

整合素连接激酶相关磷酸酶(ILKAP) 抗体的制备及其特异性分析

张应玖¹, 亓晓艳¹, 周 旺¹, 郑 宇¹, 韩树海²

(1. 吉林大学 分子酶学工程教育部重点实验室, 长春 130012;

2. 吉林大学 白求恩第一医院麻醉科, 130021)

摘要: 以整合素连接激酶相关磷酸酶(ILKAP)全蛋白为抗原, 采用腿部肌肉注射和耳缘静脉注射相结合的方法对新西兰大白兔进行免疫, 共免疫6次, 最终获得ILKAP抗血清。采用Protein A agrose柱纯化抗体, 获得ILKAP的多克隆抗体。免疫印迹分析表明, 所获得的ILKAP多克隆抗体具有较高的特异性, 间接ELISA方法测定ILKAP多克隆抗体的滴度为1:1 600。免疫荧光分析表明, 所获得的ILKAP多克隆抗体在细胞水平应用效果较好。

关键词: 整合素连接激酶相关磷酸酶(ILKAP); 抗血清; 抗体; 滴度; 特异性

中图分类号: Q556 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-5489(2012)02-0356-05

Preparation and Specificity of Anti-ILKAP Antibody

ZHANG Ying-jiu¹, QI Xiao-yan¹, ZHOU Wang¹, ZHENG Yu¹, HAN Shu-hai²

(1. Key Laboratory of Molecular Enzymology and Engineering of Ministry of Education, Jilin University, Changchun 130012, China; 2. Department of Anesthesiology, First Hospital, Jilin University, Changchun 130021, China)

Abstract: Two rabbits were immunized six times with the whole integrin-linked kinase-associated phosphatase (ILKAP) protein as antigen by intramuscular and intravenous injections, and the antiserum against ILKAP was obtained. Then, anti-ILKAP polyclonal antibody was prepared via Protein A agrose column. Western blot analysis shows that the anti-ILKAP polyclonal antibody had higher specificity, and the antibody titer came to 1:1 600 via indirect enzyme-linked immunosorbent assay (indirect ELISA). Immunofluorescence analysis demonstrates that the prepared ILKAP polyclonal antibody had a good application in cell researches.

Key words: integrin-linked kinase-associated phosphatase (ILKAP); antiserum; antibody; titer; specificity

整合素连接激酶相关磷酸酶(integrin-linked kinase-associated phosphatase, ILKAP)是丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶2C(protein phosphatase 2C, PP2C)家族中的新成员^[1], 由Tong等^[2]首先在大鼠中发现。ILKAP与小鼠PP2C α 或PP2C β 有约30%的序列同源性, 并且它的C端大片段具有PP2C结构域, 但其N端的76个氨基酸残基是其特有的, 与目前所发现的任何一种蛋白质都没有同源性。Tong等将其命名为PP2C δ , 并列入PP2C蛋白家族。

Leung-Hagesteijn等^[3]以整合素连接激酶1(integrin-linked kinase-1, ILK-1)为诱饵, 通过酵母双杂交系统筛选出PP2C δ , 并证实其与ILK-1有直接的相互作用, 因此又将PP2C δ 命名为ILKAP^[3]。Leung-Hagesteijn等^[3]研究表明, ILK-1作为ILKAP的底物, ILKAP通过去磷酸化ILK-1抑制了ILK-1的

收稿日期: 2011-11-03.

作者简介: 张应玖(1962—), 女, 汉族, 博士, 教授, 博士生导师, 从事蛋白质(酶)功能的研究, E-mail: yingjiu@jlu.edu.cn.
通讯作者: 韩树海(1959—), 男, 汉族, 博士, 副教授, 从事生物医学的研究, E-mail: zyjiujiu@yahoo.com.cn.

基金项目: 吉林省科技发展计划项目(批准号: 200905105).

