

泡沫细胞相关基因 4 兔抗人多克隆抗体的制备

冯大明¹, 王 仁¹, 孙文清¹, 郭 芳¹, 屈顺林¹, 杨向东²

(南华大学医学院 1. 病理生理学教研室, 2. 心血管病研究所, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 病理学与病理生理学; 泡沫细胞相关基因 4 蛋白; 多肽合成; 多克隆抗体; 制备

[摘要] 目的 探讨制备泡沫细胞相关基因 4 多克隆抗体的方法。方法 将从人胎肝文库经聚合酶链反应扩增获得的泡沫细胞相关基因 4 基因全长 cDNA 序列, 通过生物信息学分析, 预测泡沫细胞相关基因 4 编码氨基酸序列的二级结构、抗原决定簇、功能结构域, 并进行了多序列比对, 并根据蛋白质的亲疏水性、二级结构、偶联难度及实验难度等, 确定泡沫细胞相关基因 4 抗原 13 肽 PKLVKEEVFWRNY, 采用固相多肽合成法合成该抗原片段, 偶联后经过基础免疫, 6 次加强免疫, 经追踪检测, 于第四次免疫后 10~14 天颈动脉放血, 分离血清, 冷冻抽干, -20℃保存而制备了泡沫细胞相关基因 4 兔抗人多克隆抗体。结果 用固相多肽合成法成功制备了泡沫细胞相关基因 4 兔抗人多克隆抗体, 该抗体经间接酶联免疫吸附测定法检测其效价为 1:16 000, Western blot 检测可见 40 kDa 处有目的带, 用免疫组织化学方法从 HepG2 细胞中检测到泡沫细胞相关基因 4 蛋白表达, 证实该抗体具有较好的反应性和特异性。结论 固相多肽合成法省时、省力、制备的抗体效价高; 泡沫细胞相关基因 4 兔抗人多克隆抗体的制备, 为进一步研究泡沫细胞相关基因 4 蛋白在动脉粥样硬化中的功能作用奠定了基础。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

The Preparation of Foam Cell Related Gene 4 Rabbit Anti-Human Polyclonal Antibody

FENG DaMing¹, WANG Ren¹, SUN WenQing¹, GUO Fang¹, QU ShunLin¹, and YANG XiangDong²

(1. Department of Pathophysiology, 2. Institute of Cardiovascular Disease, Nanhua University, Hengyang 421001, China)

[KEY WORDS] Foam Cell Related Gene 4 Protein; Peptide Synthesis; Polyclonal Antibody; Preparation

[ABSTRACT] **Aim** To explore the preparation of the polyclonal antibody of a novel Homo sapiens synapse associated protein (FRG4). **Methods** FRG4 full length sequence was obtained by PCR from human fetal liver library, by bioinformatics to detect the second structure of amino acids encoded by FRG4 and its epitope and motifs, according to the hydrophilicity, second structure, coupling and experiment difficulty etc, the peptide with 13 amino acid (PKLVKEEVFWRNY) was selected and synthesized by Solid-phase Peptide Synthesis (SPSPS) method. After coupling, the peptide was immunized to rabbits through the basic and 6 fortified immunities. 10 to 14 days later just after the fourth fortified immunity, serum, separated from blood exsanguinated from carotid, was lyophilized and then stored at -20℃. **Results** Analyzed by ELISA and Western blot, the antibody dilution was 1:16 000 and the blot was showed at the location of 40 kDa, the FRG4 protein was detected in cytoplasm of HepG2 cells by immunohistochemistry. All these proved that the antibody has a good reaction and speciality. Experiments showed that the SPSPS method was convenient to control the synthesis of peptides, spare time and labours, also obtain a good dilution. **Conclusion** A novel Homo sapiens synapse associated protein (FRG4) antibody was synthesized successfully, and worked as a foundation to the further study of FRG4 protein function playing in cardiovascular disease.

