

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2012.42.017 [http://www.crter.org/crter-2012-qikanquanwen.html]

戴启宇, 邓昆, 王会英, 刘宇, 杨廷桐, 陆建福, 钱磊. 抗人凋亡诱导因子单克隆抗体的制备与鉴定[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(42): 7877-7882.

抗人凋亡诱导因子单克隆抗体的制备与鉴定*

戴启宇¹, 邓昆¹, 王会英¹, 刘宇², 杨廷桐¹, 陆建福¹, 钱磊¹

文章亮点: ①应用生物信息学对凋亡诱导因子进行了分析, 筛选出了优势抗原肽作为免疫原。②应用制备的高效单克隆抗体进行结肠癌组织细胞免疫组化对照实验, 间接评价了所制备抗体对天然抗原的特异性。

关键词: 凋亡诱导因子; 杂交瘤细胞; 单克隆抗体; 凋亡; 抗体制备; 活性; 纯度; 特异性; 结肠癌; 组织工程

摘要

背景: 凋亡诱导因子不仅具有氧化还原和电子传递功能, 还具有促细胞凋亡功能, 从而在维持细胞正常生理活动中具有重要作用。

目的: 制备抗人凋亡诱导因子单克隆抗体并进行生物学特性鉴定。

方法: 利用 Ensembl 数据库及 DNASTAR 软件包对凋亡诱导因子氨基酸序列进行分析, 获得优势表位多肽, 采用碳化二亚胺法将多肽与载体蛋白偶联制备完全抗原免疫动物, 采用杂交瘤技术制备凋亡诱导因子单克隆抗体并纯化。

结果与结论: 间接 ELISA 法检测显示, 免疫鼠腹水中抗人凋亡诱导因子单克隆抗体效价达到 1:252 400。Western blot 结果显示, 存在与抗原带一致的相对分子质量 67 000 的特异条带。免疫组化检测结果显示, 在结肠癌组织细胞中有棕色阳性颗粒表达, 说明此抗体也可用于免疫组织化学染色。提示实验获得了高活性、高纯度、高特异性抗人凋亡诱导因子单克隆抗体。

Preparation and identification of a monoclonal antibody against human apoptosis-inducing factor

Dai Qi-yu¹, Deng Kun¹, Wang Hui-ying¹, Liu Yu², Yang Ting-tong¹, Lu Jian-fu¹, Qian Lei¹

Abstract

BACKGROUND: Apoptosis-inducing factor not only has the functional redox and electron transfer function, but also has a pro-apoptotic function, so it plays an important role in maintaining the normal physiological activity of the cells.

OBJECTIVE: To prepare mouse anti-human apoptosis-inducing factor monoclonal antibodies and to identify their biological characteristics.

METHODS: The Ensembl database and DNASTAR package were used to analyze amino acid sequence of apoptosis-inducing factor and obtained the epitope polypeptide. Carbodiimide method was used to prepare the complete antigen immunized animal through coupling the polypeptide with a carrier protein. The BALB/c mice were immunized with a designed apoptosis-inducing factor peptide (KLH-coupled), and then the anti-AIF McAb was obtained by means of the B lymphoma hybridoma technique. Hybridoma technique was used to prepare and purify the apoptosis-inducing factor monoclonal antibodies.

RESULTS AND CONCLUSION: The detection of indirect ELISA method showed that titer of apoptosis-inducing factor monoclonal antibodies in ascetic fluid reached 1:252 400. The result of Western blot demonstrated that there was specific M_r 670 000 band which consistent with the antigen band. Immunohistochemical detection results showed there was brown positive expression in the colon cancer cells, which indicated that the antibodies can also be used for immunohistochemistry staining. Hyper-activity, specific and purified mouse anti-human apoptosis-inducing factors have been successfully obtained and identified.

Dai QY, Deng K, Wang HY, Liu Y, Yang TT, Lu JF, Qian L. Preparation and identification of a monoclonal antibody against human apoptosis-inducing factor. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(42): 7877-7882.

