

利用合成多肽制备兔多克隆抗体

谭凤彪^{1 2} 高家林^{2 4} 陆晓华³ 章 尧^{1 2}

(1.皖南医学院 生物化学教研室,安徽 芜湖 241002; 2.皖南医学院 活性生物大分子研究安徽省重点实验室,安徽 芜湖 241002; 3.皖南医学院 机能学实验中心,安徽 芜湖 241002; 4.皖南医学院第一附属医院 弋矶山医院 内分泌科,安徽 芜湖 241001)

【摘要】目的: 利用人工合成多肽制备载脂蛋白 M(apolipoprotein M, ApoM) 兔多克隆抗体。方法: 分析并选取一段特异性的 ApoM 氨基酸序列用于合成多肽, 并耦联钥孔血蓝蛋白(KLH) ,用来免疫雄性的新西兰大白兔, 经过多次加强免疫后用收集的兔抗血清制备多克隆抗体, 并进行 Western Blot 检测。结果: 利用人工合成并纯化的多肽, 经多次免疫后获得所需的多克隆抗体。结论: 成功制备了兔 ApoM 多克隆抗体, 为后续的实验研究 ApoM 的功能提供实验基础。

【关键词】载脂蛋白 M; 多肽; 多克隆抗体

【中图分类号】R 392.1 **【文献标识码】**A

【DOI】10.3969/j.issn.1002-0217.2016.05.004

Using synthetic peptide to prepare the rabbit anti-ApoM polyclonal antibody

TAN Fengbiao, GAO Jialin, LU Xiaohua, ZHANG Yao

Department of Biochemistry, Wannan Medical College, Wuhu 241002, China

【Abstract】Objective: To prepare rabbit anti-apolipoprotein M (ApoM) polyclonal antibody using synthetic peptides. **Methods:** Specific amino acid sequences of ApoM was initially synthesized and selected after analysis. Keyhole limpet hemocyanin (KLH) was used as carries in the conjugation of the peptides for antibody production. Then rabbit anti-ApoM polyclonal antibody was prepared using the serum obtained from male New Zealand white rabbits undergone repeatedly boosted immunization and determined with Western blot. **Results:** The rabbit anti-ApoM polyclonal antibody was successfully prepared with artificially recombined and purified polypeptides. **Conclusion:** The rabbit anti-ApoM polyclonal antibody may lay a foundation for following experimental study of the ApoM expression.

【Key words】 apolipoprotein M; polypeptide; polyclonal antibody

基金项目: 芜湖市科技局产学研项目(2013cxy04); 安徽省自然科学基金项目(1508085NH149)

收稿日期: 2016-04-10

作者简介: 谭凤彪(1984-) ,男, 2014 级硕士研究生, (电话) 13955375794, (电子信箱) 253791056@qq.com;

章 尧,男,教授,博士,硕士生导师, (电子信箱) zhangyao@ahedu.gov.cn, 通信作者。

[5] 张玉青,金芃芃,郭益民,等.高盐饮食对大鼠离体胸主动脉环收缩功能的影响及其机制[J].温州医学院学报,2007,37(6): 537-539.

[6] 王文靖,潘毅,杨涛.两肾一夹型高血压大鼠模型的改良及评价[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(1): 203-205.

[7] 张玉婕,朱男,张效林,等.高盐激活氧化应激-p38 丝裂原活化蛋白激酶肌动蛋白骨架重组诱导血管内皮细胞损伤[J].中华高血压杂志,2014,22(8): 742-748.

[8] 金海燕,钟久昌,宋蓓,等.替米沙坦对高血压大鼠血管 ACE2 表达及氧化应激水平的影响[J].中国药理学通报,2012,28(1): 54-58.

[9] 闫莉,谭晓秋,陈文轩,等.自发性高血压大鼠血管对 α1 肾上腺素受体自身抗体的血管收缩作用敏感性增强[J].中国科学,2014,44(6): 562-570.

