论著

文章编号:1000-5404(2008)13-1242-04

一个新的高保守自身免疫反应相关分子 IRF-4 结合蛋白多克隆抗体制备

张竹君,周 玉,李 鹏,易维京,杨明珍,李淑慧,胡川闽 (第三军医大学医学检验系临床生物化学教研室,重庆 400038)

摘 要:目的 获得一个新的高保守自身免疫反应相关分子 IRF-4 结合蛋白(IRF-4-binding protein,IBP)的高效价特异性多克隆抗体。方法 通过生物信息学分析选择 IBP 特异片段(1 228 ~ 1 893 bp),目的片段 cDNA 插入 pET32a 和 pGEX-KG 原核表达载体,分别转化 BL21 感受态细菌,IPTG 诱导表达后组合应用阴离子交换层析、His、GST 亲和层析技术获得免疫原(pET32a/IBP 融合蛋白)及检测原(pGEX-KG/IBP 融合蛋白)。HPLC 鉴定纯度。利用改良快速免疫法获得兔抗 IBP 多克隆抗血清,并经蛋白 A 柱纯化,非特异性抗体吸收。间接 ELISA 检测抗体滴度、Western blot 和免疫组化实验检测抗体特异性。结果 表达并纯化的 pET32a/IBP 融合蛋白纯度达 92%,pGEX-KG/IBP 融合蛋白纯度达 87%。IBP 多克隆抗体滴度达 1∶51 200,能特异地和内源性 IBP 结合。结论 成功表达并纯化了 IBP 融合蛋白,制备了高滴度、高特异性的抗 IBP 多克隆抗体。

关键词:IRF-4 结合蛋白;原核表达;蛋白纯化;快速免疫法;多克隆抗体
中图法分类号:R392-33;R392.11;R392.8 文献标识码:A

Preparation and characterization of IRF-4 binding protein and its polyclonal antibodies

ZHANG Zhu-jun, ZHOU Yu, LI Peng, YI Wei-jing, YANG Ming-zhen, LI Shu-hui, HU Chuan-min (Department of Clinical Biochemistry, College of Pharmacy and Laboratory Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To express interferon regulatory factor 4 binding protein (IBP), a novel conserved molecule engaging in autoimmune response, and prepare its polyclonal antibodies. Methods IBP specific fragment (1 228 – 1 893 bp) selected by means of bioinformatic methods, was subcloned into prokaryotic expression vectors pET32a and pGEX-KG, and then the recombinant plasmids were transformed into BL21 respectively and induced by IPTG. The objective fusion proteins were purified by affinity chromatogram with His or GST and negion exchange columns. Rabbit polyclonal antibody serum was prepared by a modified rapid immune procedure followed by purification of protein A column. The titer and specificity of the antibody were determined by ELISA, Western blotting and immunohistochemistry. Results HPLC indicated that the purity of pET32a/IBP and pGEX-KG/IBP fusion protein was 92% and 87%, respectively. The titer of the final purified antibodies was up to 1∶51 200. Western blotting and immunohistochemistry revealed that the final purified antibodies were highly specific to native IBP both in human and murine cells. Conclusion The specific IBP fusion protein is obtained. The final purified polyclonal antibodies against IBP have specificity to native IBP.

Key words: interferon regulatory factor 4 binding protein; prokaryotic expression; protein purification; polyclonal antibodies

IRF-4 结合蛋白(IRF-4-binding protein,IBP)是 Gupta 等[1]最近通过酵母双杂交技术从人淋巴结 cDNA 文库中筛选出的一个与 IRF-4 具有结合作用的蛋白。通过对 IBP 缺陷小鼠的观察,发现动物出现 SLE 样自身免疫反应,特征为血清 IgG 水平明显升高,自身抗体产生,效应 T 细胞和记忆 T 细胞积聚及凋亡紊乱[2]。众所周知,自身免疫病(auto-immune disease,AID)种类繁多,机制复杂,目前尚无有效的治疗措施及方法,IBP 缺陷小鼠自身免疫性疾病症状的出现为这一领域的研究提供了新的思路及研究方向。但目前缺乏用于研究其蛋白质表达水平的有效的工具;其次,IBP 作为潜在的 AID 诊疗靶点,有可能用于疾病的监测和治疗。得到优质的 IBP 抗体对进一步的研究和应用具有重大意义。但是 IBP 在进化过程中高度保守,

