

• 论 著 •

## 重组人纤维连接蛋白羧基端细胞结合域单克隆抗体的制备与鉴定

黄盛东\*, 陆方林, 陈和忠, 龚德军, 徐志云

(第二军医大学长海医院胸心外科, 上海 200433)

**[摘要]** **目的:**制备人纤维连接蛋白(fibronectin, FN)羧基端细胞结合域的单克隆抗体,并以该抗体检测心脏瓣膜基质蛋白中FN蛋白的表达情况。**方法:**用RT-PCR方法获取人FN羧基端细胞结合域基因序列,通过pET32质粒表达获得TRX融合蛋白。并以纯化的融合蛋白作为抗原免疫BALB/c小鼠后,按常规方法制备成单克隆抗体,获得分泌抗FN单克隆抗体的杂交瘤细胞株。**结果:**蛋白电泳结果显示,所获TRX融合蛋白条带与理论计算值相符,免疫动物后获得2株分泌抗FN羧基端细胞结合域不同位点单克隆抗体的杂交瘤细胞株,抗体亚型为IgG2a,免疫组化显示该抗体能特异性地结合人心脏瓣膜基质中的FN。**结论:**成功制备了分泌抗FN单克隆抗体,为FN结构、功能和机制的研究提供了有效工具。

**[关键词]** 纤维连接蛋白;细胞结合域;抗体,单克隆

**[中图分类号]** R 318.11 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2004)12-1357-03

### Preparation and identification of monoclonal antibodies against carboxy-terminal cell-binding domain of human fibronectin

HUANG Sheng-Dong\*, LU Fang-Lin, CHEN He-Zhong, GONG De-Jun, XU Zhi-Yun (Department of Cardiothoracic Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

**[ABSTRACT]** **Objective:** To prepare the monoclonal antibodies against carboxy-terminal cell-binding domain of fibronectin (FN), and to use the product for detection of FN protein in heart valve matrix. **Methods:** The target DNA sequence of FN carboxy-terminal cell-binding domain was obtained by RT-PCR and the TRX fusion protein was expressed with pET32 system. The 6-week-old BALB/c female mice were immunized with recombinant fusion protein TRX-FN to prepare monoclonal antibodies and to obtain hybridoma secreting anti-FN monoclonal antibody. **Results:** Two lines of hybrids secreting monoclonal antibodies against different site of FN were established, both belonging to IgG2a subtypes. These monoclonal antibodies specifically demonstrated extracellular matrix of heart valves. **Conclusion:** The monoclonal antibodies against FN has been successfully established, which provide an useful tool in the studies of extracellular matrix of heart valve.

**[KEY WORDS]** fibronectin; cell-binding domain; antibodies, monoclonal

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25(12):1357-1359]

组织工程心脏瓣膜(tissue engineering heart valve, TEHV)是当前心脏瓣膜研究领域的热点,其目的是将自体细胞种植于可降解材料或生物脱细胞瓣膜支架上,形成具有自我更新能力的心脏瓣膜。纤维连接蛋白(fibronectin, FN)是细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的主要糖蛋白成分,其功能主要是将细胞牢固地粘着胶原、蛋白多糖等其他细胞外基质成分<sup>[1]</sup>。FN羧基端细胞结合域由607个氨基酸构成,主要功能为促进细胞黏附和迁移<sup>[2]</sup>。FN羧基端细胞结合域抗体的制备对FN的功能研究及TEHV脱细胞瓣膜支架基质蛋白保留效果评价都将起到积极的推动作用。

### 1 材料和方法

1.1 动物与细胞 BALB/c雌性小鼠,6周龄(上海斯莱克实验动物有限公司);SP2/0骨髓瘤细胞

(复旦大学遗传所提供)。

1.2 主要试剂与器材 针对人FN羧基端细胞结合域编码基因的PCR引物:P+: AAC CGG ATC CAT GGC TAT TCC TGC ACC AAC TGA CCT GAA GTT CA; P-: AAG GAA GCT TTT ACC CAG GTC TGC GGC AGT TGT CAC AGC(加拿大生工公司);pET32表达质粒(Novagen公司);完全及不完全弗氏佐剂、RPMI 1640培养基、8-氮鸟嘌呤、次黄嘌呤、氨甲蝶呤、胸腺嘧啶等(Sigma公司);胎牛血清及新生牛血清(Gibco公司);聚乙二醇4000(Merck公司);兔抗人FN多克隆抗体(Santa Cruz公司);人FN(HTI公司);辣根过氧化物酶标记羊抗鼠IgG(Calbiochem公司);MABTEST试

