DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2010.05.015

·短篇论著·

兔抗人 Cyclin D1b 多克隆抗体的制备与鉴定

Preparation and identification of rabbit anti-human Cyclin D1b polyclonal antibody

郑 航[1],梁继珍[1,2],苏 宁[1,3],陈逢生[1],李 荣[1](1. 南方医科大学南方医院 肿瘤中心,广东 广州 510515; 2. 广州市红十字会医院 肿瘤科,广东 广州 510220; 3. 广州市胸科医院 呼吸肿瘤科,广东 广州 510095)

[摘 要] 目的:制备 Cyclin D1b 蛋白 C 端多肽的多克隆抗体,为后续 Cyclin D1b 的研究奠定基础。方法:用生物信息学方法分析 Cyclin D1b 蛋白的同源性、亲水性和抗原性,设计并合成 Cyclin D1b C 端的氨基酸序列,将合成后的多肽与钥孔血蓝蛋白(Keyhole-limpet hemocyanin,KLH)偶联并免疫新西兰大白兔,制备多克隆抗体。ELISA 法检测多抗效价,Western blotting 检测 Cyclin D1b 的表达,免疫组织化学法检测该抗体的特异性与适用范围。结果:成功制备兔抗人 Cyclin D1b 蛋白 C 端多肽的多克隆抗体,ELISA 法效价为 1∶18 000。纯化后的抗体用于 Western blotting 可特异识别 MCF-7 细胞中的 Cyclin D1b,并可用于免疫组织化学检测。结论:制备成功 Cyclin D1b 蛋白 C 端多肽的多克隆抗体,此多抗可用于 Western blotting 和免疫组织化学等分析。

[关键词] Cyclin D1b;多克隆抗体;MCF-7 细胞
[中图分类号] R392.11 [文献标志码] A [文章编号] 1007-385X(2010)05-0559-03

Cyclin D 是细胞周期 G_1/S 期监控点重要的正向调控因子[1]。Cyclin D1 表达异常可引起细胞周期的失控,是细胞异常增殖和癌变的原因。有研究[2]发现,Cyclin D1 基因第 4 个外显子最后一个碱基存在 G 或 A 单核苷酸多态性(A870 G),可产生两种不同转录本:转录本 a 和转录本 b。转录本 a 可等量来源于 Cyclin D1 A870、G870 等位基因,而转录本 b 则主要来自 A870 等位基因。不同的转录本可影响肿瘤的发展和预后。转录本 b 所表达的蛋白产物 Cyclin D1b 为 274 个氨基酸,相对分子质量约 31 000,该蛋白质缺乏 C 末端的 PEST 序列,因而半衰期较长,稳定性较高,使具有 MMR(mismatch repair)基因缺陷这一遗传背景的细胞在受损后仍可通过 G_1/S 限制点,继续增殖而不进入凋亡,从而促进了肿瘤的发生[3]。本研究制备 Cyclin D1b 蛋白 C-端多肽多克隆抗体,并鉴定其特异性,为 Cyclin D1b 的功能研究提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料

免疫组化试剂盒及抗兔的二抗为福州迈新生物工程公司产品。福氏完全佐剂、福氏不完全佐剂购自 Sigma 公司。抗体纯化蛋白 G 预装柱购于佰路生物科技有限公司。新西兰大白兔为南方医科大学实验动物中心饲养(动物合格证号为 0038759)。

1.2 多肽的设计

使用 DS Gene 1.1 基因分析软件,采用软件中提供的多种程序分析 Cyclin D1b 蛋白的跨膜结构域、二级结构、疏水性、亲水性和抗原性,同时在线分析 Cyclin D1b 蛋白的糖基化等修饰位点,选取亲水性与抗原性较好的 C-末端,设计一段 18 个氨基酸的多肽。将设计好的多肽再返回到蛋白数据库中进行匹配,检测该序列的特异性。将设计好的多肽交由 Chinese Peptide Company 合成并纯化,Cyclin D1b 蛋白多肽分别与钥孔血蓝蛋白(Keyhole-limpet hemocyanin,KLH)及 BSA 偶联,用高效液相色谱测定其纯度大于 78.7%。

