

抗极低密度脂蛋白受体多克隆抗体的制备及鉴定

吴 凡, 屈 伸, 陈 涛, 尹燕华

(华中科技大学同济医学院生物化学与分子生物学系, 湖北省武汉市 430030)

[关键词] 生物化学; 抗极低密度脂蛋白受体多克隆抗体的制备; 酶联免疫吸附法和免疫印迹法; 组织分布; 动脉粥样硬化; 胃腺癌; 蛋白印迹实验

[摘要] 为制备抗极低密度脂蛋白受体的多克隆抗体, 以极低密度脂蛋白受体配体结合域上特定片段的合成肽免疫新西兰家兔, 收集免疫前后动物的血清, 通过酶联免疫吸附法及免疫印迹法对血清中抗体进行分析和鉴定。结果发现, 已获得高效价的抗极低密度脂蛋白受体血清, 可利用免疫印迹法检测人、鼠组织和细胞中的天然极低密度脂蛋白受体及其亚型的蛋白。此结果提示, 抗极低密度脂蛋白受体多克隆抗体的制备为从蛋白水平研究极低密度脂蛋白受体提供了有效的工具。

[中图分类号] Q5

[文献标识码] A

Preparation and Characterization of Polyclonal Antibodies Against Very Low Density Lipoprotein Receptor

WU Fan, QU Shen, CHEN Tao, and YIN Yan-Hua

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, Tongji Medical College, Huazhong Science and Technology University, Wuhan 430030, China)

[KEY WORDS] Polyclonal Antibodies; VLDL Receptor; Tissue Distribution; Atherosclerosis; Western Blot; ELISA; Gastric Adenocarcinoma

[ABSTRACT] **Aim** To prepare the polyclonal antibodies against VLDL receptor and to characterize the antibodies.

Methods Rabbits were immunized with polypeptide fragment of VLDL receptor as antigen. The blood serum of the immunized rabbits was collected. The quality of the antibodies were analyzed and characterized with ELISA and Western Blot. **Results**

Rabbit against mouse and human VLDL receptor antibodies were obtained. The anti-serum have high title and can recognize the two subtypes of natural VLDL receptor through Western Blot. **Conclusions** The polyclonal antibodies against VLDL receptor were obtained, which provide a new tool to study the protein of VLDL receptor.

极低密度脂蛋白(very low density lipoprotein, VLDL)受体是低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)受体超家族的成员, 它可与含载脂蛋白E的脂蛋白和脂蛋白脂肪酶结合, 参与富含甘油三酯的脂蛋白在体内的代谢, 在泡沫细胞形成和动脉粥样硬化病变的发生发展中具有重要作用^[1]。近来的研究还发现, VLDL受体还可与脑内信号分子Reelin、尿激酶型纤溶酶原激活物与其抑制物的复合物等配体结合, 在胚胎神经发育、肿瘤浸润与转移等多种生理及病理生理过程中发挥作用^[2]。对VLDL受体的功能及其在病理和生理条件下表达变化的机制的研究

日益受到研究者的关注, 抗体作为一种可与蛋白质特异性结合的分子, 是对受体结构功能及表达研究过程中的重要工具。鉴于其抗体来源的限制, 国内关于VLDL受体分布及表达调控的研究多局限于mRNA水平。本实验设计制备一种针对VLDL受体胞外配体结合域上特定部位的抗体, 为进一步从蛋白质水平研究VLDL受体的功能及其在不同条件下表达状况的差异和原因提供有效的工具。

1 材料与方法

1.1 动物和试剂

雄性新西兰家兔, 12周龄, 购自湖北省卫生防疫站实验动物中心。

福氏佐剂, 噬孔一血蓝蛋白(KLH), 戊二醛, 甘氨酸, Lorry试剂购自Sigma公司; 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG, ELISA试剂购自北京中山公司; ECL试剂购自Santa Cruz公司。

