论著

文章编号:1000-5404(2007)15-1462-03

小鼠 IFIT1 多克隆抗体的制备

郭晓姝[1,2],李洪涛[1*],方海立[2],王军平[1],粟永萍[1] ([1]第三军医大学军事预防医学院防原医学教研室,全军复合伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038 [2]重庆医科大学基础医学院生理学教研室,重庆 400016)

提 要: 目的 获取小鼠 IFIT1(Interferon-induced protein with tetratricopetide repeats 1)特异性多克隆抗体。**方法** 扩增培养高效表达 IFIT1 的重组子 pMAL-C_2X-IFIT1,超声破碎后的细胞上清过 Amylose Pre-packed column 亲和层析柱,将所得纯化的融合蛋白 MBP-IFIT1 作为抗原,添加福氏佐机剂后免疫兔,收集抗血清,用 Western blot 和 ELISA 方法测定抗血清特异性反应和效价。**结果** 纯化的 MBP-IFIT1 可诱导兔产生特异性免疫应答,所得抗体能够特异性识别融合蛋白中的 IFIT1,ELISA 结果显示其效价为 1∶12 800。**结论** MBP-IFIT1 具有良好的抗原性,以该融合蛋白为抗原免疫兔成功制备出 IFIT1 特异性多克隆抗体。

关键词: IFIT1;多克隆抗体;融合蛋白;抗原性;免疫应答

中图法分类号: R392-33; R392.11 **文献标识码**: A

Preparation of polyclonal antibody of mouse IFIT1

GUO Xiao-shu[1,2], LI Hong-tao[1], FANG Hai-li[2], WANG Jun-ping[1], SU Yong-ping[1] ([1]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Combined Injury, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038; [2]Department of Physiology, School of Preclinical Medicine, Chongqing Medicine University, Chongqing 400016, China)

Abstract: **Objective** To acquire specific polyclonal antibody of mouse IFIT1 (Interferon-induced protein with tetratricopetide repeats 1). **Methods** The single clone of pMAL-C2X-IFIT1, confirmed previously to highly express MBP-IFIT1 fusion protein, was cultivated and amplified. After ultrasonic fragmentation and centrifugation, the MBP-IFIT1 fusion protein was purified from the supernatant by using the Amylose Pre-packed column. Then, the MBP-IFIT1 fusion protein, mixed with Freund's adjuvant, was injected into rabbits twice with two-week interval. The rabbit serum was collected, then its anti-IFIT1 titer was detected by ELISA, and its anti-IFIT1 specific reaction was detected by Western blot. **Results** The rabbit serum immunized with purified MBP-IFIT1 protein showed specific anti-IFIT1 ability, and its antibody titer was about 1∶12 800. **Conclusion** The purified MBP-IFIT1 fusion protein possesses favorable antigenicity, and highly specific polyclonal antibody of mouse IFIT1 can be obtained by using purified MBP-IFIT1 as antigen to immunize rabbit.

Key words: IFIT1; polyclonal antibody; fusion protein; antigenicity; immune response

IFIT1 是人类细胞经干扰素诱导产生最为丰富的蛋白质,相对分子质量为 56×10^3,其鼠类同源蛋白相对分子质量为 54×10^3。国外研究表明,一些病毒和双链 RNA 能有效诱导该蛋白表达[1],国内也曾有学者对其在系统性红斑狼疮患者中的表达情况进行了研究[2],但该蛋白的生物学功能与意义至今尚未阐明。李淑蓉等[3]以糖皮质激素受体(glucocorticoid receptor, GR)配体结合区 GR-LBD(GR-ligand binding domain)为诱饵,采用酵母双杂交方法从人骨髓 cDNA 文库筛选到干扰素诱导蛋白 IFIT1,提示 IFIT1 与 GR 之间可能存在着相互作用。为了进一步认清 IFIT1 的蛋白质功能,迫切需要针对 IFIT1 的特异性抗体,而现在并无相应市售抗体。为此,本研究首先提取并纯化 MBP-IFIT1 融合蛋白,然后将其作为抗原免疫兔,以期获得小鼠 IFIT1 特异性多克隆抗体。

1 材料与方法

1.1 实验动物

4 只雌性日本大耳兔,体质量(2.5±0.25)kg(购于第三军

基金项目:国家重点基础研究发展规划("973"项目)(G1999054201);国家自然科学基金海外学者合作研究项目(30328025);创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室开放课题(2004)
Supported by the National Natural Science Foundation of China-Joint Research Fund for Overseas Chinese Scholars (30328025) and the Open Fund of State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury ("973" Projects, G1999054201)