¹解放军第 371 中心医院检验病理科, 河南省新乡市 453000; ²新乡市中心医院妇产科, 河南省新乡市 453000

戴启宇, 男, 1954 年生, 主任技师, 主要从事临床生物化学、分子生物学方面的研究。DQY 716@sohu.com

通讯作者: 邓昆, 在读博士, 主管技师, 解放军第 371 中心医院检验病理科, 河南省新乡市 453000 ddrdengkun@gmail.com

中图分类号:R318
文献标识码:B
文章编号:2095-4344
(2012)42-07877-06

收稿日期:2012-07-09
修回日期:2012-08-16
(20120524004/YJ-C)

¹Department of Inspection and Pathology, No. 371 Central Hospital of PLA, Xinxiang 453000, Henan Province, China; ²Department of Maternity Surgery, Xinxiang Central Hospital, Xinxiang 453000, Henan Province, China

Dai Qi-yu, Chief physician, Department of Inspection and Pathology, No. 371 Central Hospital of PLA, Xinxiang 453000, Henan Province, China DQY 716@sohu.com

Corresponding author: Deng Kun, Studying for doctorate, Technician in charge, Department of Maternity Surgery, Xinxiang Central Hospital, Xinxiang 453000, Henan Province, China Drdengkun@gmail.com

Supported by: Xinxiang Key Science and Technology Program, No.09S054*

Received: 2012-07-09
Accepted: 2012-08-16

0 引言

凋亡诱导因子是存在于线粒体膜间隙中的黄素蛋白, 不仅具有氧化还原和电子传递功能, 还具有促细胞凋亡功能, 从而在维持细胞正常生理活动中具有重要作用^[1]。当死亡触发信号刺激时, 凋亡诱导因子可转移到细胞核与染色体结合, 引起不依赖经典Caspase途径的细胞凋亡, 以染色质凝集和DNA大片断裂为特征^[2]。目前认为, 组织细胞自主增殖和凋亡失调是肿瘤发生发展过程中的重要机制之一^[3], 凋亡诱导因子作为独立于Caspase凋亡通路的介导细胞凋亡的重要因子, 在肿瘤机制研究中受到越来越多的关注。但是, 目前针对凋亡诱导因子介导细胞凋亡的确切分子机制仍不清楚, 为了深入研究凋亡诱导因子在细胞凋亡中的重要作用, 作者前期实验成功制备了有效的兔抗人凋亡诱导因子多克隆抗体^[4], 为了提高工具抗体的灵敏性和特异性, 更好地研究凋亡的确切分子机制, 本次实验利用Ensembl数据库及DNASTAR软件包对凋亡诱导因子氨基酸序列进行分析, 获得优势表位多肽, 采用碳化二亚胺法将多肽与载体蛋白偶联制备完全抗原免疫动物, 采用杂交瘤技术制备凋亡诱导因子单克隆抗体并纯化, 为进一步研究肿瘤抗凋亡分子机制奠定基础。

1 材料和方法

设计: 单一样本实验。

时间及地点: 于2009年6月至2011年12月在新乡医学院免疫学研究中心和解放军第371中心医院检验病理科完成。

材料:

实验动物: SPF级BALB/c雌性小鼠12只, 鼠龄6-8周, 购自郑州大学实验动物中心(许可证号: SCXK: 2002-0027)。实验符合动物伦理学要求。

细胞及组织: SP2/0骨髓瘤细胞由新乡医学院免疫学研究中心保存。结肠癌组织及结肠癌旁正常组织取自解放军第371医院本院普通外科、肛肠外科手术患者, 实验患者知情同意。

抗人凋亡诱导因子单克隆抗体制备与鉴定的主要试剂及仪器:

| 试剂及仪器 | 来源 |
|----------------------------|---------------|
| 细胞培养用 1640 液体、胎牛血清 | GIBCO 公司 |
| HAT 选择性培养基、弗氏完全及不完全佐剂 | Sigma 公司 |
| 小鼠单克隆抗体的亚类(型)鉴定试剂盒 | Roche 公司 |
| 辣根过氧化物酶化羊抗小鼠和兔抗羊 IgG | 北京中杉金桥公司 |
| BCA 蛋白浓度检测试剂盒 | 北京博奥森生物技术有限公司 |
| A 蛋白亲和层析柱 | GE 公司 |
| 细胞培养用 96 孔, 24 孔板 | Costa 公司 |
| 免疫组化染色试剂盒, Western blot 试剂 | 武汉博士德公司 |
| 光学显微镜 | 奥林巴斯公司 |

方法:

