DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.11.012
第26卷第11期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 11
970 2004年6月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jun. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)11-0970-03

分枝杆菌Ag85B多克隆抗体的研制

张 勇,靳风烁,李黔生,江 军,李彦锋,杨登科 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所泌尿外科,重庆 400042)

提 要:目的 在原核系统中表达并纯化GST-Ag85B融合蛋白,制备兔抗Ag85B多克隆抗体。方法 首先构建编码结核分枝杆菌Ag85B分泌蛋白的重组表达质粒pGEX-Ag85B,将此质粒转入大肠杆菌,诱导表达融合蛋白并加以纯化;然后将纯化的蛋白免疫家兔,提取家兔的抗血清,纯化制备多克隆抗体并进行鉴定。结果 成功构建了原核表达质粒pGEX-Ag85B,转化入大肠杆菌BL21中诱导表达并成功纯化,用纯化的GST-Ag85B融合蛋白成功制备了兔抗Ag85多克隆抗体。结论 制备的多克隆抗体为进一步的研究奠定了基础。

关键词:多克隆抗体;Ag85B;膀胱肿瘤;融合蛋白
中图法分类号:R378.91;R392.13 文献标识码:A

Preparation of polyclonal antibody of *Mycobacterium* antigen Ag85B

ZHANG Yong, JIN Feng-shuo, LI Qian-sheng, JIANG Jun, LI Yan-feng, YANG Deng-ke (Department of Urology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To express and purify the fusion protein GST-Ag85B, and to prepare the rabbit anti-Ag85B polyclonal antibody. Methods The recombinant prokaryotic plasmid DNA expression vector encoding *mycobacterium* tuberculosis Ag85B was constructed. Fusion protein GST-Ag85B was expressed after IPTG induction, and then isolated and purified from the total proteins of *E. coli* BL21 transformed by the recombinant plasmid pGEX-Ag85B. The polyclonal antibody was obtained by immunizing rabbits with this purified fusion protein, and the quality of the antibody was identified. Results GST-Ag85B fusion protein successfully expressed in *E. coli* and purified polyclonal antibody with high specificity was prepared. Conclusion The rabbit anti-Ag85B polyclonal antibody prepared can be used in further studies.

Key words: polyclonal antibody; Ag85B; bladder cancer; fusion protein

卡介苗(bacillus calmette-Guerin, BCG)膀胱灌注是治疗膀胱肿瘤防止其复发的最有效方法之一,但目前在治疗中存在着给药量大、疗效不确切、易导致结核播散等并发症[1],提示着必须对这一方法加以改进。Ag85B是结核杆菌的主要分泌蛋白之一,是结核杆菌的主要保护性抗原[2]。利用分枝杆菌Ag85B的免疫原性,在膀胱癌及其它肿瘤治疗中的应用研究近年来受到重视,对于这方面的研究已经陆续展开。本科室正利用Ag85B基因对膀胱肿瘤的治疗进行进一步的研究,希望找到一种治疗膀胱肿瘤的新的有效方法。而这就需要利用Ag85B的IgG抗体作为一抗对在融合蛋白内或组织里的Ag85B蛋白进行鉴定,但国内外尚少见此抗体成功制备的报道。本实验的目的就是制备这一抗体,从而为进一步的实验创造条件。

1 材料和方法

1.1 菌株及质粒

pUC18-Ag85B由山东省基础医科院医学科学研究所游力博士馈赠,表达质粒pGEX-4T-1由第三军医大学大坪医院神经内科杨清武博士馈赠,大肠杆菌BL21菌株由第三军医大学大坪医院野战外科研究所分子生物学实验室提供。

1.2 原核表达质粒pGEX-Ag85B的构建

用*Eco*RⅡ和*Sal*Ⅰ双酶切,从pUC18-Ag85B质粒上切下Ag85B基因片段,然后将该片段插入经过同样双酶切的融合表达载体pGEX-4T-1中,构建重组pGEX-Ag85B质粒。酶切及测序鉴定pGEX-Ag85B重组质粒。

1.3 融合蛋白的诱导表达

挑取含pGEX-Ag85B质粒地阳性单菌落,接入5 ml LBAMP+液体培养基中,37 ℃,200 r/min摇床培养过夜,将过夜培养菌液(A_{600}约2.0)以2%接种量转接50 ml LBAMP+液体培养基中,37 ℃,250 r/min摇床培养。5 h后监测A_{600},A_{600}达到1~1.5