1.2 抗原的制备

[收稿日期] 2003-10-15 [修回日期] 2004-04-05

[基金项目] 国家自然科学基金项目(39970307)资助

[作者简介] 吴凡, 博士研究生, 研究方向为动脉粥样硬化发病分子机制的研究, 联系电话为027-83692624, E-mail为wufan1002@hotmail.com。屈伸, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为基因诊断与基因治疗, 本文通讯作者, 电话为027-83692624, E-mail为qushen@mails.tjmu.edu.cn。陈涛, 助教, 研究方向为动脉粥样硬化发病分子机制的研究, 联系电话为027-83692623, E-mail为chenjiatao@hotmail.com。

从 VLDL 受体胞外配体结合域上选取一段该受体特有的氨基酸序列(人、小鼠同源), $H_2N-SLEQCGRQPVHTK-COOH$ (aa198-aa211)^[3,4], 人工合成一段 14 肽(由北京赛百胜公司合成)。利用戊二醛交联法将这段小分子肽偶联到担体蛋白 KLH^[5] 上。方法如下: 首先将半抗原溶于 PBS 中, 调节终浓度至 5 g/L, 按 1 mol 半抗原对应 50 个氨基酸的比例加入担体蛋白, 并混匀, 然后逐滴加入等体积 0.2% 戊二醛, 边加边摇, 加完后将混合物室温下放置 1 h; 再取 1 mmol/L 的甘氨酸, 逐滴加入, 边加边摇, 至终浓度为 200 mmol/L, 然后室温下持续振摇 1 h; 将反应物置 PBS 透析过夜, 换液 4 次。Lowry 法定蛋白含量。

1.3 动物免疫及抗血清的采集

取上述交联溶液按 0.5 mg 蛋白/公斤体重, 皮下多点注射免疫两只新西兰家兔。共免疫 5 次, 每次间隔 4 周, 其中初次免疫与福氏完全佐剂乳化, 后 4 次与福氏不完全佐剂乳化。自第 3 次免疫起, 每次免疫后第 12 天, 耳缘静脉采血, 用 ELISA 法检测抗血清效价。待抗血清效价达 10^{-5} , 遂于免疫后第 14 天心脏采血 60 mL。将全血室温放置 1 h, 后转入 4℃ 过夜, 待血凝块充分收缩后, 吸取上层血清, 以 5 000 g 离心 10 min, 去除残留的红细胞及其它碎片。抗血清经过 56℃ 30 min 加热灭活, 加入等量中性甘油, 分装至小瓶, -20℃ 以下低温保存^[6]。

1.4 间接 ELISA 法检测

以 VLDL 受体合成肽 1 mg/L, 50 μ L 包被 96 孔板, 经 10 mg/L 牛血清白蛋白封闭后, 分别取免疫兔血清和未免疫兔血清(阴性对照), 自 1:200 起, 按系列倍比稀释浓度加入各孔。4℃ 结合过夜, 用含 0.05% Tween20 的 PBS 洗 5 次, 加入 1:20 000 HRP 标记的羊抗兔 IgG, 室温 1 h, 0.05% Tween20-PBS 洗 5 次, 加邻苯二胺(σ -PD)显色, 酶标仪在 492 nm 处读数, 以 $OD_{免}/OD_{对} \geq 2$ 者为阳性。

1.5 Western Blot

用裂解液[pH 7.3 10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L MgCl, 5 mmol/L EDTA, 1% NP-40, 0.5% 脱氧胆酸钠, 蛋白酶抑制剂(aprotinin、leupeptin 和 pepstatin 各 1 mg/L, 1 mmol/L PMSF)]提取小鼠心肌、肝脏、骨骼肌、脾脏、脑组织、小鼠巨噬细胞系 RAW264.7 及人胃腺癌细胞株 MKN45、SC7901 和 MKN28 的总蛋白, Lowry 法测蛋白浓度。取等量蛋白(80 μ g)上样于 7.5% 聚丙烯酰胺凝胶进行电泳, 电泳后转移蛋白于硝酸纤维素膜; 膜于含 5% 脱脂奶粉的 TBST (50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.6, 150 mmol/L NaCl, 0.1%

