

抗组氨酰-tRNA 合成酶单克隆抗体的制备及初步鉴定

曾小龙¹, 刘秀明¹, 徐伟文²

(1.广东教育学院 生物系,广东 广州 510303; 2.广州达瑞抗体工程技术有限公司,广东 广州 510663)

摘要:【目的】制备均一性和特异性高的抗组氨酰-tRNA 合成酶抗体,为研究皮肌炎和多肌炎的检测提供方法,为制备检测试剂盒提供原料。【方法】采用常规融合和间接 ELISA 检测法,获取杂交瘤细胞株;Protein G Sepharose 4FF 和 Sephadex G50 结合对含有单克隆抗体的腹水进行纯化;SDS-PAGE 电泳技术进行单克隆抗体的鉴定。【结果】筛选获得了 2 株稳定分泌阳性抗体的杂交瘤细胞株,分别命名为 W001 和 W002;杂交瘤细胞克隆后,100%的检测孔保持了分泌抗组氨酰-tRNA 合成酶抗体的能力;腹水纯化达到了较理想的效果;该 2 株单克隆抗体能特异性针对组氨酰-tRNA 合成酶,并能跟天然的蛋白结合。【结论】所制备的均一性和特异性高的抗组氨酰-tRNA 合成酶抗体,可直接用于在 ELISA、免疫印迹、免疫组化等研究方面,达到了试验的目的。

关键词: 组氨酰-tRNA 合成酶; 抗组氨酰-tRNA 合成酶; 单克隆抗体; 鉴定

中图分类号:R392.11 文献标识码:A 文章编号:1672-3554(2008)05-0606-05

Preparation and Identification of Monoclonal Antibody to Anti-histidyl-tRNA Synthetase

ZENG Xiao-long¹, LIU Xiu-ming¹, XU Wei-wen²

(1.Department of Biology, Guangdong Education Institute, Guangzhou 510303, China;

2.Guangzhou Darui Antibody Co.Ltd, Guangzhou 510663, China)

Abstract: 【Objective】 To produce anti-histidyl-tRNA synthetase, which enjoy high degree of homogeneity and distinction, to provide the test methods for the study of the diseases of dermatomyositis and polymyositis. Besides, to produce materials for the test liquid. 【Methods】 With the regular combined methods available and indirect ELISA to obtain hybridoma cell lines; to purify the ascites with monoclonal antibody in the combined use of Protein G Sepharose 4FF and Sephadex G50; to identify monoclonal antibody with the electrophoresis technique. 【Results】 Two hybridoma cell lines, named W001 and W002, have been found in the research, which can secrete anti-histidyl-tRNA synthetase monoclonal antibody stably. After the cells of hybridoma being cloned, 100% checking holes keep the capability of secreting anti-histidyl-tRNA synthetase monoclonal antibody. And the ascites of the monoclonal antibody has been purified by Protein G Sepharose 4FF and Sephadex G50, in which the purification was satisfying. In addition, the two monoclonal antibodies showed their ability to compose mold, and to integrate with natural albumen. 【Conclusion】 The anti-histidyl-tRNA synthetase monoclonal antibodies in this study are homogeneous and distinctive, which can be used directly in the research of ELISA, Western Blot and Immunohistochemistry etc. Obviously, the aim of this research has been achieved.

Key words: histidyl-tRNA synthetase; anti-histidyl-tRNA synthetase; monoclonal antibody; identification

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2008, 29(5): 606-610]

抗组氨酰-tRNA 合成酶抗体是一类结缔组织病中的多肌炎 (polymyositis) 和皮肌炎

(dermatomyositis, PM/DM) 的标志性自身抗体。PM/DM 指横纹肌弥漫性炎症疾患,主要累及对称

收稿日期:2008-04-01

基金项目:广东省科技攻关项目(2007A020300008-6)