[10] 刘时彦,黄为民,张润慧,等.盐敏感性高血压大鼠炎症因子和内皮损伤因子的表达[J].中国动脉硬化杂志,2015,23(8): 779-783.

[11] 赵锦燕,林久茂,庄群川,等.芎芍胶囊对人脐静脉内皮细胞 NO、iNOS 和 eNOS 表达的影响[J].癌变·畸变·突变,2009,21(6): 460-462,481.

[12] HONG-JYE HONG, SHIH-HURNG LOH, MAO-HSIUNG YEN. Suppression of the development of hypertension by the inhibitor of inducible nitric oxide synthase [J]. British Journal of Pharmacology, 2000, 131(3): 631-637.

[13] OLIVEIRA-PAULA GH, LACCHINI R, COELI-LACCHINI FB, et al. Inducible nitric oxide synthase haplotype associated with hypertension and responsiveness to antihypertensive drug therapy [J]. Gene, 2013, 515(2): 391-395.

载脂蛋白 M (apolipoprotein M ,ApoM) 是由徐宁等^[1]人在研究富含甘油三酯脂蛋白(triglyceride-rich lipoprotein ,TGRLP) 时发现的一种不同于以往的脂蛋白转运蛋白类蛋白,优势表达于 HDL 中,少量表达于 TGRLP 及 LDL 中。人类 ApoM 基因定位于 6 号染色体短臂(6p21.3) ,邻接 MHC III 区域,含有 6 个外显子和 5 个内含子,系单拷贝基因。人类 ApoM cDNA (734 bp) 编码一种含 188 个氨基酸残基的蛋白质,相对分子量约 26 kU,结构与 Lipocalin 家族相关联。多组织表达列阵研究显示^[2],ApoM 表达具有高度的组织特异性,人 ApoM 特异表达于肝脏和肾脏,在胚胎、胚肾、胃、骨骼肌细胞、小肠、心脏、大脑、脾脏和睾丸中也有低表达,在肌肉组织、十二指肠和卵巢中无表达,具有较高的组织特异性,这提示 ApoM 的生理功能可能与肝脏和肾脏的功能密切相关^[3]。ApoM 在 HDL 中含 5% ,是 HDL 的主要成分之一,成人血浆 ApoM 含量约为 0.63~1.13 mmol/L。ApoM 主要与 HDL 相互作用,促进 HDL 颗粒的成熟并调节其代谢^[1]。目前的研究发现 ApoM 具有抗动脉粥样硬化作用,与冠心病和糖尿病的发生密切相关,已成为研究的热点^[4-6]。细胞核因子-1 α (HNF-1 α) 可提高 ApoM 的表达水平,对心血管具有保护作用,是通过促进胆固醇代谢关键酶的表达并抑制胆固醇代谢相关抑制因子的生成进而促进胆固醇的转化来实现的。新的研究发现,ApoM 通过对血管内皮细胞的 1-磷酸鞘氨醇(sphingosine 1-phosphate ,S1P) 受体提供 S1P 充当 HDL 的血管保护成分^[7-8]。在研究蛋白质的功能和诊断检测方面,抗体是一种重要的研究工具。为进一步探明 ApoM 的功能,我们设计并合成人工多肽,通过免疫新西兰大白兔,制备 ApoM 兔多克隆抗体,为后续研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料 抗原多肽由上海生工全自动合成仪合成,完全福氏佐剂(complete Freund's adjuvant ,CFA)、不完全福氏佐剂(incomplete Freund's adjuvant ,IFA)、丙烯酰胺,购自 Sigma 公司;放射免疫沉淀技术(radioimmunoprecipitation assay ,RIPA) 裂解液、二辛可宁酸(bicinchoninic acid ,BCA) 蛋白浓度测定试剂盒、loading buffer,辣根过氧化物酶(HRP) 标记的羊抗兔 IgG(H+L) 和羊抗鼠 IgG(H+L) 抗体均购自碧云天公司,ApoM 单克隆抗体购自 CST (Cell Signaling Technology) 公司,Ladder (10-170 kU) 购自 Pierce 公司,聚偏二氟乙烯(polycylnidene fluoride ,PVDF) 膜购自 Bio-RAD 公司,化学发光试