基金项目:国家自然科学基金(30471577)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30471577)
作者简介:张竹君,男,四川省成都市人,硕士,助教,主要从事免疫分子方面的研究。电话:(023)68752313,E-mail:zhujunzhang@hotmail.com
通信作者:胡川闽,电话:(023)68753761
收稿日期:2007-09-28;修回日期:2007-12-11

鼠 IBP 与人 IBP 同源高性达 90% [3],而且人 IBP cDNA 5′端与鼠 Def-6 cDNA 几乎相同[1],难于制备其单克隆抗体。而传统的多克隆抗体制备方法存在耗时长,抗原需要量大的问题。最近报道的快速免疫法制备多克隆抗体可以较好的解决上述两个问题,且制备的抗体滴度高。本研究拟采用改良的快速免疫法制备 IBP 兔多克隆抗体,为进一步研究 IBP 分子功能奠定基础。

1　材料与方法

1.1　材料

阴离子柱 HiTrap Q、His 柱 HiTrap chelating HP、GST 柱 GSTrap FF 和 γProtein A 柱均购自 Pharmacia 公司,纯种新西兰大白兔由实验动物中心提供,弗氏佐剂购自 Gibco 公司;Jurkat、SW620、LOVO、HT29、SW480 细胞为本室保存的引自美国 ATCC 的标准细胞株;pET32a、pGEX-KG 质粒和 BL21 感受态细菌均为本实验保存;蛋白标准品为中国科学院预染 Marker;IBP RNAi Jurkat 细胞和无关 RNAi Jurkat 细胞为周玉[4] 惠赠;免疫组化 S-P 试剂盒购自北京中杉金桥公司。

1.2　方法

1.2.1　IBP 的表达　　通过生物信息学分析,针对 IBP 特异序列(1 228 ~ 1 893 bp)设计引物。正常人全血提取总 RNA,RT-PCR 获得 cDNA,应用 KOD-Plus 高保真体系扩增 IBP 特异片段。克隆并构建 pET32a/IBP 和 pGEX-KG/IBP 表达载体。将测序正确的重组质粒转化 BL21 感受态细菌中,IPTG(终浓度 1 mmol/L)诱导表达。离心集菌。50 ml 上样缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl,pH = 8.0)重悬,超声破菌,离心收集上清待用。

1.2.2　pET32a/IBP 的纯化　　菌体蛋白上阴离子柱,以上样缓冲液流洗至基线,20 个柱体积内洗脱缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl,1.0 mol/L NaCl,pH = 8.0)由 0% 上升至 100% 梯度洗脱,收集洗脱峰和穿透峰。电泳鉴定蛋白液纯度。His 柱经上样缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl,0.5 mol/L NaCl,pH = 8.0)平衡,取上一步制备样品上柱,以上样缓冲液流洗至基线,洗脱液(20 mmol/L Tris-HCl,0.5 mol/L NaCl,0.5 mol/L 咪唑)洗脱,收集蛋白峰。Brodford 法测浓度。4 ℃保存。

1.2.3　pGEX-KG/IBP 的纯化　　阴离子柱纯化处理方式同上。阴离子纯化产物上 GST 亲和柱,以上样缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl,0.15 mol/L NaCl,pH = 7.3)流洗至基线,洗脱脱缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl,10 mol/L 谷胱甘肽,pH = 8.0)由 0% 上升至 100%,收集洗脱峰。电泳鉴定蛋白液纯度,Brodford 法测浓度。4 ℃保存。

1.2.4　抗体的制备　　pET32a/IBP 融合蛋白 300 μg,1∶1配以弗氏完全佐剂免疫 2 只体质量为 2.5 kg 左右雄性纯种新西兰大白兔,首次免疫后 3 d 等量抗原配以弗氏完全佐剂再次免疫,其后 28 d 等量抗原配以弗氏不完全佐剂第 3 次免疫。每次免疫分 10 点在大白兔背部皮下注射。第 3 次免疫后 7 d 颈动脉插管收集全血。全血 4℃孵育过夜,离心收集上清,-70℃备用。