作者简介:曾小龙(1963-),男,广东丰顺人,副教授,主要研究方向:微生物学、药理学,E-mail: zengxiaolong@gdei.edu.cn

性的近端肢带肌,颈和咽部肌肉无力和萎缩,严重者导致心肌、呼吸肌群受累,引起死亡。只出现肌痛肌无力现象者称多肌炎;在多肌炎的基础上,出现典型皮疹者称皮肌炎。PM/DM 是自身免疫性疾病,临床检验发现 25% ~ 30% 的患者含抗组氨酰-tRNA 合成酶抗体^[1](临床上又称抗 Jo-1 抗体),而其他抗合成酶抗体在 PM/DM 中的阳性率仅为 1% ~ 3%,其中 PM 的阳性率为 30% ~ 40%^[2],尤其是那些同时发生肺间质病变的患者^[3]。许多研究者臻力于 PM/DM 的临床症状、诊断和治疗的研究,并研发出了检测抗 Jo-1 抗体的试剂盒。但一直以来,对 PM/DM 病因的研究缓慢,报道极少,发病机理尚不清晰。本研究旨在制备均一性和特异性高的抗组氨酰-tRNA 合成酶抗体,为研究皮肌炎和多肌炎的检测方法提供依据,为制备检测试剂盒提供原料。

1 材料和方法

1.1 材料及试剂

组氨酰-tRNA 合成酶(histidyl-tRNA synthetase),由复旦大学生命科学院季朝能教授课题组提供;小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 细胞,由广州达瑞抗体工程技术有限公司实验室提供;Balb/c 小鼠,6 ~ 8 周龄,雌性,体质量 18 ~ 20 g,购于广州中医药大学实验动物中心;HT、HAT、8-氮鸟嘌呤购于 Sigma 公司;RPMI-1640 粉剂购于 GIBCO invitrogen corporation;胎牛血清(FBS)购于杭州四季青生物工程材料有限公司;辣根过氧化物酶标记羊抗鼠 IgG 购于 Bethyl Laboratories, Inc;福氏完全佐剂、福氏不完全佐剂、5-对氨基水杨酸、四甲基联苯胺(TMB)购于 Sigma 公司;免疫球蛋白标准亚类鉴定试剂盒购于 HyCuly Biotechnology(HBT);聚乙二醇 PEG(1450);低分子量蛋白 Marker 购于 BIO-RAD。

1.2 方法

1.2.1 动物免疫 按董志伟^[4]方法进行小白鼠的初次、第 2 次和第 3 次免疫,获得免疫小白鼠。

1.2.2 抗原最佳使用浓度的筛选 用间接 ELISA 检测法和方阵滴定试验法选择最佳抗原包被浓度,辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗小鼠 IgG 作为二抗^[4]。阳性血清(免疫小白鼠)自 1:100 起倍比稀释至 1:12 800,各设两组阴性和空白对照,共 12 组,依次加样(100 μ L/孔)、酶标二抗(50 μ L/孔)、

底物(A:B=1:1 混匀,50 μ L/孔)、2 mol/L H₂SO₄(50 μ L/孔)。用酶标检测仪测定 OD₄₅₀ 值。

1.2.3 杂交瘤细胞株的建立 获取复苏骨髓瘤细胞(SP2/0)进行细胞融合,ELISA 法检测。先后进行亚克隆化和克隆化培养杂交瘤细胞,再扩大培养,用于制备腹水和冻存。用小鼠腹腔注射法制备腹水,再用 Protein G Sepharose 4FF 纯化和 Sephadex G50 脱盐、筛选和建立杂交瘤细胞株^[4]。

