DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.01.019
第24卷第1期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 1
2002年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2002

文章编号:1000-5404(2002)01-0043-04

论著

细胞膜表面标志CD系列抗体蛋白芯片制备及应用的研究

王 燕[1],刘 昕[1],缪金明[2],申大忠[3],杨梦苏[4] ([1]第三军医大学基础医学部分子遗传学教研室,重庆 400038;[2]上海第一医科大学瑞金医院,上海 200025;[3]山东大学化学学院,济南 250000;[4]香港城市大学生物化学系)

提 要:目的 本研究利用抗原抗体免疫反应的原理,研制一种可同时快速检测多种蛋白的蛋白芯片,用于细胞膜表面抗原的检测。方法 将抗细胞表面标志CD抗原的CD系列抗体蛋白固定在醛基玻片上形成微阵列,从样品细胞中抽提膜蛋白抗原并用FSE标记,然后与固定在芯片上的CD抗体阵列反应,扫描仪检测反应结果。结果 本研究选用HL-60、K562、NB4、Jurkat细胞株为代表,测定到细胞膜表面蛋白质CD抗原HL-60、K562、NB4、Jurkat细胞CD13均为阳性,HL-60、NB4、Jurkat细胞CD4阳性,NB4细胞CD38阳性,K562细胞CD7阳性。所得结果与免疫印迹及免疫组织化学验证等方法一致。结论 HL-60、K562、NB4、Jurkat细胞膜表面蛋白质CD抗原有差异。蛋白芯片方法具有的高信息通量、低成本、制备、测定快速简单的优点,展示了良好的应用前景。

关键词:CD抗体;膜蛋白;蛋白芯片
中图法分类号:R318;TP212.3 文献标识码:A

Preparation and application of protein microarray for CD series antibodies

WANG Yan, LIU Xin, MIAO Jing-ming, SHEN Da-zhong, YANG Meng-su (Department of Molecular Biology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** Based on antibody-antigen reaction to develop protein microarrays for high throughput, rapid detection of multi-proteins on cellular membrane surface. **Methods** Four types of cell lines, HL-60, K562, NB4 and Jurkat were used in this study. The antibodies for CD series were spotted on the aldehyde slide to form microarrays. The cell membrane proteins were isolated and labeled with FSE fluorescence so that the fluorescence signals could be scanned with chip scanner and analyzed after the proteins were captured by immobilized antibodies. The results from protein microarrays were compared with those with Western blot and cell immunohistochemistry. **Results** With the protein microarrays, HL-60, Jurkat, NB4 and K562 cells were all proved positive to CD13, the former 3 cell lines also showed CD4 positive, and NB4 and K562 cells had positive reaction with CD38 and CD7 antibodies respectively. All of these were identical with the results by Western blot and cell immunohistochemistry. **Conclusion** The technique of protein microarray is a rapid, simple, low cost and high-throughput approach for detecting the CD series on cell membrane.