1.3 兔抗人 Cyclin D1b 蛋白 C 端多肽抗体的制备

将已交链有 KLH 载体蛋白的多肽抗原 1 mg 溶于 1 ml 无菌水中,并与等体积弗氏完全佐剂进行充分乳化,采用皮下多点注射免疫新西兰大耳白兔。初次免疫后,改用弗氏不完全佐剂,并于第 3、5、7 周时再次加强免疫 3 次,每次抗原剂量为 1 mg。第 5 周和第 7 周免疫后抽取 2 ml 血液,分离血清,ELISA 法测定抗体效价。3 d 后颈动脉取血,按常规方法分离血清,置 -20℃中保存。

[基金项目] 广东省自然科学基金资助项目(No. 7300385);广东省医学科学技术研究基金(No. A2009412)。Project supported by the Natural Science Foundation of Guangdong Province (No. 7300385), and the Medical Science Technology Research Foundation of Guangdong Province (No. A2009412)

[作者简介] 郑航(1965-),男,广东省广州市人,主任医师,主要从事肿瘤生物治疗的研究
[通信作者] 郑航(ZHENG Hang, corresponding author),E-mail:zhengh001@163.com

1.4　ELISA 法检测 Cyclin D1b 多肽抗体的效价

将与 BSA 偶联的多肽溶解于 0.05 mol/L pH 9.6 的碳酸氢钠包被缓冲液,浓度为 1 μg/ml,按 100 μl 每孔将与 BSA 偶联的 Cyclin D1b 多肽加入到 96 孔 ELISA 检测板中,4 ℃温育过夜,使多肽抗原能稳定地吸附并包被在样品测定孔中。洗涤后在每个样品孔中加入含有 1% BSA 的 PBS 封闭缓冲液,37 ℃温育 1 h,封闭,洗涤。取 2 μl 免疫血清,加入 400 μl PBS,取 60 μl 加入 540 μl PBS,然后倍比稀释,从低浓度到高浓度每孔分别加入 100 μl;同时取 0.5 μl 免疫前血清,加入 1 ml PBS 后,取 100 μl 作为阴性对照;空白对照选用 100 μl PBS。37 ℃温育 1 h,PBS 冲洗并吸干全部液体,加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的兔抗鼠二抗,孵育后洗涤,加入显色底物 TBS 100 μl /孔,避光显色 5 min,加入 H_2SO_4 100 μl/孔终止反应。酶标仪检测 450 nm 波长下光密度值(*D*)。

1.5　SDS-PAGE 分析 Cyclin D1b 多肽抗血清的纯度

将制备的兔抗人 Cyclin D1b 多肽的抗血清用结合缓冲液(1 mol/L Tris/HCl、pH 9.0、20 mmol/L Na_3PO_4)稀释后,经 0.45 μm 的滤膜过滤,加样到 HiTrap™ ProteinG HP 的纯化柱上,用洗脱缓冲液(100 mmol/L 甘氨酸-HCl、pH 2.7)洗脱后,收集洗脱峰。纯化后的抗体经 SDS-PAGE 分析纯化效果。

1.6　Western blotting 鉴定抗 Cyclin D1b 多肽抗体

RIPA 裂解液(10 mmol/L NP240、150 mmol/L NaCl、PBS pH 7.2、2 mmol/L EDTA、50 mmol/L 氟化钠、0.2 mmol/L 矾酸钠、蛋白酶抑制剂 1∶50)裂解 MCF-7 乳腺癌细胞,冰上孵育 30 min,13 500 × *g* 离心 45 min,获得 MCF-7 总蛋白。取 5 μg 总蛋白裂解液,并加入等体积 2 × SDS 加样缓冲液,于 100 ℃加热 5 min 后,进行常规 SDS-PAGE。电泳结束后,电转至 PVDF 膜上,用 50 g/L 脱脂奶粉室温下封闭 1 h,然后加入 1∶1 000 稀释的兔抗人 Cyclin D1b 蛋白 C 端多肽多抗,室温下孵育 2 h,TBST 缓冲液洗膜后,加入羊抗兔 IgG-HRP 抗体(1∶2 000 稀释),室温下孵育 1 h,TBST 缓冲液洗膜后,ECL 法显色。

1.7　抗 Cyclin D1b 多肽抗体的免疫组化染色

取出用酒精固定的 MCF-7 细胞爬片,PBS 浸洗 3 min 后,每个组织片滴加 25 mg/L 的 Avidin 50 μl,室温孵育 15 min,滴加 H_2O_2-甲醇,室温孵育 15 min。滴加正常羊血清室温下封闭 20 min,加入 1∶500稀释的兔抗人 Cyclin D1b 多肽多抗,4 ℃孵育过夜。PBS 洗片后加入 1∶50 稀释的羊抗兔 IgG-HRP,37 ℃孵育 30 min,PBS 洗片后进行 DAB 显色,苏木精复染,封片,电镜下观察染色结果。

