

肺弹性蛋白降解肽段人工抗原的合成与鉴定*

彭方毅^{1,2}, 崔玉花¹, 马明炎², 李元宽², 鄢红雨², 姜海蓉^{1△}, 周欢¹

(1. 重庆理工大学药学与生物工程学院, 重庆 400054; 2. 重庆市垫江县中医院检验科 408300)

[摘要] **目的** 制备和鉴定肺弹性蛋白降解肽段人工抗原, 为进一步研制慢性阻塞性肺疾病(COPD)免疫检测试剂盒打下良好基础。**方法** 以 Sulfo-SMCC 为偶联剂, 钥孔血蓝蛋白(KLH)为载体蛋白制备免疫原; 经紫外扫描和十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳法(SDS-PAGE)电泳鉴定偶联情况; 以免疫原免疫 Balb/c 小鼠制备特异性抗体, 间接竞争酶联免疫吸附实验(ELISA)法评价抗血清效价及特异性。**结果** 紫外扫描和 SDS-PAGE 电泳确认了肺弹性蛋白降解肽段人工抗原合成成功, 其蛋白浓度为 1.181 mg/mL, 抗血清效价高于 1:64 000, IC₅₀ 为 13.7 ng/mL, 抗血清与无关肽段无交叉反应。**结论** 本实验成功制备了肺弹性蛋白降解肽段人工抗原, 其具有较好的免疫原性, 为建立快速准确检测 COPD 免疫检测方法奠定基础。

[关键词] 肺弹性蛋白降解肽段; 人工抗原; 抗体**[中图分类号]** R392-33**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2015)22-3037-03

Synthesis and identification of artificial antigens of lung elastin degradation peptide*

Peng Fangyi^{1,2}, Cui Yuhua¹, Ma Mingyan², Li Yuankuan², Wu Hongyu², Jiang Hairong^{1△}, Zhou Huan¹

(1. Pharmaceutical Engineering Specialty, School of Pharmacy and Bioengineering, Chongqing University of Technology, Chongqing 400054, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Dianjiang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Dianjiang, Chongqing 408300, China)

[Abstract] **Objective** To synthesize and identify artificial antigens of lung elastin degradation peptide and for the purpose of preparation of COPD test. **Methods** The artificial antigens were synthesized by Sulfo-SMCC and KLH. The complete antigens were identified by ultraviolet spectrum and SDS-PAGE. Immunize Balb/c mice was used to prepare antibody. The antiserum activity was evaluated by indirect competitive ELISA. **Results** The artificial antigens were identified by ultraviolet spectrum and SDS-PAGE. The protein concentration was 1.181 mg/mL. The titer of antiserum was 1:64 000, and IC₅₀ was 13.7 ng/mL. The antiserum had no cross-reaction with nonsense peptide. **Conclusion** The artificial antigens were acquired successfully, which had good immunogenicity. The results have laid basis for COPD test.

[Key words] lung elastin degradation peptide; artificial antigens; antibody

慢性阻塞性肺疾病(COPD)是一种常见多发病, 表现为不可逆性气道阻塞的慢性支气管炎和肺气肿^[1], 患病率约为 3%, 严重影响患者的健康和生命质量。与肺气肿发生有关的内源性蛋白酶主要是中性粒细胞和单核细胞释放的弹性蛋白酶, 此酶能降解肺组织中的弹性硬蛋白、结缔组织基质中的胶原和蛋白多糖, 破坏肺泡壁结构^[2]。任笑蒙等^[3]在对肺气肿表面活性物质蛋白 A、B 的基因表达研究中发现, 弹性蛋白酶诱发的肺泡 II 型上皮结构和功能的改变直接导致了内源性肺泡表面活性物质的变性和坏死。He 等^[4]通过人类嗜中性粒细胞弹性蛋白酶对肺弹性蛋白进行降解, 将产生的肽混合物经高效液相色谱/电喷雾串联质谱分析, 发现部分肽段在 COPD 患者血浆和唾液中存在而在正常人中缺乏。本研究利用 COPD 患者特异存在的一段肺弹性蛋白降解肽段制备人工抗原, 通过免疫小鼠制备高特异性的抗体, 为建立快速准确的 COPD 免疫检测方法奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 肺弹性蛋白降解肽段, 由北京中科亚光生物科

技术有限公司合成; 鸡卵清蛋白(OVA)、钥孔血蓝蛋白(KLH)、Sulfo-SMCC 均购自 Thermo 公司; GelCode Blue Stain Reagent 染色液、0.2% 溴酚蓝、10.0% TEMED、低分子量蛋白标准购自 BIO-RAD 公司; 蛋白质定量(BCA)试剂盒, 购自 Pierce 公司。

