DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.11.026
第24卷第11期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 11
2002年11月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Nov. 2002

文章编号:1000-5404(2002)11-1307-03

论著

重组LBP真核表达载体免疫制备兔抗人LBP抗体的研究

李永旺,麻 莉,张德明,毛宝龄,钱桂生,徐剑铖,侯 一峰 (第三军医大学附属新桥医院全军呼吸内科研究所,重庆 400037)

提 要:目的 制备兔抗人脂多糖结合蛋白(LBP)多抗,并研究其生物学特性。方法 用LBP基因的真核表达载体pEFBOS-LBP作为抗原免疫制备兔抗人LBP的抗血清。用饱和硫酸铵盐析纯化后,通过ELISA检测抗体的效价;Western blot鉴定其特异性;流式细胞术观察LBP及其抗体对荧光标记脂多糖(LPS)与单核细胞结合的影响;ELISA检测LBP及其抗体对LPS诱导肺泡巨噬细胞分泌TNFα的影响。结果 用LBP基因免疫制备的兔抗LBP多抗与LBP具有良好的结合活性;有较高的效价;LBP增强LPS与单核细胞结合的作用能被该抗体阻断;LBP增强LPS诱导肺泡巨噬细胞分泌TNFα的作用也能被该抗体阻断。结论 用LBP基因免疫制备的兔抗人LBP多抗具有较好的生物学特性。

关键词:脂多糖结合蛋白;抗体;脂多糖
中图法分类号:R392.11;R392—33 文献标识码:A

Preparation of rabbit anti-human LBP polyclonal antibody with recombined LBP eukaryotic expression vector

LI Yong-wang, MA Li, ZHANG De-ming, MAO Bao-ling, QIAN Gui-sheng, XU Jian-cheng, HOU Yi-feng (Institute of Respiratory Diseases of PLA, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To prepare rabbit anti-human lipopolysaccharide binding protein(LBP) polyclonal antibody and study its biological characteristics. Methods The eukaryotic expression vector pEFBOS—LBP was used as antigen to immunize rabbit to prepare antiserum against human LBP. The antiserum was purified by precipitation with ammonium sulphate and its titer tested by ELISA, its specificity identified by Western blot. The effect of LBP and anti LBP antibody on the binding of lipopolysaccharide(LPS) to mononuclear cells was observed by flow cytometry, and the effect of LBP and anti LBP antibody on TNFα secretion of alveolar macrophage induced by LPS was tested by ELISA. Results Rabbit anti-human LBP ploy clonal antibody prepared with LBP gene was of good binding activity to LBP and of higher titer and could block the effect of LBP. Conclusion Rabbit anti human LBP polyclonal antibody prepared by using LBP gene possesses good biological characteristics.

Key words: lipopolysaccharide binding protein; lipopolysaccharide; antibody

脂多糖结合蛋白(Lipopolysaccharide binding protein, LBP)是肝细胞分泌的Ⅰ型急性期反应蛋白,其对内毒素(Lipopolysaccharide, LPS)所致炎症反应的放大作用是导致过度全身炎症反应的重要原因之一;LPS所致过度全身炎症反应首先在肺部表现为急性肺损伤(Acute lung injury, ALI)。为了解LBP在内毒素所致急性肺损伤中的作用,我们利用重组的LBP真核表达载体免疫制备了兔抗人LBP多抗,并对其生物学特性进行了研究。

1 材料和方法

1.1 主要材料

纯种新西兰白兔由本校实验动物中心提供。LPS、FITC-LPS购自Sigma公司。重组人LBP(rhLBP)购自晶美公司,含有人LBP全长cDNA的质粒pGEMLBP为我所保存。pEFBOS真核表达载体由日本Saga医学院的Kensuke Miyake博士惠赠。*Xho*Ⅰ酶、*BamH*Ⅰ酶、质粒抽提试剂盒、PCR产物纯化试剂盒购自Promega公司。Western bloting检测试剂盒(博士德)。HRP标记的羊抗兔IgG(中山公司)。TNFα ELISA试剂盒(北京邦定公司)。