激酶活性,从而使 GSK-3 β 不被磷酸化,引起下游信号分子 β -catenin 被降解,不能入核引导 C-Myc 和 Cyclin D1 的转录,负调控整合素激酶信号通路,从而使细胞不能有效增殖.人为设计的 ILKAP 失活突变体也可以与 ILK-1 结合,但却不能对 ILK-1 的激酶活性产生任何影响,即抑制 ILK-1 激酶活性有赖于 ILKAP 的磷酸酶催化活性. ILKAP 还能使 ASK1 的 Thr845 去磷酸化,从而正调控 JNK/MAPK 信号通路,促进细胞凋亡信号的产生,最终引起细胞凋亡^[1]. 这两条信号通路与肿瘤及中风、神经萎缩等重大疾病的发生发展密切相关,因而 ILKAP 受到人们的广泛关注^[4-7]. Nakrieko 等^[8]确定 ILKAP 在表皮角化细胞中可作为 ILK 的定位及活性关键的调节子而起作用.文献[9]研究表明,在真核细胞中 ILKAP 与骨架蛋白结合,并可诱导细胞凋亡.

为了在分子水平和培养细胞体系中研究 ILKAP 的功能以及 ILKAP 与其他生物分子间的相互作用及其规律,本文利用所制备的 ILKAP 免疫新西兰大白兔,免疫6次后制备抗 ILKAP 的特异性多克隆抗体,并用免疫印迹和间接酶联免疫吸附法(间接 ELISA 法)^[10]对抗体水平和特异性进行了分析,为相关研究提供所需的抗 ILKAP 抗体.

1 材料及实验动物

ILKAP 全蛋白由吉林大学分子酶学工程教育部重点实验室酶学与神经科学课题组表达并纯化^[11]; ILKAP 真核表达载体 pcDNA3.1(+)-HIS-ILKAP 由吉林大学分子酶学工程教育部重点实验室酶学与神经科学课题组构建并保存; FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体为美国 SANTA CRUZ 公司产品; 辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔 IgG 及辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗小鼠 IgG 为北京中衫金桥生物技术有限公司产品; 蛋白分子量 marker 购自天根生物公司; 弗氏完全佐剂、二甲基亚砜(DMSO)、四甲基联苯胺(TMB)、H₂O₂ 购自鼎国公司; 其他试剂均为分析纯; 6月龄、体重2~3 kg 的健康雄性新西兰大白兔购自吉林大学实验动物中心.

2 实验方法

2.1 动物免疫

抗原剂量在一定范围内与免疫应答的强度呈正相关. 将 ILKAP 蛋白用无菌的 PBS 缓冲液(pH = 7.4)稀释至质量浓度为 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$,再用等体积的弗氏佐剂与 ILKAP 蛋白溶液混合、乳化,使 ILKAP 抗原蛋白的终质量浓度为 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. 选用注射器混匀法进行乳化,约 0.5 h 后乳化完全. 乳化的标准为乳化后的抗原滴在水面上 5 min 内不扩散.

取 6 月龄、体重 2~3 kg 的雄性新西兰大白兔,初次免疫采用腿部肌肉注射弗氏完全佐剂乳化后的 ILKAP 抗原蛋白. 加强免疫采用耳缘静脉注射 ILKAP 抗原蛋白(不加佐剂),剂量为 1 mg. 初次免疫与第一次加强免疫的时间间隔为三周,以后每隔两周进行加强免疫一次. 经过 6 次免疫,最后一次免疫 7 d 后分离抗血清,测定抗体效价.

2.2 抗血清的制备

将兔子仰卧四肢缚于动物固定架上(或由助手抓住四肢固定),头部略放低以暴露颈部. 剃毛并消毒皮肤;沿颈部中线切开皮肤约 10 cm,暴露出颈总动脉后将其游离;于动脉下套入两根黑丝线,分别置于远心端及近心端. 结扎远心端的丝线,近心端的动脉用血管夹夹住;用尖头小剪刀在两根丝线间的动脉壁上剪一小口,插入塑料放血管. 再将近心端的丝线结扎固定于放血管上,防止放血管滑脱;松开血管夹,使血液流入三角烧瓶中.