1.1.2 仪器 紫外分光光度计(UV-2450)购自 Shimadzu; 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳法(SDS-PAGE)电泳仪, 由北欧生物科技(北京)有限公司提供; 酶标仪(VersaMax)购自 Molecular Devices 分子仪器有限公司; 移液器购自 Eppendorf 公司; 漩涡混合器(QL-901)购自江苏海门其林贝尔; 洗板机(ZMX-988B)购自北京天石医疗。

1.1.3 实验动物 6~8 周龄雌性 Balb/c 小鼠, 体质量 18~22 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 免疫原的制备^[5-9] 取 360 μL 的 KLH(10 mg/mL)与 40 μL 的 OVA(10 mg/mL)溶液混合, 加入 61 μL 的 Sulfo-SMCC(4.8 mg/mL), 37 °C 孵育 30 min, 每隔 15 min 轻柔混合 1 次。于混合液中加入 1 mL 的肺弹性蛋白降解肽段溶液(4 mg/mL), 室温反应 2 h。在 2~8 °C 条件下, 将反应液置于 1 L

体积的 $1\times$ 磷酸盐缓冲液(PBS)中透析,至少换液 5 次。取出偶联物,储存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的冰箱中。

1.2.2 抗原的鉴定^[10-13]

1.2.2.1 抗原浓度测定 参照 BCA 试剂盒的操作步骤,以牛血清清蛋白(BSA)为标准蛋白,检测 562 nm 处的吸光度(OD)值,以浓度为 X 值,以 OD 值为 Y 值,构建标准曲线。根据标准曲线计算偶联物的蛋白浓度。

1.2.2.2 SDS-PAGE 电泳分析 用 12% 的分离胶,5% 的浓缩胶对偶联物、OVA 进行垂直 SDS-PAGE 电泳。

1.2.2.3 完全抗原、半抗原、载体蛋白的紫外分光光度法检测 以 $1\times$ PBS 稀释偶联物、肺弹性蛋白降解肽段、OVA、KLH 至 0.1 mg/mL ,在 $230\sim 350\text{ nm}$ 的波长范围内进行紫外扫描。

1.2.3 多抗血清(pAb)的制备 以完全抗原免疫 8 周龄小鼠 6 只,首次免疫以福氏完全佐剂乳化抗原,皮下分点注射,以腋下淋巴处为宜,免疫剂量为 $60\text{ }\mu\text{g/只}$ 。后期免疫以福氏不完全佐剂乳化抗原,免疫剂量为 $30\text{ }\mu\text{g/只}$,每隔 2 周免疫 1 次,共免疫 5 次。

1.2.4 pAb 的鉴定^[14-16]

1.2.4.1 血清效价的测定 采用间接酶联免疫吸附实验(ELISA)测定血清效价,以 10 ng/mL 的包被抗原包被酶标板 $100\text{ }\mu\text{L/孔}$, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h,洗涤 5 次,拍干。血清以 $1:1\ 000$ 为起始浓度,4 倍梯度稀释, $100\text{ }\mu\text{L/孔}$, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h,洗涤 5 次,拍干。加入辣根过氧化物酶[HRP-羊抗鼠 IgG 二抗($1:25\ 000$)], $100\text{ }\mu\text{L/孔}$, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h,洗涤 5 次,拍干。加入 TMB 显色液 $100\text{ }\mu\text{L/孔}$, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 显色 15 min,加入 2 mol/L H_2SO_4 $100\text{ }\mu\text{L/孔}$ 终止。酶标仪测定 OD 值,测定波长为 450 nm ,参考波长为 650 nm ,P/N 值大于 2.1 倍以上为阳性孔。

1.2.4.2 血清特异性检测 选择效价高的抗血清,根据方阵滴度以 OD 值在 2.0 左右的稀释度建立间接竞争 ELISA 法检测血清特异性。将肺弹性蛋白降解肽段溶液稀释成 $1\ 000.0$ 、 250.0 、 62.5 、 15.6 ng/mL 的浓度。取与肺弹性蛋白降解肽段无关的其他肽段按同样的方法稀释,进行间接竞争 ELISA 检测评价抗血清特异性。

2 结 果

2.1 偶联物蛋白浓度测定 BCA 法蛋白测定标准曲线如图 1 所示,经测定,结合物的两复孔值分别为 $OD_1=0.886$, $OD_2=0.890$ 。根据曲线计算得结合物溶液蛋白浓度为 1.181 mg/mL 。

2.2 SDS-PAGE 电泳图 由于 KLH 分子量在 $4.5\times 10^8\sim 1.3\times 10^{10}$ 之间,分子量过大在电泳图上无法可见。因此在反应体系中加入 10% 的 OVA 以验证偶联是否成功。由图 2 所示,根据 Marker 条带可知,OVA 条带在 43×10^3 左右,偶联物条带较 OVA 大,由此分析可知肺弹性蛋白降解肽段与 OVA 偶联成功,证明反应体系没问题,可认为肺弹性蛋白降解肽段与 KLH 偶联成功。