1.2 LBP真核表达载体的构建

根据文献[1]报道的人LBP基因序列设计合成一对引物,上游引物为:5′-gatctcgagTGCACTGGGAATCTAGGA-3′,含有*Xho*Ⅰ酶切位点;下游引物为:5′-gatggatccATCAAACTCTCATGTATTGG-3′含有*BamH*Ⅰ酶切位点。以质粒pGEMLBP为模板进行PCR扩增,产物经PCR纯化试剂盒回收,纯化。将纯化后的LBP基因经*Xho*Ⅰ酶和*BamH*Ⅰ酶双酶切后,定向插入pEFBOS真核表达载体的相同位点,得到重组真核表达载体pEFBOS-LBP。用质粒抽提试剂盒大量制备pEFBOS-LBP质粒。

1.3 抗LBP多抗的制备及初步纯化

以pEFBOS-LBP质粒作为抗原,在雄性新西兰白兔两侧股四头肌肌内各注射50 μg质粒DNA。2周后,用相同剂量质粒对兔进行加强免疫注射。2周后再加强免疫注射1次。第2次加强注射后10 d,从兔耳缘静脉处放血,置4 ℃冰箱过夜。吸取血清以5 000× *g*离心10 min,去除残留的红细胞及其它碎片。取50 ml血清加等量生理盐水混匀,在电磁搅拌下缓慢加入饱和硫酸铵(pH 7.4)100 ml,于4 ℃放置1 h。于4 ℃以4 500 r/min离心30 min,弃上清。沉淀加生理盐水溶解后补足至

基金项目:国家自然科学基金重点资助项目(39730210)
作者简介:李永旺(1971—),男,河南省确山县人,博士,主治医师,主要从事ARDS方面的研究。电话:(023)68755320
收稿日期:2002-04-17;修回日期:2002-06-18

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

50 ml，在电磁搅拌下缓慢加入饱和硫酸铵 25 ml，4 ℃放置 1 h。于 4 ℃再以 4 500 r/min 离心 30 min，弃上清。沉淀加 10 ml 生理盐水溶解，装入透析袋中，对流动自来水透析 40 min，再对生理盐水透析 24 h。中间换液 3～4 次。浓缩至 10 ml，于－20 ℃保存备用。

1.4 抗体效价的测定

ELISA 检测经初步纯化的抗 LBP 多抗的效价。抗原为 rhLBP，二抗为 HRP 标记的羊抗兔 IgG，抗 LBP 多抗按 $1:10^2$、$1:5\times10^2$、$1:10^3$、$1:5\times10^3$、$1:10^4$、$1:5\times10^4$、$1:10^5$、$1:5\times10^5$、$1:10^6$ 用封闭液稀释，以正常兔血清作为抗体的阴性对照，以 PBS 作为空白对照。具体操作步骤按文献[2]进行。最后用 TMB 显色液显色，H_2SO_4 终止反应。450 nm 波长下，用酶标仪测定每孔吸光度值，样品 A_{450}≥阴性对照 A_{450} 二倍以上者，判定为阳性。

1.5 纯化 LBP 多抗的 Western-blot 分析

rhLBP 经 8% SDS-PAGE 后，转移至 NC 膜上，经氨基黑染液染色证实转膜成功后，用防水笔标出分子量 Marker 所在的位置，然后洗去氨基黑染液。余下步骤按 Western bloting 检测试剂盒说明书进行。

1.6 抗 LBP 多抗的活性检测

参照文献[3]的方法，通过观察荧光标记的 LPS(FITC-LPS)与外周血单核细胞(PBMC)的亲和力，测定抗 LBP 多抗的活性。淋巴细胞分离液分离人 PBMC 后，用 1640 培养液将细胞数调整为 1×10^6/ml 并置入 1 ml 的 EP 管中。分别加入 FITC-LPS(1 μg/ml)、FITC-LPS(1 μg/ml)＋rhLBP(10 μg/ml)和 FITC-LPS(1 μg/ml)＋rhLBP(10 μg/ml)＋LBP 多抗(100 μg/ml)；另设一对照(不加任何因素)以测定细胞自身的荧光强度。37 ℃孵育 2 h，PBS 漂洗 2 次，流式细胞仪检测每份标本 10 000 个 PBMC 表面的平均荧光强度。

