文章编号:1000-5404(2009)20-2001-04

论著

人Ⅰ型丙氨酸氨基转移酶单克隆抗体的制备及鉴定

李有强[1],尹一兵[1],胥文春[1],张云燕[2],张雪梅[1],尹楠林[1] (重庆医科大学:[1]临床检验诊断学教育部重点实验室,重庆400016,[2]附属口腔医院牙体牙髓科,重庆 400010)

摘 要:目的 通过构建人Ⅰ型丙氨酸氨基转移酶(ALT1)的原核表达载体,并用纯化的ALT1重组蛋白免疫BALB/c小鼠,制备有生物活性的单克隆抗体。**方法** 用GST-ALT1融合蛋白作为免疫原,通过杂交瘤技术制备抗ALT1的单克隆抗体,用间接ELISA、Dot-Elisa、Western blot等方法对抗体的抗原结合特性进行鉴定。**结果** 获得1株能稳定分泌抗ALT1单克隆抗体的细胞株8A9,亚类鉴定这种单抗为IgG2。间接ELISA法测定细胞株腹水抗体的效价为10×10^5。Dot-ELISA、Western blot显示ALT1单克隆抗体能特异性地识别免疫原。**结论** 成功制备ALT1单克隆抗体。

关键词: Ⅰ型丙氨酸氨基转移酶;单克隆抗体;制备与鉴定
中图法分类号: R345.5;R392-33;R392.11 **文献标识码:** A

Preparation and identification of monoclonal antibody against human I-alanine aminotransferase

LI You-qiang[1], YIN Yi-bing[1], XU Wen-chun[1], ZHANG Yun-yan[2], ZHANG Xue-mei[1], YIN Nan-lin[1] ([1]Key Laboratory of Laboratory Medicine of Ministry of Education, Chongqing Medical University, Chongqing 400016; [2]Department of Endodontics, Affiliated Hospital of Stomatology, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

Abstract: Objective To prepare the bioactive monoclonal antibody (McAb) against the fusion protein of GST-human I-alanine aminotransferase (ALT1). **Methods** With the fusion protein GST-ALT1 as immunogen, the anti-ALT1 McAb was produced by using the hybridoma technique, of which the antigen binding characteristics was identified by indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), Dot-ELISA and Western blot assay. **Results** One cell strain of hybridoma was obtained and named as 8A9 which secreted the anti-ALT1 McAb. The class and subtype identification demonstrated that this cell strain was IgG2. The titers of ascites fluid which hybridoma induced was 10×10^5. Dot-ELISA and Western blotting demonstrated that this antibody recognized specifically the immunogen and ALT1 which existed in clinical serum specimen. **Conclusion** McAb against ALT1 is prepared successfully and provides a useful tool for researching on ALT1's property, function, bionomics and found a basis for establishment of specific immunoassays of human ALT1.

Key words: I-alanine aminotransferase; monoclonal antibody; preparation; identification

谷丙转氨酶(alanine transaminase, ALT)主要存在于肝脏、肾脏及肌肉等器官,是临床上用来评价肝脏功能的有效指标[1-3]。目前发现ALT有两个亚型:Ⅰ型丙氨酸氨基转移酶(alanine transaminase 1,ALT1)相对分子质量为55×10^3的单体构成的同二聚体,基因定位于染色体8q24.3;Ⅱ型丙氨酸氨基转移酶(alanine transaminase 2,ALT2)基因定位于染色体16q12.1[4]。ALT1与ALT2的组织分布有所不同,ALT1主要分布于肝脏、肾脏和心脏;ALT2主要分布于肌肉、肾脏和脂肪组织。目前酶活性测定方法实际上检测的是Ⅰ、Ⅱ型丙氨酸氨基转移酶的总和,因此有必要采用特异性方法检测并区分这二种丙氨酸氨基转移酶,使其更加真实客观地反应肝功能的损害程度。在各种检测方法中,免疫学诊断方法能有效地检测酶的质量、可特异性识别不同的同工酶,并可实现快速诊断,基于胶体金的免疫诊断试剂还特别适用于献血员的现场筛选。本研究旨在制备针对ALT1的特异性单克隆抗体,为ALT1免疫诊断方法的开发奠定基础。