Key words: CD antibody; cell membrane protein; protein microarray

生物芯片是近几年发展起来的用于分析DNA多态性,DNA测序,蛋白表达等的一种大规模集成化,简单快速的分析方法,其广泛用于基础研究,疾病诊断等领域。现在全世界许多生物芯片公司从事不同生物芯片的研究与开发,且大多为DNA芯片[1~3]。基因表达的最终产物是蛋白质,用于检测蛋白质的方法如ELISA,放射免疫方法,Westernblot,存在操作繁杂,所需时间长,同位素污染等。蛋白芯片又称蛋白质微阵列(Protein Microarray),它是继基因芯片之后,作为基因芯片功能的补充发展起来的。与基因芯片概念类似,它是在一个基因芯片大小的载体上,点布高密度不同种类的蛋白质,然后再用标记了荧光染料的已知抗体或配体等与待测样本中的抗体或配体一起同芯片上蛋白质竞争结合,在扫描仪上读出荧光强弱,计算机分析计算出待测样本结果。在此基础上可发展到对各种蛋白质、抗体以及配体的检测,弥补了基因芯片检测的空缺。最近,德国科学家Lueking领导的小组率先利用机械手将基因工程生产的92种不同种类的人体蛋白质点印在聚二氟亚乙烯的滤片上,用相应的单克隆抗体测试,得到很好的结果。此后不久,Schraml实验室又将蛋白质芯片改进在与普通的96孔酶联免疫板同样的聚四氟乙烯板中进行。而用于蛋白微阵列的介质则都是以膜为介质,如PVDF膜,NC膜等,这些膜都存在着易脆,不易操作,因而限制了蛋白微阵列的大规模点样,从而也限制了它的应用。我们在成功完成DNA芯片制作的基础上,根据蛋白质的特性,设想用蛋白质的氨基端(HN2)固定在经醛基处理的玻璃片上,在玻片上进行抗原抗体反应,以期望得到象DNA芯片简单,准确,快速,平行,高通量的结果。在淋巴细胞的表面因细胞分类不同,其表面所有的CD抗原也存在着差异。本研究选用CD系列抗体,制备CD抗体微阵列,用于观察HL-60,K562,NB4,Jurkat肿瘤细胞株细胞膜表面的CD抗原的表达。

1 材料与方法

1.1 CD系列单克隆抗体

CD系列单克隆抗体CD1,CD2,CD3,CD4,CD5,CD7,CD8,CD10,CD13,CD14,CD16,CD19,CD22,CD23,CD25,CD34,CD38,CD41,CD56,Kappa,Lambada,MPO,NSE,Nkcell marker plasma cell mark,(一Tubulin购自Neomarkers公司;细胞株:HL-60,K562,Jurkat,NB4为本室保存;醛基玻片购自CEL Associates公

作者简介:王 燕(1961—),女,江苏省金坛县人,博士,副教授,主要从事分子遗传学方面的研究,发表论文5篇。电话:(023)68752257

收稿日期:2001-09-28;修回日期:2001-12-06

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

司; cyanoborodehydride coupling buffer (CCB), fluorescein succinimidyl ester(FSE)购自 Sigma 公司; RPMI 1640, 胎牛血清购自 GBICO 公司; 辣根过氧化酶标记的羊抗鼠抗体, FITC(fluorescein-isothiocyante 标记的羊抗鼠及羊抗兔 IgG 购自公司; PVFD 膜购自 Millipore 公司; SephadexG-25 购自 Pharmacira 公司。

1.2 CD 单克隆抗体的固定

常规方法对 CD 系列抗体进行纯化[4]。并用 Bradfood 法测定抗体浓度, 使抗体浓度在 200 μg/ml, 取 1 μl(20 ng)抗体蛋白与 1 μl 点样缓冲液(0.5 mol/L 乙醇胺+CCB+0.1 mol/L 醋酸钾, 1∶1∶1 混合液)混匀, 将抗体蛋白点在醛基玻片上, 每个抗体蛋白重复 4 点, 同时在 CD 抗体阵列中加 4 个重复点的牛血清白蛋白(40 ng)做阴性对照和 4 个重复点的 FITC 标记的 IgG 做 Marker 标记, 室温下自然干燥 48 h 后, 4 ℃保存。

1.3 CD 蛋白微阵列固定的检测

用 5 μg/ml FSE 荧光素对 CD 抗体微阵列室温下避光直接染色 2 h, 0.01 mol/L PBS 缓冲液(pH 7.2)冲洗, 分别用 FITC 标记的羊抗鼠和羊抗兔 IgG(FITC 标记的 IgG 稀释度为 1∶200), 取 10 μl 滴在抗体微阵列区, 加盖玻片室温下避光反应 2 h, 0.01 mol/L PBS(pH 7.2)冲洗, 干燥后, 扫描观察。

1.4 细胞株的培养

细胞初时浓度为 1× 10^5 cells/ml 的 HL-60, K562, NB4, Jurkat 在含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培基中 5% CO_2, 37 ℃的条件下培养 72 h 后收获细胞。