1.7 肺泡巨噬细胞分泌 TNFα 的变化

通过肺泡灌洗获得正常人肺泡巨噬细胞。通过离心(4 ℃，1 200 r/min 离心 10 min)肺泡灌洗液获得细胞，用 1640 培养液(含 10%胎牛血清、50 U/ml 青霉素和 50 mg/ml 链霉素)重悬细胞，用 96 孔培养板(调整细胞密度为 1×10^5/孔)于 37 ℃，5% CO_2 孵箱中培养 2 h，获取贴壁的单层肺泡巨噬细胞。PBS 漂洗 2 次，随机分为正常对照组、LPS(1 μg/ml)组、LPS(1 μg/ml)＋rhLBP(10 μg/ml)组和 LPS(1 μg/ml)＋rhLBP(10 μg/ml)＋LBP 多抗(100 μg/ml)组。加入上述 1640 培养基于 37 ℃，5% CO_2 孵箱中培养 2 h 后，夹心 ELISA 检测培养上清中 TNFα 的含量，具体步骤按照试剂盒说明书进行。

1.8 统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 t 检验。

2 结果

2.1 真核表达载体(pEFBOS-LBP)的构建和酶切鉴定

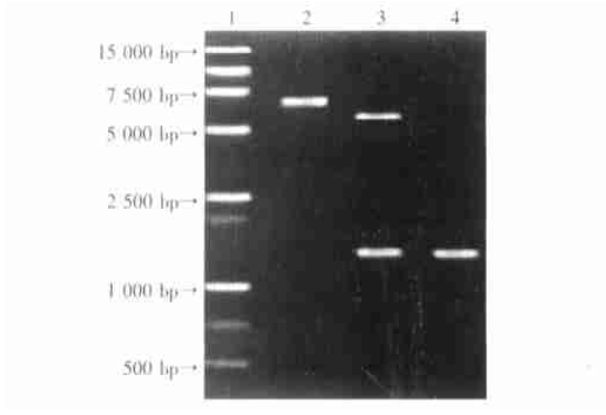
从 pGEMLBP 质粒中扩增出的 LBP 基因长度为 1.5 kb，与理论值相符。构建的载体 pEFBOS-LBP 经 XhoI/BamH1 双酶切后电泳，琼脂糖凝胶中出现两条 DNA 带，分别位于 5.5 kb(pEFBOS)处及 1.5 kb(LBP)处，见图 1。

2.2 抗 LBP 多克隆抗体效价的确定

ELISA 分析抗 LBP 多抗的效价达到 $1:10^5$。用 ELISA 检测抗体效价的结果见图 2。

2.3 抗 LBP 多抗的特异性分析

将制备的兔抗人 LBP 多抗进行 Western blot 分析的结果表明，与 rhLBP 作用后，在分子量为 60 000 处有 1 条显著的显色带，且非特异性条带较少，说明特异性和纯度都较好，见图 3。



1：DNA Marker DL2000＋15000；2：pEFBOS-LBP/BamH1 digested(7.0 kb)；3：pEFBOS-LBP/*Xho* Ⅰ and *BamH* Ⅰ digested(5.5 kb＋1.5 kb)；4：PCR product

