

人血管生成素相关蛋白 2 单克隆抗体的制备与鉴定

孟舒¹, 曹江¹, 黄盛东², 秦永文^{1*}

(1. 第二军医大学长海医院心血管内科, 上海 200433; 2. 长海医院胸心外科)

[摘要] **目的:**制备人血管生成素相关蛋白 2(angiotensin-related protein 2, ARP2)的单克隆抗体。**方法:**用 RT-PCR 方法获取人脾脏组织 ARP2 基因序列, 构建 pET32a-ARP2, 经电穿孔导入大肠杆菌诱导表达, 获得可溶蛋白样品和包涵体蛋白样品, 回收、纯化蛋白, 免疫 BALB/c 小鼠, 采用杂交瘤技术建立产生 ARP2 抗杂交瘤细胞株, Western 印迹鉴定。**结果:**获得融合蛋白的相对分子质量为 570 000, 与理论计算值相符, 纯化后蛋白浓度 >90%, 杂交瘤细胞培养上清抗体效价为 1:10⁴, 腹水抗体效价为 1:10⁷~1:10⁸, 抗体亚型为 IgG2a 类, Western 印迹示目的蛋白相对分子质量为 570 000, 免疫组化显示该抗体能特异结合人 ARP2。**结论:**制备的抗 ARP2 单克隆抗体可用于 ARP2 蛋白鉴定。

[关键词] 血管生成素相关蛋白 2; 抗体, 单克隆; 杂交瘤技术

[中图分类号] R 541 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)07-0781-03

Preparation and identification of monoclonal antibody against angiotensin-related protein 2

MENG Shu¹, CAO Jiang¹, HUANG Sheng-dong², QIN Yong-wen^{1*} (1. Department of Cardiology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Cardiothoracic Surgery, Changhai Hospital)

[ABSTRACT] **Objective:** To prepare a monoclonal antibody against human angiotensin-related protein 2 (ARP2). **Methods:** Human spleen ARP2 gene was obtained by RT-PCR. A pET32a-ARP2 plasmid was constructed and was incorporated into *E. coli*. The products were purified and were used to immunize 6-week-old BALB/c female mice. Hybridoma secreting anti-ARP2 monoclonal antibody was obtained by standard procedure. Mass production was carried out after specificity identification with Western blotting. **Results:** The fusion protein obtained by pET32a system had a relative molecular weight of about 570 000, which was in accordance with the theoretical value. The purity of the protein was more than 90% after purification. The antibody titer was 1:10⁴ in the hybridoma culture supernatant and 1:10⁷-10⁸ in the ascites. The IgG2a type antibody had a relative molecular weight of about 570 000 by Western blot analysis. Immunohistochemistry method showed that the antibody bond with human ARP2. **Conclusion:** The prepared anti-human ARP2 monoclonal antibody in this study can be used for identification of ARP2 protein.

[KEY WORDS] angiotensin-related protein 2; antibodies, monoclonal; hybridomas

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(7):781-783]

1999 年 Kim 等^[1]成功克隆了血管生成素相关蛋白 2 (angiotensin-related protein 2, ARP2) 基因, 研究发现, ARP2 结构、功能与血管生成素 1 (angiotensin 1, Ang 1) 类似, 但其体外促内皮细胞分化作用并不通过 Ang 1 受体 Tie 2。Edelberg 等^[2]发现血小板衍生生长因子 (platelet-derived growth factor, PDGF) 是老年大鼠体内的主要促血管生成因子, 本课题组预实验发现老年大鼠体内 ARP2 与 PDGF 的表达量均下降, 在幼年及成年鼠体内的表达量均增加, 由此推测 ARP2 将在老年缺血心肌中发挥重要的促血管新生作用。由于国内外尚无商品化的人 ARP2 单克隆抗体 (monoclonal antibody, mAb) 出售, 因此自行制备抗人 ARP2 mAb 是实验得以顺利进行的保障。本研究拟构建携带 ARP2 基因的原核表达载体, 在大肠杆菌中诱导表达重组 ARP2 蛋白, 纯化后免疫动物, 应用杂交瘤技术制备抗人 ARP2 mAb, 旨在为 ARP2 的功能和机制研究提供一种重要工具。

