

· 基础论著 ·

人 Tamm-Horsfall 片段蛋白的表达及单克隆抗体的制备和鉴定

马红雨 叶龙 祁术元 全首祯 朱美财

【摘要】 目的 构建人 Tamm-Horsfall 蛋白(THP)抗原决定簇的原核表达载体,表达纯化重组人 Tamm-Horsfall 片段蛋白并制备单克隆抗体。方法 将人 Tamm-Horsfall 蛋白片段 cDNA 克隆至原核表达载体 pET28a,经大肠杆菌表达、纯化,获得的 Tamm-Horsfall 蛋白片段免疫小鼠,取其脾淋巴细胞与 sp2/0 细胞融合,制备能产生 THP 蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞株,进一步采用 Western blot、ELISA、免疫组化等技术对制备的单克隆抗体进行鉴定。结果 原核表达重组质粒在大肠杆菌中能高效表达 THP 蛋白抗原决定簇的蛋白片段,用纯化的 THP 蛋白片段制备了鼠抗 THP 单克隆抗体。结论 成功制备了 9 株 THP 单克隆抗体,为进一步研究 THP 蛋白的分布、结构、功能及检测试剂盒的研发奠定了基础。

【关键词】 抗体,单克隆; 原核细胞; 人 Tamm-Horsfall 蛋白; 纯化

Expression of human Tamm-Horsfall fragment protein and its monoclonal antibody preparation and identification MA Hong-yu, YE Long, QI Shu-yuan, QUAN Shou-zhen, ZHU Mei-cai. Clinical Laboratory Center, Air Force General Hospital, Beijing 100142, China

Corresponding author: MA Hong-yu, Email: mhy06052@163.com

【Abstract】 Objective To construct expression vectors of human Tamm-Horsfall protein antigenic determinant, to purify recombinant human Tamm-Horsfall protein and to prepare monoclonal antibodies. **Methods** cDNA of human Tamm-Horsfall protein fragment was cloned into pET28a expression vector and was further transfected into DE3. The recombinant protein fragment of human Tamm-Horsfall was used immunized Balb/c mouse. The spleen lymphocyte was fused with sp2/0 hybridoma to produce monoclonal antibody against THP protein. Western blot, ELISA and immunohistochemistry were carried out to identify the monoclonal antibody produced by these hybridomas. **Results** Protein fragment of THP protein antigenic determinant was purified from DE3 transfected with THP protein antigenic determinant cDNA prokaryotic expression vector, and purified THP protein fragment was used to prepare THP monoclonal antibody against rats. **Conclusions** We successfully prepare nine hybridomas which can stably produce monoclonal antibodies against THP, and these work has laid foundation for further study regarding THP proteins distribution, structure, function and for detection kits.

【Key words】 Antibodies, monoclonal; Prokaryotic cells; Human Tamm-Horsfall protein; Purification

Tamm-Horsfall 蛋白(THP)是一种糖蛋白,在尿中含量非常丰富,同时也是尿管型的主要组成成分,它由肾髓祥升支厚壁段及远曲小管上皮细胞合成与分泌^[1-2]。1950年 Tamm 及 Horsfall 利用盐析法将其分离纯化,故称为 Tamm-Horsfall 蛋白,正常人每日 THP 的排泄量为 20~200 mg。现已证明肾小球来源的红细胞在通过肾小管髓祥时,红细胞表面可附着 THP,因此,通过特异性检测尿红细胞表面的 THP 蛋白有助于判定血尿来

源^[3-4]。此外,通过检测血清及尿液中 THP 蛋白量的改变,可提示多种疾病的发生与发展。肾病(慢性肾病、肾功能不全、尿毒症)患者由于其肾组织受到不同病因及不同程度的损害,THP 的合成减少,致使尿液和血液中 THP 含量下降,与尿素氮、肌酐的增高成正比。在尿路梗阻、肾移植排异反应及肾炎等疾病中均发现 THP 在肾间质中沉积,这是由于 THP 从梗阻或肾小管损伤导致的裂隙中漏出所致。另外,THP 蛋白存在于泌尿系结石的核心,对结石的发生、发展起着不可忽视的作用^[5]。为了进一步研究 THP 的结构功能和临床应用,我们表达纯化了具有免疫原性的 THP 蛋白的片段,免疫小鼠制备了高滴度的 THP 单克隆抗体,经鉴定后具有很好的免疫学功能,为科研实验和临床诊断试剂盒的研发奠定了基础。