2.3 紫外扫描结果 紫外扫描显示 KLH、OVA 均在 280 nm 处有最大吸收峰,肺弹性蛋白降解肽段没有吸收峰,偶联物在 278 nm 处有最大吸收峰,与 KLH、OVA 相比发生了部分偏移。由此分析可得肺弹性蛋白降解肽段与 KLH 偶联成功,见图 3。

2.4 抗血清效价测定 被免疫的 6 只小鼠除了 8 号均产生了

较强抗体,第 3 次血清效价相对于第 2 次血清效价有所增高。其中 7 号小鼠血清效价最高,第 3 次血清效价大于 $1:64\ 000$ 。

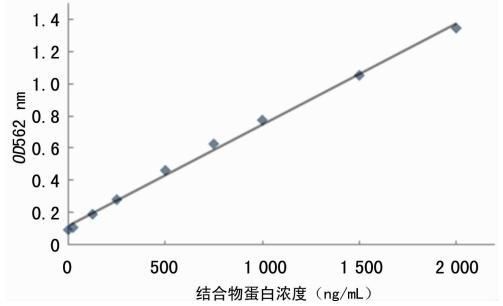
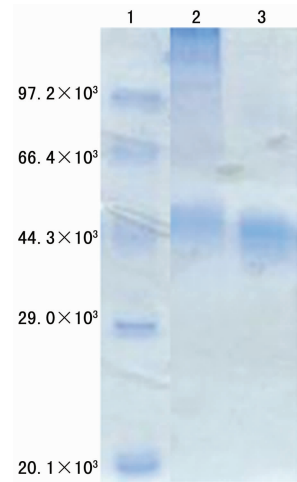
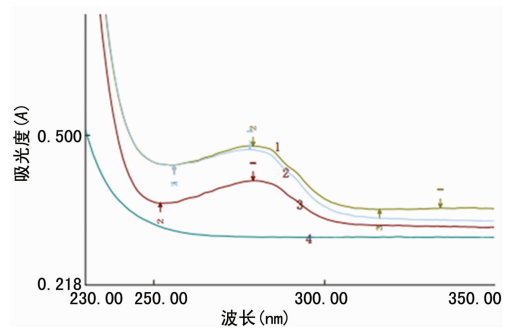


图 1 BCA 法蛋白测定标准曲线



1: Marker; 2: 偶联物; 3: OVA。

图 2 偶联物及 OVA 的 SDS-PAGE 电泳图



1: KLH; 2: 偶联物; 3: OVA; 4: 肺弹性蛋白降解肽段。

图 3 KLH、OVA、肺弹性蛋白降解肽段及偶联物的紫外光谱图

2.5 血清特异性鉴定 通过方阵实验确立了除 8 号小鼠外的血清最佳包被浓度及稀释度。除 4 号鼠外 (10 ng/mL),其余最佳包被浓度为 20 ng/mL 。4~9 号鼠的血清最佳稀释度分别为 $1:1\ 500$ 、 $1:1\ 500$ 、 $1:1\ 000$ 、 $1:6\ 000$ 、 $1:1\ 500$ 。在最佳包被浓度及稀释度条件下,间接竞争 ELISA 法确定 5 只小鼠血清均能与目的肽特异性结合,与无关肽没有交叉反应。其中,4 号与 7 号小鼠灵敏度较高,4 号的 IC_{50} 为 15.6 ng/mL ,7 号的 IC_{50} 为 13.7 ng/mL 。

3 讨 论

半抗原的设计和合成,以及效价高、特异性强的抗体的获得是建立免疫分析方法的关键步骤。半抗原的结构特征与蛋

白质连接的位点、连接臂的长度,以及偶联比的高低均直接影响着抗体的效价和特异性^[17-18]。本研究中所合成的肺弹性蛋白降解肽段分子量小,缺乏 T 细胞表位而无法直接诱导动物机体等产生特异性抗体,本身不具有免疫原性。由于其结构本身不具有适用于偶联的活性基团,如羧基、氨基、巯基等,本实验通过化学修饰在肽段一端连接上 GGC 片段,使其端基为半胱氨酸,借助交联剂 Sulfo-SMCC 与大分子载体蛋白 mcKLH 结合成功制备出人工抗原。实验周期短,操作简便。紫外扫描和 SDS-PAGE 电泳确认了该人工抗原合成成功,其蛋白浓度为 1.181 mg/mL,抗血清效价高于 1:64 000,IC₅₀ 为 13.7 ng/mL,且抗血清与无关肽段无交叉反应。间接竞争 ELISA 法初步证明抗血清具备效价高,特异性强等特点,为建立快速准确检测 COPD 免疫检测方法奠定了基础。