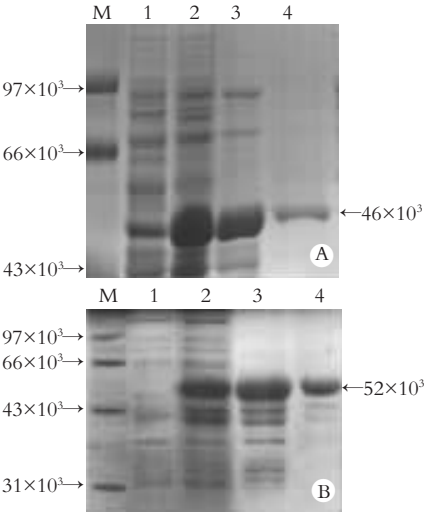
1.2.5　抗体的纯化与吸收　　兔血清与上样缓冲液(100 mmol/L 磷酸钠,100 mmol/L 柠檬酸钠,pH = 7.0)按 1∶9稀释混匀上 Protein A 柱,以上样缓冲液流洗至基线,洗脱液(100 mmol/L 磷酸钠,100 mmol/L 柠檬酸钠,pH = 3.0)由 0% 上升至 100%,收集单峰,-20 ℃备用。制备 pET32a 空载体转化菌菌体蛋白,方法同融合蛋白制备。上样缓冲液平衡 His 亲和柱后,取菌体蛋白上柱,以上样缓冲液流洗至基线,再取上一步纯化的多抗上样,收集穿透液,-20 ℃保存。

1.2.6　抗体滴度与特异性检测　　以 pGEX-KG/IBP 融合蛋白,重组巨噬细胞迁移抑制因子(MIF),重组 proBNP(N 端心房钠尿肽),重组淋巴细胞增强因子 1(LEF-1)包被 96 孔板,间接 ELISA 法检测。提取 Jurkat、SW620、LoVo、HT29、SW480 IBP RNAi-Jurkat(慢病毒方法构建,经 Realtime PCR 检测抑制率约 70%)、无关 RNAi-Jurkat 细胞蛋白、成年小鼠胸腺、成年小鼠脾脏蛋白,以吸收后抗体(1∶500 稀释)和未经吸收抗体(1∶500 稀释)进行 Western blot 检测。收集 Jurkat 细胞,涂片后应用吸收后的抗体(1∶100 稀释)进行免疫组化检测。

2　结果

2.1　IBP 的表达与纯化

扩增出的带特定酶切位点的 IBP 特异片段(约 670 bp),连接入原核表达载体 pET32a 和 pGEX-KG,重组载体经双酶切鉴定和测序证明序列正确插入。经 IPTG 诱导后,在 pET32a/IBP 和 pGEX-KG/IBP 转化菌裂解液中,分别新出现 1 条约 46×10^3 和 52×10^3 的蛋白条带(图 1),与预期的融合蛋白相对分子质量相符。经阴离子柱、镍柱、GST 柱纯化的上述蛋白,在 SDS-PAGE 电泳后几乎为单一条带,DHPLC 法鉴定纯度分别达到 92% 和 87%。Brodford 法测浓度分别为 0.6、1.0 mg/ml。



A:pET32a/IBP 融合蛋白　　M:蛋白标准;1:BL21pET32a/IBP 未诱导;2:BL21pET32a/IBP 诱导;3:阴离子柱纯化产物;4:His 柱纯化产物

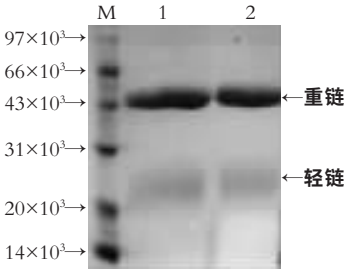
B:pGEX-KG/ IBP 融合蛋白　　M:蛋白标准;1:BL21pGEX-KG/IBP 未诱导;2:pGEX-KG/IBP 诱导;3:阴离子柱纯化产物;4:GST 柱纯化产物