1.5 细胞膜蛋白质的抽提及标记

用 1% Triton-X114 抽提细胞膜蛋白, 收获 2× 10^7 cells/ml 的细胞, 用 Bradford 法测定膜蛋白质浓度, 并将膜蛋白质浓度定为 1 mg/ml, 取膜蛋白质 20 μl(2 μg)用终浓度 2.5 μg/ml FSE 避光室温下标记 1 h, SephadexG-25 以去除游离的 FSE 后加 2 μl BSA(10 mg/ml), 2 μl 0.5 mol/L 乙醇胺室温反应 1 h, 4 ℃避光保存。

1.6 标记膜蛋白质与蛋白芯片反应

蛋白芯片用封闭液(0.5 mol/L 乙醇氨胺+CCB+0.1 mol/L 醋酸钾, 1∶1∶1 等体积混匀)室温下封闭 1 h, 0.01 mol/L PBS 缓冲液冲洗, 在抗体阵列区加 10 μl FSE 标记的膜蛋白质, 盖上盖玻片, 室温避光反应 1 h 后, 0.01 mol/L PBS 缓冲液冲洗, 干燥后, 用 Scan-400 扫描仪检测信号。

1.7 细胞膜蛋白质的免疫印迹

取蛋白芯片检测 HL-60, K562, NB4, Jurkat 肿瘤细胞株细胞膜蛋白质 CD 抗体阳性的膜蛋白质进一步做免疫印迹, 膜蛋白质先用 10% SDS-PAGE 电泳后将蛋白电转移到 PVDF 膜上, CD 单克隆抗体按 1∶1000 稀释, 室温反应 2 h, 0.01 mol/L PBS-T 液洗膜, 3 次, 5 min/次。加 1∶500 稀释辣根过氧化酶表记的羊抗鼠抗体, 室温反应 30 min, 0.01 mol/L PBS-T 液洗 PVFD 膜, 3 次, 5 min/次, DAB 显色。

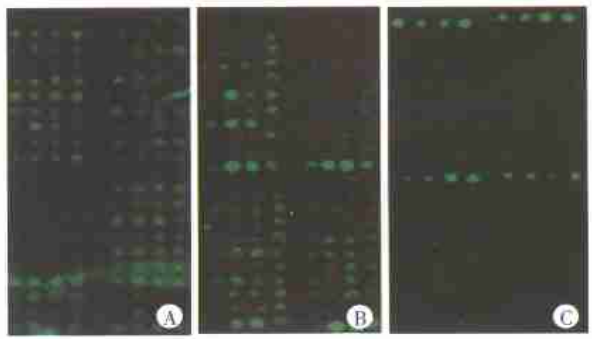
1.8 细胞免疫组织化学检测细胞膜表面 CD 抗原

细胞初时浓度为 1× 10^5 cells/ml 的 HL-60, K562 细胞在含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中 5% CO^2, 37 ℃的条件下培养 72 h 后, 收获细胞, 4% 多聚甲醛室温固定细胞 30 min, 0.01 mol/L PBS 洗涤细胞 3 次, 5 min/次, 细胞从新悬浮在 500 μl 的 0.01 mol/L PBS 中, 取 50 μl 细胞悬液, 加入 1∶200 稀释度的蛋白芯片检测阳性的 CD 单克隆抗体, 室温下反应 2 h, 0.01 mol/L PBS 洗涤 3 次, 加入 1∶500 稀释度的 FITC 标记的羊抗鼠 IgG, 室温下避光反应 1 h, 0.01 mol/L PBS 洗涤 3 次, 重新悬浮在 50 μl 的0.01 mol/L PBS 液中, 取 10 μl 滴在载玻片上, 加上盖玻片, 用共聚焦显微镜观察结果。