参考文献

- [1] 杨畅,冯燕,王新卫,等.慢性阻塞性肺疾病患者颈动脉弹性相关参数分析[J].中国全科医学,2013,16(1):47-49.
- [2] 蔡映云.慢性阻塞性肺疾病[M].北京:科学出版社,2010:165-180.
- [3] 任笑蒙,韩晓男,张旭晨,等.弹性蛋白酶肺气肿表面活性物质蛋白 A、B 的基因表达[J].医学研究通讯,2001,2(2):6-10.
- [4] He J, Turino GM, Lin YY. Characterization of peptide fragments from lung elastin degradation in chronic obstructive pulmonary disease[J]. Exp Lung Res, 2010, 36(9):548-557.
- [5] 卢希勤,施海燕,王鸣华.甲氧菊酯人工抗原的合成和鉴定[J].免疫学杂志,2009,5(3):346-348.
- [6] Barroso B, Abello N, Bischoff R. Study of human lung elastin degradation by different elastases using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry[J]. Anal Biochem, 2006, 358(2):216-224.
- [7] Brusselle GG, Joos GF, Bracke KR. New insights into the immunology of chronic obstructive pulmonary disease[J]. Lancet, 2011, 378(9795):1015-1026.
- [8] 宋娟,王榕妹,王悦秋,等.半抗原的设计、修饰及人工抗原的制备[J].分析化学,2010,38(8):1211-1218.
- [9] 万巍巍,张换敬,叶辉铭,等.25-羟维生素 D3 人工完全抗原的合成与鉴定[J].细胞与分子免疫学杂志,2011,27(11):1173-1175,1179.
- [10] 韩盈盈,李小兵,刘国文,等.重金属镉离子人工抗原的合成与鉴定[J].吉林农业大学学报,2013,35(2):188-191.
- [11] 邓省亮,李平,邱静,等.双烯雌酚人工抗原的合成及特异性抗体的制备[J].免疫学杂志,2011,3(3):250-253,258.
- [12] Kong T, Liu GW, Li XB, et al. Synthesis and identification of artificial antigens for cadmium and copper[J]. Food Chem, 2010, 123(4):1204-1209.
- [13] Sui K, Pan JR, Wang L, et al. Synthesis and identification of generic antigen for ether pyrethroid pesticides[J]. Chinese J Anal Chem, 2012, 40(8):1274-1278.
- [14] Yang TT, Zhao CC, Shen XP, et al. Synthesis and identification of hapten and complete antigen of norketa mine[J]. Chinese J Anal Chem, 2010, 38(1):109-112.
- [15] Cao H, Ji F, Wang XY, et al. Synthesis and identification of the hapten and complete antigens for Zearalenone[J]. Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi, 2011, 27(9):975-978.
- [16] Zhu GN, Gui WJ, Zheng ZT, et al. Synthesis and identification of artificial antigen for imidacloprid[J]. Agri Sci China, 2006, 5(4):307-312.
- [17] Cui Y, Zhang H, Ma Y, et al. Synthesis and identification of artificial antigens for sulfaguanidine and sulfathiazole[J]. Wei Sheng Yan Jiu, 2010, 39(4):440-443.
- [18] Liu B, Perepelov AV, Svensson MV, et al. Genetic and structural relationships of Salmonella O55 and Escherichia coli O103 O-antigens and identification of a 3-hydroxybutanoyltransferase gene involved in the synthesis of a Fuc3N derivative[J]. Glycobiology, 2010, 20(6):679-688.

(收稿日期:2015-02-08 修回日期:2015-07-10)

统计资料类型

统计资料共有三种类型:计量资料、计数资料和等级资料。按变量值性质可将统计资料分为定量资料和定性资料。

定量资料又称计量资料,指通过度量衡的方法,测量每一个观察单位的某项研究指标的量的大小,得到的一系列数据资料,其特点为具有度量衡单位、多为连续性资料、可通过测量得到,如身高、红细胞计数、某一物质在人体内的浓度等有一定单位的资料。

定性资料分为计数资料和等级资料。计数资料为将全体观测单位(受试对象)按某种性质或特征分组,然后分别清点各组观察单位(受试对象)的个数,其特点是没有度量衡单位,多为间断性资料,如某研究根据患者性别将受试对象分为男性组和女性组,男性组有 72 例,女性组有 70 例,即为计数资料。等级资料是介于计量资料和计数资料之间的一种资料,可通过半定量的方法测量,其特点是每一个观察单位(受试对象)没有确切值,各组之间仅有性质上的差别或程度上的不同,如根据某种药物的治疗效果,将患者分为治愈、好转、无效或死亡。