**[基金项目]** 国家自然科学基金(30371418)。

**[作者简介]** 黄盛东(1965-),男(汉族),博士,副研究员,硕士生导师。

\*Corresponding author. E-mail: huangsd@public6.sta.net.cn

剂盒(晶美公司);酶联检测仪(BIO-RAD 公司)。

1.3 目的基因获取 采用逆转录 PCR 方法由正常人脾组织 RNA 中获取目的基因,PCR 条件为:94℃变性 2 min,94℃10 s,62℃15 s,72℃2 min,共 30 个循环,最后 72℃延伸 6 min。

1.4 抗原制备 将上述目的基因片段插入 pET32 表达质粒,经电穿孔导入大肠杆菌 B21(DE3)中。通过 IPTG 诱导表达,B-PER™抽提细菌蛋白后通过镍亲和柱进行蛋白纯化后得到重组蛋白。

1.5 杂交瘤细胞株的建立 抗原蛋白免疫 BALB/c 雌性小鼠、小鼠脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞融合、单克隆瘤株筛选以及抗体效价测定均采用冷泉港实验室单克隆抗体制备方法进行<sup>[3]</sup>。Ig 类型及亚类鉴定以 MABTEST 试剂盒操作说明书进行。

1.6 抗 FN 抗体分泌杂交瘤株的筛选 以 FN-TRX 融合蛋白和 TRX 蛋白(质粒 pET32 表达产物)分别包被 96 孔板,ELISA 法初步筛选 FN 抗体分泌杂交瘤株,进而通过有限稀释法获得抗 FN 抗体分泌杂交瘤单克隆细胞株。

1.7 FN 单克隆抗体特异性鉴定 以上述抗 FN 抗体分泌杂交瘤株细胞的培养上清对表达的重组蛋白进行 Western 印迹检测。同时以该上清分别对人 FN 蛋白及血清白蛋白进行 ELISA 检测,明确其与天然 FN 蛋白结合的特异性。

1.8 脱细胞瓣 FN 蛋白检测 取人的脱细胞瓣膜组织以 4%多聚甲醛固定,石蜡包埋,连续切片,厚 5 μm,组织切片常规脱蜡至水,微波中功率修复。滴加上述抗 FN 抗体分泌杂交瘤株细胞的培养上清 50 μl,阳性对照组加抗 FN 多抗,阴性对照组加骨髓瘤细胞培养上清,37℃过夜。PBS 洗涤后实验组和阴性对照组加辣根过氧化物酶标记羊抗鼠 IgG,阳性对照组加辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG,室温作用 30 min,PBS 洗涤后,DAB 显色,苏木精复染,梯度乙醇脱水封片。

## 2 结果

2.1 目的基因获取 PCR 产物电泳结果显示在目的基因大小附近有特异性条带,回收克隆至 pET32 表达质粒后,经酶切和测序鉴定,结果与 GenBank 报道的 FN 相应基因序列完全一致。

2.2 目的蛋白获取 蛋白电泳结果显示 IPTG 诱导后在相对分子量 70 000 处出现特异性蛋白条带,表达量占细菌总蛋白 30%左右,通过镍亲和柱进行蛋白纯化后得到的重组蛋白纯度大于 90%(图 1)。

2.3 抗体效价 SP2/0 骨髓瘤细胞培养上清、腹水

及血清作阴性对照,以  $D$  值  $\geq$  阴性对照平均  $D$  值  $\pm 2s$  者为阳性标准,出现阳性的最高稀释倍数为该腹水或血清的效价。杂交瘤细胞的培养上清抗体效价为  $1:10^4$  左右;腹水抗体效价为  $1:10^7 \sim 1:10^8$ 。