将血液置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱 1 h,再置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱 3~4 h. 待血液凝固血块收缩后,用毛细管吸取血清. 于 3 000 r/min 离心 15 min,取上清液加入防腐剂(质量分数为 0.01% 的硫柳汞或质量分数为 0.02% 的叠氮钠),分装后置 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存备用.

2.3 多克隆抗体的纯化

按常规方法进行多克隆抗体的纯化. 取 Protein A agrose 柱,先用体积分数为 50% 的乙醇消毒,再用 50 mL 无菌 PBS 洗柱子,最后用 10 个体积 20 mmol/L Tris pH = 8.0 平衡柱子. 将抗血清缓慢加到

Protein A agrose 柱子中,然后用6个柱体积的20 mmol/L Tris (pH = 8.0)洗柱子,再用10个柱体积的20 mmol/L 氨基乙酸 (pH = 5.0)洗柱子.用3~5个柱体积的0.1 mol/L 氨基乙酸 (pH = 2.5)洗脱抗体,最后加入10个柱体积的0.1 mol/L 乙酸钠和0.5 mol/L 的氯化钠缓冲液洗去多余的抗体.洗脱产物按体积比为1:10稀释(50 μ L 样品加入450 μ L 的PBS),以PBS作为空白对照,在紫外分光光度计280 nm处读取OD值,将其转换为抗体浓度.

2.4 免疫印迹

将目的蛋白进行SDS-PAGE.切下含有目的蛋白的凝胶,准备1张同等大小的硝酸纤维素膜.用电转仪将目的蛋白转移到膜上.转移结束后,将膜取出加封闭液(含质量分数为3%的脱脂奶粉的PBS)室温封闭1~2 h或4 $^{\circ}$ C过夜.用含有质量分数为0.1% BSA的PBS稀释一抗(本文制备的ILKAP多克隆抗体或购买的His标签抗体),加入适量的一抗溶液,将硝酸纤维素膜的转移面与抗体溶液接触,室温反应2 h,洗膜3次.将膜以同样的方式与二抗结合2 h,洗膜3次.用DAB显色试剂盒进行显色,显色完成后加入蒸馏水终止显色反应.

2.5 ILKAP 多克隆抗体滴度的测定

采用间接ELISA法测定ILKAP特异性抗体,用非免疫血清做阴性对照.用包被液(Na_2CO_3 1.59 g, NaHCO_3 2.93 g, pH = 9.6)稀释抗原至终质量浓度5 $\mu\text{g}/\text{mL}$,加入酶标板,每孔100 μL ,37 $^{\circ}$ C包被4 h(或4 $^{\circ}$ C过夜).加入100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 的封闭液(含质量分数为5%脱脂奶粉的PBS),37 $^{\circ}$ C封闭2 h.用洗涤液(含体积分数为0.1% Triton X-100的PBS)洗板3次,每次3 min.用含质量分数为1% BSA的PBS倍比稀释ILKAP抗体(1:50,1:200,1:800,1:1600,1:3200,1:6400),每孔加100 μL ,其中一列加倍比稀释的对照血清,每孔100 μL ,37 $^{\circ}$ C孵育1.5 h.用洗涤液洗板3次,每次3 min.每孔加50 μL 底物缓冲液,放置10 min,显色后每孔加入2 mol/L的浓硫酸30 μL 终止.酶标仪读450 nm的OD值.

底物缓冲液(pH = 5.0): $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 3.68 g, 柠檬酸 1.02 g, 100 mL 二次蒸馏水; 1 mg TMB溶于DMSO配成1 mg/mL的溶液;体积分数为30%的 H_2O_2 .使用前按体积比(900:100:1)将上述3种溶液混合.阳性判断: $\text{OD}_{450} \geq \text{阴性对照} + 0.20$,且 $\text{OD}_{450} \geq 2.1 \times \text{阴性对照}$.