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 (长海医院胸心外科实验室提供)。

1.2 主要试剂与器材 针对人 ARP2 基因的 PCR 引物: P+; CAG AAT TCA TGA GGC CAC TGT GCG TGA C, P-; GAA AGC TTT TAG TGG AAG GTG TTG GGG T (加拿大生工公司); pET32 表达质粒 (Nogagen 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); 辣根过氧化物酶标记羊抗鼠 IgG (Calbiochem 公司); MABTEST 试剂盒 (晶美公司); 酶联检测仪 (BIO-RAD 公司); 缓冲液 1-4、抗体

[基金项目] 国家自然科学基金 (30171029)。Supported by National Natural Science Foundation of China (30171029)。

[作者简介] 孟舒, 博士, 主治医师, 现在上海交通大学附属新华医院心内科, 上海 200092。

* Corresponding author. E-mail: YWQIN@citiz.net

亲和凝胶自行配置。

1.3 目的基因获取^[3] 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 1 min, 58℃ 45 s,72℃ 45 s,共 30 个循环,最后 72℃ 的延伸 8 min。

1.4 抗原制备 将上述目的基因片段经 *EcoR* I / *Hind* III 双酶切,插入 pET32 表达质粒,经电穿孔导入大肠杆菌 B21 (DE3)中。阳性克隆通过 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等均采用冷泉港实验室单克隆抗体制备方法进行^[4]。Ig 类型及亚型鉴定以 MABTEST 试剂盒操作说明书进行。

1.6 抗 ARP2 抗体分泌杂交瘤株的筛选 以 ARP2-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 ARP2 抗体分泌杂交瘤株,进而通过有限稀释法获得抗 ARP2 抗体分泌杂交瘤单克隆细胞株。

1.7 ARP2 单克隆抗体特异性鉴定 以上述抗 ARP2 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。

1.8 人心肌免疫组织化学检测 取适量人心脏组织以 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。实验组滴加上述抗 ARP2 抗体分泌杂交瘤细胞的培养上清 50 μl 作为一抗,阴性对照组不加一抗,阳性对照组加等量的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,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 ARP2 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 诱导后在相对分子质量 570 000 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 $D \geq$ 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。

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质量 570 000 处出现特异性显色条带,而对照

组未见相应的表达条带(图 2)。

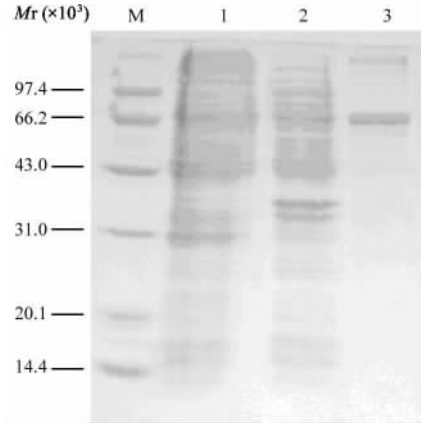


图 1 诱导纯化后的 pET32a-ARP2 融合蛋白电泳结果
Fig 1 Electrophoresis result of pET32a-ARP2 infusion protein after induction and purification