剂盒购自赛默飞公司,其他试剂均为国产分析纯。雄性健康 8 周龄新西兰大白兔 2 只(每只 2.5 kg 左右) 购自南京大学-模式动物研究所,动物实验得到皖南医学院弋矶山医院动物伦理委员会的批准。

1.2 方法

1.2.1 ApoM 特征性抗原肽段的合成 根据 ApoM 基因编码的氨基酸序列,利用在线蛋白分析软件对 ApoM 蛋白信号肽、亲水性和抗原性进行分析,确定抗原肽段氨基酸序列,由上海生工合成并偶联 KLH,合成后的总量为 10 mg,置于 4℃ 保存备用。

1.2.2 合成多肽的溶解和分装 多肽的溶解性很大程度上取决于多肽的极性。酸性蛋白溶解于碱性溶液,而碱性蛋白可溶解于酸性溶液,含有大量不带电荷的极性氨基酸残基或疏水性氨基酸的疏水性多肽和中性多肽可采用少量有机溶剂如二甲基亚砜(DMSO) 溶解,然后再用 PBS 稀释。但是含有甲硫氨酸或半胱氨酸的多肽不能用 DMSO 溶解,因为 DMSO 可能造成侧链氧化。耦联了 KLH 的人工合成多肽颗粒,在溶解前先加入 DMSO 到多肽粉末中,方法是 1 mg 多肽溶于 200~300 μ L 的 DMSO,然后加 PBS 补足至 1 mL,这样所得多肽溶液的浓度是 1 mg/mL,便于后续实验取用。超声处理有助于打碎颗粒并增加溶解度,但应注意降温,避免超声处理引起溶液发热和多肽降解。溶解后的多肽分装到冻存管中置于-20℃ 冰箱保存备用,避免反复冻融。

1.2.3 抗原与佐剂的乳化 取溶解后的多肽抗原 1mL,加入等体积的佐剂,用 2.5 mL 注射器抽取液体后,注射器留存少量空气,通过三通头连接另一注射器,然后相互推动注射器的活塞,使抗原与佐剂相互混合^[9]。当抗原和佐剂充分乳化后,滴一滴乳化后的液体在水面上,如果液体呈球形而不扩散,表示抗原与佐剂乳化完全。

1.2.4 免疫兔子制备 新西兰大白兔(分别标记兔 1、兔 2) 实验前常规饲养 1 周,采用背部脊柱旁多点皮下注射的方法免疫。首次免疫采用 CFA 乳化抗原,兔 1 和兔 2 分别注射抗原乳化液 800 μ L(400 μ g) 和 400 μ L(200 μ g) 作为基础免疫,分 4~8 点作皮丘注射。首次免疫前先于注射点备皮并用 75% 的乙醇消毒,预防感染。注射前排净注射器内空气后捏起兔子皮肤,按针头与皮肤呈 15°角进针,进针深度以 1~2 cm 为宜,不宜刺入肌肉。首次免疫后每 2 周加强免疫 1 次,加强免疫采用 IFA 乳化抗原,相较于首次免疫,加强免疫剂量减半。第 3 次免疫后通过耳缘静脉采血 1 mL,获得抗 ApoM 血清,做 Western Blot 检测。如果检测到抗体后,于再次免疫