2 结果

2.1 CD 抗体蛋白芯片扫描结果

在醛基玻片上的 CD 系列单克隆抗体阵列用 FSE 荧光素直接染色, 及用 FITC 标记的羊抗鼠 IgG 和羊抗兔 IgG 与 CD 蛋白芯片进行免疫结合反应。结果显示用 FSE 荧光素直接染色抗体阵列及 BSA(40 ng)扫描检测可见荧光信号, 见图 1A。分别用 FITC 标记的羊抗鼠 IgG 和羊抗兔 IgG 与 CD 蛋白芯片进行免疫结合反应, FITC 羊抗鼠 IgG 除 BSA 点未见荧光信号外 CD 单克隆抗体阵列区均有荧光信号, 见图 1B, 而 FITC 羊抗兔 IgG 除 Marker 有荧光信号, CD 抗体阵列区及 BSA 均无荧光信号, 见图 1C。说明 CD 系列抗体蛋白微阵列稳定固定在醛基玻片上。



A: Direct staining with 5 μg/ml FSE for 2 h; B: Indirect staining with 10 μl anti-mouse IgG-FITC; C: Indirect staining with 10 μl anti-rabbit IgG-FITC

图 1 CD 抗体蛋白芯片荧光染色结果

Fig 1 Fluorescence staining of protein microarrays for CD series

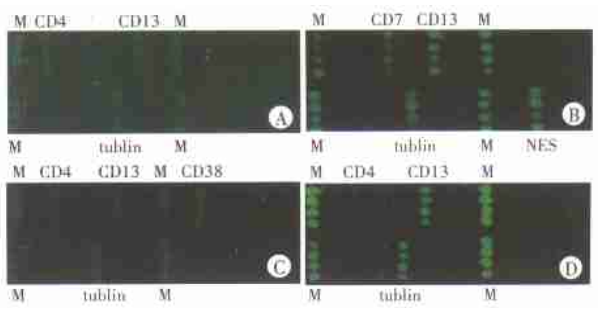
2.2 标记的细胞膜蛋白与蛋白微阵列反应结果

用 HL-60, K562, NB4, Jurkat 培养细胞抽提的膜蛋白用 FSE 标记后与 CD 抗体蛋白微阵列进行免疫结合反应, 结果显示 4 种细胞株细胞表面 CD 抗原不同。见表 1, 图 2。

表 1 4 种细胞膜蛋白 CD 抗体微阵列阳性结果

Tab 1 CD detection of 4 cell lines with protein microarrays

Cell	Antibodeis							
	CD3	CD4	CD7	CD13	CD19	CD38	NES	Tublin
HL-60	−	+	−	+	−	−	−	+
K562	−	−	+	+	−	−	+	+
NB4	−	+	−	+	−	+	−	+
Jurkat	−	+	−	+	−	−	−	+



A: HL-60; B: K562; C: NB4; D: Jurkat

图 2 CD 抗体蛋白芯片检测细胞表面蛋白

Fig 2 Detectuib of cell membrane protein with the protein microarrays

2.3 膜蛋白质的免疫印迹结果

对 CD 蛋白微阵列检测呈阳性的 HL-60, K562, NB4, Jurkat

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

细胞用相符的 CD 抗体进一步做免疫印迹, 结果与蛋白芯片结果一致, 见图 3。

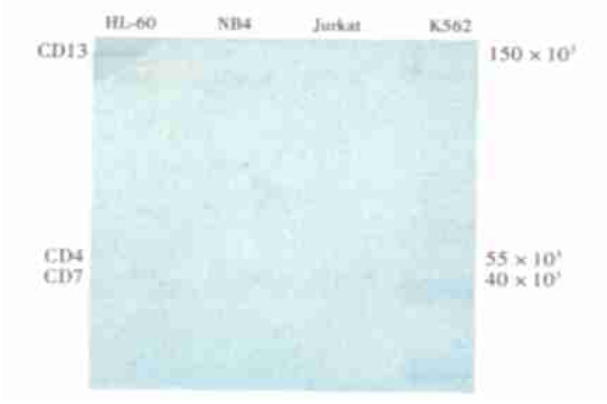
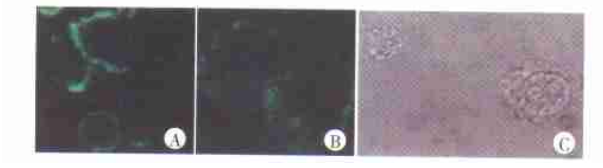


