌症死因第四位,2012年约有136万新病例和近70万死亡病例。位居我国常见肿瘤第5位,我国每年约有37.6万结直肠癌新发病例,19.1万人死于结直肠癌<sup>[2]</sup>。虽然我国结直肠癌的发病率较其他国家低,但随着经济的发展,我国的结直肠癌发病率呈现上升趋势(图1.1和图1.2)。大量临床资料显示,进展期及晚期结直肠癌预后较差,而早期结直肠癌的治愈率较高。故及时准确的发现癌前病变和早期癌,为患者争取最佳治疗时机,是提高结直肠癌治愈率及生存质量的关键。肿瘤血清标志物检测在癌症早期辅助诊断和普查中已得到了广泛应用。目前,消化道肿瘤诊断的常用血清标志物有CEA、CA125、Fer等。但这些肿瘤标志物在敏感性和特异性方面一直不能满足临床需求,也不适用于结直肠癌的早期诊断。因此,寻找一种能够对结直肠癌进行早期诊断并对其恶性程度进行判断的方法显得尤为重要。

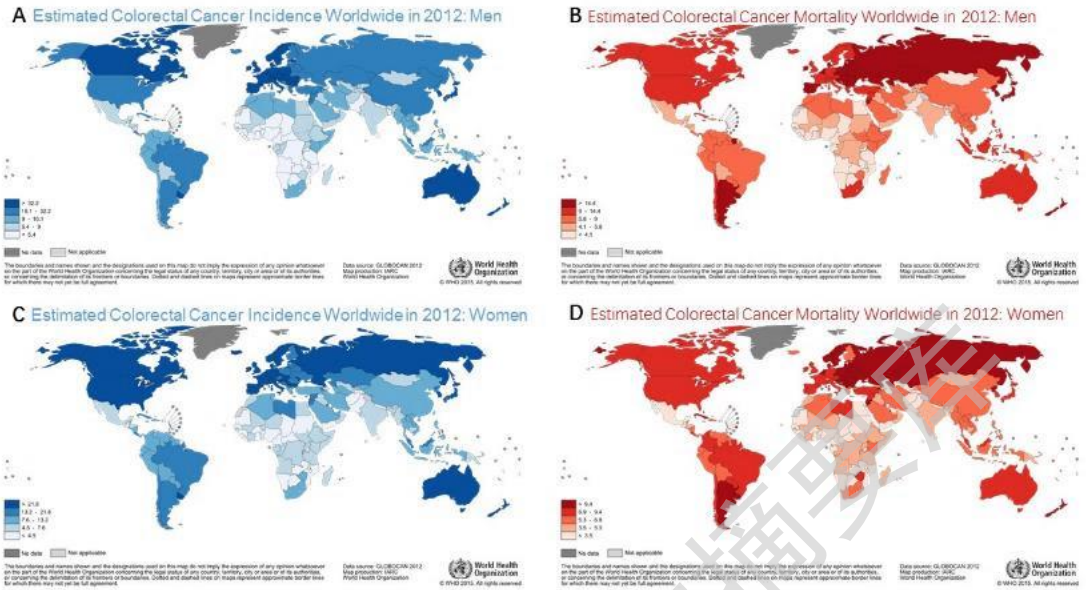


图 1.1 2012 年全球结直肠癌发病率及死亡率统计（每 10 万人）

Figure 1.1 Worldwide colorectal cancer incidence and mortality rates (per 100000) in 2012.

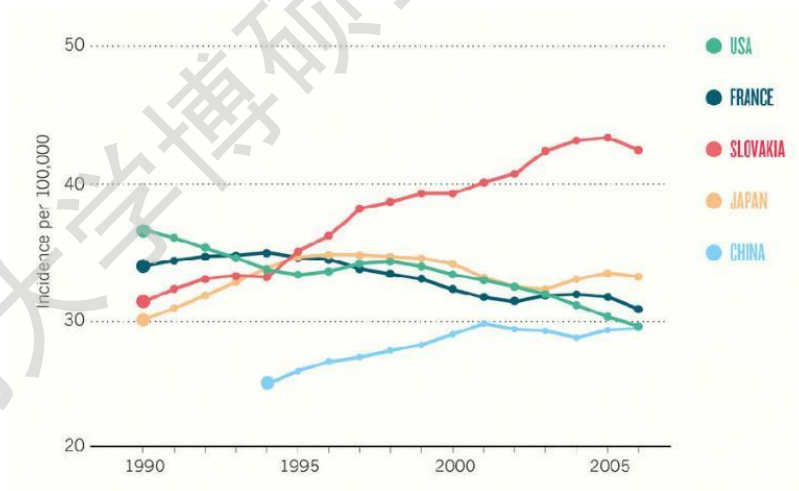


图 1.2 各国结直肠癌发病率变化

Figure 1.2 Trends of colorectal cancer incidence over time.