2.6 真核表达载体 pcDNA3.1(+)-HIS-ILKAP 转染 B16 细胞

将无菌的玻璃片放入培养板的孔中,再加入生长良好的B16细胞悬液,培养细胞至密度约为70%.用PBS洗3次.更换不含血清和抗生素的DMEM培养液.使用转染试剂FuGENE HD转染质粒DNA pcDNA3.1(+)-HIS-ILKAP,使之覆盖整个孔的表面.转染后4 h内,加入体积分数为10%的胎牛血清,继续培养48 h,取出爬片进行固定.以相应的未经转染的细胞作为阴性对照.

2.7 免疫荧光分析

取出B16细胞爬片,用PBS冲洗3次,直接加入固定液,室温固定30 min. PBS冲洗3次、每次5 min,晾干后加入封闭液室温封闭2 h或4 $^{\circ}$ C过夜, PBS冲洗5 min,加入本文制备的ILKAP多克隆抗体或购买的His标签抗体(按体积比1:1000稀释),室温放置2~3 h.用PBS洗3次,每次5 min.再加入FITC标记的山羊抗兔IgG或FITC标记的山羊抗小鼠IgG(按体积比1:200稀释),避光室温反应2~3 h.用PBS洗3次,每次10 min,注意避光.分别以未使用一抗的对照细胞为阴性对照组.最后用含有体积分数为80%甘油的PBS封片,进行荧光观察.

3 结果与讨论

3.1 抗血清中 ILKAP 特异性抗体的检测

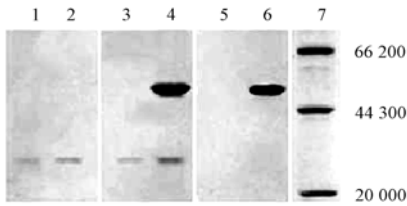
采用免疫印迹方法对抗血清中的ILKAP特异性抗体进行测定.以未经诱导的细胞和诱导表达ILKAP的细胞蛋白为检测抗原,以免免疫后制备的ILKAP抗血清(按体积比1:200稀释)或购买的His标签单克隆抗体为一抗,辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG或辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠IgG为二抗,并以未经免疫的兔血清作对照进行免疫印迹分析,结果如图1所示.

免疫印迹分析结果表明:以未经诱导的细胞和诱导表达ILKAP的细胞蛋白为检测抗原,以未经免疫的兔血清为一抗时,均未检测出目的蛋白,而以未经诱导的细胞蛋白和诱导表达ILKAP的细胞蛋白

为检测抗原, 以本文 ILKAP 抗血清(按体积比 1 : 200 稀释)为一抗时, ILKAP 抗原被抗血清检测出. 同时以未经诱导的菌体和诱导表达的 ILKAP 为检测抗原, 以购买的 His 标签单克隆抗体为一抗时, ILKAP 抗原也被 His 标签抗体检测出, 这与诱导表达的 ILKAP 抗原带有 His 标签相符. 因此, 用本文制备的 ILKAP 蛋白免疫兔子 6 次后, 诱导了体液免疫反应, 抗血清中含有 ILKAP 的特异性抗体, 所获得的抗体具有较高的特异性.

3.2 ILKAP 抗体滴度的检测

采用 2.4 方法, 应用 Protein A agrose 柱从上述抗血清中纯化出抗 ILKAP 的多克隆抗体. 以表达纯化的 ILKAP 蛋白为抗原, 以纯化的 ILKAP 多克隆抗体为一抗, 在不同体积比稀释后进行间接 ELISA 实验, 同时以不同稀释度的未经免疫的兔血清为阴性对照, 测定 OD₄₅₀ 处吸光度值, 并进行统计学分析, 结果列于表 1, 所获得的 ILKAP 抗体在不同稀释度下的免疫反应性如图 2 所示.



