

# 自噬基因融合蛋白重组多克隆抗体的纯化与检测

朱雄伟,张佑红,徐智鹏,苏腾甲,熊 瑶,翟莉莉

(武汉工程大学化工与制药学院,绿色化工过程省部共建教育部重点实验室,湖北 武汉 430074)

**摘 要:**为了提纯并鉴定自噬基因融合蛋白重组多克隆抗体,探讨其在部分组织中的免疫定位.首先合成带谷胱甘肽转移酶标签的自噬基因融合蛋白,免疫新西兰大白兔,制备多克隆抗体,然后用聚丙烯酰胺凝胶电泳检测抗体浓度,最后用免疫亲和纯化方法提纯抗血清中的多克隆抗体,酶联免疫吸附法检测抗体效价,蛋白印迹检测抗体特异性及在组织中的表达情况.结果表明:制备得到自噬基因融合蛋白重组多克隆抗体经聚丙烯酰胺凝胶电泳检测其质量浓度为每 10  $\mu\text{L}$  含 5  $\mu\text{g}$ ,用酶联免疫吸附法显示此抗体效价及特异性较高,蛋白印迹显示蛋白大小为 55 kD 左右.

**关键词:**多克隆抗体;免疫亲和纯化;酶联免疫吸附法;蛋白印迹;聚丙烯酰胺凝胶电泳

**中图分类号:**R392.1

**文献标识码:**A

**doi:**10.3969/j.issn.1674-2869.2013.02.008

## 0 引 言

免疫学技术正沿着基础研究—应用研究—高技术开发研究 3 条主线在开展,三者互相促进,推动现代医学的发展<sup>[1]</sup>.杂交瘤技术的建立和细胞因子对免疫细胞发育、分化的发现,基因工程技术的发展,使实验室的研究直接转向生物高技术产品的开发,如重组细胞因子、单克隆抗体及其相应的试剂盒、多克隆抗体、基因工程抗体和疫苗等已经或正在投入临床使用,特别是抗体药物以其对人体无毒无副作用、完全天然和高度特异性的疗效,越来越显示其优势,并创造出巨大的社会效益和经济效益<sup>[2]</sup>.

1962 年, Ashford 等<sup>[3]</sup>报道在电子显微镜下发现肝细胞自噬现象,近年来由于发现与自噬相关的基因,以及自噬在生物体生理和病理等方面的作用,自噬基因融合蛋白(ATG12)是与自噬相关基因表达的蛋白.本研究合成带谷胱甘肽转移酶(GST)标签 ATG12 融合蛋白来免疫新西兰大白兔,制备多克隆抗体,并用免疫亲和纯化方法提纯抗血清中的多克隆抗体、酶联免疫吸附法(ELISA)检测抗体效价、蛋白印迹(Western blotting)检测抗体特异性及在组织中的表达情况、聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)检测其浓度.

## 1 实验部分

### 1.1 材 料

1.1.1 研究对象 新西兰大白兔.

1.1.2 实验试剂 抗原;乙醇;20 mmol/L 磷酸缓冲溶液 pH 7.2;福氏佐剂;GST 透析液;His 溶液;PBS 溶液;coupling buffer; pH 5.0 的甘氨酸; pH 2.0 的 HCl 溶液;1 mol/L Tris 封闭液; pH 5.0 HCl 溶液;CBB 溶液;0.01 mol/L Tris pH 7.5 中和液;甘油;防腐剂  $\text{NaN}_3$ ;HRP 酶标二抗;质量分数 2% SKL; beads;0.01 mol/L PBS (pH 7.3);10% 分离胶;质量分数 4% 浓缩胶;G250 考马斯亮蓝溶液;0.15 mol/L NaCl 溶液;2 $\times$ (5 $\times$ )SDS 上样缓冲液;甲醇;电泳缓冲液;转移缓冲液;10 $\times$ 丽春红染液、封闭液;TBST;TBS;ECL 显影底物;显影液;定影液;DAB 溶液;化学发光试剂;HRP 酶标二抗;脱脂奶粉;1 mol/L 的  $\text{NaHCO}_3$ ;TMB 显色液;所有试剂均为分析级.