2　结　果

2.1　兔抗人 Cyclin D1b 蛋白 C 端多肽抗体的成功制备

经 2 次动物免疫并进行效价测定确定抗体产生抗人 Cyclin D1b 多肽抗体后,收集兔抗血清。经 HiTrap™ ProteinG HP 纯化柱纯化,ELISA 检测纯化抗体的效价,结果显示兔抗人 Cyclin D1b 蛋白 C 端多肽的多克隆抗体的效价约为 1∶18 000。

2.3　兔抗人 Cyclin D1b 多肽抗体的的识别功能

乳腺癌细胞 MCF-7 表达 Cyclin D1b[4],因此将 MCF-7 细胞裂解后获取的总蛋白作为电泳样本,对纯化的兔抗人 Cyclin D1b 多肽的多克隆抗体进行 Western blotting 分析。结果发现,兔抗人 Cyclin D1b 多肽的多抗可特异识别 MCF-7 细胞中相对分子质量约为 31 000 的蛋白(图 1)。

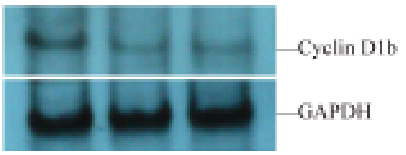

图 1　Cyclin D1b 的多肽抗体与 MCF-7 细胞中 Cyclin D1b 蛋白结合

2.4　兔抗人 Cyclin D1b 多肽抗体的免疫组化定位

经免疫组化实验证明,Cyclin D1b 多肽抗体可对乳腺癌细胞 MCF-7 中的 Cyclin D1b 分子定位识别(图 2)。此多抗所识别的 Cyclin D1b 分子位于 MCF-7 细胞核中。

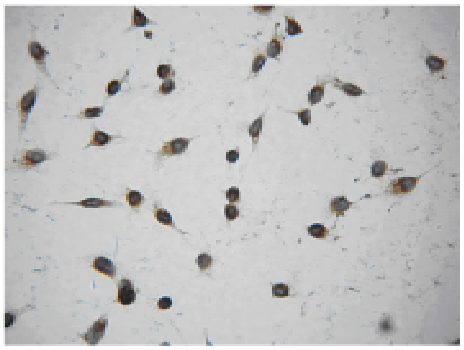

图 2　Cyclin D1b 多肽抗体定位识别乳腺癌细胞 MCF-7 中的 Cyclin D1b 分子(×400)

3　讨　论

编码人类 Cyclin D1 的基因 *CCND1* 位于 11q13 染色体上,全长约 15 000 bp。Cyclin D1 的半衰期很短,不足 30 min。Cyclin D1 在 G_1 期开始增高,在 S 期达到高峰,在 G_2 期逐渐降解[4]。Cyclin D1 在乳腺细胞分化中的作用已经在转基因小鼠的研究中得到证实,Cyclin D1 过度表达导致乳腺导管细胞增殖,最终产生恶性肿瘤。Solomon 等[5]报道了 Cyclin D1b 在组织培养细胞过表达时作为一种核内蛋白,其过表达可使细胞丧失接触抑制,从而引起恶性增殖。Cyclin D1 核内输出而非其过表达,在 Cyclin D1 诱导的细胞转化方面起关键作用。关于食管癌细胞中 Cyclin D1b 的研究[6]发现,Cyclin D1b 在食管癌形成过程中具有重要作用,且 Cyclin D1b 的表达在多种肿瘤中普遍存在,但 Cyclin D1b 在肿瘤中的等位基因特异性表达尚未完全清楚。

由于目前尚无抗 Cyclin D1b 的商业化特异抗体,使 Cyclin D1b 的研究工作举步维艰。本实验中以此为切入点,制备了兔抗人 Cyclin D1b 分子 C 端多肽的多克隆抗体。鉴于 Cyclin D1b 分子 C 端 18 个氨基酸的特殊意义,本研究设计一段多肽,以期在借其研究 Cyclin D1b 功能的同时,还能确定 Cyclin D1b 的功能域。在抗原制备方面,选择化学合成的方法具有更加准确和快捷的优点。通过化学合成 Cyclin D1b 蛋白 C 端多肽后,制备了抗 Cyclin D1b 蛋白 C 端多肽的多克隆抗体,纯化后通过 Western blotting 和免疫组化验证,为以后 Cyclin D1b 的功能研究提供了有力的支持。

[参 考 文 献]

[1] Alao JP, Gamble SC, Stavropoulou AV, Pomeranz KM, Lam EW, Coombes RC, et al. The cyclin D1 proto-oncogene is sequestered in the cytoplasm of mammalian cancer cell lines[J]. Mol Cancer, 2006, 2(17): 5-7.