作者简介:张 勇(1966-),男,安徽省合肥市人,硕士研究生,主治医师,主要从事膀胱肿瘤方面的研究。电话:(023)68757724

收稿日期:2004-01-05;修回日期:2004-04-20

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

时, 取诱导前样后, 各加入 100 mmol/L 的 IPTG 至终浓度 0.2 mmol/L, 37 ℃, 250 r/min 摇床继续培养 4 h, 取诱导后样品。菌体 200 mmol/L PBS 重悬, 液氮于室温冻融后, 用冰水浴、700 W 超声破菌, 取离心沉淀及离心上清液的 0.4 μm 膜滤液作 SDS-PAGE 电泳。

1.4　蛋白的纯化

取工程菌 200 mmol/L PBS 重悬, 液氮于室温冻融后, 用冰水浴、700 W 超声破菌, 取离心沉淀。包涵体的洗涤: 分别用含 0.1% Triton X-100 的 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液及含 3 mol/L 尿素的 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 值均为 8.0), 洗涤包涵体, 取样品作 SDS-PAGE 电泳检测。包涵体的变性及复性: 用 8 mol/L 尿素溶解包涵体, 室温放置 1 h, 加 9 倍体积的(50 mmol/L KH_2PO_4 pH 7.0, 1 mmol/L EDTA pH 8.0, 50 mmol/L NaCl, 2 mol/L 还原性谷胱甘肽, 1 mmol/L 氧化性谷胱甘肽), 室温放置 30 min, 用 KOH 保持 pH 到 10.7。用 HCl 调至 pH 8.0, 最少在室温放置 30 min。10 000 r/min、室温离心 15 min。取样品作 SDS-PAGE 电泳检测。

1.5　多克隆抗体的制备

将纯化的 GST-Ag85B 融合蛋白作为抗原, 在与不完全福氏佐剂乳化后, 背部多点免疫家兔共 4 次, 抽取家兔的抗血清。用饱和硫酸铵盐析法粗提 Ig 多克隆抗体, QAE-SephadexA25 离子交换法进一步纯化抗体: 取离子交换剂 QAE-SephadexA25 在 0.05 mol/L pH 7.5～8.6 的磷酸盐缓冲液中平衡后, 加入盐析法粗提的球蛋白, 在室温 30 min 后, 离心取得上清液。上清液再如此处理 1 次, 即获得纯化的 IgG。

1.6　酶联免疫测定(ELISA)鉴定抗体

将纯化的 GST-Ag85B 融合蛋白加入塑料微孔板中, 每孔 200 μl, 同时将第 1 孔只加包被液作为空白对照, 另用正常的兔血清作阴性对照。然后于 4 ℃过夜。次日取出培养板, 弃去孔内抗原包被液, 用 0.02 mol/L 的 PBS-T 洗 3 次, 每次间隔 3 min(3 min×3 次)。每孔加 0.3 ml 封闭液(以加满各孔为原则), 37 ℃水浴中放置 60 min, 以阻断内源性过氧化物酶。从水浴中取出后倒空封闭液, 再用 PBS 洗 3 次, 每次 3 min。每孔加入 100 μl 纯化的 GST-Ag85B 融合蛋白多克隆 Ig 抗体(一抗), 4 ℃过夜。次日将待测物空干, 用洗涤液洗 3 次, 每次 3 min。每孔加用酶标抗体稀释液稀释到 1∶1 000 的辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG(二抗) 100 μl, 37 ℃孵育 60 min, 用洗涤液洗 5 次, 每次 3 min。每孔加新鲜配制的 100 μl 底物溶液(显色液), 置 37 ℃暗处反应 30 min。取出后每孔加 100 μl 2 mol/L H_2SO_4, 终止反应, 放于酶标分光光度计测 A 值(波长 492 nm)。

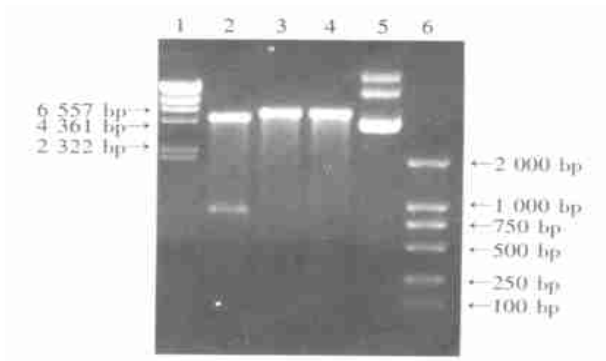
1.7　Western-blot 鉴定融合蛋白 Ag85B/IL-2

先配制 8%的分离胶和 5%的积层胶, 进行 SDS-PAGE 电泳, 再电转印至聚偏氟乙烯膜(PVDF 膜), 5%脱脂奶粉封闭 PVDF 膜 2 h, 用纯化的 Ag85B 多克隆抗体作为一抗室温孵育 2 h, 用辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔 IgG 作为二抗室温孵育 2 h。加入新鲜配制的 OPD-H_2O_2 底物溶液(显色液)置 37 ℃暗处反应 30 min 后, 加 2 mol/L H_2SO_4, 终止反应。