图 3　免疫 T 迹检测细胞表面膜蛋白 CD 抗原

Fig 3　Western blot of cell membrane proteins

2.4　HL-60 细胞, K562 细胞免疫组织化学结果

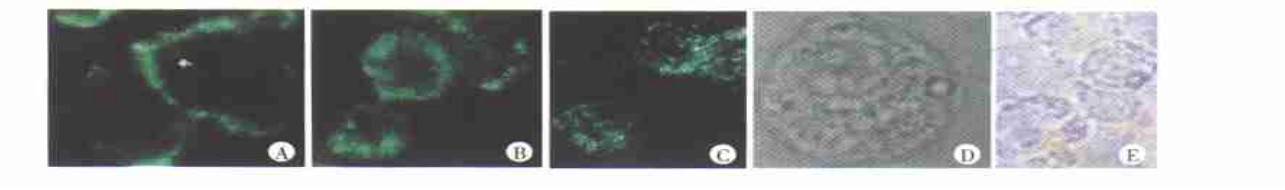
用 CD3, CD4, CD7, CD19, NES 单克隆抗体对 HL-60 细胞, K562 细胞做疫组织化学检测, 共聚焦显微镜观察, 结果显示 HL-60 细胞膜表面 CD13, CD4 抗原呈阳性, CD19 呈阴性; K562 波细胞膜表面 CD7, CD13, NES 为阳性, CD 19 为阴性, 与 CD 蛋白微矩阵检测结果一致, 见图 4、5。



A: CD4 antibody; B: CD 13 antibody; C: No antibody

图 4　免疫荧光技术检测 HL-60 细胞表面 CD 抗原

Fig 4　Immunofluorescent detection of CD antigens on HL-60 cells



A: CD7 antibody; B: CD13 antibody; C: NES antibody; D: CD19 antibody; E: No antibody

图 5　免疫荧光技术检测 K562 细胞表达 CD 抗原

Fig 5　Immunofluorescent detection of CD antigens on K562 cells

3　讨论

Lueking 等[5] 报道用抗体筛选基因表达的蛋白芯片, 是将基因表达产物固定在 PVDF 膜上, 再用抗体与固定在膜上的基因表达蛋白进行免疫结合反应来筛选阳性蛋白。他们是利用 PVDF 膜能吸附蛋白质的特点, 但 PVDF 膜存在较脆, 易破损的缺点, 不易大规模点阵蛋白。本研究利用蛋白质的氨基端(NH_2)可与醛基(CHO)发生反应, 将蛋白质固定在醛基处理过的载玻片上, 0.1 mol/L 醋酸钾缓冲液作用下, CD 抗体蛋白质牢固, 稳定的固定在醛基玻片上, 在玻片上形成 CD 抗体微矩阵。从我们的实验结果证实这一点。我们用 FITC 标记的羊抗鼠和羊抗兔 IgG 与 CD 蛋白微矩阵列反应, 结果显示固定在醛基玻片上的 CD 抗体微矩阵列能与羊抗鼠 IgG 发生特异结合, 扫描呈阳性荧光信号, 与作为阴性对照的 BSA 及与 FITC 标记的羊抗兔 IgG 反应扫描则无荧光信号, 这表明 CD 抗体蛋白质固定在醛基片上。本研究选用了 4 株不同的肿瘤细胞株的膜蛋白与 CD 抗体蛋白微矩阵列反应, 结果显示这 4 种细胞株表面 CD 抗原有不同, 见表 1。因我们在玻片上固定了多种 CD 单克隆抗体, 可同时检测到多种抗体, 用免疫印迹及免疫组织化学实验证, 结果如 HL—60 细胞膜蛋白 CD4, CD13 呈阳性, CD19 阴性, K562 细胞膜蛋白, CD7, CD13, NES 呈阳性, CD19 阴性, 阳性对照 Tublin 抗体均呈阳性, BSA 阵点也未见荧光信号。证实了蛋白芯片的结果, 其结果与用免疫印迹检测 4 株肿瘤细胞的膜蛋白一致, 说明 CD 蛋白芯片阳性结果可靠, 特异性强。我们选用玻片做为载体, 使操作简单易行, 所需时间短, 结果可靠, 敏感, 每点只需固定 10～20 ng 的蛋白, 就可得到阳性信号。并可用高密度点阵仪在 0.5 cm × 0.5 cm 的面积内固定成百个蛋白质, 一次反应可得到许多数据, 为大规模的分析提供条件。