抗原肽的设计: 从美国Ensembl数据库获得凋亡诱导因子蛋白的氨基酸序列, 利用抗体设计筛查软件(美国Dragonfly公司)进行分析。

单克隆抗体的制备:

免疫动物: 将合成的凋亡诱导因子抗原肽-钥孔戚血蓝素1 mL与等量弗氏完全佐剂充分乳化, 制备完全抗原进行动物免疫。

取小鼠进行皮下多点注射(0.2 mL/点)。首次免疫剂量取200 mg/L, 间隔2周以相同剂量的抗原加等量弗氏不完全佐剂免疫2次。末次免疫2周后腹腔注射50 μg无佐剂抗原肽进行融合前加强免疫^[5]。

杂交瘤细胞株的建立: 加强免疫3 d后无菌取BALB/c小鼠脾脏制备脾细胞悬液与处于对数生长期的SP2/0骨髓瘤细胞按5:1的比例常规融合, 用HAT选择培养基培养, 融合后第4天更换培养液(换液时原培养液要吸净)。

2周后改换HTPRMI-1640培养液继续培养, 当细胞克隆长至1/3-1/2培养孔面积时, 对细胞培养上清液进行检测, 采用ELISA法筛选阳性杂交瘤细胞株^[6]。将纯化的凋亡诱导因子合成多肽(200 ng/孔)包被酶标96孔板, 空白对照为碳酸盐缓冲液, 阴性对照为Sp2/0细胞培养上清液, 阳性对照为免疫小鼠的阳性血清。取待测杂交瘤细胞培养上清加入包被板中, 4 ℃过夜, 洗涤3次, 加入辣根过氧化物酶化羊抗鼠IgG(1:2 000稀释), 37 ℃孵育1 h后,

洗涤5次。TMB显色, 2 mol/L H₂SO₄终止反应。以(样品孔吸光度值-空白对照吸光度值)/(阴性对照孔吸光度值-空白对照孔吸光度值)>2为阳性标准。

选取抗体检测呈强阳性的细胞孔有限稀释法连续3次克隆化, 杂交瘤上清液均呈阳性的3株分泌抗凋亡诱导因子抗原的鼠单克隆抗体细胞株, 分别进行编号冻存备用。于液氮中保存2个月以上, 然后进行复苏传代, 并对分泌的抗体进行ELISA效价测定。

单克隆抗体的收集与纯化: 预先给BALB/c小鼠腹腔注射液体石蜡(0.5 mL/只), 1周后腹腔注射对数生长期约 5×10^6 个杂交瘤细胞(0.5 mL/只), 接种细胞2周后收集腹水, 置37 °C温箱2 h, 4 000 r/min(离心半径8 cm)离心10 min, 吸取上清液, 56 °C水浴灭活30 min后, 应用G-sepharose柱亲和层析法^[7], 按照标准化操作流程, 对获得的凋亡诱导因子单克隆抗体进行纯化, 获得纯度高于95%单克隆抗体, 分装置-20 °C保存备用。

单克隆抗体效价测定: 将杂交瘤细胞的培养上清液和腹水经梯度稀释后, 采用间接ELISA法测定单克隆抗体的免疫活性效价和亲和力, 采用BCA法检测单克隆抗体蛋白浓度^[8]。

Western blot 法分析单克隆抗体的特异性: 取20-50 μg人工合成凋亡诱导因子抗原多肽经10% SDS-PAGE电泳后半干转移至PVDF膜上, 质量浓度50 g/L脱脂奶粉 37 °C封闭1 h, 加入1:200倍稀释的抗凋亡诱导因子单克隆抗体, 4 °C过夜, TBS-Tween 20洗膜3次, 每次15 min, 加入1:5 000倍稀释的辣根过氧化物酶化羊抗鼠IgG, 37 °C下放置1 h, TBST洗膜3次, 每次15 min, 然后用ChemiScope Mini化学发光检测系统采集图像。同时用抗凋亡诱导因子多克隆抗体作为对照样品分析。

单克隆抗体免疫组化鉴定: 取结肠癌组织及结肠癌旁正常组织的标本切片5.0-6.0 μm, 脱蜡, 浸于H₂O₂液中30 min灭活内源性过氧化物酶, 以蒸馏水洗2次, 用制备的单克隆抗体4 °C孵育过夜, PBS洗片后加入辣根过氧化物酶化羊抗小鼠IgG, 37 °C孵育30 min, PBS洗片后DAB显色, 苏木精复染, 返蓝后, 脱水, 透明, 封固, 光学显微镜观察。