基金项目:重庆市教委科技项目(000106)
Supported by the Science and Technology Project of Chongqing Municipal Education Commission (000106)
作者简介:李有强,男,湖南省娄底市人,硕士,检验师,主要从事临床免疫学诊断方面的研究。E-mail:liyouqiang21@126.com
通信作者:尹一兵,电话:(023)68485658,E-mail:yibingyin56@126.com
收稿日期:2009-01-21;修回日期:2009-03-19

1 材料与方法

1.1 材料

HepG2 细胞、宿主大肠杆菌 DH5α、*E. coli* BL21(DE3)和载体 pGEX-4T-2(+)为本室保存。雌性 BALB/c 小鼠 10 只,体质量为 18~25 g,均购自重庆医科大学实验动物中心。限制性内切酶 *Eco*R Ⅰ和 *Bam*H Ⅰ、MutanBEST Kit、PCR 试剂盒、pMD19-T 载体为 TaKaRa 公司产品, RIPA 裂解液购自上海碧云天生物技术有限公司,Freund 氏完全佐剂和不完全佐剂、PRIM1640、细胞融合剂 PEG4000、HAT 及 HT 培养液为 invitrogen 公司产品,胎牛血清为美国 Hyclone 公司产品,SP2/0 骨髓瘤细胞由重庆医科大学感染病重点实室馈赠,抗体分型试剂盒为 Sigma 公司产品,ALT 试剂盒购自中生公司。商品化 ALT1 mAb 与 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 二抗均购自台湾 Abnova 公司。

1.2 目的片段的扩增与克隆

从 $HepG_2$ 细胞中提取总 RNA 为模板,Olig(d)T 逆转录成 cDNA 后 PCR 通过含 *Bam*H Ⅰ酶切位点的上游引物:5′-CGCG-GTACCATGGCCTCGAGCACAGGTGACC-3′与含 *Eco*R Ⅰ酶切位点的下游引物: 5′-CGAAGCTTTCAGGAGTACTCGAGGGT-GAACTTG-3′扩增出目的基因 alt1。回收 PCR 产物,用连接酶将回收产物与 PMD-19 连接,转化 DH5α,提取质粒,进行双酶切和测序鉴定。从测序正确的 pMD19-T-alt1 克隆质粒中扩增目的基因后回收 PCR 产物,用连接酶将回收产物与 pGEX-4T-2 载体连接,转化 DH5α,提取质粒,进行 PCR、酶切鉴定与测序鉴定。取鉴定正确的重组质粒转化感受态表达菌株 BL21(DE3)。

1.3 目的蛋白的诱导表达与纯化

将转化 BL21(DE3)的单个菌落接种入 LB 培养液(含 100 mg/L 氨苄青霉素)中,30 ℃待其光密度值 *D*(600)约为 0.6 时加入终浓度为 0.4 mmol/L 的 IPTG 诱导,30 ℃振摇 5 h,离心收集上清按 GST 纯化柱说明纯化。

1.4 目的蛋白鉴定

取纯化后的目的蛋白经 SDS-PAGE 后,用半干电转膜仪稳压 20 V,转膜 30 min,10% 脱脂奶粉封闭,一抗为鼠抗人的 ALT1 单克隆抗体(1∶1 000),二抗为山羊抗鼠 HRP-IgG(1∶2 500),DAB 底物显色,Western blot 鉴定。同时按 ALT 试剂盒说明书设置全自动生化分析的测量参数,取 100 μg GST-ALT1 与 1 ml 底物溶液(L-丙氨酸、NADH、LD、Tris buffer、α-酮戊二酸)在奥林巴斯 AU400 全自动生化分析仪上速率法检测其活性。

1.5 抗人 ALT1 mAb 的产生

1.5.1 动物免疫 基础免疫为 BALB/c 小鼠腋下、腹部皮下腹腔注射等体积弗氏完全佐剂的 10 μg ALT1 重组蛋白,2 周后, 在皮内多点注射等体积弗氏不完全佐剂的 50 μg ALT1 重组蛋白。1 周后腹腔注射 50 μg ALT1 重组蛋白,加强免疫为尾静脉注射,每只注射 10 μg 重组 ALT1 蛋白。3 d 后取脾融合。