本研究所设计的蛋白芯片可用于基因表达, 蛋白质的检测, 疾病诊断等方面的研究。利用我们制备的蛋白质微阵列的方法可对来源不同的个体, 不同组织、不同刺激细胞的蛋白质进行检测, 从而对这些不同的个体、不同的组织、细胞分化发育阶段、病变和刺激等特异性有综合的分析和判断。其效率是常规研究不能达到的。可见它有着很大的应用前景。

参考文献:

[1] Sosnowski R G, Tu S, Butler W F, *et al*. Rapid determination of single-basses mismatch mutation in DNA hybrids by direct electric field control [J]. PNAS, 1997, 94: 1 119—1 123.

[2] Livache T, Bazin H, Caillat P, *et al*. Electroconducting polymers for the construction of DNA or peptide arrays on silicon chips [J].

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

Biosen &bioelectro, 1998, 13: 629－634.
[3] Fodor S P. Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis [J]. Science, 1991, 251(Feb): 767－773.
[4] 金冬雁, 黎孟枫, 等 译. 分子克隆实验指南[M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社出版, 1992. 858.
[5] Lueking A, Horn M, Eickhoff H, *et al*. Protein Microarrays for gene expressionand antibody screening[J]. Analytical Biochemistry, 1999, 270: 103－111.

（编辑 陈聪连）

个案与短篇

文章编号: 1000-5404(2002)01-0046-01

一次性密度梯度超速离心分离人血清脂蛋白及无脂血清

Separation of human serum liproproteins and lipoprotein-deficint serum by one-step density gradient ultracentrifugation

何菊英, 刘松青 （第三军医大学附属西南医院药剂科, 重庆 400038）

本研究采用角度转头和一次性密度梯度超速离心法, 从正常人血清中将 VLDL, LDL, HDL 和无脂血清相互分离, 效果满意, 并成功应用于脂蛋白和胆固醇代谢的研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 仪器 超速离心机为 BeckmanL8-55 型, 55.2-Ti 角度转头, 容量 38.5×10 ml。分析天平为 TG-328 型(浙江温州天平仪器厂)。

1.1.2 密度盐溶液配制 将分析纯之 NaCl、KBr 在 125 ℃干燥 24 h 后, 将 NaCl 配制成密度为 1.006 的溶液, 而干燥 KBr 用于调定血清密度。

1.1.3 人血清标本 正常人新鲜全血, 在室温放置 1h 使凝固, 然后在 4 ℃、5 000 r/min 离心 30 min, 取出血清, 加 NaN_3(终浓度为 0.01%)。

1.1.4 试剂 氨基黑 10 B、苏丹黑 10 B 均为北京化工厂产品, 其余试剂均系分析纯。

1.2 方法

1.2.1 人血清脂蛋白的快速分离 取正常人混合血清, 定量移入烧杯中, 根据 d= m/v, 用万分之一分析天平根据称量法测出血清初始密度 do, 用干燥固体溴化钾调血清密度至 1 300 g/ml, 按 Radding-Steining 公式计算需加入的干燥 KBr 重量, 公式如下: X= Vo(dm-do)/1-0.312× d m 式中, Vo 代表原血清毫升数, do 代表初始血清密度, dm 代表需调定的血清密度, 0.312 为 KBr 的比容(ml/g), X 代表需加 KBr 克数。