单克隆抗体亚型鉴定: 经小鼠单克隆抗体亚型鉴定试剂盒检测02B8C2, 02C11E8, 02F2D6 三株杂交瘤细胞株所分泌的单抗亚型。

主要观察指标: ①凋亡诱导因子抗原表位分析结果。②杂交瘤细胞株建立结果。③单克隆抗体特性鉴定结果。④单克隆抗体亚型鉴定结果。

2 结果

2.1 凋亡诱导因子抗原表位分析结果 利用抗体设计筛查软件进行分析, 首先通过DNASTar分析凋亡诱导因子蛋白的一般性质, 凋亡诱导因子蛋白的理论相对分子质量为67 000左右, 597个氨基酸中77个为强碱性氨基酸、75个为强酸性氨基酸、203个疏水性氨基酸、126个极性氨基酸, 等电点为7.594, 见图1。

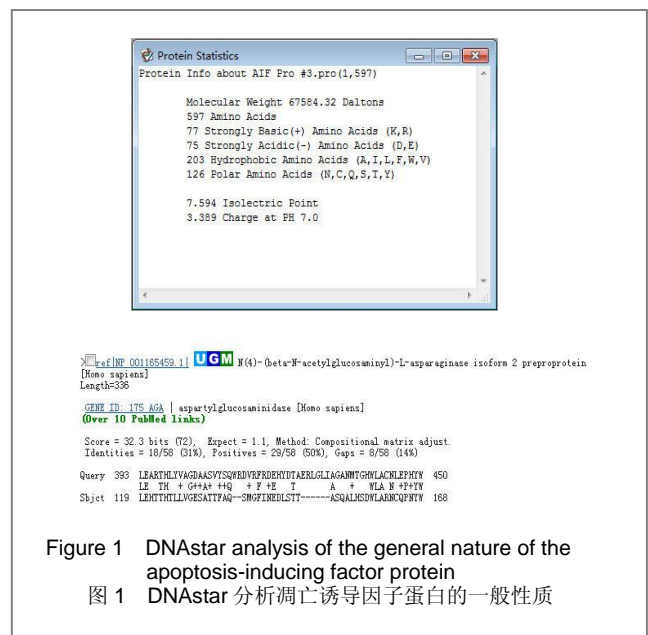


Figure 1 DNASTar analysis of the general nature of the apoptosis-inducing factor protein
图1 DNASTar 分析凋亡诱导因子蛋白的一般性质

凋亡诱导因子蛋白质BLAST分析结果显示, 在数据库中人的蛋白除凋亡诱导因子自身和异构体外, 人抗麦胶蛋白/麦醇溶蛋白与之相似性最高, 相同性达到31%, 相似性达到50%, 二者相差较大的序列主要位于8-58区域, 见图2。

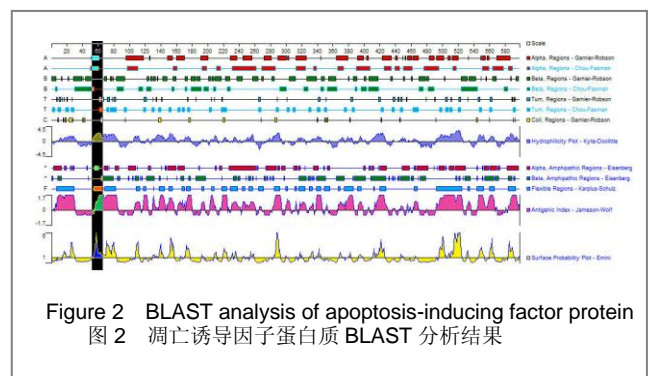


Figure 2 BLAST analysis of apoptosis-inducing factor protein
图2 凋亡诱导因子蛋白质 BLAST 分析结果

通过对B细胞线性表位的预测, 同时结合凋亡诱导因子蛋白二级结构/亲水性及抗原特异性的分析, 确定AIF⁵³⁻⁶⁷(氨基端53-QMASSGASG GKIDNS-67)序列为有效的凋亡诱导因子抗原肽。