1.5.2 细胞融合、筛选及克隆化 小鼠脾细胞与 Sp2/0 用 1640 洗涤后,与 Sp2/0 按 10∶1的比例以 50 % PEG4000 进行融合。融合细胞用 HAT 培养液选择培养,杂交瘤生长后改用 HT 培养液培养,融合后 10~15 d 取上清间接 ELISA 进行筛选[5]。杂交瘤细胞的亚克隆采用软琼脂稀释法,先配制 1% 琼脂糖溶液,高压灭菌后 42 ℃预热。再用 1 份 1% 琼脂加 1 份含 20% 胎牛血清的 2 倍浓缩的 RPMI1640 配制 0.5% 琼脂配置 42 ℃保温。取 0.5% 琼脂液在室温中分别与不同浓度的细胞悬液相混合。混匀后立倾注于 24 孔板中,在室温放置使其凝固,孵育于 37 ℃、5% CO_2孵箱中。4~5 d 后即可见针尖大小白色克隆,7~10 d 后,直接移种至 24 孔中进行培养。

1.6 抗人 ALT1 单克隆抗体的鉴定

Dot-ELISA:分别将重组 ALT1 抗原和血清点样于 PVDF 膜上,1 % BSA 封闭后,相继用杂交瘤细胞培养上清和 HRP-羊抗鼠 IgG 作用,DAB 显色,商品化抗人 ALT1 单抗作为阳性对照。ALT1 mAb 特异性鉴定:用克隆化后的阳性杂交瘤细胞上清作一抗,Western blot 法检测重组蛋白与血清中经速率法鉴定含 ALT 1 的血清。杂交瘤细胞染色体分析:将克隆化后的杂交瘤细胞经秋水仙素作用后,获取杂交瘤细胞染色体中期分裂象,KCL 低渗处理细胞,Giemsa 染色后镜检。Ig 类与亚类及型鉴定按 Sigma 公司出产的抗体分型试剂盒说明进行。

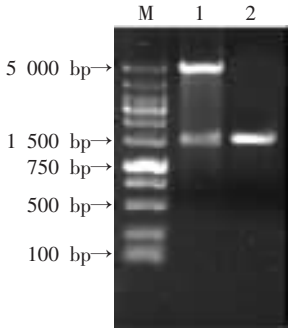
1.7 单克隆抗体体外扩大培养

取阳性杂交瘤细胞 10×10^6 腹腔注射石蜡油致敏的 BALB/c 小鼠,观察待小鼠腹部膨胀长满腹水后抽取腹水,分装,-80 ℃ 保存,备用。

2 结果

2.1 目的基因的扩增与鉴定

RT-PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳在大小约 1 500 bp 见清晰的扩增条带(图 1)。将测序正确的目的片段亚克隆到 pGEX-4T-2 载体中双酶切鉴定,于期望位置上出现目的条带(图 1),证明 alt1 基因正确克隆入 pGEX-4T-2 载体。



M:标准; 1:目的基因酶切鉴定; 2: PCR 扩增目的片段

图 1 ALT1 PCR 扩增与 *Bam*H Ⅰ、*Eco*R Ⅰ双酶切鉴定

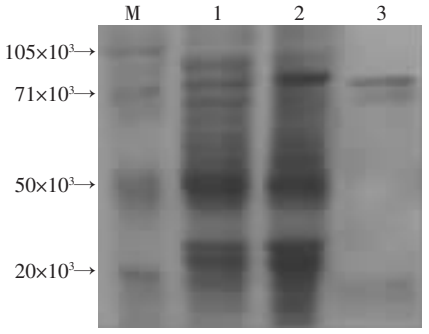
2.2 ALT1 基因融合蛋白的表达与纯化

SDS-PAGE 结果显示,转化菌经诱导后,较未诱导菌有 1 条明显增粗的蛋白条带,其相对分子质量为 81×10^3左右(图 2),与期望相符(ALT1 蛋白为 55×10^3,再加上 26×10^3左右的 GST 蛋白)。Western blot 证实 ALT1 蛋白绝大部分以包涵体形式存在,仅极少量以可溶性形式存在。