1.2.4 单克隆抗体的鉴定 细胞培养上清效价测定:采用间接 ELISA 法,以免疫小白鼠的血清作阳性对照,以空白作阴性对照^[4]。抗体亚类鉴定:方法按免疫球蛋白标准亚类鉴定试剂盒的说明进行。单克隆抗体的 SDS-PAGE 电泳^[5]:分别取纯化后的单克隆抗体 W001 和 W002 的峰值蛋白进行 SDS-PAGE 电泳。单克隆抗体与抗原的免疫印迹(Western Blot):①电泳(方法同单克隆抗体的 SDS-PAGE 电泳):第 1 道为组氨酰-tRNA 合成酶 10 μ L,第 2 道蛋白 Marker 10 μ L,一抗为细胞株 W001 的上清液。②转膜条件:20 V,30 min;280 mA,120 min。在冰水中进行。③用 5% 的脱脂牛奶封闭,4 $^{\circ}$ C 过夜。④加细胞株 W002 上清液,37 $^{\circ}$ C,60 min。加二抗,37 $^{\circ}$ C,60 min。ECL 显色。⑤压膜,拍片。单克隆抗体与天然蛋白的免疫印迹(Western Blot):电泳方法同单克隆抗体的 SDS-PAGE 电泳。第 1,2,3,4,5 道依次上样蛋白 Marker 10 μ L 空白,正常细胞 20 μ L,病变细胞 20 μ L,组氨酰-tRNA 合成酶 10 μ L。

2 结果

2.1 抗原的最佳使用浓度

采用酶标检测仪测定 OD₄₅₀ 值,结果如表 1。表中序号 1-8 为实验组,9-10 和 11-12 分别为阴性对照和空白对照组,A、B、C 分别表示浓度为 0.003 mg/mL、0.004 mg/mL、0.005 mg/mL 的抗原用 CBS(小牛血清)。

用间接 ELISA 检测法筛选时,选择阳性血清和阴性血清的比值最大,且 OD₄₅₀ 值接近于 1 的抗原稀释度作为间接 ELISA 反应体系的最佳工作浓度。筛选杂交瘤细胞时用该体系对细胞上清液进行检测,当 P/N \geq 2.1 时,判为阳性。因此,表 1 结果显示:抗原的最佳使用浓度时 0.003 mg/mL,即小鼠阳性血清的最佳稀释度是 1:800。

表 1 抗原最佳使用浓度的确定

Table 1 The determination of the optimal concentration of antigen (mg/mL)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1.423	1.179	1.135	0.988	0.742	0.411	0.231	0.120	0.067	0.069	0.001	0.002
B	1.622	1.598	1.345	1.456	1.121	0.902	0.611	0.371	0.108	0.128	0.003	0.001
C	1.704	1.656	1.539	1.441	1.107	0.912	0.784	0.551	0.121	0.052	0.002	0.001

Note: The antigen is enveloped at the ratio of 1:250, 1:500, 1:1 000

2.2 杂交瘤细胞株的筛选和建立

杂交瘤细胞株筛选过程中的数据见表 2。表中符号“+、-”分别表示阳性和阴性。

表 2 单克隆抗体筛选过程的数据

Table 2 The data of the screening process of monoclonal antibody (OD₄₅₀)

	Cell fusion	Filter 1	Filter 2	Filter 3
W001	1.578	0.768	0.794	1.936(+)
W002	1.677	0.949	0.776	1.695(+)
-	0.123	0.091	0.078	0.062
+	1.602	1.083	1.092	2.002