1: 阴性对照/未免疫血清; 2: ILKAP/未免疫血清; 3: 阴性对照/免疫血清; 4: ILKAP/免疫血清; 5: 阴性对照/His 标签抗体; 6: ILKAP/His 标签抗体; 7: 分子量标准蛋白.

图 1 抗 ILKAP 抗血清的免疫印记分析

Fig. 1 Western blot analysis of antiserum against ILKAP

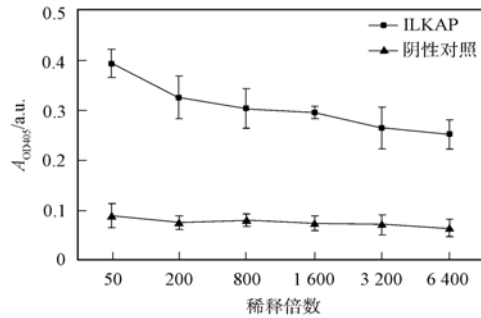


图 2 抗 ILKAP 抗体的免疫反应性

Fig. 2 Immunoreactivities of anti-ILKAP antibody

表 1 抗 ILKAP 抗体的 ELISA *

Table 1 ELISA of anti-ILKAP antibody

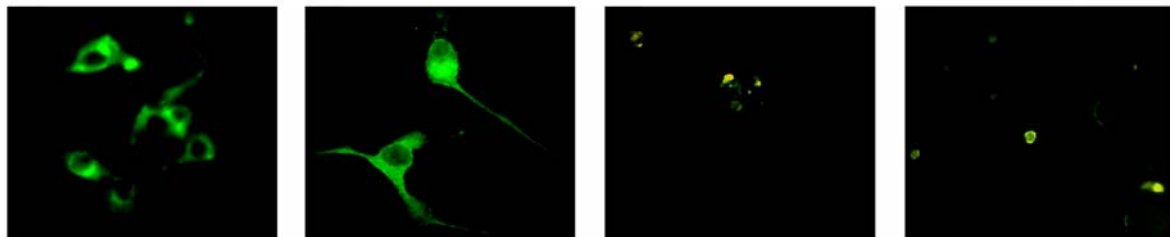
抗原	稀释倍数					
	1 : 50	1 : 200	1 : 800	1 : 1 600	1 : 3 200	1 : 6 400
ILKAP	0.392 5	0.323 5	0.302 0	0.294 5	0.262 0	0.250 5
阴性对照	0.088 0	0.074 0	0.079 5	0.073 0	0.070 0	0.063 0

* 阳性判断: OD₄₅₀ ≥ 阴性对照 + 0.20, 且 OD₄₅₀ ≥ 2.1 × 阴性对照.

统计结果表明, 免疫组与阴性对照组相比, 差异具有显著性 ($p < 0.05$). 可见 ILKAP 抗原免疫兔子诱导了较好的体液免疫反应. 根据阳性结果的判断标准可知, 抗血清中抗 ILKAP 特异性抗体的滴度达到 1 : 1 600.

3.3 ILKAP 抗体在细胞免疫荧光中的应用

将重组质粒 pcDNA3.1(+)-HIS-ILKAP 转染 B16 细胞, 转染 48 h 后将细胞爬片固定, 分别以本文制备的 ILKAP 多克隆抗体和购买的 His 标签抗体为一抗, 以 FITC 标记的山羊抗兔 IgG 或 FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG 为二抗进行免疫荧光分析, 结果如图 3 所示.