2　结果

2.1　原核表达质粒 pGEX-Ag85B 的构建

Ag85B 基因片段及线性化 pGEX-4T-1 质粒胶回收后, 将 Ag85B 基因连入线性化 pGEX-4T-1 质粒, 并转化宿主菌。取 100～200 μl 涂于含 Amp (100 μg/ml)的 LB 固体培养基的培养皿中。37 ℃培养过夜(12～18 h)后, 有 10 余个菌落生长。挑取单菌落, 提取少量质粒 DNA, 经 *Eco*RⅠ、*Sal*Ⅰ酶切鉴定, 两片段大小均与预期一致(图 1)。经 DNA 测序显示读框正确, 重组质粒 pGEX-4T-1-Ag85B 构建成功。



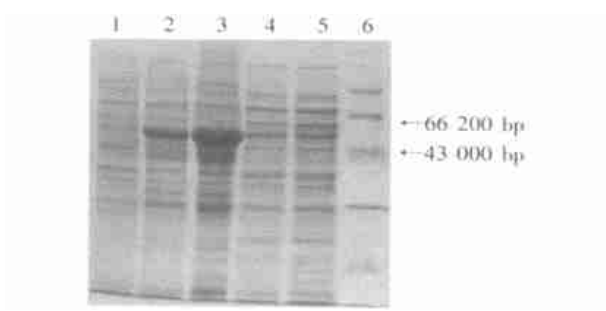
1: *Hind*Ⅲ Marker; 2: pGEX-Ag85B plasmid DNA+ *Eco*RⅡ-*Sal*Ⅰ; 3: pGEX-Ag85B plasmid DNA+ *Eco*RⅡ; 4: pGEX-Ag85B plasmid DNA+ *Sal*Ⅰ; 5: pGEX-Ag85B plasmid DNA; 6: DL2000 Marker

图 1　融合表达载体 **pGEX-Ag85B** 的酶切鉴定

Fig 1　Enzyme identification of pGEX-Ag85B

2.2　蛋白的表达及纯化

将 pGEX-Ag85B 重组质粒转化 BL21, 将阳性菌落摇床培养后, 用 IPTG, 37 ℃诱导表达, 菌体 200 mmol/L PBS 重悬, 液氮于室温冻融后, 用冰水浴、700 W 超声破菌, 取离心沉淀及离心上清液的 0.4 μm 膜滤液作 SDS-PAGE 电泳。结果表明, 转化的菌株在约 56×10^3 处出现 1 条明显的蛋白条带, 与预期结果一致, 而目的蛋白质主要存在于沉淀中, 有少量可溶存在于上清滤液中(图 2)。



1: Puified GST-Ag85B; 2: Washed inclusion body; 3: Supernatant of induced pGEX-Ag85B; 4: Inclusion body of induced pGEX-Ag85B; 5: pGEX-Ag85B without induction; 6: Induced pGEX-Ag85B

图 2　蛋白的表达及纯化

Tab 2　Expression and purification of the protein

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

2.3 ELISA 鉴定多克隆抗体

首先用肉眼观察，同时加入抗原和一抗的反应孔颜色变深呈黄白色而其它反应孔的颜色无明显变化。以纯化的 GST-Ag85B 融合蛋白及两个阴性对照为 X 轴，A_{490} 值为 Y 轴。可见 GST-Ag85B 融合蛋白随蛋白含量的减少，A_{492} 值逐渐减小，而两个阴性对照的 A_{492} 值 A_{492} 值变化不大。二者比值大于 2.1，说明 GST-Ag85B 融合蛋白能和纯化的多抗反应，而两个阴性对照不能被该抗体识别，该抗体具有较好的特异性。

2.4 Western-blot 鉴定融合蛋白 Ag85B/IL-2（图 3）

Ag85B/IL-2 融合蛋白是由本科杨登科博士制备，用于治疗膀胱肿瘤的研究。将 Ag85B/IL-2 融合蛋白经 SDS-PAGE 电泳后，电转印至 PVDF 膜，用本实验所制备的 Ag85B 多克隆抗体作为一抗，利用 OPD-H_2O_2 显色，呈现清晰的阳性反应条带，说明制备的 GST-Ag85B 融合蛋白多克隆抗体能有效识别 Ag85B/IL-2 融合蛋白。