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2013.03.050

基金项目:北京首都医学发展基金(2009-2056)

作者单位:100142 北京,空军总医院临床检验中心(马红雨、全首祯、朱美财),输血科(祁术元);大连医学院检验系(叶龙)

通讯作者:马红雨,Email:mhy06052@163.com

材料与amp;方法

1. 菌株、细胞株和动物:感受态细胞 BL21、表达载体 PET28a 由军事医学科学院九所提供。Balb/c 小鼠:购自北京维通利华实验动物有限公司。Sp2/0 为北京康为世纪生物科技有限公司产品。

2. 工具酶与试剂:Trizol 总 RNA (Invitrogen 公司)、HiFi-MMLV cDNA 第一链合成试剂盒;5 × In-Fusion HD Enzyme PreMix (Clontech);限制性内切酶 BamH1、Not I (MBI);质粒小量提取试剂盒、DNA 产物回收试剂盒、Ni-Agarose His 标签蛋白纯化试剂盒均购自 TaKaRa 公司。引物合成及目的基因序列测定为北京诺赛基因组研究中心完成;辣根过氧化物酶偶联的羊抗鼠二抗由康为世纪公司提供。天然 THP 纯品购自 R&D 公司。

3. 人 THP 蛋白片段的分子克隆、原核表达及纯化:根据 CeneBank 数据库人 THP 的核酸序列,利用 Bioedit 软件对序列进行同源比对,确定保守序列,再结合对其抗原决定簇表位研究,确定研究片段并合成引物。在上、下游引物分别引入 BamH1、NotI 酶切位点,具体序列如下:367-431aa-上游引物:5'-AATGGGTCGCGGATC-CTCGGGCTTCAATGACAGACAACC-3';367-431aa-下游引物:5'-TGCTCGAGTGGCGCCCATGTCCAGGG-GTAGGAGCAT-3';提取人正常肾组织 mRNA,并以其为模板进行 PCR 反应,PCR 产物经纯化后,将回收后的 PCR 产物 367-431aa DNA 目的片段经 BamH1 与 Not I 双酶切,并与同样双酶切、线性化的 pET28a 在 T DNA 连接酶的作用下进行连接,连接产物转化入感受态菌 BL21。挑选阳性克隆,提取质粒,双酶切鉴定后测序。将测序正确的克隆抽提质粒,并转入 BL21 菌株,IPTG 诱导表达,SDS-PAGE 电泳监测目的蛋白的表达。表达的目的蛋白经 Ni 柱纯化后,得到具有免疫原性的目的蛋白 THPP。

4. 鼠单克隆抗体的制备:以纯化的重组 THP 片段蛋白为免疫原免疫 Balb/c 小鼠 5 只,每隔 3 周后加强免疫一次,第 10 天取血检测抗体效价,待抗体效价达到要求后,取脾脏。取加强免疫后检测抗体效价最好的一只 Balb/c 小鼠分离脾细胞培养,采用常规方法,以 PEG1500 为融合剂与杂交瘤细胞融合,经过大量培养细胞,间接 ELISA 法进一步分离和筛选细胞株。采用有限稀释方法对所有筛选确认的阳性细胞株进行亚克隆,待细胞集落生长至显微镜视野 1/3 时吸取上清进行筛选。待亚克隆阳性率达到 100% 时,正式建株,每株细胞冻存 5 支以上。筛选阳性杂交瘤细胞腹腔免疫小鼠获得腹水,经 Protein A 亲和层析柱纯化小鼠单克