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)性心脑血管疾病在老年人群中发病广、危害重,目前对其发病机制尚未完全阐明,从分子和基因水平研究巨噬细胞泡沫化机制,对于 As 发病机制和防治研究具有重要意义^[1]。泡沫细胞相关基因 4(foam cell related gene, FRG4)是应用抑制消减杂交法(suppression subtractive hybridization, SSH)筛选 ox-LDL 致 U937 细胞泡沫化

过程中的差异表达基因,登录在 GenBank (BI502586, BI502587)^[2]。FRG4 编码蛋白与人突触相关蛋白(Homo sapiens synapse-associated protein, SYAP1)有着高度的同源性(核酸同源性为 99%,氨基酸同源性为 87%),但其功能仍不是很清楚,国内外尚未见文献报道。因此,用固相多肽合成法合成该抗原片段,进而制备 FRG4 多克隆抗体,为研究 FRG4 蛋白在 As 中的功能作用奠定了基础。

[收稿日期] 2004-07-26

[修回日期] 2005-05-16

[基金项目] 国家自然科学基金(30200103)和湖南省自然科学基金(02JJY4011)资助

[作者简介] 冯大明,副教授,研究方向为心血管疾病防治。王仁,硕士,讲师。通讯作者杨向东,医学博士,副教授,硕士研究生导师,主要从事心血管疾病相关基因克隆和细胞凋亡机制的研究。

1 材料和方法

1.1 试剂与材料

新西兰兔为首都医科大学北京宣武医院提供,

HepG2 细胞株为本研究所培养, DMEM 培养基、完全弗氏佐剂及不完全弗氏佐剂购自 GIBCO BRL 公司, 小牛血清购自美国 Hyclone 公司, ABC 免疫组织化学试剂盒购自武汉博士德, FITC 标记羊抗兔 IgG 购自北京中山公司, ELISA 试剂盒购自北京丽科公司, 多肽合成所用氨基酸及其它相关试剂购自 ACT 公司。HepG2 细胞用含 10% 灭活新生小牛血清的 DMEM 培养基, 于 37℃、含 5% CO₂ 的恒温箱中培养。

1.2 泡沫细胞相关基因 4 抗原表位分析

将 FRG4 全长 cDNA 翻译成氨基酸序列, 进行氨基酸同源性分析; 将具有 BSD 功能域的氨基酸序列进行多重对齐分析; 进行蛋白质的亲疏水性、二级结构、跨膜区分析; 分析蛋白质结构功能域, 并根据蛋白质的亲疏水性、二级结构、偶联难度及实验难度等最终确定 FRG4 抗原表位。

1.3 泡沫细胞相关基因 4 抗原肽的合成

抗原 13 肽 PKLVKEEVFWRNY, 采用美国 ABI 公司的多肽自动合成仪, 以固相合成法合成, 合成程序按照 ABI 操作指南及 Fmoc 化学合成步骤。经过缩合→洗涤→去保护→中和洗涤→下一轮缩合等操作, 直到完成所要求的序列, 使用 Kaiser 方法对成肽过程中缩合反应程度进行定性监测。

1.4 半抗原与载体的偶联

泡沫细胞相关基因 4(FRG4) 多肽与钥孔血蓝蛋白(keyhole limpet hemocyanin, KLH) 用 BDB 法交联。取 FRG4 纯肽 11.0 mg, 用 PBS 缓冲液(pH 7.6) 溶解; KLH 10 mg, 用 pH 8.0 硼酸盐缓冲液溶解, 然后将两者混合, 冷却至 0℃, 取 BDBCL2 110 μL, 室温下反应 1.5 h, 透析过夜后分装成 6 支, -20℃保存。

1.5 偶联的检测

用紫外分光光度法鉴定 FRG4 抗原同 KLH 偶联是否成功。将 FRG4 抗原、KLH 及 FRG4-KLH 略作稀释, 以 PBS 作为空白, 用紫外分光光度计在 200~400 nm 下测定其紫外光吸收值, 绘制反应前后的紫外吸收光谱变化, 判定偶联是否成功。

1.6 多克隆抗体的产生

体重约 2 kg 新西兰兔 5 只。基础免疫是将 FRG4 抗原液与等体积的弗氏完全佐剂混合, 充分乳化后每只兔以 300 μg 于背部多点(20 点左右) 皮内注射。每隔 4 周加强免疫一次, 共 6 次: FRG4 抗原与不完全弗氏佐剂充分乳化后, 以 100 μg/ 只于背部多点注射。第四次加强免疫后第 10~14 天颈动脉放血, 分离血清, 冷冻抽干, -20℃保存。

1.7 抗体产生的追踪检测

在每次加强免疫 10 天后取耳静脉血, 用 ELISA

法检测抗体效价, 以追踪抗体产生的情况, 从而在最佳时期获得抗体。经第一次加强免疫后, 可检测到效价较低的抗体, 随着加强免疫的进行, 抗体效价开始逐步上升, 至 4 个月后(第四次加强免疫), 抗体效价达到最高, 可在此期放血, 分离血清。