[2] Zhang YJ, Chen SY, Chen CJ, Santella RM. Polymorphisms in CyclinD1 gene and heap-tocellular carcinoma[J]. Mol Carcinog, 2002, 33(2): 125 -129.

[3] Kong S, Amos CI, Luthra R, Lynch PM, Levin B, Frazier ML, et al. Effects of cyclinD1 polymorphism on age of onset of hereditary nonpolyposis colorectal cancer[J]. Cancer Res, 2000, 60(2): 249-252.

[4] Abou El-Ela M, Nagui N, Mahgoub D, El-Eishi N, Fawzy M, El-Tawdy A, et al. Expression of cyclin D1 and p16 in psoriasis before and after phototherapy[J]. Clin Exp Dermatol, 2010, 35(7): 781-785.

[5] Solomon DA, Wang Y, Fox SR, Lambeck TC, Giesting S, Lan Z, et al. Cyclin D1 splice variants: Differential effects on localization, RB phosphorylation and cellular transformation[J]. J Biol Chem, 2003, 278(32): 30339-30347.

[6] Lu F, Gladden AB, Diehl JA. An alternatively spliced cyclin D1 isoform, cyclin D1b, is a nuclear oncogene[J]. Cancer Res, 2003, 63(21): 7056-7061.

[收稿日期] 2010 - 04 - 28　　[修回日期] 2010 - 08 - 14
[本文编辑] 韩　丹

· 读者 · 作者 · 编者 ·

《中国肿瘤生物治疗杂志》征订启事

《中国肿瘤生物治疗杂志》是由中国免疫学会和中国抗癌协会联合主办的国家级医学学术期刊(刊号为 ISSN 1007-385X; CN31-1725/R),双月刊,国内外公开发行。本刊为中国惟一的肿瘤生物治疗专业高级学术刊物,重点报道我国肿瘤生物治疗领域基础理论与临床应用的最新研究成果、新理论、新技术及新经验,宣传我国肿瘤生物治疗的政策和发展策略。主要栏目有述评、院士论坛、专家论坛、论著(基础研究,临床研究)、研究快报、技术方法、文献综述、学术争鸣、专题讲座、科技动态等。本刊以肿瘤防治专业的中高级临床和科研工作者、医药院校师生及其他相关学科的科技人员为读者对象。

本刊为中国中文核心期刊、中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊),已被美国《化学文摘》(CA)、美国《剑桥科学文摘》(CSA)、美国《乌利希国际期刊指南》(Ulrich IPD)、俄罗斯《文摘杂志》(AJ)、荷兰《医学文摘》(EMbase)、英国《国际农业和生物科学研究文摘》(CABI)、英国《公共健康研究数据库》(GH)、波兰《哥白尼索引》(IC)等多个国际著名检索系统收录;已被中国科技论文与引文数据库(CSTPCD)、中国科学引文数据库(CSCD)、中国学术期刊综合评价数据库(CAJCED)等国内所有知名检索系统和专业相关权威文摘期刊收录。本刊在肿瘤学领域的学术地位和影响力名列前茅,在国际学术界的显示度日益广泛和增强。

《中国肿瘤生物治疗杂志》每期定价 12.00 元,全年定价 72.00 元。邮发代号: 4-576,请通过邮局订阅。若错过,可从本刊编辑部补订,请将 72.00 元(优惠免邮资)寄编辑部,并注明详细通讯地址及邮政编码,编辑部负责将每期杂志准时寄给您。

联系地址:上海市翔殷路 800 号第二军医大学免疫楼《中国肿瘤生物治疗杂志》编辑部(邮编 200433)

联 系 人: 王 莹, 韩 丹; **联系电话**: 021-55620605 ×22, 021-81871002 ×22; **传 真**: 021-81871007

网址:www. biother. org; **电子邮箱**:cjcb@ biother. org