隆抗体腹水,得到纯化的 THP 单克隆抗体。

5. 抗体的效价、亚类抗体亚类的测定:按照 Sigma 亚类测定试剂盒说明书完成。抗体效价的测定采用间接 ELISA 法:首先加 150 μL/孔封闭液,37 °C 2 h 后,洗涤 3 次,置 4 °C 冰箱保存备用。用检测用抗原即天然 THP 蛋白包被酶联反应板,2 μg/孔,将抗体稀释成:1:500、1:1000、1:3000、1:9000、1:27 000、1:81 000、1:240 000、1:720 000,37 °C 孵育 30 min,洗板 4 次,拍干;用正常小鼠血清(免疫前的)做阴性对照,取辣根酶标记的羊抗鼠 IgG 特异按 1:5000 倍稀释后,100 μL/孔,37 °C 孵育 20 ~ 30 min,洗涤 4 次。稀释 20 × TMB 至 1 × TMB,按 100 μL/孔加入,37 °C 显色 15 ~ 30 min。加入终止液(2 mol/L H₂SO₄) 50 μL/孔。以 450 nm 单波长测定各孔 OD 值,判断结果。

6. Western blot 检测单克隆抗体的特异性:天然 THP 蛋白 SDS-PAGE 电泳,转硝酸纤维素膜,2% 牛血清白蛋白 4 °C 封闭过夜;与 1:20 稀释的 THP 单克隆抗体 37 °C 孵育 2 h,加入 TBST 稀释(1:4000)的辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 抗体,30 °C 孵育 2 h;以上步骤完成后用 TBST 洗 3 次(5 min/次)。将膜放入新鲜配制的二氨基苯胺(DAB)底物溶液中显色,蒸馏水洗涤终止显色反应,观察结果。

7. 免疫组织化学法检测单克隆抗体的特异性:组织标本经 4% 多聚甲醛固定,石蜡包埋,切片厚度 3 ~ 4 μm,常规二甲苯脱蜡,血清封闭后滴加抗 THP 单克隆抗体(1:50)稀释,室温孵育 2 h,滴加生物素化羊抗鼠 IgG,再滴加 ABC(1:100),37 °C,DAB 显色,苏木素复染 1 min,常规脱水、透明中性胶封片。阴性对照的一抗加入普通小鼠血清。结果判断:阳性结果为显微镜下可见细胞核、胞质内或细胞膜上出现浅黄色、棕黄色及棕黑色颗粒,呈团块状分布。

结果

1. PCR 扩增结果:cDNA 为模板,以设计的上下游引物进行扩增,扩增出大小约 200 bp 的条带,与预期的片段大小相符(图 1)。

2. 人 THP 蛋白片段的表达纯化:重组质粒 pET28a-THPP 转化大肠杆菌 DL21,经 IPTG 诱导表达,超声破菌,离心得到包涵体,与空菌比较,重组菌具有良好的表达。经 Ni 柱进行纯化,得到目的蛋白的纯度为 95% (图 2)。

3. 抗体的效价、亚类:经过 3 ~ 5 次克隆共建稳定分泌抗体的细胞株 9 株。经 Protein A 亲和层析柱纯化得到纯度大于 90% 的 THP 单克隆抗体,抗体效价为 10⁻⁸ ~ 10⁻⁴,所获得 9 株细胞其中 8 株细胞亚型均为