待固体溴化钾完全溶解后, 将血清分别移至 10 个透明的离心管中, 再用滴管沿管壁小心铺加密度为 1.006 的氯化钠溶液约 28 ml, 勿使界面混扰。平衡后加盖封闭, 小心放入 55.2-Ti 角度转头, 置入 Beckman L8-55 型超速离心机中, 选用慢加速工作程序, 加速和减速时间均控制在 45 min, 10 ℃, 50 000 r/min, 离心 5 h。离心结束后, 取出离心管, 见血清脂蛋白已分层。

1.2.2 透析 将超速离心所得四个组分分别置于透析带中, 反复透析 48 h(4 ℃), 每日换透析液 3～4 次, 透析液为 0.15 mol/L NaCl 和 0.3 mmol/L EDTA 的缓冲液(pH 7.4)。

1.2.3 聚丙烯酰胺凝胶电泳[1] 将超速离心分离各组分进行电泳, 凝胶浓度为 3.85%, 脂蛋白用苏丹黑 10B 预染, 电泳后再以氨基黑 10 B 染蛋白质。

2 结果

2.1 超速离心对血清脂蛋白分离的效果

按方法 1 进行, 离心结束后可见离心管中液体明显分为七层: 顶部乳白色为极低密度脂蛋白, 第三层淡黄色为低密度脂蛋白, 第五层橘黄色为高密度脂蛋白, 第二、四、六层为生理盐水, 最低层为脱脂血清。并将各层脂蛋白及无脂血清用吸管收集于系列试管中。

2.2 各种脂蛋白纯度的鉴定[2]

聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE): 分离的人血清脂蛋白与正常人血清同时进行电泳, 用苏丹黑 10 B 预染脂质, 经不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳后, 凝胶柱上正常人血清脂蛋白分成三个区带, 从上到下依次为 VLDL、LDL 及 HDL, 而分离的脂蛋白均为单一区带, 并与正常人血清三种脂蛋白的泳动位置相对应, 表明没有脂蛋白间的相互混杂, 为电泳纯的单一脂蛋白组分。无脂血清脂染色阴性。

3 讨论

分离血清脂蛋白, 国外学者多采用系列超速离心法, 但离心时间很长(90 h 左右), 且需 Abbe 折射仪调血清密度。本研究在无 Abbe 折射仪调血清密度条件下, 采用称量法以及角度转头和一次性密度梯度超速离心, 将离心时间缩短到 5 h, 并且分离效果满意, 重复性好, 为一次性获得相当量的人血清脂蛋白及 LDS 提供了一种简便可行的手段。本法中获得的脱脂血清平均胆固醇含量仅为 0.046 mmol/L、甘油三酯为 0.2 mmol/L, 而且该脱脂血清可用于细胞脂蛋白受体功能测定及体外细胞胆固醇代谢的研究。本研究成功地应用了一次性密度梯度超速离心法制备了所需各种脂蛋白及脱脂血清, 为进一步研究动脉粥样硬化发生原理及某些降血脂药作用机制提供了有利条件。

关键词: 极低密度脂蛋白(VLDL); 低密度脂蛋白(LDL); 高密度脂蛋白(HDL); 脱脂血清(LDS); 密度梯度
中图法分类号: R446.1 文献标识码: B

参考文献:

[1] 赵凤丽, 王拥军, 周卫东, 等. 低密度脂蛋白颗粒大小测定及意义[J]. 临床检验杂志, 2000, 18(2): 73－75.
[2] 楼正青, 庄一义. 人工合成高密度脂蛋白样颗粒测定血清胆固醇酯转运蛋白活性[J]. 临床检验杂志, 2001, 19(2): 88－90.

（编辑 汪勤俭）

作者简介: 何菊英(1970－), 女, 四川省内江市人, 主管药师, 主要从事临床药理方面的研究。电话: (023)68754225

收稿日期: 2001-04-05; 修回日期: 2001-10-14

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