图 1 质粒 pEFBOS-LBP 酶切鉴定图谱

Fig 1 Restriction endonuclease map of plasmid pEFBOS-LBP

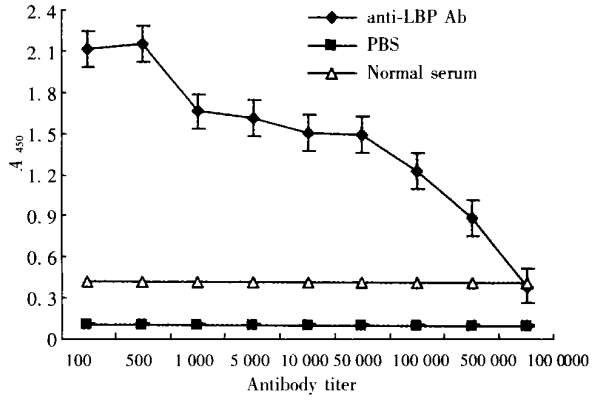
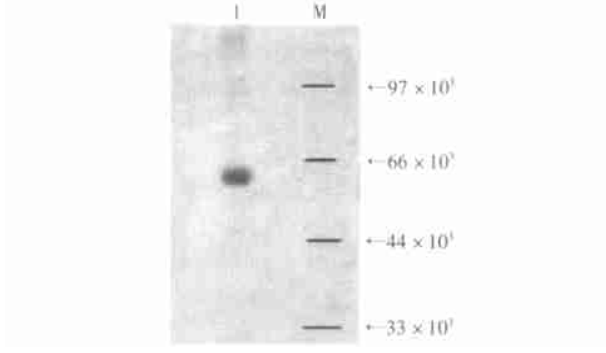


图 2 ELISA 检测抗 LBP 抗体的效价

Fig 2 Titer of anti-LBP polyclonal antibody detected by ELISA



1：rhLBP；M：protein marker

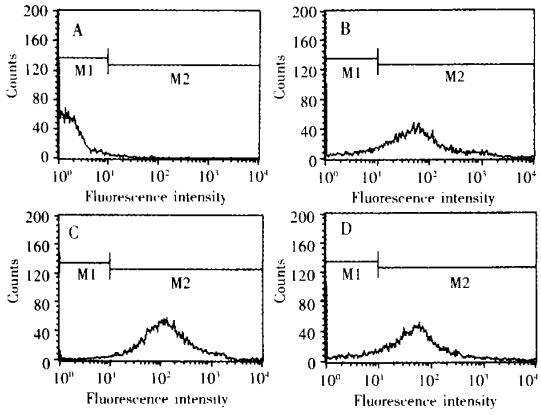
图 3 抗 LBP 多抗的 Western blot 分析

Fig 3 Analysis of anti－LBP polyclonal antibody by Western blot

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

2.4　抗 LBP 多抗活性分析

rhLBP 能明显增强 FITC-LPS 与 PBMC 的结合, 而抗 LBP 多抗能阻断其效应。图 4 为 FITC-LPS 与 PBMC 结合的流式细胞仪测定结果, 由图中可见, B、C、D 组与 A 组相比细胞表面荧光强度显著增强, C 组与 B 组相比荧光强度亦显著增强, 而 D 组与 C 组相比荧光强度受到显著抑制, 见表 1。



A: Control group; B: LPS group; C: LPS+rhLBP group; D: LPS+rhLBP+anti-LBP antibody group

图 4　FITC-LPS 与外周血单个核细胞的结合

Fig 4　Binding of FITC-LPS to PBMC

表 1　外周血单个核细胞与 FITC-LPS 结合后的表面荧光强度变化($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Changes of surface fluorescence intensity of PBMC after being binded by FITC-LPS ($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

Group	Control	LPS	LPS+rhLBP	LPS+rhLBP+anti-LBP
Fluorescence intensity	55.16±7.67	44.83±8.65 *▲	166.33±9.17 *	139.16±18.19 *▲

*: $P<0.001$ *vs* Control; ▲: $P<0.01$ *vs* LPS+rhLBP

2.5　抗 LBP 多抗及 rhLBP 对 LPS 诱导肺泡巨噬细胞分泌 TNFα 的影响

rhLBP 能明显增强 LPS 诱导肺泡巨噬细胞分泌 TNFα, 而抗 LBP 抗体能拮抗它的作用, 见表 2。

表 2　肺泡巨噬细胞培养上清中 TNFα 的含量变化($n=8$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Content of TNFα in the culture medium of alveolar macrophage ($n=8$, $\bar{x}\pm s$)