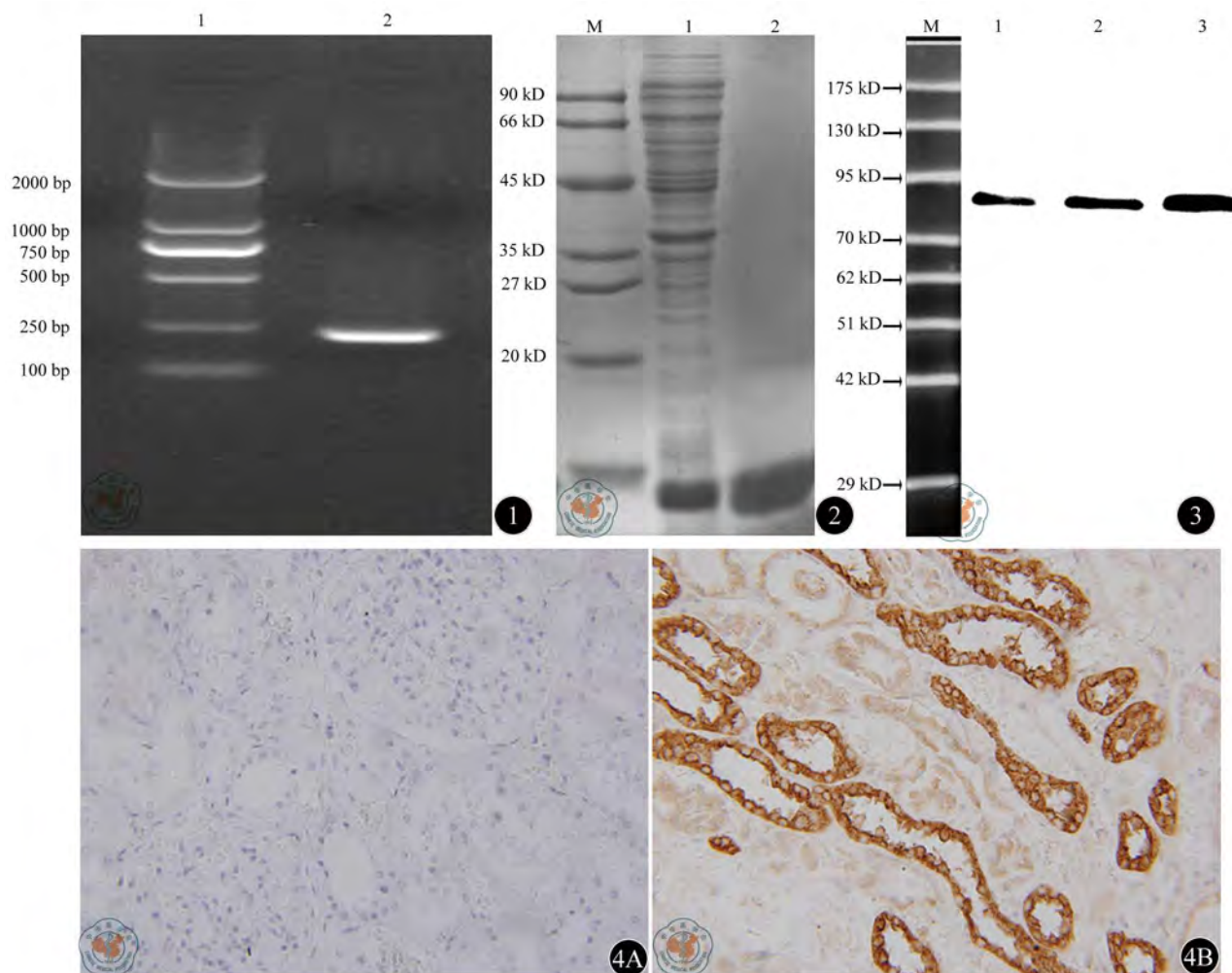


图1 目的片段PCR电泳图。1: DNA marker; 2: PCR产物 图2 THPP蛋白表达、纯化SDS-PAGE电泳。M: 蛋白质 marker; 1: THPP表达产物; 2: 纯化THPP 图3 mAb的Western blot分析。M: 蛋白质 marker; 1~3: THP 图4 THP 蛋白抗体的免疫组化鉴定(×400)。4A: 阴性对照; 4B: THP在人肾组织中的表达

IgG1 + kappa, 1 株细胞亚型为 IgG2a + kappa, 对其进一步 Western blot 和免疫组化鉴定。

4. THP 单克隆抗体 Western blot 鉴定: 我们用制备的单克隆抗体检测天然 THP 蛋白, 结果显示, 在相对分子量 94 kD 处有明显的识别条带, 抗体能够识别天然 THP 蛋白, 结果见图 3。

5. THP 单克隆抗体在免疫组化分析中的应用: 进一步用制备的抗体进行肾组织的免疫酶学检测, 图 4 结果显示, THP 单克隆抗体在免疫组化染色中很好地识别肾远曲小管的天然 THP 蛋白。在正常肾组织中 THP 蛋白主要分布于肾远端小管和集合管。

讨 论

众所周知, THP 在肾结石、肾小球肾炎、肾盂肾炎及尿毒症等肾脏系统疾病的发生、发展过程中发挥重要作用。随着分子生物学和遗传学技术的发展, 将 THP 的生物学研究推向了又一个高潮, 最近的研究资