### 1.2 实验方法

1.2.1 抗血清的制备 具体方法如下<sup>[4]</sup>:

a. 新西兰大白兔的免疫.免疫途径有多种多样,如静脉内、腹腔内、肌肉内、皮内、皮下、淋巴结内注射等,一般常用皮下或背部多点皮内注射,每点注射 0.1 mL 左右.抗原剂量,首次剂量为 300~500  $\mu\text{g}$ ,加强免疫的剂量约为首次剂量为 1/4 左右.

每 2~3 周加强免疫一次. 加强免疫时用不完全佐剂, 首次免疫时皮下注射百日咳疫苗 0.5 mL, 加强免疫时不必注射百日咳疫苗. 在第 2 次加强免疫后 2 周, 从耳缘静脉取 2~3 mL 血, 制备血清, 检测抗体效价.

**b. 抗血清的采集与保存.** 取兔血有两种方法, 一是耳缘静脉或耳动脉放血, 一是颈动脉入血, 也可心脏采血. 取动脉或静脉放血时, 将兔放入一个特造的木匣或笼内, 耳露于箱(笼)外, 也可由另一人捉住兔身. 剪去耳缘的毛, 用少许二甲苯涂抹耳廓, 30 s 后, 耳血管扩张、充血. 用手轻拉耳尖, 以单面剃须刀或尖的手术刀片, 快速切开动脉或静脉, 血液即流出, 每次可收集 30~40 mL. 然后用棉球压迫止血, 凝血后洗去二甲苯. 二星期后, 可在另一耳放血. 此法可反复多次放血. 颈动脉放血时, 将兔仰卧, 固定于兔台, 剪去颈部的毛, 切开皮肤, 暴露颈动脉, 插管, 放血. 取收集的血液在 37 °C 恒温箱中放置 30 min 以防止激活补体系统, 再将试管在 4 °C 放置过夜使血液凝固. 用药铲将血凝块从管壁上拨落, 将血液转移至塑料离心管中, 于 4 °C 下 4 000 r/min 离心 10 min. 在无菌条件下, 吸出血清, 分装, 可在 -20 °C 保存数年.

#### 1.2.2 抗体的纯化 具体步骤如下<sup>[5]</sup>:

**a. 抗原柱子的制备.** 找到相应的血清和抗原、抗原的透析(对非包涵体蛋白)、活化 beads、抗原与 beads 连接、封闭 beads.

**b. 抗血清的预处理.** 将解冻好的血清在 3 600 r/min, 条件下离心 17 min; 除去离心后浮在表面的脂肪, 将血清转移到标记好的瓶子中备用, 注意尽量不要将沉在管底的血细胞倒出; 对免疫原是 GST 融合蛋白的血清, 同时是纯化抗原也是 GST 融合蛋白, 此时需过 GST 柱子, 吸附掉 anti-GST 的抗体. 注意此时要留抗原小样, 做 ELISA 检测看 anti-GST 的抗体有没有除尽.

**c. beads 与对应的抗血清的结合.** 将连接好抗原的 beads 和对应的抗血清一起孵育, 封口后排气, 在转子上固定好, 孵育, 室温 2 h 或 4 °C 过夜, 让血清流出纯化管, 收集, 10 mL PBS 洗涤三次.

**d. 收集抗体.** 加入 10 mL pH5.0 甘氨酸, 预洗脱, 加入预冷的 HCl 洗脱液. 同时检测收集的抗体浓度, 确定收集峰, 收集浓度高抗体, 于 4 °C 暂时保存.

**e. 浓缩和透析.** 将浓度不高的抗体吸水浓缩, 注意放 4 °C 保持低温. 浓缩好后透析. 次日检测收集的抗体浓度, 确定收集峰. 收集浓度高抗体, 于 4 °C 暂时保存.

**f. beads 的清洗和保存.** 依次用 Tris 和 PBS

洗, 加入甘油、防腐剂 -20 °C 保存.