	TNFα (pg/ml)
Control	334.17±97.17
LPS	1 076.16±138.88 *
LPS+rhLBP	1 792.66±161 △
LPS+rhLBP+anti-LBP	1 103.66±115.11 *

*: $P<0.01$ *vs* Control; △: $P<0.01$ *vs* LPS

3　讨论

内毒素血症及由此引起的中毒性休克、全身炎症反应综合征(SIRS)和多器官功能障碍综合征(MODS)是病人感染死亡的重要原因。LPS 是该类疾病的主要致病原, 尽管抗生素在临床上得到广泛应用, 但其危害并没有得到有效控制。由 LPS 介导→细胞激活→介质释放→SIRS→MODS 是革兰阴性菌感染、内毒素血症导致 MOF 的基本途径, 而 LPS 介导的细胞激活有赖于 LBP 的参与[1-4]。在 LPS 所致炎症反应中, 肺脏往往是最易受侵害的靶器官。研究 LBP 在 LPS 所致急性肺损伤中的作用, 可为临床感染后内毒素引发的防治难题探索新的防治对策。但由于人 LBP 抗原的获得较为困难, 因此我们用 LBP 基因的真核表达载体作为抗原免疫制备兔抗人 LBP 多抗。与传统抗原相比, 基因抗原具有独特的优越性, 首先, 能模拟活疫苗, 有良好的免疫原性, 基因免疫后, 蛋白质抗原在宿主细胞内表达, 其加工处理过程与病原的自然免疫过程相似, 因此, 可表达出与病原体相似的抗原; 其次, 具有免疫持续性, 可获长期免疫力, 避免蛋白质抗原反复加强免疫的繁琐; 其三, 对一些难纯化的抗原可直接利用其基因在体内表达, 省略了蛋白纯化分离的工作[5]。本实验用 LBP 基因制备出的抗 LBP 多克隆抗体效价达 $1:10^5$ (ELISA), 充分说明用 LBP 基因作为抗原免疫制备抗体是可行和高效的。经 Western-blot 鉴定表明, 制备的抗 LBP 多抗能检出重组的人 LBP 蛋白, 说明具有很好的特异性, 且具有较高的纯度。通过观察荧光标记的 LPS(FITC-LPS)与外周血单个核细胞(PBMC)的亲和力, 并通过研究抗 LBP 多抗及 rhLBP 对 LPS 诱导肺泡巨噬细胞分泌 TNFα 的影响, 结果发现抗 LBP 多抗能拮抗 LBP 对 LPS 所致炎症反应的增敏作用。由于肺泡巨噬细胞是肺脏防御病原微生物的第一道防线, 在急性肺损伤的发病中承担着重要角色[6], 而 TNFα 又是内毒素血症发病过程中的主要细胞因子之一, 因此我们选用肺泡巨噬细胞和 TNFα 作为研究对象具有重要的实际意义。以上研究结果为进一步研究 LBP 在内毒素所致急性肺损伤中的作用奠定了基础。

参考文献:

[1] Schumann R R, Leong S R, Flaggs G W, *et al*. Structure and function of lipopolysaccharide binding protein[J]. Science, 1990, 249(4 795): 1 429-1 431.

[2] 陈　胜, 邬堂春, 海　涛, 等. 用酶联免疫吸附法测定血浆 HSP70 抗体滴度[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 1999, 17(2): 100-101.

[3] Gallay P, Carrel S, Glauser M P, *et al*. Purification and characterization of murine lipopolysaccharide binding protein[J]. Infect Immun, 1993, 61(2): 378-383.

[4] Calandra T. Pathogenesis of septic shock: implications for prevention and treatment[J]. J Chemother, 2001, 13(1): 173-180.

[5] 马大龙 主编. 生物技术药物("863" 生物高技术丛书)[M]. 北京: 科学出版社, 2001. 72-84.

[6] Lee P T, Holt P G, McWilliam A S. Role of alveolar macrophages in innate immunity in neonates: evidence for selective lipopolysaccharide binding protein production by rat neonatal alveolar macrophages[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2000, 23(5): 652-661.

(编辑　陈聪连)

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