图 1　pET-32a/IBP 和 pGEX-KG/IBP 融合蛋白的表达和纯化

2.2　IBP 兔多抗的纯化和吸收

兔血清经过 Protein A 柱纯化和 pET32a 空载体转化菌菌体蛋白吸收后,SDS-PAGE 电泳仅见抗体的重链和轻链,未见其他

杂带，证明抗体纯度很高（图2）。

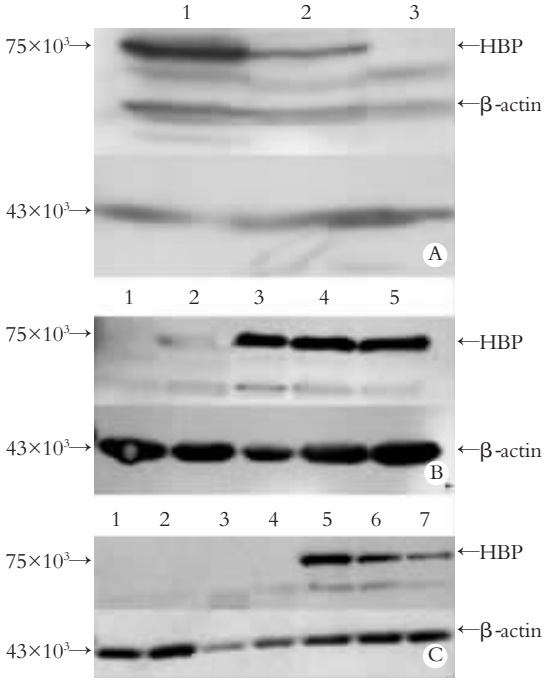


M：蛋白标准；1：纯化后抗体；2：吸收后抗体

图2 兔抗 IBP 多克隆抗体的纯化与吸收

2.3 间接 ELISA、Western blot 和免疫组化

ELISA 检测证明吸收后的抗 IBP 多克隆抗体效价达 1∶51 200。与无关抗原均无交叉。Western blot 显示未经吸收的抗体非特异结合现象较严重（图3A），在目的条带（天然 IBP 约 75×10^3）上下均有较多得非特异条带。吸收后抗体特异性显著提高。非特异条明显减少。白血病 T 细胞来源的 Jurkat 细胞高表达 IBP[1]，成年小鼠胸腺退化，T 细胞少，故 IBP 表达量少。而小鼠脾脏以 B 细胞为主，未检测到 IBP 的表达（图3B）。RNAi-Jurkat 细胞 IBP 表达明显受抑，无关 RNAi-Jurkat 细胞 IBP 表达正常，结肠癌细胞株 SW620、Lovo、HT29、SW480 等均无 IBP 表达（图3C）。Jurkat 细胞免疫组化显示 IBP 为阳性（图4），位于细胞质。以上证明我们制备的抗体与人源和鼠源性 IBP 均能结合。