#### 1.2.3 ELISA 检测<sup>[6-8]</sup>

**a. 抗原包被.** 用抗原包被液(1 mol/L 的  $\text{NaHCO}_3$ ) 稀释抗原, 50 微升/孔, 蛋白量为 2~3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 孵育, 室温 2 h 或 4 °C 过夜, 用 GST 标签蛋白作对照.

**b. 封闭.** 倒出孔内溶液, 拍干, 每孔加入 100  $\mu\text{L}$  稀释液(3% 脱脂牛奶 + PBST), 封闭, 放摇床上室温孵育 1 h.

**c. 加一抗.** 倒出孔内溶液, 拍干, 洗 3 次, 每次 5 min. 倒出孔内溶液, 拍干, 加入一抗, 摇床上室温孵育 1 h.

**d. 加二抗.** 倒出孔内溶液, 拍干, 洗三次, 每次 5 min. 倒出孔内溶液, 拍干, 加入二抗, 摇床上室温孵育 1 h.

**e. 加底物显色.** TMB 显色液 A、B 按 1:1 混合, 100  $\mu\text{L}/\text{孔}$ , 放摇床上 15 min 内观察结果, 照相.

**f. SDS-PAGE 电泳.** 电泳时间一般 4~5 h, 电压为 40 V 较好, 也可用 60 V. 电泳至溴酚蓝刚跑出即可终止电泳, 进行转膜.

#### g. 转 膜.

(1) 转一张膜需准备 6 张 7.0~8.3 cm 的滤纸和 1 张 7.3~8.6 cm 的 PVDF 膜, 将切好的 PVDF 膜置于甲醇上浸才可使用.

(2) 在加有转移液的塑料盒里放入转膜用的夹子、两块海绵垫、一支玻棒、滤纸和浸过的膜.

(3) 将夹子打开使黑的一面保持水平. 在上面垫一张海绵垫, 用玻棒来回擀几遍以擀走里面的气泡.

(4) 要先将玻璃板撬掉才可剥胶, 撬的时候动作要轻, 要在两个边上轻轻的反反复复撬. 撬一会儿玻璃板便开始松动, 直到撬去玻璃板. 小心剥下分离胶盖于滤纸上, 用手调整使其与滤纸对齐, 轻轻用玻棒擀去气泡. 在膜上盖 3 张滤纸并除去气泡. 最后盖上另一个海绵垫, 擀几下就可合起夹子. 整个操作在转移液中进行, 要不断的擀去气泡, 膜两边的滤纸不能相互接触, 接触后会发生短路.

(5) 将夹子放入转移槽槽中, 要使夹的黑面对槽的黑面, 夹的白面对槽的红面. 电转移时会产生热, 在槽的一边放一块冰来降温. 一般用 60 V 转移 2 h 或 40 V 转移 3 h. (6) 转完后将膜用 1×丽春红染液染 5 min, 然后用水冲洗掉染液上的染料就可看到膜上的蛋白. 将膜晾干备用.

#### h. 免疫反应.

(1) 将膜用 TBS 从下向上浸湿后, 移至含有封闭液的平皿中, 室温下脱色摇床上摇动封闭 1 h.