2.2 成功建立分泌抗凋亡诱导因子抗原的杂交瘤细胞株 通过细胞融合、筛选和3次有限稀释克隆化培养,最后获得3株分泌抗凋亡诱导因子抗原的鼠单克隆抗体细胞株,分别编号为02B8C2, 02C11E8, 02F2D6。于液氮中保存2个月以上,多次复苏传代仍能稳定分泌抗体,ELISA测定杂交瘤细胞株的效价均未降低。

2.3 鼠抗人凋亡诱导因子单克隆抗体的特性鉴定结果 间接ELISA法检测结果显示,鼠抗人凋亡诱导因子单克隆抗体细胞株培养上清液抗体效价为1:10 400,

免疫鼠腹水中抗体效价为1:252 400,见图3,表1。

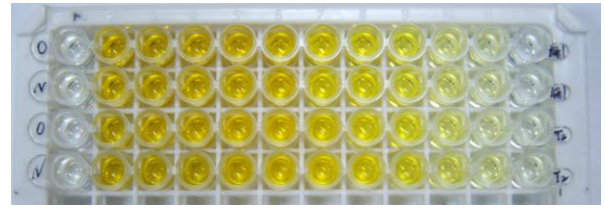
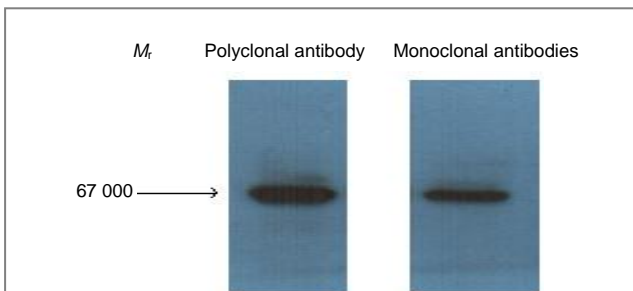


Figure 3 Apoptosis-inducing factor antibody titer in the ELISA assay in mouse ascites
图3 ELISA法检测鼠腹水中凋亡诱导因子抗体效价

表1 ELISA法检测鼠腹水中凋亡诱导因子抗体效价对应的吸光度值
Table 1 ELISA assay in mouse ascites apoptosis-inducing factor antibody titer corresponding absorbance value

| No. | Blank control | 1:1 000 | 1:2 000 | 1:4 000 | 1:8 000 | 1:16 000 | 1:32 000 | 1:64 000 | 1:128 000 | 1:256 000 | 1:512 000 | 1:1 024 000 |
|-----|---------------|---------|---------|---------|---------|----------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|-------------|
| A | 0.088 0 | 1.471 0 | 1.461 0 | 1.353 0 | 1.382 0 | 1.168 0 | 1.298 0 | 1.107 0 | 0.904 0 | 0.496 0 | 0.332 0 | 0.109 0 |
| B | 0.106 0 | 1.562 0 | 1.506 0 | 1.391 0 | 1.434 0 | 1.256 0 | 1.294 0 | 1.168 0 | 0.991 0 | 0.608 0 | 0.370 0 | 0.161 0 |
| C | 0.095 0 | 1.346 0 | 1.384 0 | 1.340 0 | 1.390 0 | 1.241 0 | 1.363 0 | 1.138 0 | 1.046 0 | 0.668 0 | 0.418 0 | 0.230 0 |
| D | 0.090 0 | 1.403 0 | 1.393 0 | 1.341 0 | 1.387 0 | 1.232 0 | 1.334 0 | 1.146 0 | 1.087 0 | 0.757 0 | 0.445 0 | 0.218 0 |
| E | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| F | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| G | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| H | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

BCA蛋白浓度检测试剂盒测得单克隆抗体蛋白浓度为6 120 g/L。Western blot检测结果显示,凋亡诱导因子-钥孔戚血蓝素蛋白泳道存在与抗原带大小一致的67 000特异条带,与凋亡诱导因子多克隆抗体所检测的条带一致,见图4。



注:利用 Ensembl 数据库及 DNASTar 软件包对凋亡诱导因子氨基酸序列进行分析,获得优势表位多肽,采用碳化二亚胺法将多肽与载体蛋白偶联制备完全抗原免疫动物,采用杂交瘤技术制备凋亡诱导因子单克隆抗体并纯化,Western blot 结果显示,存在与抗原带一致的相对分子质量67 000的特异条带。