1 周后取血。

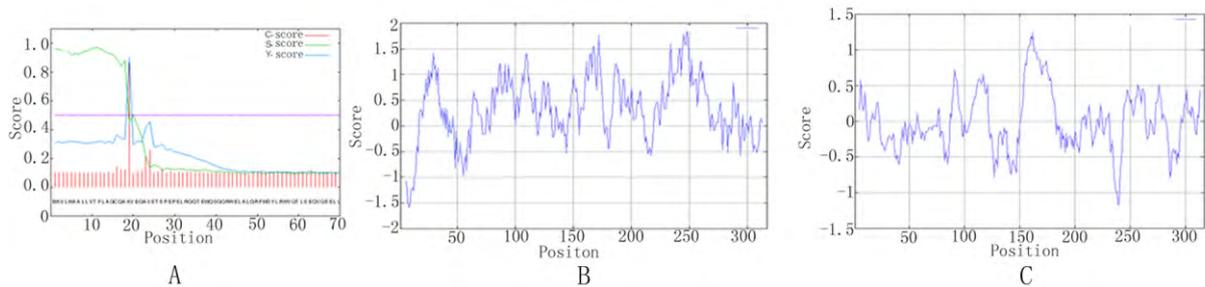
1.2.5 免疫前后采血 准备两个 5 号医用输液针 , 从针头后约 2 cm 处剪断皮管备用。在助手协作下固定兔子 , 用手指轻弹其耳根部使血管充盈 , 采用乙醇消毒后 , 将输液针头插入耳部血管中 , 血液顺着针管一滴滴流出 , 用离心管收集所需量血液后退出针头 , 并用干棉球按压止血。该方法操作简单 , 每次取血量不超过 8 mL , 饲养一段时间后可反复取血。先将离心管置于 37℃ 的恒温箱中 30 min , 然后置于 4℃ 冰箱中过夜 , 使其自然凝固 , 析出血清。以 4000 r/min 4℃ 离心 10 min , 收集上清后分装置于 -80℃ 冰箱保存备用。

1.2.6 Western blot 检测抗体 ①组织蛋白的处理。分别取野生型、杂合型和剔除型 ApoM 模型小鼠的肝脏组织 , 严格按 RIPA 试剂盒说明书操作法提取肝组织蛋白 , 采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定提取蛋白浓度后 , 取适量蛋白样品与上样缓冲液按 4 : 1 混匀 , 100℃ 金属浴 10 min 后冷却至室温备用 , 其余样品置于 -80℃ 备用。②配制 SDS-PAGE 胶。按照制胶方案制备 15% 的分离胶和 5% 的浓缩

胶。③采用 SDS-PAGE 方法检测血清中 ApoM 的抗体。具体操作方法为每孔点样金属浴后的蛋白 30 μg 后电泳 , 100V 恒压转膜 70 min , 标记蛋白面后将 PVDF 膜置于 5% 的脱脂奶粉中封闭 1 h , 以 1 : 500 稀释的兔抗血清作为一抗 , 用商业化的 ApoM 单克隆抗体作为对照 , 4℃ 孵育过夜。以 1 : 10 000 稀释的 HRP 标记的羊抗兔 IgG 或羊抗鼠 IgG 抗体作为二抗孵育 1 h 后洗膜 , 滴加发光液在多功能成像仪中检测 Western blot 结果并分析。

2 结果

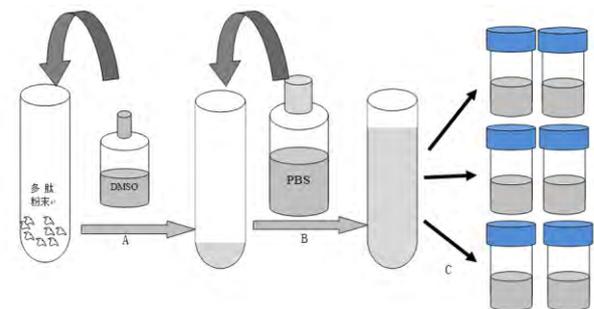
2.1 ApoM 多肽氨基酸序列分析 利用在线蛋白分析软件对 ApoM 蛋白氨基酸序列进行分析 , 并结合市场上利用多肽制备的成熟抗体所选择的氨基酸序列 , 避免选择蛋白内部重复或接近重复段的序列以及同源性太强的肽段作为抗原 , 以提高获得抗体的特异性。经过对 ApoM 蛋白信号肽、亲水性和抗原性分析 , 最终选择 ApoM 蛋白氨基酸序的第 106 ~ 120 位氨基酸 (ETRARLSKELQAAQA) 作为合成多肽的序列 , 见图 1。