1: Before induction; 2: After induction; 3: Obvious band after purification

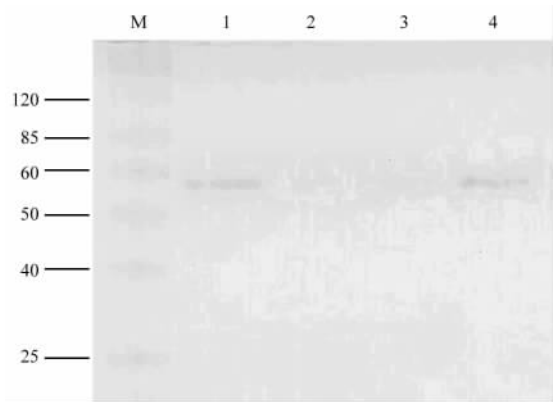


图 2 ARP2 单克隆抗体特异性鉴定 Western 印迹检测结果
Fig 2 Results of Western blot of ARP2 monoclonal antibody

M: Marker; 1: Group Ad. ARP2; 2: Group Ad. Null; 3: Group PBS; 4: Standard ARP2

2.6 抗人 ARP2 抗体在免疫组化检测中的应用 结果显示实验组可以检测到 ARP2 蛋白(图 3A); 阴性和阳性对照组检测不到 ARP2 蛋白(图 3B,3C)。

3 讨论

本研究采用 ANTHEPROT 5.0 对 ARP2 全长进行了序列分析和预测,并结合 Blast 同源性分析,选定了 ARP2 全长氨基酸序列作为抗原,本研究证明,该序列有较强的免疫原性。

本研究中设计的 ARP2 引物,用于扩增 ARP2 cDNA 的全长编码序列,在 5' 端引物序列中引入了 *EcoR* I 位点,在 3' 端引物序列中引入了 *Hind* III 位点,以便于将 ARP2 cDNA 融合至 pET32a 中。pET32 系列是用于克隆和高水平表达

融合了 10999Trx-Ta_qTM 硫氧还蛋白^[5], 其克隆位点包含 His. Ta_q 和 S. Ta_qTM 序列, 这两个序列均有助于融合蛋白识

别和纯化作用。

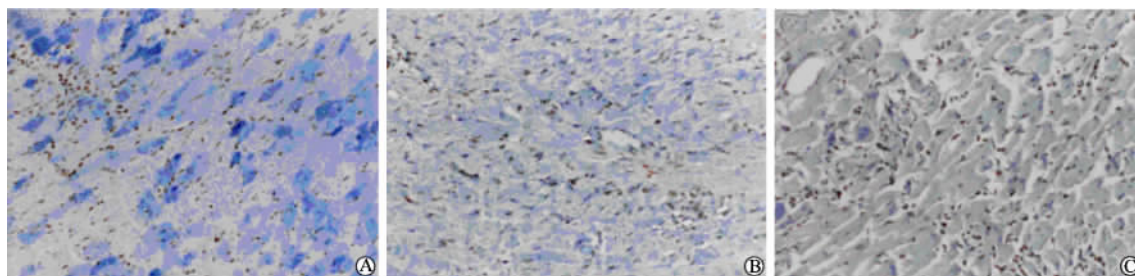


图3 人心脏 ARP2 免疫组化检测结果

Fig 3 Immunohistochemical detection of ARP2 in human cardiac tissues(×200)

A: Positive result of ARP2; B: Negative control group; C: Positive control group

在抗原选择方面, 能够获得高效表达的 pET 融合蛋白体系是十分重要的。然而, pET 融合蛋白通常会同时以包涵体和可溶性两种形式表达, 不同的融合蛋白的诱导条件差异很大。本研究经过摸索, 对不同 IPTG 浓度、温度、诱导时间进行优化, 发现能够使 ARP2 蛋白以最大程度可溶性形式表达的条件是: 100 μmol/L IPTG, 30℃ 摇床 200 r/min×4 h, 此条件下 SDS-PAGE 扫描发现, pET32a-ARP2 融合蛋白至 *E. coli* BL21(DE3) 菌株中的表达量占细菌总蛋白 30% 以上, 通过镍亲和和柱进行蛋白纯化后得到的重组蛋白浓度大于 90%, 纯化后样品的相对分子质量大小为 570 000, 与理论值基本一致。