1.8 间接 ELISA 法检测抗体效价

用抗原包被液(50 mmol/L 碳酸盐包被液, pH 9.6) 稀释 FRG4 抗原至 10 mg/L, 加到酶标板中(200 μL/ 孔), 4℃过夜, 5% 脱脂奶粉封闭, 37℃ 2 h; 各孔加 100 μL FRG4 抗血清, 抗血清依次按 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, 同时设空白组和阴性对照组, 37℃孵育 1.5~2 h; 每孔加入羊抗兔 IgG 100 μL, 二抗按 1: 1 000 稀释, 37℃孵育 1.5 h, OPD 底物液 150 μL 显色, 酶标仪 490 nm 波长测其吸光度, 大于阴性对照 2 倍以上为阳性。

1.9 Western 印迹检测抗体

800 r/min 收集 HepG2 细胞, 加入 50~100 μL 悬浮去污剂, 冰浴 15 min, 4℃, 10 kr/min 离心 5 min, 收集上清蛋白, BCA 蛋白定量后, -80℃保存。解冻后, 加入 5×SDS 上样缓冲液, 以 1×SDS 上样缓冲液调节蛋白总量; 积层胶时电压用 60 V, 待到积层胶与分离胶交界位置时, 提高电压至 120 V; 90 mA, 5 h 电转移; TPST 液清洗 5 min×2 次; 5% 脱脂奶粉 4℃封闭过夜; 一抗室温 3 h; TBST 洗膜 1 h; 二抗室温 1 h; TBST 洗膜 1 h; AB 化学发光剂显色、压片、显影、定影; 图像分析。

1.10 免疫组织化学检测

将长有 HepG2 细胞的玻片, 用 PBS 液清洗一次, Fixative 中 5 min; Acetone 中 2 min(玻璃器皿); PBS 中 5 min; 3% H₂O₂ 室温孵育 5~10 min; 蒸馏水清洗, PBS 浸泡 5 min; 滴加试剂 1(蓝色), 室温孵育 10~15 min, 倾去; 滴加适当比例的一抗(FRG4 抗体), 37℃孵育 1~2 h 或 4℃过夜; PBS 清洗, 3 min×3 次; 滴加试剂 2(黄色), 室温或 37℃孵育 10~15 min; PBS 清洗 3 min×3 次; 滴加试剂 C(橙色), 室温或 37℃, 孵育 10~15 min; PBS 清洗, 3 min×3 次; 显色剂显色(DAB 或 ACE), 3~5 min; 水充分冲洗; 苏木素复染; 1% 盐酸乙醇分色 30 s; 水冲洗 1 h, 可延长过夜冲洗; 80% 乙醇 5 min, 95% 乙醇, 5 min, 二甲苯 15 min; 中性树胶封片。

2 结果

2.1 泡沫细胞相关基因 4 抗原表位的确定

参与比对的序列与人 FRG4 氨基端的第 50 位

以后氨基酸序列有高度同源性,特别是第 130~ 220 位氨基酸之间,说明在这一区域可能含有一重要的功能域,而 BSD 正好位于这一区域(为第 160~ 206 位氨基酸)。同时,用生物信息学方法预测其二级结构、抗原决定簇、功能结构域等,最后选取位于 189~ 202 位 PKLVKEEVFWRNY 作为抗原多肽片段。

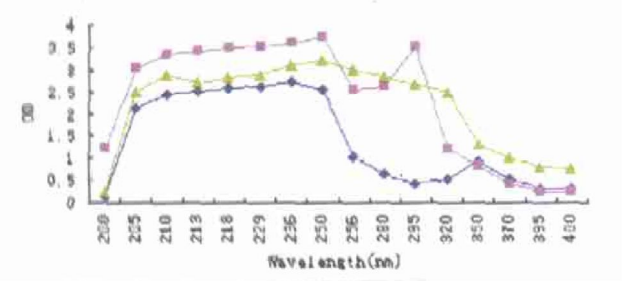


图 1. 泡沫细胞相关基因 4-KLH 偶联紫外扫描鉴定图 纵坐标为吸光度,横坐标为波长(nm),--为 KLH, - - 为 FRG4, - ▲- 为 FRG4-KLH。