A 为信号肽分析结果 , 位于 19 位氨基酸对应的 c 值最大 , s 值陡峭 , y 值最高峰 , 该处预测为信号肽的剪切位点。B 为亲水性分析结果 , 蛋白的亲水部位与蛋白抗原表位有密切的联系。C 为抗原性分析结果 , 抗原肽段应选择亲水性和抗原性强的区域 , 并综合参考各种参数。

图 1 ApoM 蛋白质性质分析结果

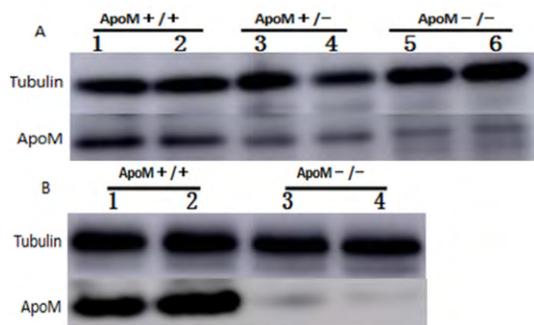
2.2 抗原多肽的溶解和分装 取一个 10 mL 的离心管 , 加入 6 mg 多肽 , 滴加 DMSO 溶解后 , 加入 PBS 调至 6 mL 并混匀 , 然后分装在 6 支冻存管中 , 每支 1 mg/mL , 便于后续实验 , 置于 -20℃ 冰箱保存备用 , 避免反复冻融 , 见图 2。



A: 向多肽粉末中加入 DMSO , 溶解多肽; B: 用 PBS 定容至 6 mL; C: 将溶解后的多肽溶液分装冻存管中 , 放 -20℃ 冰箱保存备用。

图 2 多肽的溶解和分类

2.3 ApoM 多克隆抗体的检测 利用耦联了 KLH 的 ApoM 多肽抗原免疫新西兰大白兔 , 获得兔抗血清。通过 Western blot 检测 , ApoM 剔除小鼠及野生型和杂合子小鼠肝组织中 ApoM 的表达 , 结果显示在 23 ku 左右有一特异性条带 , 结果与预测一致 , 商业化的 ApoM 单抗约为 25 ku , 如图 3 所示。



A 为免疫后兔抗血清的检测结果 ,Lane1~2 为野生型鼠 ,Lane3~4 为杂合子鼠 ,Lane5~6 为剔除鼠; B 为商业化的 ApoM 单克隆抗体的检测结果 ,Lane1~2 为野生型鼠 ,Lane3~4 为剔除鼠。

图 3 western blot 检测结果

3 讨论

ApoM 是一种新型的与脂蛋白相关的载脂蛋白 ,主要存在于高密度脂蛋白 (HDL) ,ApoM 可能影响 HDL 代谢和抗动脉粥样硬化的功能 ,并与糖尿病等代谢性疾病关系密切。对 ApoM 近启动子侧多态性位点研究发现 ,T-778C 的单核苷酸多态性与 1 型糖尿病显著相关; 且 T-778C 与胆固醇水平相关 ,与 2 型糖尿病的易感性有关 ,提示 ApoM 基因启动子的 T-778C 可能参与了 1 型和 2 型糖尿病的共同发病机制^[6,10]。ApoM 在冠心病发生发展扮演重要角色 ,促进 HDL 成熟 ,可逆转动脉粥样斑块的形成 ,可能作为冠心病诊断与治疗的新靶点。而在糖尿病的发病过程中 ,胰岛素、血糖对 ApoM 调控的复杂机制以及 ApoM 与糖尿病的发病关联还有待进一步实验揭示。ApoM 在肾脏组织中高表达 ,为肾巨蛋白配体 ,可阻止肾脏脂质分子的丢失 ,但是其在肾脏疾病中的作用尚少见报道 ,对于其在肾脏组织内的生理及病理作用有待进一步揭示。为进一步研究 ApoM 在上述疾病中的作用及其对信号通路的影响机制 ,我们采用人工合成并耦联了 KLH 的 ApoM 多肽片段作为抗原 ,为了增强机体的免疫应答反应 ,采用佐剂和抗原混合免疫的方法。该方法可以刺激网状内皮系统 ,通过增加免疫活性细胞来促进 T 细胞与 B 细胞的相互作用 ,进而增强抗体的产生。用乳化后的抗原免疫新西兰大白兔 ,最终获得兔多克隆抗体。免疫动物时 ,由于个体差异及不同抗原的最佳免疫剂量不同 ,过高或过低都无法获得最佳的免疫效果。