经过上述试验方法,建立了杂交瘤细胞株分别为 W001 和 W002,100%检测孔保持了分泌抗组氨酰-tRNA 合成酶抗体的能力,其融合率达 90%。

2.3 单克隆抗体的鉴定

2.3.1 细胞培养上清效价的测定 细胞培养上清效价的测定结果见表 3。表中符号“-”表示“空白”。

表 3 结果显示:细胞株 W001 上清效价为 1:1600,细胞株 W002 上清效价为 1:800。

2.3.2 抗体亚类的鉴定 抗体亚类鉴定的结果如图 1。图 1 显示:细胞株 W001 和 W002 分泌的单克隆抗体亚类都是重链为 IgG1,轻链为 κ。

2.3.3 单克隆抗体的 SDS-PAGE 电泳 单克隆抗体的 SDS-PAGE 电泳结果如图 2。

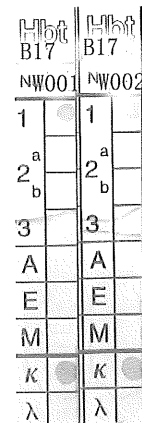


图 1 细胞株上清液的效价图

Fig.1 The picture of the titer of supernatant of cell line

The heavy-chains in Fig. 1:1 is IgG1, 2a is IgG2a, 2b is IgG2b, 3 is IgG3, A is IgA, E is IgE, M is IgM; light-chains: κ is κ-chain, λ is λ-chain.

结果显示:腹水经 Protein G sepharose 4FF 和 sephadex G50 纯化后在电泳中基本没有杂带,纯化效果比较理想。

2.3.4 单克隆抗体的特异性(Western Blot) 单克隆抗体与抗原的免疫印迹和单克隆抗体与天然蛋白的免疫印迹结果分别如图 3、4。图 3 显示:细胞株 W001 分泌的单克隆抗体能够与重组抗原结合。图 4 显示:细胞株 W002 分泌的单克隆抗体能够跟重组抗原和天然蛋白结合,跟正常细胞中相比有一定的区别。但在病变细胞中,其特异性较

表 3 细胞培养上清效价测定

Table 3 The test of titer of supernatant in cell cultivation

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1.655	1.431	1.201	0.988	0.703	0.455	0.211	0.201	0.200	0.199	0.126	0.115
B	1.325	1.056	0.883	0.455	0.201	0.200	0.197	0.147	0.125	0.117	0.115	0.112
C	-	1.584	1.509	1.415	1.315	1.053	0.777	0.530	0.312	0.194	0.155	0.078
D	-	0.127	0.177	0.125	0.105	0.107	0.098	0.087	0.080	0.078	0.063	0.059

Note: The serial number 1 is the same of primary antibody, beginning from 2 primary antibody is diluted at the ratio of 1:200; A is the supernatant of the cell line W001, B is the supernatant liquor of the cell line W002, C is the positive contrast, D is the negative contrast; the blank means the omission of primary antibody

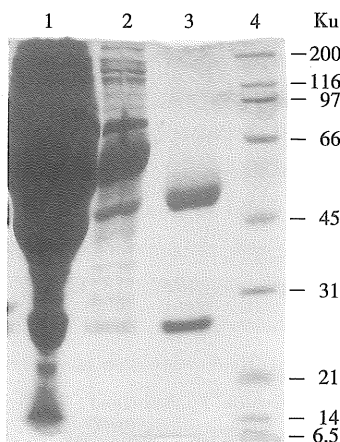


图 2 抗体纯化结果

Fig. 2 The result of the purification of antibody

Holes 1, 2, 3, 4 containing respectively the ascites before purification, through liquid, monoclonal antibody after purification and albumen Marker

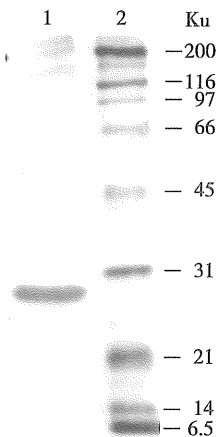


图 3 单克隆抗体与抗原的免疫印迹结果

Fig.3 The result of immunoblotting of monoclonal antibody and antigen

The arrow in the diagram pointing to the prupose strip

低, 出现了较多的非特异性条带, 而且目的条带比一些非特异性条带弱。

3 讨论

PM/DM 的特异性抗体是抗组氨酰-tRNA 合成酶抗体, 其抗原是组氨酰-tRNA 合成酶(HARS), 临床上称之为 Jo-1。

组氨酰-tRNA 合成酶是胞内酶, 由“管家”基因编码, 可在所有的组织中表达。研究发现, 抗组氨酰-tRNA 合成酶抗体只能识别哺乳动物的 HRS 的抗原决定簇, 不能识别原核生物和真菌分子^[6],