作者简介:郭晓姝(1973-),女,山西省怀仁县人,硕士研究生,医师,主要从事分子生物学方面的研究。电话:(023)68753662, E-mail:guoxiaoshu999@yahoo.com.cn
*:同等贡献者
通讯作者:粟永萍,电话:(023)68752279,E-mail:suyp2003@yahoo.com.cn

收稿日期:2006-08-31;**修回日期**:2006-12-12

医大学实验动物中心），4 只鼠龄 2～4 周野生型 C57/129 小鼠，体质量 22～25 g，雌雄不拘（本实验室提供）。

1.2　材料与试剂

pMAL-C2X-IFIT1 重组表达质粒（本室制备）；IPTG 异丙基-1-硫代-β-D-半乳糖苷（AMERSCO，USA）；Amylose Pre-packed column（New England Biolabs）亲和层析柱；福氏佐剂（Bio Basic Inc. Canada）；羊抗兔 IgG-HRP（博士德生物工程有限公司）；ELISA 实验包板（Costar，USA）。总蛋白提取液（Pierce，USA）

1.3　方法

1.3.1　MBP-IFIT1 的原核表达　　挑取 pMAL-C2X-IFIT1 单克隆接种到 5 ml 的 LB/葡萄糖/氨苄青霉素培养基中 37℃振荡培养过夜。5 ml 的过夜培养物移入 45 ml 的 LB/葡萄糖/氨苄青霉素培养基中（1∶10 稀释）37 ℃振荡培养 6 h，继续扩增细菌，待吸光度值为 0.6 时，加入诱导剂 IPTG（终浓度为 0.3～0.4 mmol/L）继续培养，并在 4 h 时收集菌体。分别取诱导前、后菌液做 12% SDS-PAGE 凝胶电泳实验，检测是否有目的蛋白产生。

1.3.2　MBP-IFIT1 的纯化　　将收集的 pMAL-C2X-IFIT1 菌体在低温离心机（4 ℃，5 000 × g，5 min）离心，冰浴 column buffer 洗涤 1 次，离心后加 column buffer，吹打混悬。经超声破碎仪裂解细菌，裂解后离心收集上清。用 Amylose Pre-packed column 亲和层析柱对上清液中融合蛋白进行特异性的吸附，并用 column buffer 洗去未结合的蛋白，然后用含麦芽糖的 column buffer（麦芽糖浓度为 0.1 mol/L）进行洗脱，收集洗脱液，10% SDS-PAGE 凝胶电泳实验进行蛋白分离，将相对分子质量为 97×10^3 的条带用手术刀切下，放入三通针头连接的两支注射器中抽打破碎，再加入 PBS 抽打至悬浮状，准备免疫兔用。

1.3.3　抗血清的制备　　将含 MBP-IFIT1 的 PBS 分为 2 份，1 份加福氏完全佐剂（1∶1）作为初次免疫，另 1 份加福氏不完全佐剂（1∶1）作为二次免疫用。每次间隔两周，均采用皮下多点注射。每次免疫注射量为 1 ml/只，含纯抗原 150 μg/只。兔在免疫前从耳缘动脉采第 1 次血，初次免疫后 2 周第 2 次采血，采血后进行二次免疫。二次免疫后 2 周进行第 3 次采血，每次采集后分离血清于 -20℃冻存备用。

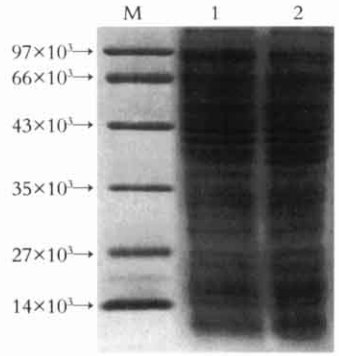
1.3.4　ELISA 实验　　以纯化的 MBP-IFIT1 包板，浓度为 1 μg/ml（用含 0.05% NaN_3 的 PBS 溶液稀释），含 0.5% 脱脂奶粉的 PBST20 溶液作为封闭液，二抗用羊抗兔 IgG-HRP 以1∶800 稀释，经紫外高效分析仪检测吸光度。①将待测血清按 1∶100 稀释，进行兔免疫效果鉴定。②将鉴定后最佳免疫兔的二次免疫后血清按1∶100、1∶200、1∶400、1∶800、1∶1 600、1∶3 200、1∶6 400、1∶12 800 比例稀释，检测血清抗体滴度。

1.3.5　免疫印迹分析　　小鼠脱颈处死，取肝组织，蛋白裂解液提取肝脏总蛋白，经 10% SDS-PAGE 后，电转移至硝酸纤维素滤膜上，5% 的脱脂奶粉 4 ℃封闭过夜，加入自制抗血清（1∶50）4 ℃反应过夜，洗涤后加辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 37 ℃反应 2 h，洗膜，DAB 显色，硫酸镍铵加强显色。