2.3 ALT1 蛋白 Western blot 鉴定及其活性测定

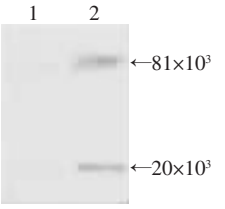
纯化后的 ALT1 重组蛋白经 Western blot 鉴定在 81×10^3出现预期目的条带,同时显示其在 20×10^3左右出现条带,Western blot 证实为目的蛋白不稳定降解所致(图 3)。同时, ALT1 重

组蛋白经奥林巴斯 AU400 全自动生化分析仪速率法测定,显示蛋白活性为 895 U/mg ,证明纯化蛋白有着较高的生物学活性。



M:标准; 1: IPTG 诱导前破菌后菌液上清; 2: IPTG 诱导后的破菌后菌液上清; 3:纯化的 ALT1 目的蛋白

图 2　ALT1 基因表达鉴定与纯化



1: BL21(DE3)空菌蛋白; 2:纯化后 ALT1 蛋白

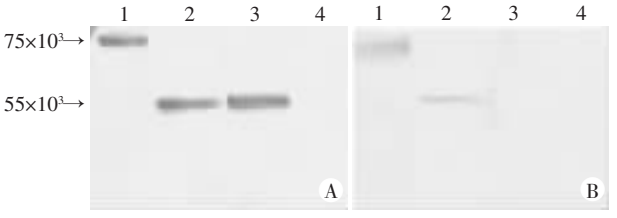
图 3　纯化蛋白 ALT1 鉴定

2.4　杂交瘤细胞系的建立

用 ALT1 作为免疫原制备杂交瘤,免疫 BALB/c 小鼠 6 只,免疫达到效价后取小鼠脾脏与 Sp2/0 进行细胞融合,从 454 个杂交瘤生长孔上清中,筛选出阳性克隆 1 个,命名为 8A9。

2.5　抗人 ALT1 单克隆抗体特性鉴定

Dot-ELISA 间接法测定显示 8A9 细胞株培养的上清与商品化抗人 ALT1 单抗均能识别免疫电泳的重组蛋白与血清中 ALT1,以细胞培养基为对照的阴性血清为阴性。以重组蛋白与血清作为抗原 Western blot 检测显示抗血清能与重组 ALT1 与临床标本中的 ALT1,结果显示血清发生免疫反应(图 4A)。以 ALT1 重组蛋白、HepG2 细胞裂解蛋白、BSA 作为抗原进行鉴定,结果显示 ALT1mAb 仅识别重组 ALT1 与 HepG2 细胞 ALT1,而不与 HepG2 细胞中 ALT2 和 BSA 发生交叉反应(图 4B)。8A9 分泌的 mAb 亚类鉴定为 IgG_2。杂交瘤细胞染色体分析交瘤细胞染色体数为 96 ~ 104,符合杂交瘤特征(图 5)。



A:ALT1mAb 特异识别血清中的 ALT1　1: ALT1mAb 识别重组 ALT1;2:ALT1mAb 识别人血清中 ALT1;3:商品化单抗识别人血清中 ALT1;4:阴性对照; B: ALT1mAb 特异识别 HepG2 中 ALT1 1:ALT1mAb 识别重组 ALT1; 2: ALT1mAb 识别 HepG2 细胞中 ALT1;3:ALT1mAb 识别 BSA;4:阴性对照

图 4　ALT1mAb Western blot 鉴定



图 5　显微镜下观察杂交瘤细胞株 8A9 核染色体　(×100)