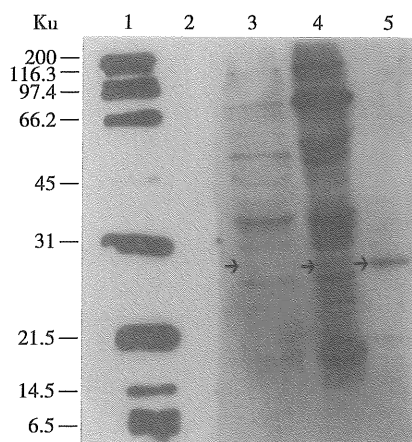


图 4 单克隆抗体与天然蛋白的免疫印迹结果

Fig. 4 The result of immunoblotting of monoclonal antibody and natural albumen

In the diagram, albumen Marker 10 μ L, blank and normal cell 2 0 μ L, polymyositis cell 20 μ L and histidyl-tRNA synthetase 10 μ L were repectively put in number 1, 2, 3, 4, 5. The arrow indicates the position of the prupose strip.

但可以同时识别抗原上多个相关或相互独立的抗原决定簇^[7]。有研究者认为, 组氨酰-tRNA 合成酶分子上有 3 个抗原决定簇, 其中两个分别位于氨基酸 2-44 和 286-509 两个区域, 而第 3 个抗原决定簇虽然没有确定其位置, 但发现抗组氨酰-tRNA 合成酶抗体可以抑制合成酶的活性。研究还发现, 发生热变性的组氨酰-tRNA 合成酶分子不能与抗组氨酰-tRNA 合成酶抗体发生免疫反应^[8], 这意味着抗原决定簇对空间结构有一定的依赖性。

抗组氨酰-tRNA 合成酶抗体主要作用于组氨酰-tRNA 合成酶并阻止组氨酰-tRNA 与其同源氨基酸(组氨酸)结合, 同时聚集在酶的活性部位, 与酶的多个部位发生作用而引起酶的构形损害, 使合成酶失去活性。

实验结果表明: 所获得的 2 个杂交瘤细胞株能稳定分泌阳性抗体, 经克隆后, 100% 的检测孔保持了分泌抗组氨酰-tRNA 合成酶抗体的能力, 这与杨湘越等^[9]通过基因克隆在巴斯德毕赤酵母中成功表达 HARS 完全一致。该 2 个杂交瘤细胞株能与组氨酰-tRNA 合成酶和天然蛋白结合, 具有免疫原性和免疫特异性^[10]。另有研究表明, SDS-PAGE 和 IBT 结果显示, 融合蛋白分子量 75000, 具有天然人自身抗原 Jo-1 的免疫原性, 成功克隆表达人自身抗原 Jo-1^[11]。因而所制备的单克隆抗体可以用于亲和层析纯化抗原, 可以在制备试剂

盒时用于检测抗原,可以用于 ELISA、免疫印迹、免疫组化学等研究方面,为建立 PM/DM 自身免疫抗体检测方法奠定了基础。但细胞株 W002 分泌的单克隆抗体的特异性较低,以及对 PM/DM 的发病机理,有待进一步探讨。

参考文献:

- [1] Targoff IN, Reichlin M. Humoral immunity in polymyositis and dermatomyositis[J]. Mt Sinai J Med, 1988, 55(3): 487-493.
- [2] Mathews MB, Bernstein RM. Myositis autoantibody inhibits histidyl -Trysynthetase: model for autoimmunity [J]. Nature, 1983, 304(4): 177-179.
- [3] Yoshida S, Akizuki M. The precipitating antibody to an acidic nuclear protein antigen, the Jo-1, in connective tissue diseases; A marker for a subset of polymyositis with interstitial pulmonary fibrosis[J]. Arthritis Rheum, 1983, 26(2): 604-611.
- [4] 董志伟,王 琰. 抗体工程[M].北京:北京医学大学出版社,2002:56-235.
- [5] 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术[M].北京:科学出版

社,2000:152-194.