2　结果

2.1　MBP-IFIT1 的原核表达

将经 IPTG 诱导表达前、后取样的菌液经 12% SDS-PAGE 凝胶电泳实验观察，诱导、未诱导表达结果显示，挑取的克隆经 IPTG 诱导表达后在 97×10^3 处均可见清晰的表达条带（IFIT1 和 MBP 相对分子质量分别为 54×10^3 和 43×10^3），IPTG 诱导后表达增高（图 1）。

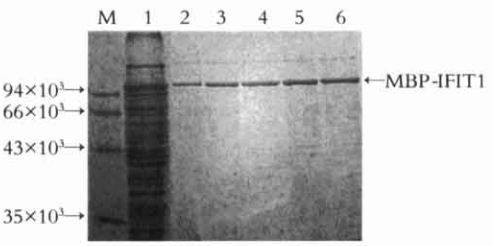


M：蛋白质标准；1：经 IPT G 诱导后的 pMAL-C2X-IFIT1；2：未诱导的 pMAL-C2X-IFIT1

图 1　融合蛋白在大肠杆菌中的表达

2.2　MBP-IFIT1 的纯化

将纯化后收集到的蛋白上样，10% SDS-PAGE 凝胶电泳，结果显示，纯度可达到 90%。将 97×10^3 处条带切胶，作为免疫抗原（图 2）。

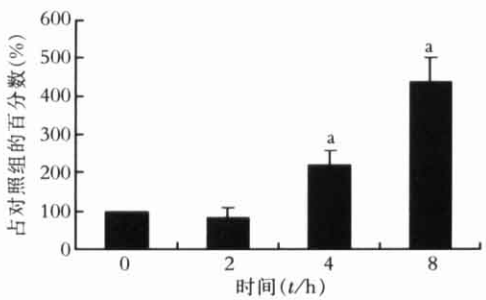


M：蛋白质标准；1：穿透液；2～6：洗脱液

图 2　MBP-IFIT1 的纯化

2.3　ELISA 检测抗血清效价

MBP- IFIT1 包板，在 405 nm 波长下，测得 4 只兔子 3 次血清在 1∶100 稀释度下的吸光度值，观察到 3 号兔有明显的特异性免疫反应。将 3 号兔 2 次免疫后血清以不同浓度稀释测抗体效价，所得抗血清效价结果为 1∶12 800（图 3）。

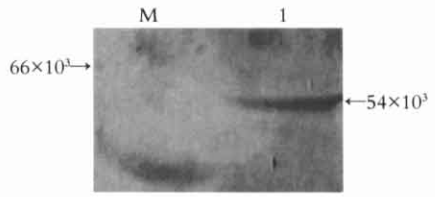


1：1∶100；2：1∶200；3：1∶400；4：1∶800；5：1∶1 600；6：1∶3 200；7：1∶6 400；8：1∶12 800

图 3　MBP- IFIT1 抗血清效价测定

2.4 免疫印迹分析

肝脏总蛋白经10% SDS-PAGE，电转移后，用自制兔抗IFIT1多克隆抗体作为一抗进行免疫印迹分析，出现一阳性反应带（图4），大小与预期值一样。



M：低分子量预染标准；1：IFIT1

图4 小鼠肝脏组织 Western blot 检测结果

3 讨论

制备多克隆抗体，首先要得到纯化的抗原，我们前期实验成功构建了pMAL-C2X-IFIT1重组子，为以后的实验奠定了基础。麦芽糖结合蛋白载体MBP（pMAL-C2X）可用于表达和纯化与MBP融合的克隆基因表达的蛋白质，而且大多数大肠杆菌都可以用IPTG诱导MBP融合蛋白的表达，这是我们成功得到高表达的pMAL-C2X-IFIT1菌的关键。利用与载体配套的亲和层析柱Amy lose Pre-packed column能够很容易与融合蛋白（MBP-IFIT1）中的载体——MBP发生特异性的亲和反应，并将其纯化，这是免疫动物的前提。采用天然抗原或肽-载体蛋白偶联物作为抗原来制备多克隆抗肽的抗血清是经典的作法[4]。MBP-IFIT1序列接近IFIT1天然抗原构象，具有与IFIT1相同的免疫原性，而且至今并未有MBP在哺乳动物体内表达的记载，因此，该抗体用于哺乳动物相应实验不会有干扰。利用纯化了的融合蛋白制备多克隆抗体有其优点，表达水平高，比较稳定，易纯化，我们直接用切胶纯化的融合蛋白作为抗原，这也是一种常规的抗原制备方法[5]，优点是操作简便，获得的抗原量较大，容易产生高效价抗体。作者将切胶纯化的融合蛋白直接用于免疫，抗原所含的PAGE胶本身即是良好的免疫佐剂，这更有助于免疫的成功。ELISA间接法对于从抗血清中筛选特异性抗体是非常敏感的，可以检测出1ng/ml的蛋白质抗原[4]，其特点是灵敏度高，步骤少，操作简便和快速，适用于对大量样品进行检测。