Tween 20) 中室温下封闭 2 h, 加以封闭液稀释的抗血清(1:500), 4℃ 过夜; 用 TBST 洗膜 3 \times 15 min, 加封闭液稀释的 HRP 标记二抗(1:10 000), 室温下 1 h, TBST 洗膜 3 \times 15 min, 加 ECL 试剂, X 光胶片曝光、洗片。

2 结果

酶联免疫吸附试验测定显示, 与未免疫兔血清相比, 两只免疫兔抗血清与极低密度脂蛋白受体合成肽抗原均呈强阳性反应, 抗体稀释度可达 25 600 以上。

表 1 免疫兔抗血清酶联免疫吸附试验滴度

Table 1. Antiserum ELISA titre of immunized rabbit

稀释度	未免疫兔血清	免疫兔血清
1:400	0.19	0.98
1:800	0.03	0.98
1:1600	0.00	0.97
1:3200	0.00	0.96
1:6400	0.00	0.87
1:12800	0.00	0.78
1:25600	0.00	0.65
1:51200	0.00	0.34

注: $OD_{免}/OD_{未} \geq 2$ 者为阳性。

小鼠各组织 Western Blot 结果显示, 小鼠心肌蛋白样品在平均分子量约 160 kDa 处可见一强反应条带, 骨骼肌次之, 小鼠脾脏、脑组织及巨噬细胞蛋白样品在该位置的条带较弱, 而小鼠肝脏蛋白样品在该位置未见条带。此外, 脾脏蛋白样品在约 110 kDa 处还可见一清晰条带, 为 VLDL 受体的亚型(\oplus 型剪接体)。各条带的位置及在各组织细胞中的表达状况与文献[7]报道一致。



图 1. 抗极低密度脂蛋白受体抗血清与小鼠各组织蛋白样本的免疫印迹实验

Figure 1. Western blott assay with several murine tissue samples

人胃腺癌细胞株 Western Blot 结果显示, 高分化的 MKN28 细胞株在 160 kDa 和 110 kDa 处均有条带, 且以 160 kDa 的条带为主。而低分化的 MKN45 和 SC7901 则主要以 110 kDa 的条带为主。

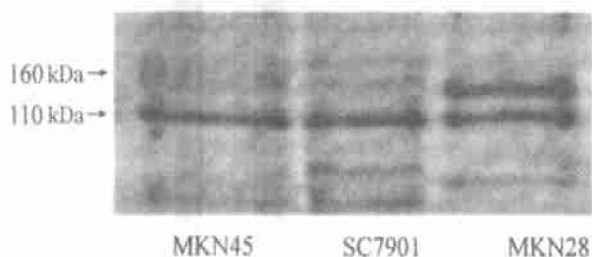


图 2. 抗极低密度脂蛋白受体抗血清与不同分化程度的人胃腺癌细胞株的免疫印迹实验

Figure 2. western blott assay with human gastric adenocarcinoma cells

3 讨论

早期从蛋白质水平来研究脂蛋白受体的结构和功能多采用配体印迹的方法, 如 RAP 蛋白, 各种脂蛋白分子等。但由于各种脂蛋白受体的配体谱多有交叉, 且在多个细胞和组织中伴行分布, 配体印迹实验的结果极易受到干扰。利用高效特异型的抗体来识别和结合靶蛋白已成为国际上通用的研究受体表达和分布的方法。VLDL 受体属于 LDL 受体超家族中的小受体, 根据糖链结合域的存在与否, 分为一型(全长, 约 160 kDa)和二型(O-糖链区缺失, 约 110 kDa)两个亚型。VLDL 受体的分子结构与家族中的另外两个小受体, LDL 受体和载脂蛋白 ER2 十分相似, 氨基酸序列有 50%~55% 的同源性。为避免出现交叉反应, 本研究从 VLDL 受体胞外配体结合域上选取了一段该受体特有的氨基酸序列, 人工合成一段半抗原, 用以免疫动物, 成功的获取了可识别 VLDL 受体抗原肽的抗血清。以小鼠多种组织的蛋白提取物为抗原进行免疫印迹鉴定, 在预期的 160 kDa 处可见一清晰条带, 且在能量代谢活跃的心肌和骨骼肌中, 该条带相应较强, 而在 VLDL 受体痕量表达, LDL 受体高表达的肝组织中则未见明显的条带。在脾脏和脑组织中表达相对较弱, 且有 II 型受体出现。这一结果与文献中对 VLDL 受体的 mRNA 在小鼠各组织中分布的检测结果相吻合^[2]。此外,