料表明 THP 16 号染色体 12.3 区域的基因突变会导致 THP 储积病, 导致家族性幼年高尿酸血症肾病、肾性囊肿^[6]; THP 基因区域的几个重要单核苷酸多态性与慢性肾脏疾病有关^[7], 还有证据证明, THP 特异性体液免疫或细胞免疫反应在人类肾脏疾病中发挥重要作用^[8]。本实验用基因工程的方法制备重组 THP 片段蛋白作为免疫原, 得到高效单克隆抗体, 相信针对 THP 表达及其作用机制的进一步研究将会为肾脏疾病的诊断和治疗奠定基础。

本研究中, 对 THP 蛋白进行基因序列分析, 结合抗原表位的现有研究, 选取含有 THP 蛋白抗原决定簇的一段基因片段, 构建该基因片段的表达载体, 得到具有抗原活性的 THP 的一片段蛋白。目的蛋白的表达为包涵体表达, 可能与表达时的温度、蛋白性质等有关。由于为包涵体表达, 目的蛋白又有二硫键, 在复性过程中, 可能会发生蛋白质二硫键的错配等情况, 导致活性的丧失, 为了避免蛋白质的错误折叠, 在蛋白质复性

中,逐步减低尿素的浓度,起到了很好的效果。用纯化好的蛋白进行检测,Western blot、ELISA 都呈阳性反应,说明重组蛋白具有良好的免疫活性。

本研究中,以纯化的重组 THP 抗原决定簇片段为抗原,腹腔多次免疫获得分泌 THP 单克隆抗体的小鼠脾细胞。与 sp2/0 细胞融合后,建立能稳定分泌 THP 单克隆抗体的杂交瘤细胞株,在体外传代 10 次(培养 5 个月),分泌抗体的能力没有改变,说明具有很好地稳定性。我们用得到的 THP 蛋白单克隆抗体与人尿、肾组织中天然 THP 进行 Western blot、免疫组化反应得到很好的结果,表明制备的单克隆抗体能准确识别内源性 THP 蛋白,具有很好的特异性,为今后 THP 蛋白的分子机制研究、临床诊断试剂盒的开发奠定了坚实的基础。

参 考 文 献

- [1] Parsons CL, Stein P, Zupkas P, et al. Defective Tamm-Horsfall protein in patients with interstitial cystitis. *J Urol*, 2007, 178:2665-2670.
- [2] Akiyama A, Stein PC, Houshiar A, et al. Urothelial cytoprotective ac-

tivity of Tamm-Horsfall protein isolated from the urine of healthy subjects and patients with interstitial cystitis. *Int J Urol*, 2000, 7: 176-183.

- [3] Fukuzaki A, Kaneto H, Ikeda S, et al. Determining the origin of hematuria by immunocytochemical staining of erythrocytes in urine for Tamm-Horsfall protein. *J Urol*, 1996, 155:248-251.
- [4] Janssens PM, Kornaat N, Tieleman R, et al. Localizing the site of hematuria by immunocytochemical staining of erythrocytes in urine. *Clin Chem*, 1992, 38:216-222.
- [5] Mo L, Huang HY, Zhu XH, et al. Tamm-Horsfall protein is a critical renal defense factor protecting against calcium oxalate crystal formation. *Kidney Int*, 2004, 66:1159-1166.
- [6] Hart TC, Gorry MC, Hart PS, et al. Mutations of the UMOD gene are responsible for medullary cystic kidney disease 2 and familial juvenile hyperuricaemic nephropathy. *J Med Genet*, 2002, 39:882-892.
- [7] Scolari F, Caridi G, Rampoldi L, et al. Uromodulin storage diseases: clinical aspects and mechanisms. *Am J Kidney Dis*, 2004, 44: 987-999.
- [8] Chambers R, Groufsky A, Hunt JS, et al. Relationship of abnormal Tamm-Horsfall glycoprotein localization to renal morphology and function. *Clin Nephrol*, 1986, 26:21-26.

(收稿日期:2012-08-10)

(本文编辑:戚红丹)

马红雨,叶龙,祁木元,等.人 Tamm-Horsfall 片段蛋白的表达及单克隆抗体的制备和鉴定[J/CD].中华临床医师杂志:电子版,2013,7(3):1134-1137.

中 华 医 学 会