3　讨论

长期以来,ALT 在临床上作为评价肝功能、反应肝损伤的生化指标广泛应用,但无论是传统的赖氏法还是现在普遍采用的速率法测定的都是该酶的活性,为Ⅰ与Ⅱ型谷丙转氨酶活性的总和[6]。文献[6]表明,在排除了肝病和糖尿病的人群中,仍有 2.8 % 的个体丙氨酸氨基转移酶活力升高,且主要与肥胖有关。由于肌肉、脂肪组织中富含 ALT2,从而导致有时血清总 ALT 升高并不能反映肝脏损害的真实程度。因此,有必要建立新的方法,以特异性地检测和区分这 2 种类型的丙氨酸氨基转移酶。在特异性地检测同功酶亚型的方法中,免疫学方法检测干扰因素少,更可排除标本中黄疸、脂血等因素的影响,从而成为首选。

免疫学检测方法的建立关键是要得到高特异性和高亲合力的特异性的单克隆抗体,而单克隆抗体制备的首要条件是要得到高质量的抗原。本研究采用基因工程重组表达 ALT1 抗原,采用 pGEX-4T-2 原核表达系统,实现了该蛋白的可溶性表达。在目的蛋白之前融合了谷胱甘肽 S-转移酶,目的为增加目的蛋白的可溶,促进二硫键的正确形成。谷胱甘肽 S-转移酶抗原性小,表达后可不经蛋白酶切割,在单抗筛选时可单独用该蛋白筛选去除识别 GST 的细胞株。

本研究重组表达的可溶性 ALT1 存在着一定程度的蛋白降解现象,虽曾尝试通过在裂解液中加入 PMSF、EDTA、COCKTAIL、甘油等物质及保持全程低温操作,但均未避免该蛋白的降解现象,已有文献报道该蛋白性质不稳定,容易发生降解[7]。虽然该蛋白存在一定程度上的降解,但酶活性分析依然显示出较高的催化活性,这可能与降解后蛋白仍保持着完整的功能结构域有关,同时用此重组蛋白进行 Western blot 与 ELISA 分析均可得到阳性结果,表明其仍保持着该蛋白的抗原性。

本研究通过基因工程技术获得 ALT1 重组蛋白,进而制备了鼠抗人 ALT1 mAb,获得特异性针对 ALT1 的细胞株 8A9。最终为建立以免疫反应为基础的

ALT1 检测方法奠定基础。

参考文献：

[1] Torezan-Filho M A, Alves V A, Neto C A, *et al*. Clinical significance of elevated alanine aminotransferase in blood donors: a follow-up study [J]. Liver Int, 2004, 24(6): 575 - 581.

[2] Kim W R, Flamm S L, Di-Bisceglie A M, *et al*. Serum activity of alanine aminotransferase (ALT) as an indicator of health and disease[J]. Hepatology, 2008, 47(4): 1363 - 1370.

[3] Wang C C, Lim L Y, Deubner H, *et al*. Factors predictive of significant hepatic fibrosis in adults with chronic hepatitis B and normal serum ALT[J]. J Clin Gastroenterol, 2008, 42(7): 820 - 826.

[4] Yang R Z, Blaileanu G, Hansen B C, *et al*. cDNA cloning, genomic structure, chromosomal mapping, and functional expression of a novel human alanine aminotransferase[J]. Genomics, 2002, 79(3): 445 - 450.

[5] 张 娟, 张 君, 余晓林, 等. 特异性O1群稻叶型霍乱弧菌单克隆抗体的制备、筛选及识别抗原表位的分析[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(15): 1444 - 1447.

[6] Ruhl C E, Everhart J E. Determinants of the association of overweight with elevated serum alanine aminotransferase activity in the United States[J]. Gastroenterology, 2003, 124(1): 71 - 79.

[7] Choi S, Kim D J, Choi E Y. Development of a method for the immunological measurement of aspartate aminotransferase with monoclonal antibodies[J]. Taehan Kan Hakhoe Chi, 2003, 9(2): 135 - 144.