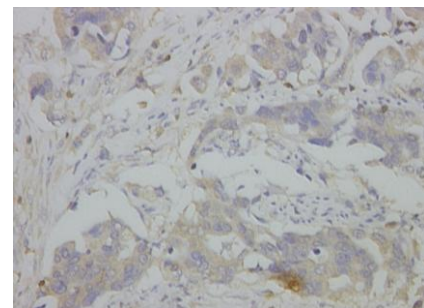
Figure 4 Western blot analysis showed that the band detected by mouse anti-human apoptosis-inducing factor monoclonal antibody was consistent with that detected by anti-human apoptosis-inducing factor polyclonal antibody showed

图4 Western blot 分析制备凋亡诱导因子单克隆抗体与凋亡诱导因子多克隆抗体所检测的条带一致

免疫组织化学染色结果显示,所制备的抗凋亡诱导因子单克隆抗体能与结肠癌组织凋亡诱导因子结合,在结肠癌组织细胞中有明显的棕色阳性颗粒存在,而癌旁正常组织细胞中无明显阳性着色,见图5。



a: Normal tissue



b: Colon cancer tissue

注:结肠癌旁正常组织不表达凋亡诱导因子;结肠癌组织大量表达凋亡诱导因子。凋亡诱导因子阳性表达呈棕色。

Figure 5 Positive expression of apoptosis-inducing factor in colon cancer cells (Immunohistochemistry staining, x200)

图5 结肠癌组织细胞中有凋亡诱导因子阳性表达(免疫组化染色, x200)

2.4 单克隆抗体亚型鉴定结果 经检测02B8C2, 02C11E8, 02F2D6 三株杂交瘤细胞株所分泌的单抗均为IgG1亚型, 轻链均为κ链, 结果见表2。

表2 三株杂交瘤细胞株所分泌的单抗亚型测定结果(A₄₅₀)
Table 2 Subtypes determination result of mouse anti-human apoptosis-inducing factor monoclonal antibody secreted by three hybridoma cell lines (A₄₅₀)

| Subtype of monoclonal antibody | 02B8C2 | 02C11E8 | 02F2D6 | Positive control | Negative control |
|--------------------------------|--------|---------|--------|------------------|------------------|
| AntiIgG1 | 0.582 | 0.377 | 0.403 | 0.571 | 0.087 |
| AntiIgG2a | 0.067 | 0.896 | 0.060 | 0.438 | 0.031 |
| AntiIgG2b | 0.075 | 0.104 | 0.042 | 0.533 | 0.084 |
| AntiIgG3 | 0.102 | 0.094 | 0.079 | 0.461 | 0.047 |
| AntiIgM | 0.079 | 0.046 | 0.034 | 0.349 | 0.033 |
| AntiIgA | 0.058 | 0.069 | 0.028 | 0.685 | 0.067 |
| AntiIgLx | 0.790 | 0.488 | 0.670 | 0.547 | 0.031 |
| AntiIgLA | 0.087 | 0.091 | 0.102 | 0.623 | 0.041 |

02B8C2, 02C11E8, 02F2D6 三株杂交瘤细胞株所分泌的单抗均为 IgG1 亚型, 轻链均为 κ 链

3 讨论

凋亡诱导因子是一种凋亡效应分子, 现已证明凋亡诱导因子是不依赖经典Caspase途径介导细胞凋亡的重要细胞因子^[9]。

有实验证明, 凋亡诱导因子和DNA, RNA直接的物理联系, 可以导致染色质凝集^[10]。但其引起DNA凝集和降解的确切机制尚未阐明。

电子显微镜观察凋亡诱导因子-DNA的相互作用显示大量的凋亡诱导因子分子和较少的DNA结合形成簇型形式。这种相互作用和DNA凝集(DNA缩短), 发夹结构(分子内折叠)的形成有关^[11]。

目前针对凋亡诱导因子诱导染色体凝集及降解的分子机制有2种假说: 一是凋亡诱导因子与DNA的结合产生电子交流破坏正常的染色体结构, 从而提高了DNA对核酸酶的敏感性; 二是凋亡诱导因子可募集下游的核酸酶使染色体凝集和降解。但是在凋亡诱导因子与caspase级联通路之间也存在多个水平的交叉, 如活化的caspase-2, 8, 以及由caspase激活的t-Bid等都可引发线粒体释放凋亡诱导因子分子^[12]。