2.4 单克隆抗体 Ig 类型 经 MABTEST 试剂盒测定,杂交瘤细胞培养上清及腹水中的抗体均为 IgG2a 类。

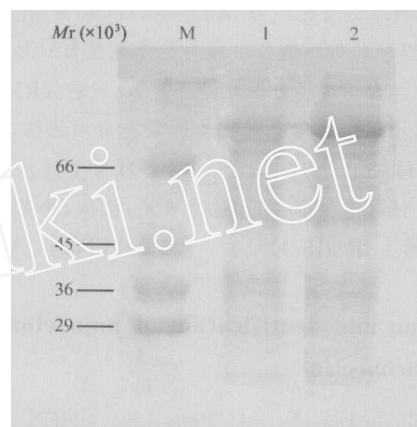


图 1 重组纤维连接蛋白羧基端细胞结合域蛋白电泳结果

Fig 1 SDS-PAGE of recombinant carboxy-terminal cell-binding domain of fibronectin

M:Protein marker;1:Total cell protein of uninduced sample;  
2:Total cell protein of induced sample

2.5 单克隆抗体的特异性 Western 印迹结果显示,目的蛋白在相对分子量 70 000 处出现特异性显色条带,而 TRX 未见相应的表达条带(图 2)。ELISA 检测结果显示,所获目的抗体能特异性结合天然的人 FN,而与人白蛋白不结合。

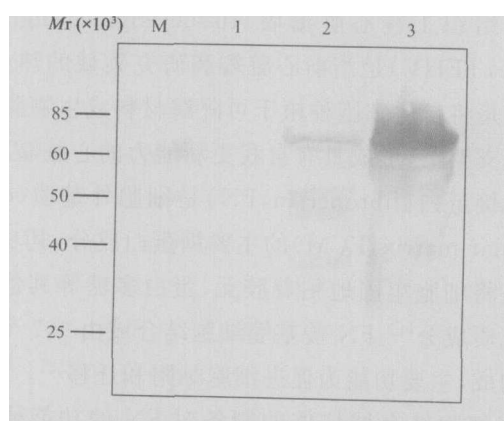


图 2 重组纤维连接蛋白羧基端细胞结合域蛋白 Western 印迹结果

Fig 2 Western blot of recombinant carboxy-terminal cell-binding domain of fibronectin

M:Protein marker;1:Total cell protein of *E. coli*;  
2:Total cell protein of uninduced sample;  
3:Total cell protein of induced sample

2.6 脱细胞心脏瓣膜 FN 单克隆抗体免疫组化检测 结果显示 FN 单克隆抗体染色呈浅棕色,阳性对照组染色呈棕色,均呈弥漫状分布(图 3A,3B),

阴性对照组检测结果为阴性(图 3C),表明所获抗体能与猪脱细胞瓣膜组织上的生理性 FN 特异性结合。

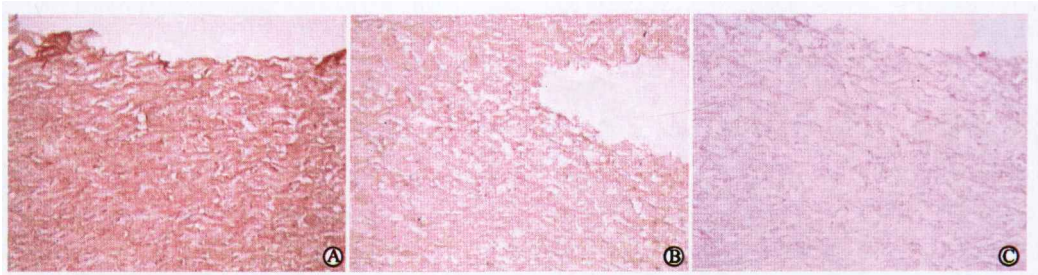


图3 猪脱细胞心脏瓣膜免疫组化检测结果

Fig 3 Immunohistochemistry of porcine acellular heart valve( $\times 100$ )

A: Strongly positive staining of polyclonal FN-Ab; B: Positive staining of monoclonal FN-Ab; C: Negative control