HIS 标签抗体

ILKAP 抗体

HIS 标签抗体阴性对照

ILKAP 抗体阴性对照

图 3 ILKAP 抗体免疫荧光检测 B16 细胞中的 ILKAP

Fig. 3 Anti-ILKAP antibody immunofluorescence of ILKAP in B16 cells

由图3可见,本文制备的 ILKAP 多克隆抗体与购买的 His 标签抗体效果相似,均能检测出 B16 细胞中表达的 ILKAP,且 ILKAP 均位于细胞质中。

综上所述,本文以 ILKAP 全蛋白为抗原,对新西兰大白兔进行免疫,经过6次免疫获得 ILKAP 特异性抗血清,经过 Protein A agrose 柱纯化得到抗 ILKAP 的多克隆抗体,免疫印迹分析表明,所获得的 ILKAP 多克隆抗体具有较高的特异性,采用间接酶联免疫吸附方法(间接 ELISA 法)分析得知抗体的滴度达到 1 : 1 600,免疫荧光观察表明,所获得的 ILKAP 多克隆抗体在细胞水平应用效果较好。

参 考 文 献

- [1] ZHOU Wang, GUAN Ke-xing, ZOU Xue, et al. Effect of ILKAP on Tumorigenesis and Tumor Development [J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2009, 25(6): 489-494. (周旺,关可兴,邹雪,等. ILKAP 在肿瘤发生发展中的作用 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2009, 25(6): 489-494.)
- [2] TONG Yi-ai, Quirion R, SHEN Shi-hsiang. Cloning and Characterization of a Novel Mammalian PP2C Isozyme [J]. J Biol Chem, 1998, 273(52): 35282-35290.
- [3] Leung-Hagesteijn C, Mahendra A, Naruszewicz I, et al. Modulation of Integrin Signal Transduction by ILKAP, a Protein Phosphatase 2C Associating with the Integrin-Linked Kinase, ILK1 [J]. EMBO J, 2001, 20: 2160-2170.
- [4] Kashiwaba M, Katsura K, Ohnishi M, et al. A Novel Protein Phosphatase 2C Family Member (PP2C ζ) Is Able to Associate with Ubiquitin Conjugating Enzyme 9 [J]. FEBS Letters, 2003, 538(1): 197-202.
- [5] Uchid C, Gee E, Ispanovic E, et al. JNK as a Positive Regulator of Angiogenic Potential in Endothelial Cells [J]. Cell Biology International, 2008, 32(7): 769-776.
- [6] Sriraman V, Modi S R, Bodenbarg Y, et al. Identification of ERK and JNK as Signaling Mediators on Protein Kinase C Activation in Cultured Granulosa Cells [J]. Molcell Endocrinol, 2008, 294(122): 52-60.
- [7] Sury M D, Agarinic C, Widmer H R. JNK Is Activated but Does Not Mediate Hippocampal Neuronal Apoptosis in Experimental Neonatal Pneumococcal Meningitis [J]. Neurobiol Dis, 2008, 32(1): 142-152.
- [8] Nakrieko K A, Vespa A, Mason D, et al. Modulation of Integrin-Linked Kinase Nucleo-Cytoplasmic Shuttling by ILKAP and CRM1 [J]. Cell Cycle, 2008, 7(14): 2157-2166.
- [9] ZHOU Wang, CUI Shu-sen, HAN Shu-hai, et al. Palladin Is a Novel Binding Partner of ILKAP in Eukaryotic Cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2011, 411(4): 768-773.
- [10] CHU Wen-lei, CUI Jie, MA Ying, et al. Preparation and Identification of Polyclonal Antibody against Florfenicol [J]. Journal of Natural Science of Heilongjiang University, 2010, 27(2): 242-245. (褚文雷,崔杰,马莺,等. 抗氟甲砜霉素多克隆抗体的制备与鉴定 [J]. 黑龙江大学自然科学学报, 2010, 27(2): 242-245.)
- [11] ZHOU Wang, QI Xiao-yan, ZHANG Ying-jiu. Expression, Purification and Catalytic Activity of Protein Phosphatase 2C(PP2C) [J]. Journal of Jilin University: Science Edition, 2009, 47(1): 144-149. (周旺,亓晓艳,张应玖. 蛋白磷酸酶 2C 的表达、纯化与催化活性分析 [J]. 吉林大学学报:理学版, 2009, 47(1): 144-149.)

(责任编辑:单 凝)