- [6] Levine SM, Rosen A, Casciola Rosen LA. Antiaminoacyl tRNA synthetase immune responses: insights into the pathogenesis of the idiopathic inflammatory myopathies [J]. Curr Opin Rheumatol, 2003, 15(6): 708-713.
- [7] Targoff IN, Reichlin M. Measurement of antibody to Jo-1 by ELISA and comparison to enzyme inhibitory activity[J]. J Immunol, 1987, 138(12): 2874-2882.
- [8] Martin A, Shulman MJ, Tusi FW. Epitope studies indicate histidyl-tRNA synthetase is a stimulating antigen in idiopathic myositis[J]. Arthritis J, 1995, 9(12): 1226-1233.
- [9] 杨湘越,兰小鹏,冯福英,等.自身抗原组氨酰转移核糖核酸合成酶基因在巴斯德毕赤酵母中的分泌表达研究[J].生物技术通讯,2006,17(6): 856-858.
- [10] 毕智丽,吴亦红,赵晓瑜,等.人组氨酰-tRNA 合成酶基因的克隆与表达[J].河北大学学报:自然科学版,2005,25(03): 318-322.
- [11] 杨湘越,兰小鹏,廖 剑,等.自身抗原组氨酰转移核糖核酸合成酶的基因克隆和原核表达研究[J].中华检验医学杂志,2005,28(11): 1201-1203.

(编辑 徐 杰)

(上接第 601 页 from page 601)

度迅速下降,不会与芬太尼产生明显的相互作用,加之本研究中芬太尼负荷剂量(1.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$)仍属于小剂量给药,因而对麻醉的苏醒过程影响不大。然而,由于本研究所涉及的研究对象主要为青壮年病人,故此 IVPCA 给药方法对老龄病人或小儿是否适用尚有待进一步研究。

总之,本研究结果表明:在异丙酚-瑞芬太尼复合麻醉结束时给予 1.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 芬太尼作为 IVPCA 的负荷给药量可安全有效地接替瑞芬太尼的镇痛作用,提高麻醉的整体质量,值得推广应用。

参考文献:

- [1] Egan TD, Lemmens HJM, Fiset P, et al. The pharmacokinetics of the new short-acting opioid remifentanyl (GI87084B) in healthy adult male volunteers [J]. Anesthesiology, 1993, 79(6): 881-892.
- [2] Beers R, Camporesi E. Remifentanyl update: clinical science and utility [J]. CNS Drugs, 2004, 18(15): 1085-1104.
- [3] Kiyama S. Postoperative analgesia after remifentanyl [J].

Masui, 2007, 56(11): 1306-1311.

- [4] Munoz HR, Guerrero ME, Brandes V, et al. Effect of timing of morphine administration during remifentanyl-based anesthesia on early recovery from anesthesia and postoperative pain [J]. Br J Anaesth, 2002, 88(6): 814-819.
- [5] Dolin SJ, Cashman JN, Bland JM. Effectiveness of acute postoperative pain management: I. Evidence from published data [J]. Br J Anaesth, 2002, 89(4): 409-423.
- [6] 张文其,邓硕曾.超前镇痛的某些发现及其应用前景 [J]. 国外医学:麻醉与复苏分册, 1996, 17(4): 199-201.
- [7] Gaszynski TM, Strzelczyk JM, Gaszynski WP. Post-anesthesia recovery after infusion of propofol with remifentanyl or alfentanil or fentanyl in morbidly obese patients [J]. Obes Surg, 2004, 14(4): 498-503.
- [8] Ahmad J, Riley R, Sieunarine K. PCA-induced respiratory depression simulating stroke following endoluminal repair of abdominal aortic aneurysm: a case report [J]. J Med Case Reports, 2007, 10(1): 45.

(编辑 于占洋)