IFIT1基因定位于人染色体10q25-q26处[6]，蛋白质定位于细胞质，具体功能少见报道，干扰素（Interferon，IFN）或病毒可强烈诱导IFIT1的产生，通过和eIF3结和抑制蛋白质翻译过程[1]。国外文献报道，IFN家族及其免疫调控通路可能在SLE发病中扮演重要角色，IFIT1增高保护T、B细胞免受攻击破坏，从而介导更多的炎性因子，使自身免疫反应加重，抑制该蛋白的表达可能作为SLE治疗的一种新措施[7-9]。本课题组前期研究表明GR减少是体内抗炎机制减弱的主要原因[10-12]，之后又发现GR与IFIT1在体内外发生相互作用，IFIT1抑制GR介导的转录活性，提示IFIT1蛋白对GR核转录有调节作用。结合有关文献报道分析认为烫伤、烧伤早期IFN升高可能诱导IFIT1表达增多，增多的IFIT1与GR结合，导致转录活性降低，GR的抗炎能力减弱，使机体处于高细胞因子状态，过度炎症反应发生，由此推测GR与IFIT1相互作用与GR调节的抗炎机制相关。课题组前期成功获取IFIT1全长及各种缺失突变体[13]，为进一步研究提供了可能。为了认清IFIT1的蛋白质表达水平功能，我们成功制备了其多克隆抗体，该抗体可用于抗原分子组成和抗原表位的研究，还可用于抗体的检测，具有重要的分子生物学意义。

参考文献：

[1] Guo J, Peters K L, Sen G C. Induction of the human protein P56 by interferon, double-stranded RNA, or virus infection[J]. Virology, 2000, 267(2): 209-219.

[2] 华晶，沈南，陈顺乐，等. 应用荧光定量PCR验证干扰素诱导表达基因在系统性红斑狼疮患者中的表达[J]. 上海医学，2004，27(8)：584-586.

[3] 李淑蓉，粟永萍，刘晓宏，等. 干扰素诱导蛋白P56与糖皮质激素受体的相互作用及对其转录活性的影响[J]. 生物化学与生物物理进展，2004，31(9)：791-795.

[4] 奥斯伯F M，金斯顿R E，塞德曼J G，等. 精编分子生物学实验指南[M]. 马学军，舒跃龙，译. 第4版. 北京：科学出版社，2005：476-708.

[5] 林筱洁，罗建红，宋 英，等. 人细胞色素P450 1A1与谷胱甘肽S-转移酶的融合蛋白及其抗体的制备[J]. 中国药理学与毒理学杂志，2000，14(6)：434-439.

[6] De-Veer M J, Sim H, Whisstock J C, *et al*. IFI60/ISG60/IFIT4, a new member of the human IFI54/IFIT2 family of interferon-stimulated genes[J]. Genomics, 1998, 54(2): 267-277.

[7] 汤建平，顾越英，沈 南，等. 干扰素诱导表达的淋巴细胞抗原6复合体E和干扰素诱导蛋白1基因与系统性红斑狼疮患者病情活动性的关系[J]. 中华医学杂志，2004，84(14)：1157-1160.

[8] Ye S, Pang H, Gu Y Y, *et al*. Protein interaction for an interferon-inducible systemic lupus associated gene, IFIT1[J]. Rheumatology (Oxford), 2003, 42(10): 1155-1163.

[9] Han G M, Chen S L, Shen N, *et al*. Analysis of gene expression profiles in human systemic lupus erythematosus using oligonucleotide microarray[J]. Genes Immun, 2003, 4(3): 177-186.

[10] Liu D H, Su Y P, Zhang W, *et al*. Changes in glucocorticoid and mineralocorticoid receptors of liver and kidney cytosols after pathologic stress and its regulation in rats[J]. Crit Care Med, 2002, 30(3): 623-627.

[11] 刘都户，粟永萍，楼淑芬，等. 烫伤大鼠肝组织糖皮质激素受体的变化及α-MSH、合成肽KPV的调节作用[J]. 第三军医大学学报，2001，23(5)：550-552.

[12] 王军平，赵景宏，粟永萍. 糖皮质激素受体调控与创伤应激紊乱关系的研究进展[J]. 中华创伤杂志，2001，17(8)：508-510.

[13] 邓正阳，李淑蓉，王 蒙，等. 人P56蛋白及其各种缺失突变体酵母表达质粒的构建及鉴定[J]. 第三军医大学学报，2004，26(7)：561-564.

（编辑 王小寒）