（编辑 龙 亮）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2009)20-2004-01

体外成熟培养 - 胚胎移植技术治疗多囊卵巢综合征11例临床分析

邓志华，丘 映，谭秀群，刘 锋，谭庆英 （广西壮族自治区南宁市第二人民医院生殖中心，南宁 530031）

我中心对11例多囊卵巢综合征（polycystic ovary syndrome, PCOS）患者施行体外成熟培养 - 胚胎移植技术（*in vitro* maturation-embryo transfer, IVM-ET），初步探讨IVM的治疗价值和影响因素，现报告如下。

1 资料与方法

1.1 病例选择及准备

选择22例有ICSI助孕指征的PCOS患者行IVM或ICSI治疗，IVM组不作降调，在卵泡早期使用小剂量FSH，主导卵泡直径达10～12 mm注射HCG 10 000 IU，36 h后取卵；ICSI常规长方案降调超排卵。

1.2 卵母细胞的获取

在阴道B超引导下用16G双腔取卵针进行卵子抽吸，镜下寻找卵冠丘复合体。

1.3 体外成熟培养与受精

IVM培养系统包括：洗卵液、成熟培养液、卵裂培养液、FSH、LH、10%血清代用品。将未成熟卵母细胞置于37 ℃，5% CO_2及饱和湿度条件下培养28 h后，用0.1 % 透明质酸酶消化颗粒细胞，以第一极体排出作为成熟的标志，行ICSI受精18～20 h后出现两原核（2PN）为正常受精，每24 h观察卵裂，ICSI后第3天移植（ET）。

1.4 子宫内膜的同步准备

如注射HCG日子宫内膜厚度 <7 mm，则补充外源性雌激素6～8 mg/d，取卵后第2天起肌注黄体酮60 mg/d，ET后14 d测尿HCG阳性后继续予黄体支持。

2 结果

实施IVM周期11个，获未成熟卵123枚，成熟率为82.93%，受精率为98.04%，优胚率为39.13%，临床妊娠率为20.00%，种植率为8.33%，累计临床妊娠率为36.36%，11例患者未发生卵巢过度刺激综合征（OHSS）。

结果与11例ICSI组比较，Gn天数、用量、均少于ICSI组，有统计学意义（$P<0.05$），受精率、卵裂率无明显差异（$P>0.05$），优胚率、妊娠率、种植率、均低于ICSI组，无统计学意义（$P>0.05$），ICSI组发生2例中重度OHSS，但无统计学意义（$P>0.05$），ICSI组流产率为60.00%，IVM为0，无统计学意义（$P>0.05$）。

3 讨论

在培养时间的选择方面有人主张培养24～36 h后观察，若卵子成熟即可受精，本结果显示培养28 h可获得较理想的成熟率。IVM在平均Gn用量、天数、OHSS发生率等方面有较明显的优势。自然流产在PCOS患者中的发生率高达30% ～50%，朱亮等[1]发现减少Gn用量是降低流产率的有效手段，2组流产率比较提示超促排卵可影响卵子质量和子宫内膜而导致流产。ICSI的优胚率、种植率、临床妊娠率高于IVM与其起步晚、胞质不完全成熟、透明带变性等有关[2]。赵军招等[2]报道了与常规IVF/ICSI - ET相近的临床妊娠率，但IVM技术不能保证正常胎儿的出生和发育，其安全性仍需高度重视。

关键词： 多囊卵巢综合征；未成熟卵母细胞；体外成熟
中图法分类号： R711.605 **文献标识码：** B

参考文献：

[1] 朱 亮, 全 松, 邢福祺. 体外受精-胚胎移植后单胎妊娠自然流产相关因素分析[J]. 广东医学, 2007, 28(10): 1558 - 1560.

[2] 李洁华, 郭建军, 卞书春, 等. 多囊卵巢综合征患者脂联素变化的研究[J]. 实用临床医药杂志, 2008, 12(4): 85 - 86.

[3] 赵军招, 黄学锋, 葛红山, 等. 未成熟卵母细胞体外培养治疗不孕症的临床研究[J]. 温州医学院学报, 2007, 37(1): 56 - 59.

（编辑 王 红）

作者简介： 邓志华，女，广西壮族自治区柳州市人，主治医师，主要从事生殖医学方面的研究。E-mail：zhihuadeng009@hotmail.com
通信作者： 丘 映，E-mail：nnqying@sina.com
收稿日期： 2009-03-02；**修回日期：** 2009-05-19