同时P53在凋亡诱导因子基因表达的水平、Bcl2和热休克蛋白在线粒体通透性的调节水平、钙调蛋白在凋亡诱导因子从线粒体膜分离水平等多个层面参与了凋亡诱导因子对凋亡的调控。

凋亡诱导因子基因中包含了与P53反应的元件可与P53结合, 故P53可在基因表达水平上影响凋亡诱导

因子^[13]。凋亡诱导因子基因不同于其他的P53目标基因, 可被基础水平的P53调节, 而被毒性激活的P53并不能使凋亡诱导因子表达增加。

目前研究显示, 凋亡诱导因子在多种肿瘤组织中均有表达, Daugas等^[14]研究结果显示65个不同起源的肿瘤细胞系中凋亡诱导因子蛋白呈阳性表达, 80.5%结肠癌中有凋亡诱导因子表达, 60例胃腺癌组织中有42例有凋亡诱导因子阳性高表达。提示凋亡诱导因子可能在肿瘤的发生和演化中普遍起作用。

因此, 针对凋亡诱导因子在凋亡机制及肿瘤细胞凋亡失调中的进一步研究将可为肿瘤的早期诊断、预防和治疗拓宽新的思路。

目前抗体制备方法多采用构建原核表达载体, 在*E.coli*中表达并纯化融合蛋白, 随后免疫动物制备抗体, 但该方法繁琐, 抗体特异性不理想。

随着生物信息学的迅速发展, 生物学家设计了许多分子生物学软件用于蛋白质的分析, 利用生物信息学手段, 能够快速建立一套切实可行的抗原分析及筛选方法, 提高获得应用范围广/表位明确抗体的可能性, 缩短了试验周期。生物信息学在基因识别、蛋白质功能预测、蛋白质生理范围的确定、蛋白质高级结构的预测等方面有着重要的作用^[15]。利用该方法能对蛋白的抗原性、跨膜结构域、二级结构、疏水性、结合位点、氨基酸的带电性及多肽的合成难易等进行分析。

文章中通过生物信息学预测分析凋亡诱导因子分子, 获得凋亡诱导因子优势抗原表位多肽, 该方法既可避免盲目选择免疫原性低的肽段, 造成所制备的抗体效价过低, 又可避免选取的肽段免疫原性虽高但却与已知蛋白具有较高的同源性, 导致抗体特异性下降, 同时又可不必偶联其他异种蛋白, 保持其自身较高的免疫原性。然后将抗原肽与钥孔戚血蓝素偶联免疫小鼠, 采用杂交瘤细胞融合技术, 经克隆、筛选, 获得了3株持续、稳定分泌特异性抗人凋亡诱导因子的杂交瘤细胞株02B8C2, 02C11E8, 02F2D6。

由于不包含外源融合成分, 减少了制备抗体的非特异性反应, 也减少了对血浆中其他蛋白成分的交叉反应, 通过Western blot检测获得1条67 000的特异条带, 证明该实验免疫产生的抗体特异性好。

2次免疫之间的间隔时间选择对免疫效果具有很大影响, 结果显示间隔2周连续2次免疫及一次加强免疫的动物产生了很好的免疫应答, 所产生抗体的ELISA效价, 腹水纯化抗体效价达1:252 400, 也证明实验设计的多肽抗原是正确的。为了纯化特异性抗体, 作

者应用G-sepharose柱亲和层析法, 获得纯度高于95%单克隆抗体。经抗体亚型鉴定属小鼠IgG1, 轻链为κ链。

免疫组化分析结果显示, 制备的该单克隆抗体能够有效地与天然的凋亡诱导因子蛋白结合, 同时免疫组化结果也显示凋亡诱导因子在结肠癌组织细胞中阳性表达率高, 而结肠癌旁正常组织细胞中则阳性表达率低。说明制备的凋亡诱导因子单克隆抗体可用于免疫组织化学染色。

实验主要关注抗人凋亡诱导因子单克隆抗体的制备与鉴定。证实利用生物信息学筛选凋亡诱导因子优势表位抗原肽, 并利用杂交瘤技术制备抗凋亡诱导因子单克隆抗体。同时文章创新的应用了生物信息学作为抗原筛选的方法, 但不足之处在于没有对凋亡诱导因子的功能进行进一步的研究。