以不同分化程度的人胃腺癌细胞株蛋白样本进行的免疫印迹结果显示: 低分化的 MKN45 和 SC7901 细胞主要表达二型受体, 而高分化的 MKN28 细胞则两型均有, 与 RT-PCR 检测的 mRNA 结果相一致^[8]。以上实验证明 VLDL 受体合成肽与细胞内存在的 VLDL 受体抗原组成成分相符, 抗血清确可识别人及小鼠组织和细胞内的 VLDL 受体, 并区分不同的亚型, 具备检测 VLDL 受体天然蛋白表达状况的应用价值。

极低密度脂蛋白(VLDL)受体在人体内分布广泛, 在多种组织器官中均有表达, 在能量代谢旺盛的组织中尤为丰富。VLDL 受体在机体内的表达受血浆脂质水平的调节, 据报道, 在动脉粥样硬化兔的粥样斑块内, VLDL 受体的 mRNA 的表达可上升 100 倍^[1]; 体外实验也显示, VLDL 可诱导小鼠巨噬细胞内 VLDL 受体表达显著上调(待发表), 促进巨噬细胞源性泡沫细胞的形成。上述研究说明, VLDL 受体在富含甘油三酯的脂蛋白致动脉粥样硬化过程中有重要作用。我室的研究还发现, 在肝硬化脾脏, 糖尿病脂肪组织, 不同分化程度的胃肠道肿瘤等多种病变组织中 VLDL 受体的表达及亚型分布亦有改变。抗 VLDL 受体多克隆抗体的制备为进一步从蛋白质水平研究在不同病理生理条件下 VLDL 受体表达变化及其机制提供了有效的工具。

[参考文献]

- [1] Hiltunen TP. Expression of LDL receptor, VLDL receptor, LDL receptor-related protein and scavenger receptor in rabbit atherosclerosis lesions. *Circulation*, 1998, **97**: 689-701
- [2] Rotenberger PM, Oka K, Petersen HH, Christensen A, Andreasen PA. Ligand Binding Properties of the Very Low Density Lipoprotein Receptor. *J Bio Chem*, 1999, **274**: 8 973-980
- [3] Hiroaki I, Tokuo TY. Expression and Characterization of a Very Low Density Lipoprotein Receptor Variant Lacking the O-linked Sugar Region Generated by Alternative Splicing. *J Bio Chem*, 1998, **124**: 747-755
- [4] 屈伸, 王剑波, 刘志国, 邓耀祖, 冯宗忱. 中国人极低密度脂蛋白受体基因的克隆及其在中国仓鼠卵巢巢细胞中的表达. *中国动脉硬化杂志*, 2000, **8** (3): 189-192
- [5] Harlow E, and Lane D. Antibodies: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Press, 1988: 75-78
- [6] 巴德年. 当代免疫学技术与应用. 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1998: 136-140
- [7] Tiebel O, Oka K, Sullivan M. Mouse very-low-density-lipoprotein receptor (VLDLR): gene structure, tissue-specific expression and dietary and developmental regulation. *Atherosclerosis*, 1999, **145**: 239-251
- [8] Nakamura Y, Yamamoto M, Kumamaru E. Very low density lipoprotein receptor in fetal intestine and gastric adenocarcinoma cells. *Arch Pathol Lab Med*, 2000, **124**: 119-122

(此文编辑 朱雯霞)