(2)将一抗用 TBST 稀释至适当浓度,撕下适当大小的一块儿保鲜膜铺于实验台面上,四角用水浸湿以使保鲜膜保持平整;将抗体溶液加到保鲜膜上;从封闭液中取出膜,用滤纸吸去残留液后,将膜蛋白面朝下放于抗体液面上,室温下孵育 1~2 h 后,用 TBST 在室温下脱色摇床上洗两次,再用 TBS 洗一次。

(3)准备二抗稀释液并与膜接触,室温下孵育 1~2 h 后,用 TBST 在室温下脱色摇床上洗两次,每次 10 min;再用 TBST 洗一次,10 min,进行化学发光反应。

#### i. 化学发光、显影、定影<sup>[9-10]</sup>。

(1)将 A 和 B 两种试剂在保鲜膜上等体积混合,1 min 后,将膜蛋白面朝下与此混合液充分接触,1 min 后,将膜移至另一保鲜膜上,去尽残液,包好,放入暗盒中。

(2)在暗室中,将 1×显影液和定影液分别到入塑料盘中;在红灯下取出胶片,用切纸刀剪裁适当大小;打开暗盒,把胶片放在膜上,一旦放上,便不能移动,关上暗盒,开始计时;根据信号的强弱适当调整曝光时间,一般为 1 min 或 5 min,也可选择不同时间多次压片,以达最佳效果;曝光完成后,打开暗盒,取出胶片,迅速浸入显影液中显影,待出现明显条带后,即刻终止显影。显影时间一般为 1~2 min(20~25 ℃),显影结束后,马上把胶片浸入定影液中,定影时间一般为 5~10 min,以胶片透明为止,用自来水冲去残留的定影液后,室温下晾干。

## 2 结果与讨论

### 2.1 GST 柱子分析

免疫原是 GST 融合蛋白的血清,同时是纯化 GST 柱子的穿流液 FtGST 融合蛋白,此时需过 GST 柱子,用来吸附掉 anti-GST 的抗体。图 1 所示的是未过 GST 柱子的血清 F 和 GST 柱子的穿流液 Ft 加入 TMB 底物后显色反应,表 1 所示的是血清 F 与穿流液 Ft 的稀释梯度<sup>[11-12]</sup>。

表 1 血清 F 与穿流液 Ft 的稀释梯度

Table 1 Dilution gradient of serum F and transit fluid Ft

血清 F	穿流液 Ft
1 : 500	1 : 500
1 : 1 000	1 : 1 000
1 : 2 000	1 : 2 000
1 : 4 000	1 : 4 000

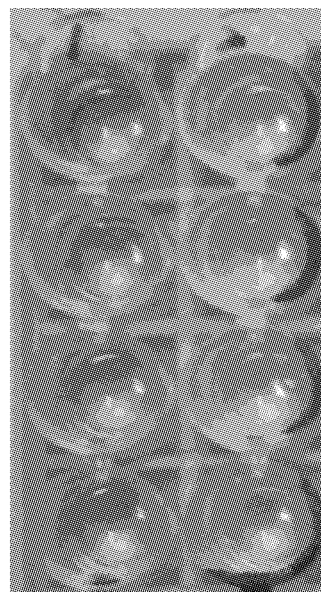


图 1 血清 F(“1”)与穿流液 Ft(“2”)的显色反应

Fig. 1 Chromogenic reaction of serum F and transit fluid

由图 1 和表 1 可知:在四种梯度下,血清 F 加 TMB 底物显色后四孔全部显蓝色,而穿流液 Ft 全部无色,说明 anti-GST 已除干净。

### 2.2 ELISA 结果分析

图 2 所示的是未过 GST 柱子的血清 F、GST 柱子的穿流液 Ft 和抗体 Pu 加入 TMB 底物后显色反应、表 2 所示的是血清 F、穿流液 Ft 和抗体 Pu 的稀释梯度。

