

人血管能抑素免疫兔抗血清制备及其特性测定^{*}

贺国安, 罗进贤, 李瑞芳, 张添元, 吴群悦

(中山大学基因工程教育部重点实验室, 广东 广州510275)

摘要: 纯化的人血管能抑素包涵体进行 SDS-PAGE 分离, 切胶回收目的蛋白, 与弗氏不完全佐剂充分乳化后, 进行多点皮下注射免疫新西兰白兔, 制备兔抗人血管能抑素抗血清, 抗血清去除交叉反应抗体后, 进行 Western Blotting 分析抗血清与人血管能抑素及其 N 端和 C 端片段的抗原抗体反应特性。结果表明, 经过 4 次加强免疫后, 获得了高效价的兔抗人血管能抑素抗血清。抗血清去除交叉反应抗体后, Western Blotting 分析表明, 它能与人血管能抑素发生特异的抗原抗体反应, 同时还能与人血管能抑素的 N 端片段和 C 端片段发生特异性较弱的抗原抗体反应。证明制备的兔抗人血管能抑素抗血清能应用于人血管能抑素及其 N 端和 C 端片段免疫学研究中。

关键词: 人血管能抑素; N 端片段; C 端片段; 抗血清

中图分类号: Q78; R338 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2003) 06-0134-03

人血管能抑素 (canstatin) 是最近发现的新的血管生成抑制因子, 它是胶原蛋白 IV 的 $\alpha 2$ 链的 C 端非胶原区 (NCI)^[1]。本室利用 RT-PCR 技术从中国人胎盘脐带总 RNA 中合成了人血管能抑素基因, 并实现了在大肠杆菌中表达、表达产物的纯化和生物活性测定^[2], 同时也克隆了人血管能抑素的 N 端^[3]和 C 端基因片段, 并实现了它们在大肠杆菌中表达、表达产物的纯化和生物活性分析。研究显示, 人血管能抑素及其 N 端和 C 端片段都能特异地抑制血管内皮细胞的生长, 并且都能抑制 BALB/c 小鼠体内 B16 黑色素瘤的生长 (另文发表)。本研究利用纯化的人血管能抑素包涵体作为抗原来免疫新西兰白兔制备兔抗人血管能抑素抗血清, 并研究了它与人血管能抑素及其 N 端和 C 端片段的抗原抗体反应特性, 为进一步研究人血管能抑素及其 N 端和 C 端片段的功能和作用机制打下基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料 人血管能抑素及其 N 端和 C 端片段包涵体均由本室制备和保存^[2,3]。新西兰白兔, 雄性, 2~3 kg, 购自广东省医学实验动物中心。

1.2 免疫抗原制备^[4] 将约 10 mg 的纯化人血管能抑素包涵体进行 SDS-PAGE, 切胶回收人血管能抑素目的条带, 用 PBS 摇动洗涤 48 h, 期间换 2~3 次 PBS; 加适量的 PBS, 用研钵充分地研磨凝胶成乳状, 加入等体积的弗氏不完全佐剂 (10 g 羊毛脂与 40 mL 石蜡油充分研磨成乳白色粘稠油乳状物) 混合, 再加入卡介苗素达 10 mg/mL, 充分研

磨成完全油包水, 以备免疫用。

1.3 兔抗人血管能抑素抗血清的制备^[5] 选择 2~3 kg 的新西兰白兔, 免疫前先从耳沿静脉抽取 1.0 mL 的血清作为阴性血清, ELISA 法检测是否与抗原交叉反应。首次免疫时, 从双后跖部各注入 0.5 mL 的抗原与弗氏完全佐剂混合液, 2 周后于双侧后肢肿大的淋巴结内各注入 0.5 mL 的同样制剂, 第三周沿背部脊柱两侧皮下分 4×2 点注射, 每点 0.2 mL, 每只兔臀部皮下注射 0.5 mL, 一周后用 ELISA 测效价, 若效价达不到理想值可再次加强免疫 1~2 次; 效价达到理想值时, 采用颈静脉放血, 用无菌的平皿装血, 37℃静置 2 h, 析出血清。

1.4 抗血清中交叉反应抗体的去除 采用表达人血管能抑素的空载体菌株 *E. coli* BL21 (DE3, pET-3c) 培养物的丙酮抽提物去除抗血清中能与 *E. coli* BL21 (DE3, pET-3c) 菌体抗原起反应的抗体。具体方法参照文献^[6]。