Figure 1. UV spectrum of FRG4-KLH

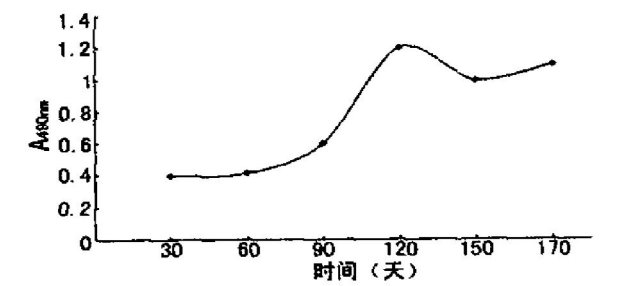


图 2. 泡沫细胞相关基因 4 抗体产生追踪示意图 横坐标为免疫后时间。

Figure 2. Tracing of FRG4 antibody come into being

2.2 偶联检测结果

偶联检测结果如图 1(Figure 1)所示,FRG4、KLH、FRG4-KLH 的紫外吸收均不相同。FRG4 在 236 nm 和 350 nm 处有最大吸收峰,KLH 在 250 nm 和 295 nm 处有最大吸收峰,而 FRG4-KLH 则于 250 nm 处有最大吸收峰,且于 250~ 320 nm 之间仍然保持很高的吸收峰,它保留了 KLH 于 250 nm 处的最大吸收峰,同时将 FRG4 350 nm 处的最大吸收峰前移至 320 nm 处,说明了它不但保留了 FRG4 的性质,也包含了 KLH 的性质,证明偶联是成功的。

2.3 抗体产生的追踪检测结果

对免疫后的新西兰兔进行追踪监测,这有利于了解抗体的产生情况,从而在最佳时期获得抗体。如图 2(Figure 2)所示,4 个月后,抗体产生曲线达到最高峰。

2.4 间接酶联免疫吸附法抗体效价测定结果

经第 4 次加强免疫后,取抗血清用间接酶联免

疫吸附法检测其效价,反复 3 次实验,结果如表 1 (Table 1)所示,P/N 之比均大于 2.0(其中 P 为待测血清在某一稀释倍数测得的 A 值,N 为对照血清在相应稀释倍数时测得的 A 值),尤以 1: 16 000 时为最高,1: 32 000 以后 A 值逐渐下降。对照组 A₄₉₀ 平均值= 0.607,0.607×2= 1.214。稀释倍数 1: 16 000 时的 A₄₉₀ 平均值为 1.817,为最高,且 A₄₉₀= 1.817> 1.214= A₄₉₀,故所制备的 FRG4 抗体最高效价为 1: 16 000。

表 1. 抗血清效价的检测(A₄₉₀)

稀释倍数	管数	平均效价	最大效价	对照管
1: 1 000	4	1.629	2.009	0.784
1: 2 000	4	1.565	2.117	0.684
1: 4 000	4	1.758	1.912	0.698
1: 8 000	4	1.601	1.810	0.631
1: 16 000	4	1.817	1.998	0.786
1: 32 000	4	1.627	1.919	0.549
1: 64 000	4	1.542	1.588	0.420
1: 132 000	4	1.382	1.488	0.309

2.5 Westerm blot 检测结果

为鉴定抗体,我们选用 HepG2 细胞蛋白,Western blot 结果如图 3(Figure 3)所示,可见 40 kDa 处有目的带。由于制备的是抗血清,所以背景有些模糊。

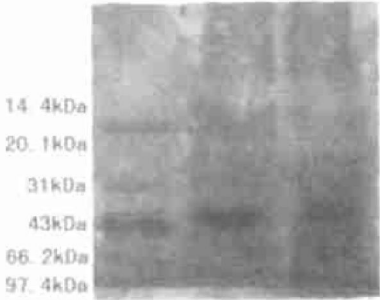


图 3. Western blot 鉴定抗体

Figure 3. Detect FRG4 antibody by Western blot

2.6 泡沫细胞相关基因 4 抗体在免疫组织化学检测中的应用

我们以不加一抗(兔抗人 FRG4 抗体)作为阴性对照(图 4A, Figure 4A),加正常兔血清作为阳性对照(图 4B, Figure 4B),加一抗兔抗人 FRG4 抗体作为实验组(图 4C, Figure 4C),应用免疫组织化学方法对 FRG4 多克隆抗体进行鉴定分析。结果可见阴性及

阳性对照组检测不到 FRG4 蛋白, 而实验组则可检测其表达, 主要是在细胞胞浆, 胞核处少量表达, 与

生物信息学分析结果一致。



图 4. 免疫组织化学检测泡沫细胞相关基因 4 蛋白在肝癌细胞株中的表达 (200 ×) A 为不加 FRG4 抗体的空白对照组, B 为加正常兔血清的阳性对照组, C 为实验组。