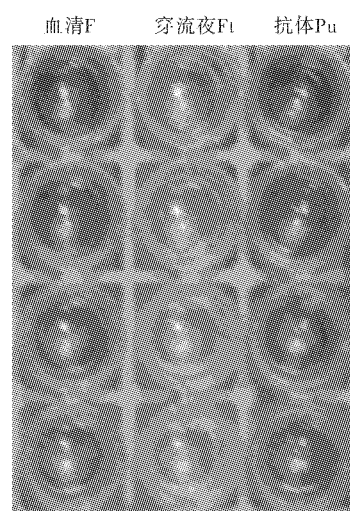


图 2 血清 F、穿流液 Ft、抗体 Pu 的显色反应

Fig. 2 Chromogenic reaction of serum F, transit fluid Ft and antibody Pu

由图 2 和表 2 可知,以 Ft 为参照,F、Ft、Pu 显色孔数依次为 4,3,4,其中 Ft 的是底色。结果说明血清还可以进一步纯化,而且收集的纯化血清效果也不错,即稀释度为 1:500 000。

表 2 血清 F、穿流液 Ft、抗体 Pu 的稀释梯度  
Table 2 Dilution gradient of serum F, transit fluid  
Ft and antibody Pu

血清 F	穿流液 Ft	抗体 Pu
1 : 500	1 : 500	1 : 500
1 : 5 000	1 : 5 000	1 : 5 000
1 : 50 000	1 : 50 000	1 : 50 000
1 : 500 000	1 : 500 000	1 : 500 000

### 2.3 SDS-PAGE 测定 ATG12 多克隆抗体浓度<sup>[13]</sup>

使用 SDS-PAGE 测定蛋白质浓度,图 3 所示的是 ATG12 多克隆抗体的 SDS-PAGE 图.如图 3 所示:左边的条带为 ATG12 蛋白,右边为 marker 条带,marker 的分子质量图中已经标出.以 67 kD 为参照来估测蛋白浓度,67 kD 代表的 marker 质量浓度为每 10  $\mu\text{L}$  含 8  $\mu\text{g}$ ,而目的蛋白的颜色只有其 5/8 深,则蛋白浓度为每 10  $\mu\text{L}$   $5/8 \times 8 \mu\text{g}$ ,即每 10  $\mu\text{L}$  为 5  $\mu\text{g}$ .

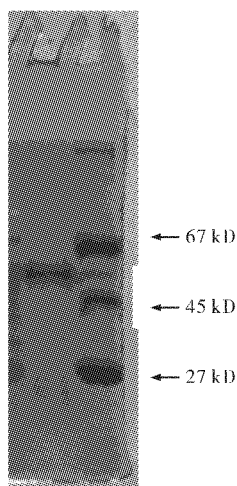


图 3 ATG12 多克隆抗体的 SDS-PAGE

Fig. 3 SDS-PAGE of ATG12 polyclonal antibody

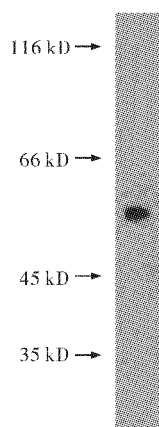


图 4 免疫印记蛋白质大小

Fig. 4 Size of Immune mark protein

### 2.4 Western blotting 分析

图 4 所示的是免疫印记蛋白质大小及在 Colon(结肠)中的表达条带中的表达情况.

由图 4 可知:Western blotting 条带上的点清晰,说明其能在结肠中较好的表达,由图知蛋白质大小为 55 kD 左右.

## 3 结 语

使用带 GST 标签的融合蛋白免疫新西兰大白兔,制备得到 ATG12 多克隆抗体,运用 ELISA 及 Western blotting 检测结果显示此抗体效价及特异性较高,Western blotting 检测结果显示其在结肠组织中表达,SDS-PAGE 结果显示其浓度也较高.本研究成功得到浓度较高的 ATG12 多克隆抗体,并证实其在结肠组织中表达较明显.

## 致谢

感谢天惠生物公司对本研究的支持与帮助.