## 1.2 RNA 螺旋酶及 DHX32

RNA 螺旋酶被发现存在于所有的真核生物、大多数细菌和部分古细菌中<sup>13, 41</sup>。人 RNA 螺旋酶（human RNA helicase, HRH）能够水解三磷酸腺苷（ATP）提

供能量来催化 RNA 双链解螺旋和 RNA-蛋白质复合物的重塑<sup>[5]</sup>。它们在 RNA 代谢方面起到了重要的作用，从 mRNA 的转录到降解<sup>[3, 4, 6]</sup>。RNA 螺旋酶共含有 8 个高度保守序列 (I、Ia、Ib、II-VI)，根据保守模序 II 的氨基酸序列不同可分成 DHX 螺旋酶和 DDX 螺旋酶两类<sup>[7, 8]</sup>。DHX 螺旋酶可参与 mRNA 前体的剪接加工、核糖体合成、转录水平的调控、翻译水平的调节以及细胞核和线粒体内的 RNA 转录后加工等过程<sup>[9-13]</sup>。RNA 螺旋酶在人体内广泛存在，且与多种疾病具有相关性 (表 1.1)。如，DHX9 在乳腺癌中表达异常，DDX1 在乳腺癌组织中高表达，DDX3 在肝细胞癌中高表达<sup>[14-17]</sup>。因此，RNA 螺旋酶在肿瘤发生发展过程中发挥的作用正逐渐引起人们的关注。

表 1.1 RNA 螺旋酶与疾病的关系

Table 1.1 RNA helicases involved in disease.

RNA helicase	Disease	Role	References
DDX6	脊髓小脑性共济失调	信使 rna 衰变 P body 组装	[18, 19]
Senataxin	肌萎缩性脊髓侧索硬化症 共济失调眼球运动失用症	未知	[20, 21]
Gemin3	脊髓性肌萎缩	snRNP 组装 转录	[22-24]
UAP56	阿尔茨海默病	剪接体组装 mRNA 出核	[25]
DDX19	致命的先天挛缩综合征	mRNA 出核	[26]
DDX1	成神经细胞瘤 成视网膜细胞瘤	转录 mRNA 加工 翻译	[27-31]
DDX5	结直肠癌、前列腺癌、乳腺癌	microRNA 的加工和成熟	[32]
DDX39	肺癌、胃肠癌	与生长相关及维持基因 组的完整性	[33, 34]
eIF4A	黑色素瘤、肝癌、肺癌、结肠	翻译起始	[35]

癌和乳腺癌			
DHX36	衰老、肿瘤	端粒维持 mRNA 降解	[36-38]
DHX9/RHA	系统性红斑狼疮	转录 翻译	[39-41]
Brr2	色素性视网膜炎	mRNA 剪接	[42]

DHX32 是 Abdelhaeem 等<sup>[43]</sup>于 2002 年新发现的一种 RNA 螺旋酶，广泛分布于体内组织，如肝脏、直肠和乳腺等组织中。DHX32 编码基因位于 10q26 号染色体上，包含 11 个外显子，全长 60kb，编码 743 个氨基酸，分子量为 84kD。Abdelhaleem 等发现 DHX32 在骨髓性白血病细胞系 HL-60 中可以产生两种转录本，一种为 DHX32 全长 (UniProt: Q7L7V1)，全长约 3kb；另一种通过可变剪切产生的 exon4 共 243bp 完全缺失转录本 (DHX32 $\Delta$ 4)，全长约 2.8kb，删除的片段编码 81 个残基 (284aa-364aa)，剩余片段共编码 662 个氨基酸，分子量约 75kD<sup>[43]</sup>。有报道指出，在 Jurkat T 细胞中，DHX32 参与细胞凋亡<sup>[44]</sup>。DHX32 在急性淋巴细胞白血病中表达异常，且与淋巴细胞分化和凋亡也有密切关系<sup>[45]</sup>。DHX32 在滤泡性淋巴瘤中表达也存在异常<sup>[46]</sup>。有研究表明，DHX32 可以促进细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭，其在结直肠癌组织中过表达<sup>[47, 48]</sup>。最新的研究表明，DHX32 可以通过  $\beta$ -catenin 信号通路促进 VEGFA 表达，从而促进肿瘤的生长<sup>[49]</sup>。因此，DHX32 可望作为结直肠癌治疗的新靶点和结直肠癌早期诊断与预后判断的新的肿瘤标志物。

## 1.3 原核表达及蛋白纯化

### 1.3.1 原核表达系统

目前，重组蛋白已广泛应用于生物工程、制药工业等领域。重组蛋白可以通过原核细胞表达、哺乳动物细胞表达、酵母菌表达、昆虫细胞表达及人工合成等方式获得。大肠杆菌是首次应用到重组蛋白表达的宿主菌，也是目前最常用的原核表达系统。同其他表达系统相比，大肠杆菌表达系统具有遗传背景比较清楚，目的基因表达水平较高，培养周期较短，抗污染能力较强，转化效率高，成本低



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士学位论文摘要库