因此我们选择两只实验兔子 ,分别注射采用不同剂量的抗原 ,以保证有一只兔子能产生最佳的免疫效果。采用人工合成多肽的方法制备抗原 ,与传统原核表达目的蛋白制备的抗原相比 ,人工合成多肽纯度高 ,且操作简洁 ,所得抗体特异性强 ,灵敏度高 ,进一步节约制备抗体所用时间^[11]。为进一步方便研究人员研究该分子在疾病中的作用提供便利的检测基础 ,同时也为探明 ApoM 信号传导通路及机制提供有效的研究手段。

【参考文献】

- [1] XU N ,DAHLBACK B.A novel human apolipoprotein (apoM) [J]. J Biol Chem ,1999 ,274(44) : 31286-31290.
- [2] ZHANG XY ,DONG X ,ZHENG L *et al.* Specific tissue expression and cellular localization of human apolipoprotein M as determined by in situ hybridization [J]. Acta Histochem ,2003 ,105(1) : 67-72.
- [3] 黄丽珠 ,章尧 ,陈昌杰 ,等. ApoM 在不同肝细胞中的表达及其与临床病理因素的关系 [J]. 皖南医学院学报 ,2012 ,31(3) : 182-185.
- [4] XU WW ,ZHANG Y ,TANG YB *et al.* A genetic variant of apolipoprotein M increases susceptibility to coronary artery disease in a Chinese population [J]. Clin Exp Pharmacol Physiol ,2008 ,35(5-6) : 546-551.
- [5] WU X ,NIU N ,BRISMAR K *et al.* Apolipoprotein M promoter polymorphisms alter promoter activity and confer the susceptibility to the development of type 1 diabetes [J]. Clin Biochem ,2009 ,42(1-2) : 17-21.
- [6] NIU N ,ZHU X ,LIU Y *et al.* Single nucleotide polymorphisms in the proximal promoter region of apolipoprotein M gene (apoM) confer the susceptibility to development of type 2 diabetes in Han Chinese [J]. Diabetes Metab Res Rev ,2007 ,23(1) : 21-25.
- [7] 章尧 ,陈昌杰 ,杨清玲 ,等. 干扰肝细胞核因子-1 α 对 HepG2 细胞载脂蛋白 M 及胆固醇相关代谢酶表达的影响 [J]. 中华肝脏病杂志 ,2011 ,19(2) : 121-126.
- [8] CHRISTOFFERSEN C ,OBINATA H ,KUMARASWAMY SB *et al.* Endothelium - protective sphingosine-1-phosphate provided by HDL-associated apolipoprotein M [J]. Proc Natl Acad Sci USA ,2011 ,108(23) : 9613-9618.
- [9] 王德斌. 快速制备抗原-佐剂乳剂新方法 [J]. 细胞与分子免疫学杂志 ,2001 ,17(6) : 596.
- [10] ZHOU JW ,TSUI SK ,NG MC *et al.* Apolipoprotein M gene (APOM) polymorphism modifies metabolic and disease traits in type 2 diabetes [J]. PLoS One ,2011 ,6(2) : e17324.
- [11] 胡小元 ,张岐蜀 ,段伟 ,等. 用人工合成多肽作为半抗原制备 Bt Cry1Ac 的单克隆抗体 [J]. 中国农业科技导报 ,2012 ,14(2) : 88-94.