1.5 ELISA 法确定抗体的效价^[7] 将抗原适当稀释后每孔加 100 μ L 于酶标板中, 37℃静置 2 h; 倾去抗原, 每孔加入 200 μ L 封闭液, 37℃静置 2 h; 倾去封闭液, 用洗涤液洗 3 次, 每次 5 min; 将抗血清从 10^{-1} ~ 10^{-5} 梯度稀释, 每孔加入 100 μ L 稀释液, 37℃静置 1 h; 倾去抗血清, 用洗涤液洗 3 次, 每次 5 min; 每孔加入 100 μ L 按使用说明稀释的羊抗兔 IgG HRP, 37℃静置 1 h; 倾去上清液, 用洗涤液洗 3 次, 每次 5 min; 加入 100 μ L AEC

* 收稿日期: 2003-10-04

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目 (011207)

作者简介: 贺国安 (1974 年生) 男, 博士研究生; 通讯联系人: 罗进贤; E-mail: lsbr02@zsu.edu.cn

(3-氨基-9-乙基咔唑) 显色液, 室温避光显色 10 min, 显色 (鲜红色) 到理想程度, 每孔加入 50 μ L 的 2 mol/L H_2SO_4 终止反应, 根据颜色深浅进行定性判断。

1.6 抗血清反应特性的 Western Blotting 分析^[6] 将人血管能抑素及其 N 端和 C 端片段包涵体进行 SDS-PAGE 分离, 电泳转移到硝酸纤维素 (NC) 膜上, 晾干 NC 膜, 在封闭液中室温缓慢摇动 2 h, 以封闭膜上没有结合的蛋白结合位点; 与 10^{-2} 稀释的兔抗人血管能抑素抗血清在 37 $^{\circ}C$ 孵育 1 h, 用洗涤液洗 3 次, 每次 10 min; 与适当稀释的羊抗兔 IgG-HRP 在 37 $^{\circ}C$ 孵育 1 h, 用洗涤液洗 3 次, 每次 10 min; 在 DAB (二氨基联苯胺) 显色液中显色 (棕色) 数分钟, 待目标条带显色清晰时, 将 NC 膜转移到 PBS 中停止显色, 并拍照记录结果。

2 结 果

2.1 兔抗人血管能抑素抗血清的制备及其效价的 ELISA 测定 试验兔按免疫程序免疫 5 次后, 从耳沿静脉取血进行 ELISA 测定抗血清的效价。去除了交叉反应抗体的抗血清与辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 结合, 通过显色底物 AEC (3-氨基-9-乙基咔唑) 显色, 显示鲜红色。抗血清经过 $10^0 \sim 10^{-5}$ 的梯度稀释后, 显色反应依次减弱, 从图 1 可知, 抗血清在 10^{-4} 稀释下, 仍可判断为阳性反应, 而阴性血清无颜色反应。

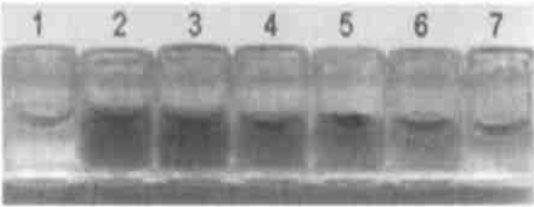


图 1 兔抗人血管能抑素抗血清效价的 ELISA 测定
1: 阴性血清对照; 2-7: 抗血清从 $10 \sim 10^{-5}$ 梯度稀释
Fig 1 Determination of titer of the rabbit antiserum against human conastatin by ELISA
1: negative blood serum; 2~7: gradient dilution of antiserum from 100 to 10^{-5} , respectively

2.2 兔抗人血管能抑素抗血清反应特性的 Western Blotting 分析 将人血管能抑素及其 N 端和 C 端片段包涵体进行 Western Blotting 分析。如图 2 所示, 经过去除交叉反应抗体的兔抗人血管能抑素抗血清, 在 10^{-2} 稀释度下, 能与血管能抑素起特异的抗原抗体反应, 而与血管能抑素 N 端和 C 端片段抗原抗体反应特异性较弱。各蛋白的双倍相对分子质量处也有一条较弱的反应带, 推测可能是各

蛋白的二聚体。

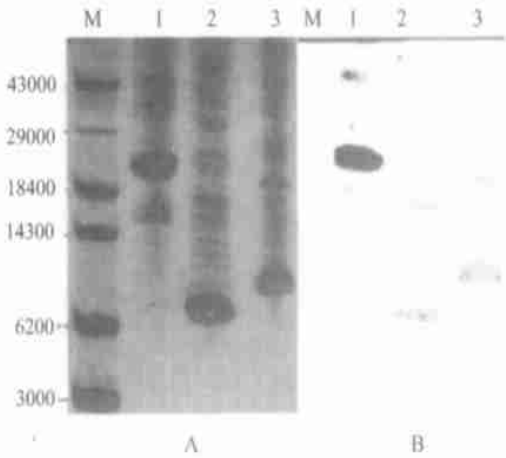


图 2 兔抗人血管能抑素抗血清反应特性的 Western Blotting 分析
1. 血管能抑素包涵体;
2. 血管能抑素 C 端片段包涵体;
3. 血管能抑素 N 端片段包涵体
Fig 2 Western Blotting analyses of the characteristic reaction of rabbit antiserum against human conastatin
A: SDS PAGE; B: Western blotting