Figure 5. Expression of FRG4 protein in HepG2 cells by immunohistory (200 ×)

3 讨论

突触相关蛋白家族 (family of synapse-associated proteins, SAP) 目前包括 Dlg、SAP97/hDlg、SAP90/PSD-95、SAP102 和 PSD-93/chapsyn, 主要分布在兴奋性或抑制性突触的前膜或后膜。SAP 的功能与突触膜上的谷氨酸酯受体和钾离子通道的定位和功能有关^[3]。SAP 在神经系统中有重要的作用, 它能介导神经递质的释放、促进神经的生长、发育及修复, 也与大脑的记忆功能有密切的联系。SAP 基因的突变或表达改变, 可能引起一系列的神经精神疾病如 Parkinsonism 病、癫痫病甚至精神分裂症等^[4-6]。经 Blast 分析, FRG4 编码蛋白与人类突触相关蛋白 (SYAP1) 有高度同源性, 可能是 SAP 家族新成员。当前关于 SAP 功能研究主要集中于神经系统, 对其与 As 等心血管疾病的关系尚无文献报道。

制备一种效价高、特异性好的抗体, 是研究疾病相关基因的表达、定位等生物学功能非常重要的一步。相对其它如基因工程抗体技术而言, 固相多肽合成法合成抗原多肽具有以下特点: 首先是纯度高, 其次就是容易获取。另外, 人工合成片段的大小可以人为控制, 可有目的的研究蛋白质不同区域的生物学活性, 作为包被抗原又有特异性高, 假阳性低等特点; 反应迅速且高产率; 合成时间短, 一个 13 肽的合成只需 7 h 左右; 整个过程可完全自动化等。但是合成多肽必须有意义, 至少应为 B 细胞的一个表位或多个表位序列; 合成多肽分子量小, 抗原性弱, 需要与赖氨酸分支肽或其它蛋白质交联成免疫原是成功制备抗体的关键所在^[7]。因此, 在确定抗原表

位时, 我们在首都医科大学北京宣武医院多肽合成室盛树力教授指导下, 并参照国内外多个实验室的工作, 对 FRG4 编码蛋白进行了生物信息学分析, 从亲水性、抗原性、可及性、可塑性和二级结构等方面综合考虑, 根据蛋白质的亲水性、二级结构、偶联难度及实验难度等选取了位于 189~202 位的 PKLV-KEEVFWRNY 这 13 个氨基酸作为抗原多肽, 采用固相合成法合成。我们选用的交联剂是 BDB, 肽合成时没有加半胱氨酸, 因为 13 肽的序列中有一个酪氨酸(Y) 可与载体蛋白交联。制备抗血清经 western blot 检测可见 40 kDa 处有目的带, ELISA 检测, 其效价达到 1:16 000 以上, 特异性较高, 说明我们多肽的选取和抗体制备是成功的。免疫组织化学在人肝癌细胞株 HepG2 中检测到 FRG4 蛋白表达, 主要表达于胞浆中, 与生物信息学预测显示一致。

[参考文献]

- [1] Lippy P, Geng YJ, Aikawa M, Schoenbeck U, Mach F, Clinton SK, et al. Macrophages and atherosclerotic plaque stability. *Curr Opin Lipidol*, 1996, 7 (5): 330-335
- [2] 杨向东, 王抒, 唐蔚青, 易光辉, 何淑雅, 唐朝枢, 等. 人单核细胞泡沫化敏感候选基因的筛选. *中国动脉硬化杂志*, 2002, 10 (3): 195-198
- [3] Fujita A, Kurachi Y. Breakthroughs and views SAP family proteins. *Biochem Biophys Res Com*, 2000, 269 (1): 1-6
- [4] Ferreira A, Rapoport M. The synapsins: beyond the regulation of neurotransmitter release. *Cell Mol Life Sci*, 2002, 59 (4): 589-595
- [5] Steward O, Worley P. Local synthesis of proteins at synaptic sites on dendrites: role in synaptic plasticity and memory consolidation? *Neurobiol Learn Mem*, 2002, 78 (3): 508-527
- [6] Antar LN, Bassell GJ. Sunrise at the synapse: the FMRP mRNA shaping the synaptic interface. *Neuron*, 2003, 37 (4): 555-558
- [7] Plaue S, Muller S, Briand JP, Van Regenmortel MH. Recent advances in solid-phase synthesis and preparation of antibodies to synthetic peptides. *Bio-logicals*, 1990, 18 (3): 147-157

(此文编辑 胡必利, 文玉珊)