总之, 实验利用生物信息学分析预测氨基酸抗原性和亲水性, 在既不增加免疫佐剂复杂性又不偶联其他异种蛋白的情况下, 利用合成多肽免疫动物成功的制备了高活性、高纯度、高特异性的抗人凋亡诱导因子单克隆抗体。

该抗体的成功制备, 为下阶段深入研究凋亡诱导因子与恶性肿瘤抗凋亡机制的关系提供了重要的实验材料, 也为进一步探讨恶性肿瘤发生发展机制提供新的实验方法, 在临床肿瘤诊疗学领域有着广泛的应用前景。

4 参考文献

- [1] Joza N, Susin SA, Daugas E, et al. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature*. 2001;410(6828):549-554.
- [2] Otera H, Ohsakaya S, Nagaura Z, et al. Export of mitochondrial AIF in response to proapoptotic stimuli depends on processing at the intermembrane space. *EMBO J*. 2005;24(7):1375-1386.
- [3] Delettre C, Yuste VJ, Moubarak RS, et al. AIFsh, a novel apoptosis-inducing factor (AIF) pro-apoptotic isoform with potential pathological relevance in human cancer. *J Biol Chem*. 2006;281(10):6413-6427.
- [4] Dai QY, Shi Y, Song B. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu*. 2009;13(15):2841-2844.
戴启宇,石瑛,宋蓓.兔抗凋亡诱导因子多克隆抗体的制备纯化与鉴定[J].*中国组织工程研究与临床康复*, 2009,13(15):2841-2844.
- [5] Lowe M, Badell IR, Thompson P, et al. A Novel Monoclonal Antibody to CD40 Prolongs Islet Allograft Survival. *Am J Transplant*. 2012;12(8):2079-2087.
- [6] Li XJ, Zhang ZJ, Yi WJ, et al. *Disan Junyi Daxue Xuebao*. 2011;33(6):566-569.
李新军,张竹君,易维京,等. 抗preS1分子高效单克隆抗体的制备及其在血清LHBs检测中的应用[J]. *第三军医大学学报*,2011,33(6):566-569.
- [7] Wang CY, Zhang HZ, Shi XY, et al. *Hebei Yike Daxue Xuebao*. 2011;32(10):1127-1129.
王从印,张红中,史希媛,等.抗HIV-1P24单克隆抗体纯化方法的研究[J].*河北医科大学学报*,2011,32(10):1127-1129.
- [8] Guo JX,Li P,Wu YF, et al. *Disan Junyi Daxue Xuebao*. 2006;28(6):546-549.
郭建秀,李鹏,伍艳芳,等.抗人MIF单克隆抗体的制备及其活性的初步鉴定[J].*第三军医大学学报*,2006,28(6):546-549.
- [9] Ravagnan L, Gurbuxani S, Susin SA, et al. Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. *Nat Cell Biol*. 2001;3(9):839-843.
- [10] Ferri KF, Jacotot E, Blanco J, et al. Apoptosis control in syncytia induced by the HIV type 1-envelope glycoprotein complex: role of mitochondria and caspases. *J Exp Med*. 2000;192(8):1081-1092.
- [11] Ye H, Cande C, Stephanou NC, et al. DNA binding is required for the apoptogenic action of apoptosis inducing factor. *Nat Struct Biol*. 2002;9(9):680-684.
- [12] Lee JW, Jeong EG, Soung YH, et al. Immunohistochemical analysis of apoptosis-inducing factor (AIF) expression in gastric carcinomas. *Pathol Res Pract*. 2006;202(7):497-501.
- [13] Stambolsky P, Weisz L, Shats I, et al. Regulation of AIF expression by p53. *Cell Death Differ*. 2006;13(12):2140-2149.
- [14] Daugas E, Nochy D, Ravagnan L, et al. Apoptosis-inducing factor (AIF): a ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis. *FEBS Lett*. 2000;476(3):118-123.
- [15] Bartlett GJ, Todd AE, Thornton JM. Inferring protein function from structure. *Methods Biochem Anal*. 2003;44:387-407.

来自本文课题的更多信息--

基金声明: 新乡市重点科技攻关计划项目(09SO54)。

作者贡献: 所有作者共同进行实验设计、实施及评估。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求: 实验过程中对动物的处置应符合 2009年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

作者声明: 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。