3 讨 论

影响免疫应答的因素较多, 主要有动物种类、遗传因素、抗原的物理状态、抗原的用量、注射途径和免疫程序等。特别是抗原的物理状态, 应尽可能的使抗原与佐剂充分乳化和包被, 抗原的用量不能低于一定的量, 否则, 免疫动物可能会产生免疫耐受大大降低抗体的产量^[6]。本研究免疫第 3 次时, 抗体的效价很低, 经过 2 次加强免疫后, 抗体的效价迅速增加。

本研究制备的抗血清属于多克隆抗体类, 在抗原制备过程中难免会有菌体蛋白污染而产生交叉反应抗体, 为了去除抗血清中交叉反应抗体, 本研究参照文献方法 [6], 采用 *E. coli* BL21 (DE3, pET-3c) 培养物的丙酮抽提物去除能与 *E. coli* BL21 (DE3, pET-3c) 菌体抗原起反应的抗体。经过这些处理后, 抗血清的特异性大大增加, 在 Western blotting 检测中, 兔抗人血管能抑素抗血清与抗原发生特异的抗原抗体反应。

抗原与抗体的反应是由抗原的免疫原性决定的^[6]。用人血管能抑素包涵体制备的兔抗血清与人血管能抑素包涵体发生强烈的抗原抗体反应, 在 Western blotting 检测中呈现一条强烈的杂交带, 而与人血管能抑素 N 端片段或 C 端片段包涵体的抗原抗体反应特异性大大降低, 在 Western blotting 检测中呈现一条较弱的杂交带, 说明人血管能抑素的

免疫原性可能是由其 N 端和 C 端共同组成。本研究制备的兔抗人血管能抑素抗血清除了能应用于人血管能抑素的免疫学研究外, 还能应用于人血管能抑素的 N 端和 C 端片段的免疫学研究中, 这对进一步研究人血管能抑素及其 N 端和 C 端片段的功
能及其作用机制具有重要的意义。

参考文献:

[1] KAMPHAUS G D, COLORADO P C, PANKA D J, et al. Canstatin, a novel matrix-derived inhibitor of angiogenesis and tumor growth[J]. J Biol Chem, 2000, 275: 1209—1215.
[2] 贺国安, 罗进贤, 张添元, 等. 人血管能抑素基因的克隆、表达及其表达产物的纯化和生物活性测定[J]. 微生物学报, 2003(5): 87—92.

[3] 贺国安, 罗进贤, 张添元, 等. 人血管能抑素基因 N 端片段的表达、纯化及其生物活性测定[J]. 生物化学与生物物理学报, 2003, 35(5): 483—487.
[4] 尹崇, 李朝飞, 王立华, 等. 新基因 *Sp/11 37* 在大肠杆菌中的表达及抗体制备[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2002, 41(4): 75—77.
[5] 李瑞芳, 张素梅, 杨明凡, 等. 不同佐剂 PRV 灭活苗免疫奶牛及山羊抗体消长规律研究[J]. 河南农业大学学报, 2001, 35(3): 275—277.
[6] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T. Molecular cloning: a laboratory manual[M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
[7] 崔保安, 杨明凡, 李瑞芳, 等. 间接 ELISA 检测羊伪狂犬病抗体的研究[J]. 畜牧与兽医, 2003, 35(1): 10—12.

Preparation and Characteristic Test of
the Rabbit Antiserum Against Human Canstatin

HE Guo an, LUO Jin xian, LI Rui fang, ZHANG Tian yuan, WU Qun yue
(Key Laboratory of Genetic Engineering of Ministry of Education,
Sun Yat sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: The purified human canstatin was isolated by recovering the target band on the SDS PAGE gel and used to immunize the New Zealand white rabbits by subcutaneous injection after emulsified with Freund's incomplete adjuvant. After removing its cross reacting antibodies, the antiserum against human canstatin was used to test its characteristic reaction with human canstatin and its N terminal and C terminal domains by Western blotting analyses. The results showed that high titer antiserum against human canstatin was obtained in immunized rabbits after four reinforced immunizations. The results of Western blotting analyses after removing the cross reacting antibodies showed that the rabbit antiserum against human canstatin specifically intensively reacted with human canstatin and faintly with its N terminal and C terminal domains. These results demonstrated the prepared rabbit antiserum against human canstatin can specifically react with human canstatin and its N terminal and C terminal domains, and can be applied in immunological study of N-terminal and C terminal domains.

Key words: human canstatin; N terminal domain; C terminal domain; antiserum