图 3 Western-blot 鉴定融合蛋白 Ag85B/IL-2

Tab 3 Identification of fusion protein Ag85B/IL-2 by Western-blotting

3 讨论

Ag85B（antigen85B）是结核杆菌 Ag85 复合物的主要成分之一。Ag85B 很容易结合于人纤维连接蛋白[3,4]，抵抗结核杆菌再感染的能力优于 BCG[5,6]，它可诱导 PPD 阳性健康人群外周血单个核细胞分泌高水平的 IFN-γ，而活动期肺结核患者的外周血单个核细胞分泌的 IFN-γ 水平极低，这也进一步表明 Ag85B 是机体的保护性靶抗原[7]。有学者利用 Ag85B cDNA 构建了小鼠膀胱肿瘤疫苗[8]；还有人将小鼠的 IL-2 基因插入 Ag85B 序列中，构成的融合基因，然后转化入 BCG，构建重组 BCG（rBCG-Ag85B/IL-2）。它能分泌 Ag85B/IL-2 融合蛋白，以治疗膀胱肿瘤[9]。这些动物实验的结果都显示了其对膀胱肿瘤的良好疗效。

本实验利用家兔制备多克隆抗体的原因主要是：①多克隆抗体具有敏感性高、稳定性好等优点，此技术经过长期实践已经发展得相当成熟可靠，多种诊断试剂盒均采用此种抗体，在临床诊断、免疫学鉴定等方面已获得广泛的应用；②在后期实验中应用的动物模型（膀胱移行细胞癌）一般均为小鼠，因此制备的抗体要为非鼠源性的，而单克隆抗体（包括基因工程抗体）一般均为鼠源性的，所以不宜采取这种方法制备此抗体。

虽然进行 Western-blot 鉴定直接用兔抗血清即可，但在标记的免疫测定或其他技术中将特异性抗体纯化出来，是非常重要的。例如在 ELISA 中，用于包被的抗体用特异性 IgG，才能得到良好的效果。这是因为全血清中有大量非抗体蛋白，如白蛋白、α_1 和 α_2 球蛋白等，如不除去，会干扰包被。

本实验成功制备了高纯度的 Ag85B 多克隆抗体，初步应用效果满意，为 Ag85B 与膀胱肿瘤的研究奠定了基础，为进一步的研究创造了良好的条件。

参考文献：

[1] 吴阶平，马永江. 实用泌尿外科学[M]. 北京：人民军医出版社，1991. 249.

[2] Wilker H G, Harboe M. The antigen 85 complex: a major secreted product of M. tuberculosis[J]. microbp Rev, 1992, 56(10), 648.

[3] Nagai S, Wiker H G, Harboe M, *et al*. Isolation and partial characterization of major protein antigens in the culture fluid of mycobacterium tuberculosis[J]. Infect Immun, 1991, 59(1): 372—382.

[4] Wiker H G, Sletten K, Nagai S, *et al*. Evidence for three separate genes encoding the proteins of the mycobacterial antigen 85 complex[J]. Infect Immun, 1990, 58(1): 272—274.

[5] Horwitz M A, Lee B W, Dillon B J, *et al*. Protective immunity against tuberculosis induced by vaccination with major extracellular proteins of Mycobacterum tuberculosis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92: 1530—1534.

[6] Sinha R K, Verma I, Khuller G K, *et al*. Immunobiological properties of a 30 kDa secretory protein of Mycobacterium tuberculosis H37Ra[J]. Vaccine, 1997, 15(6-7): 689—699.

[7] Torres M, Herrera T, Villareal H, *et al*. Cytokine profiles for peripheral blood lymphocytes from patients with active pulmonary tuberculosis and healthy house hold contacts in response to the 30-kilodalton antigen of Mycobacterium tuberculosis[J]. Infect Immun, 1998, 66(1): 176—180.

[8] Kuromatsu I, Matsuo K, Takamuta S, *et al*. Induction of effective antitumor immune responses in a mouse bladder tumor model by using DNA of an alpha antigen from mycobacteria[J]. Cancer Gene Ther, 2001, 8(7): 483—490.

[9] Yamada H, Matsumoto S, Matsumoto T, *et al*. Murine IL-2 secreting recombinant Bacillus Calmette-Guerin augments macrophage-mediated cytotoxicity against murine bladder cancer MBT-2[J]. J Urol, 2000, 164(2): 526—531.

（编辑 刘洪娥）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net