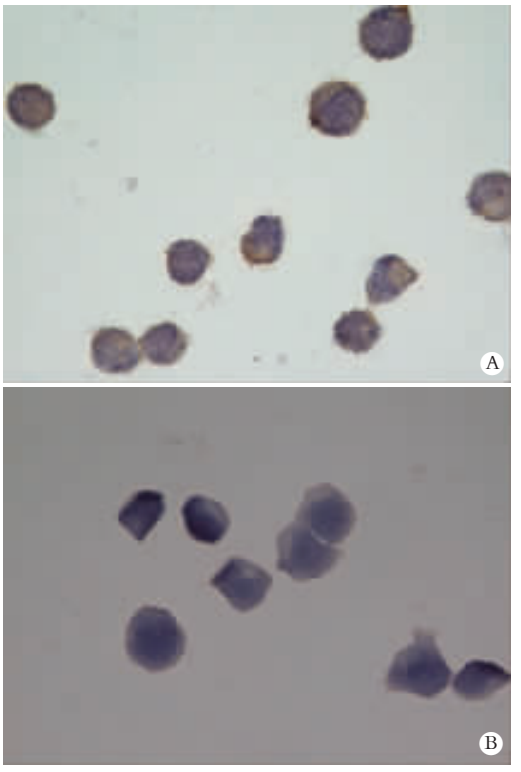


A：吸收前 IBP 多克隆抗体 Western blot 检测　1：Jurkat；2：小鼠胸腺；3：小鼠脾脏

B：吸收后 IBP 多克隆抗体 Western blot 检测　1：小鼠脾脏；2：小鼠胸腺；3－5：Jurkat

C：IBP 多克隆抗体检测细胞 IBP RNAi 抑制效果　1：SW620；2：LoVo；3：HT29；4：SW480；5：无关 RNAi Jurkat；6，7：IBP RNAi Jurkat

图3 抗 IBP 多克隆抗体特异性鉴定结果



A：IBP 阳性 Jurkat 细胞；B：阴性对照

图4 IBP 多克隆抗体用于 Jurkat 细胞免疫组化检测　（S-P×1 000）

3 讨论

IBP 是新近发现的和免疫反应相关的一个分子，全长约 2 300 bp，包含一个 1 893 bp 的开放阅读框（open reading frame，ORF）编码 631 个氨基酸，天然 IBP 相对分子质量约 75×10^3 [1]。在不同种属间的同源性高。IBP 从 N 端到 C 端依次为 EF-hand、PH（pleckstrin-homology）、DH（Db1-homology）结构域[5]。分别与钙离子信号转导通路、结合磷酸肌醇及 GEF 活性相关。根据生物信息学分析。我们选择了包含 DH 结构域的部分，即 DNA 序列 1 228～1 893 bp 段克隆入表达载体。利用这种融合蛋白制备的多克隆抗体可以结合不同种属来源的 IBP，且特异性高。由于融合蛋白均带有标签，免疫动物后可能产生抗标签抗体而出现假阳性，为了避免在筛选和鉴定抗体时出现假阳性，我们使用两种载体 pET32a 和 pGEX-KG 来表达带不同标签的融合蛋白分别作为免疫原和鉴定抗原[6,7]。传统的多克隆抗体制备方法共需 4～5 次的免疫，每次免疫的间隔在 2～3 周，需要花费 3 个月甚至更长的时间才能得到较高滴度的抗体。且需要的抗原量较大，对于一些很珍贵的抗原就此种免疫方法就存在很大的局限性。Hu 等[8]报道的快速免疫法则较好的解决了这两个问题，该方法共注射 3 次，整个过程

仅需1个月，得到的抗体效价是传统方法在1个月时得到的抗体效价的7～60倍。我们根据此方法制备得到抗IBP多抗，纯化后电泳显示抗体纯度很高，但Western blot显示，非特异条带较多，分析原因是我们的抗原中仍含有一些其他蛋白，且多抗体是针对多个抗原表位，易出现交叉反应。为了进一步提高抗体的特异性，我们设计了非特异抗体的吸收实验。提取转化有PET-32a空质粒的BL21菌体蛋白，穿过His亲和层析柱时，能与亲和柱结合的成分则留在His柱上，抗体再缓慢流经柱时，针对这些菌体成分的非特异抗体则被留在柱上，穿透的抗体则是我们的目的抗体。间接ELISA显示纯化吸收后的抗体滴度达到1∶51 200，Western blot和免疫组化实验证明我们制备的抗体可以特异地和天然IBP结合。

IBP作为一个新的与自身免反应相关分子，可能成为研究自身免疫反应的一个新的靶点。由于其进化的高度保守性，难于制备其单克隆抗体，我们应用一种改良的免疫方法制备了多克隆抗体，经过纯化与吸收，得到了高滴度、高特异的IBP多克隆抗体。为进一步研究IBP分子的功能，阐明自身免疫病的分子机制奠定了基础。