亲和层析技术是生物化学中常用的检测和纯化蛋白的方法, 其关键在于选择能识别并特异性结合目的蛋白的配体, 所选择的配体对目的蛋白应具有较强的亲和力。一般来说, 配体对目的蛋白亲和力越高, 在亲和层析中的应用价值就越大, 但亲和力太高时, 洗脱条件较为剧烈, 容易导致欲纯化蛋白的变性。在 ARP2 蛋白纯化时以下几个方面要加以注意: (1) 用蛋白质核酸检测仪时, 咪唑会产生基线上移, 尤其在用高浓度的咪唑洗脱时, 这种现象会更明显, 不要与蛋白峰混淆; (2) 破菌后的沉淀用缓冲液溶解时, 如有不全溶解现象, 属正常; (3) 如果用尿素溶解后纯化未见目的蛋白, 可以改用 6 mol/L 的盐酸胍, 因为盐酸胍的助溶效果有时会更好; (4) 所有的溶液中不能含有金属螯合离子(如 EDTA), 以及其他的强还原剂(如 DTT)^[4]。

根据文献^[6]报道, 制备单克隆抗体可直接使用载体的融合蛋白作为抗原免疫或可纯化的目的蛋白。由于本研究通过基因工程方法得到的 ARP2 蛋白的量相对较少, 故选择 BALB/c 雌性小鼠为免疫动物^[7]。通过杂交瘤技术经间接 ELISA 筛选出 3 株分泌单抗的杂交瘤细胞。应用 Western 印迹对获得的单抗进行检测, 显示 3 株抗体均能与 ARP2 及 pET32a-ARP2 结合, 而与 pET 及菌体蛋白无反应, 而且特异性地检测到原核表达 ARP2(pET32a-ARP2), 提示单克隆抗

体具有很高的特异性。本实验结果首次证明, 用 pET32a-ARP2 融合蛋白免疫 BALB/c 小鼠可获得效价较高的抗 ARP2 单克隆抗体。

抗 ARP2 单克隆抗体的成功研制为 ARP2 的检测及功能研究提供了一种重要工具。由于单克隆抗体针对单一抗原决定簇, 可避免与其他抗原产生交叉反应, 因此用单克隆抗体所建立的检测方法具有特异、灵敏、准确的优点, 为后续的研究奠定了基础。

[参考文献]

- [1] Kim I, Moon So, Koh KV, et al. Molecular cloning, expression, and characterization of angiopoietin-related protein; angiopoietin-related protein induces endothelial cell sprouting [J]. *Biol Chem*, 1999, 274: 26523-26528.
- [2] Edelberg JM, Lee SH, Kaur M, et al. Platelet-derived growth-AB limits the extent of myocardial infarction in a rat model; feasibility of restoring impaired angiogenic capacity in the aging heart [J]. *Circulation*, 2002, 105: 608-613.
- [3] 孟舒, 黄盛东, 秦永文, 等. 体外促进血管内皮细胞分化的实验观察: 人血管生成素相关蛋白 2 全长编码基因克隆的研究 [J]. *中国临床康复*, 2005, 9: 146-147.
- [4] Harlow E, David L. *Antibodies: a laboratory manual* [M]. New York: Cold Spring Harbor Lab Press, 1988: 139-244.
- [5] LaVallie ER, DiBlasio EA, Kovacic S, et al. A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm [J]. *Biotechnology(NY)*, 1993, 11: 187-193.
- [6] 杜敏, 朱美君, 张曼天, 等. 钙蛋白酶抑制蛋白功能结构域 IV 在大肠杆菌中的表达、纯化及其抗血清的制备 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2000, 16: 23-27.
- [7] 沈关心, 周汝麟 主编. *现代免疫学实验技术* [M]. 武汉: 湖北科学技术出版社, 2001: 23-94.

[收稿日期] 2005-12-19

[修回日期] 2006-04-24

[本文编辑] 曹静