## 参考文献:

- [1] 周建光,杨梅. 免疫学技术的发展及临床应用[J]. 医疗装备,2011,24(7): 49-51.
- [2] 孔维,杨文辉. 单克隆抗体及其应用的研究进展[J]. 畜牧兽医科技信息,2009(1): 9-11.
- [3] Ashford T P, Porter K R. Cytoplasmic components in hepatic cell lysosomes[J]. The Journal of cell biology,1962(1):198-202.
- [4] 谭荣荣,刘明炎,龚自明. 茶尺蠖核型多角体病毒多克隆抗体的制备及检测应用[J]. 湖北农业科学,2012,51(2): 298-301.
- [5] 张花美,李因来,潘熙萍. 抗麦草畏多克隆抗体 v 的制备及其间接竞争 ELISA 检测方法的建立[J]. 浙江大学学报: 农业与生命科学版,2012,38(2): 153-158.
- [6] Susumu H T, Suzuki K, Akahori Y. Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity is induced by a single-chain Fv-protein III fusion in the presence of a rabbit anti-protein III polyclonal antibody[J]. Immunology Letters,2011,136(1):44-48.
- [7] Horiguchi T, Urushitani H, Ohta Y. Establishment of a polyclonal antibody against the retinoid X receptor of the rock shell Thais clavigera and its application to rock shell tissues for imposex research[J]. Ecotoxicology,2010,19(3):571-576.
- [8] Xu M Y, Wang S D. Prokaryotic expression of pathogenesis related protein 1 gene from Nicotiana benthamiana: antifungal activity and preparation of its polyclonal antibody[J]. Biotechnology Letters,

- 2012,34(5):919-924.
- [9] Anderson G J, Cipolla C M, Kennedy R T. Western Blotting Using Capillary Electrophoresis[J]. Analytical chemistry, 2011, 83 (4):1350-1355.
- [10] Welinder C, Ekblad L. Coomassie Staining as Loading Control in Western Blot Analysis[J]. Journal of proteome research, 2011, 10(3): 1416-1419.
- [11] Rath A, Glibowicka M, Nadeau V G. Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009, 106(6):1760-1765.
- [12] Hans J C, Wessels R O. LC-MS/MS as an alternative for SDS-PAGE in blue native analysis of protein complexes[J]. Cell & Molecular Biology, 2009, 9 (17):4221-4228.
- [13] Riechers A, Schmidt F, Stadlbauer S. Detection of Protein Phosphorylation on SDS-PAGE Using Probes with a Phosphate-Sensitive Emission Response [J]. Bioconjugate Chemistry, 2009, 20 (4):804-807.

## Purification and detection of autophagy-related gene fusion protein restructured polyclonal antibody

ZHU Xiong-wei, ZHANG You-hong, XU Zhi-peng, SU Teng-jia, XIONG Yao, ZHAI Li-li

(Key Laboratory for Green Chemical Process of Ministry of Education, School of Chemical Engineering and Pharmacy, Wuhan Institute of Technology, Wuhan 430074, China)

**Abstract:** The aim of the study is to purify and identify the autophagy-related gene fusion protein restructured polyclonal antibody, and to detect the immune localization in tissues. Firstly, the autophagy-related gene fusion protein restructured polyclonal antibody with glutathione-S-transferase tag was synthesized, the New Zealand white rabbits was immunized and the polyclonal antibody was prepared. Secondly, the antibody concentration was detected by polyacrylamide gel electrophoresis. Finally, the antibody was purified in the anti-serum by using immunoaffinity purification, antibody titer was detected by enzyme linked immunosorbent assay methods, the antibody specificity and the organization expression were tested by Western blotting. The result shows that autophagy-related gene fusion protein restructured polyclonal antibody concentration is 10  $\mu$ L per 5  $\mu$ g, which is detected by polyacrylamide gel electrophoresis; the antibody is proved to have higher titer and specificity by enzyme linked immunosorbent assay; the molecular weight of the protein is about 55 kD from Western blotting results.

**Key words:** polyclonal antibody; immune affinity purification; enzyme linked immunosorbent assay; Western blotting; polyacrylamide gel electrophoresis

本文编辑:张 瑞