参考文献：

[1] Gupta S, Lee A, Hu C, *et al*. Molecular cloning of IBP, a SWAP-70 homologous GEF, which is highly expressed in the immune system[J]. Hum Immunol, 2003, 64(4): 389-401.
[2] Fanzo J C, Yang W, Jang S Y, *et al*. Loss of IRF-4-binding protein leads to the spontaneous development of systemic autoimmunity[J]. J Clin Invest, 2006, 116(3): 703-714.
[3] Tanaka Y, Bi K, Kitamura R, *et al*. SWAP-70-like adapter of T cells, an adapter protein that regulates early TCR-initiated signaling in Th2 lineage cells[J]. Immunity, 2003, 18(3): 403-414.
[4] 周 玉，李 鹏，李淑慧，等. siRNA介导的IBP表达抑制对T细胞凋亡的影响[J]. 免疫学杂志，2007，23(3)：248-251.
[5] Masat L, Caldwell J, Armstrong R, *et al*. Association of SWAP-70 with the B cell antigen receptor complex[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97(5): 2180-2184.
[6] Yang J, Guo S Y, Pan F Y, *et al*. Prokaryotic expression and polyclonal antibody preparation of a novel Rab-like protein mRabl5[J]. Protein Expr Purif, 2007, 53(1): 1-8.
[7] 王 旻，石建莉，程国艳，等. 人细胞核自身抗原精子蛋白的重组表达及多克隆抗体制备[J]. 中华男科学，2006，12(10)：867-871.
[8] Hu Y X, Guo J Y, Shen L, *et al*. Get effective polyclonal antisera in one month[J]. Cell Res, 2002, 12(2): 157-160.

（编辑 王小寒）

文章编号：1000-5404(2008)13-1245-01

个案与短篇

43例老年人胶囊内镜检查临床分析

李英姿，赵晓晏，王 雷，樊超强 （第三军医大学新桥医院消化内科，重庆 400037）

老年人常因合并心脑肺等多器官疾病，不能耐受胃肠镜等检查，而难以明确消化系统疾病诊断。胶囊内镜因其安全、无痛苦等优点，为老年人提供了一种较有价值的检查手段。兹将我院从2005年10月至2007年10月43例老年患者行胶囊内镜检查报告如下。

1 资料与方法

1.1 病例资料

本组43例老年患者，男性13例，女性30例，年龄60～80岁，平均68.2岁。其中不明原因消化道出血32例，腹痛6例，腹胀2例，腹泻1例，肠易激综合征1例，淋巴瘤1例。32例合并有多脏器疾病：高血压15例，冠心病7例，风湿性心脏病联合瓣膜病变1例，慢性阻塞性肺病5例，胆囊炎胆囊结石4例（3例胆囊切除术后），2型糖尿病3例，心功能Ⅲ级2例，脑出血及脑梗死后遗症、右肾癌术后、腹主动脉瘤、桥本氏甲状腺炎各1例。

1.2 仪器与方法

胶囊内镜选用重庆金山公司生产的OMOM胶囊内镜系统。患者于检查前1天作肠道准备，吞服胶囊后，仍须禁食水2，15 h后结束检查。嘱患者观察胶囊排出的时间。

2 结果

2.1 胶囊内镜在体内工作情况

43例患者完成全消化道检查，胶囊内镜在人体内工作时间平均562.29 min，照片帧数平均41 148.4帧，胶囊内镜排出体外时间平均38.2 h，无1例滞留。

2.2 胶囊内镜检查的耐受性与安全性

本组患者，吞咽胶囊无困难，整个检查过程无痛苦，亦无并发症及不良反应发生。

2.3 病变检出情况

本组43例患者病变总检出率为83.7%（36/43），检出小肠疾病33例（76.7%），胃炎6例（14.0%），结肠疾病3例（7.0%），食管静脉曲张1例（2.3%）。

32例不明原因消化道出血患者中27例检出病变（2种或

（下转1255页）

作者简介：李英姿，女，福建省福州市人，主治医师，主要从事消化内科疾病临床诊治方面的研究，现在福建武警总队医院内科。电话：(0591)83128053
通信作者：赵晓晏，E-mail：zhaoxx@medmail.com.cn
收稿日期：2008-01-18；修回日期：2008-04-16