### 3 讨论

TEHV 是按照组织工程学原理,构建具有心脏瓣膜形态的支架并种植自体活细胞。自体细胞在支架上生长并产生细胞外基质,逐渐对原来的支架进行改建,最终形成完全由自体细胞和基质所构成的活性瓣膜组织<sup>[4]</sup>。用于构建 TEHV 的支架材料主要分为生物可降解的高分子聚合物支架和去细胞天然瓣膜支架。但前者在生物相容性、柔韧性、降解吸收速度控制等多个方面尚存在许多不足;而同种心脏瓣膜不仅来源缺乏,还受到伦理道德等方面的限制。综合分析各个方面的影响因素来看,猪瓣膜的解剖学形态、组织结构与人体心脏瓣膜相近。去细胞猪瓣膜支架去除了细胞成分,保留了胶原蛋白和弹力蛋白等重要的支架结构,免疫原性较弱且来源充足,制作简便,是较为理想的支架材料。

尽管大多数专家认为瓣膜的主要免疫原性来自于细胞,去细胞猪瓣在动物实验及部分临床应用取得了较为理想的结果<sup>[5,6]</sup>。但近来有临床研究发现,去细胞猪瓣仍存在一定的免疫原性,尤其当受者为儿童时<sup>[7]</sup>。因此,对瓣膜基质各种成分的免疫原性研究将成为下一阶段去细胞猪瓣支架研究的重要方向。细胞外基质是由多种成分构成的高度有序的网络结构,主要包括胶原、蛋白多糖及糖蛋白 3 类大分子物质。其中 I、II、III 型胶原呈纤维束状分布,IV、V、VI 型胶原呈纤维网状分布;蛋白多糖包括硫酸肝素、硫酸软骨素、透明质酸等。而糖蛋白主要起将细胞粘着于细胞外基质的作用,主要包括 FN 和 LN 等。现有的瓣膜去细胞方法评价指标往往停留于力学功能测定及电镜等形态学观察<sup>[8]</sup>,而不同的去细胞方法对瓣膜基质成分的影响,及其对细胞和

瓣膜间黏附力是否有影响有待进一步的研究探讨。

总之,本研究成功地构建了人 FN 羧基端细胞结合域单克隆抗体,不仅为 FN 黏附功能研究提供了有力的工具,而且有望为瓣膜去细胞方法研究提供一种新的检测方法。

### 参考文献

- [1] Monaghan E, Gueorguiev V, Wilkins-Port C, et al. The receptor for urokinase-type plasminogen activator regulates fibronectin matrix assembly in human skin fibroblasts[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(2): 1400-1407.
- [2] Beauvais-Jouneau A, Delouvee A, Craig SE, et al. Direct role of the carboxy-terminal cell-binding domain of fibronectin in neural crest cell motility[J]. *Exp Cell Res*, 1997, 233(1): 1-10.
- [3] Harlow E, David L. *Antibodies: a laboratory manual*[M]. New York: Cold Spring Harbor Lab Press, 1988. 139-244.
- [4] Rabkin E, Schoen FJ. Cardiovascular tissue engineering[J]. *Cardiovasc Pathol*, 2002, 11(6): 305-317.
- [5] Goldstein S, Clarke DR, Walsh SP, et al. Transpecies heart valve transplant: advanced studies of a bioengineered xenograft[J]. *Ann Thorac Surg*, 2000, 70(6): 1962-1969.
- [6] Sievers HH, Stierle U, Schmidtke C, et al. Decellularized pulmonary homograft (SynerGraft) for reconstruction of the right ventricular outflow tract: first clinical experience[J]. *Z Kardiol*, 2003, 92(1): 53-59.
- [7] Simon P, Kasimir MT, Seebacher G, et al. Early failure of the tissue engineered porcine heart valve SYNERGRAFT in pediatric patients[J]. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2003, 23(6): 1002-1006.
- [8] 宋智刚, 张宝仁, 朱家麟, 等. 不同方法处理的自体心包瓣生物力学特性的实验研究[J]. *第二军医大学学报*, 1997, 18(增刊): 69-72.

[收稿日期] 2004-07-30

[修回日期] 2004-11-18

[本文编辑] 曹 静