

胸腺素 $\alpha 1$ 抗体的制备和鉴定^①

周克夫 章 军 陈天圣 徐 虹 秦 燕 殴阳青 楼士林 刘仁海 柯珍恋
(厦门大学生命科学学院, 厦门 361005)

中国图书分类号 R392.33 文献标识码 A 文章编号 1000-484X(2001)01-0043-03

摘 要 目的: 制备用于检测转胸腺素基因蓝藻表达产物的特异性抗体。方法: 用提纯的小肽(28个氨基酸)胸腺素 $\alpha 1$ 与牛血清白蛋白偶联后作为抗原, 采用皮下多点注射免疫的方法免疫大鼠。经过3个月的免疫, 获得抗T $\alpha 1$ 的多克隆抗体。结果: 用间接酶联免疫吸附(ELISA)方法, 测得抗体效价超过4 096。蛋白印迹(Western blot)检测结果显示, 该抗体能特异性地与胸腺素 $\alpha 1$ 抗原产生明显免疫亲和反应。结论: 所制备的抗体具有很好的灵敏性和特异性。

关键词 胸腺素 $\alpha 1$ 酶联免疫吸附反应 蛋白印迹

Preparation and determination of polyclonal antibody to thymosin $\alpha 1$

ZHOU Ke-Fu, ZHANG Jun, CHEN Tian-Sheng et al. College of Life Science, Xiamen University, Xiamen 361005

Abstract Objective: To prepare specific antibody against Thymosin $\alpha 1$. **Methods:** Thymosin $\alpha 1$ (T $\alpha 1$, 28 peptide) was conjuncted with BSA as immune antigens, rats were immunized and the polyclonal antibody to T $\alpha 1$ was obtained. **Results:** With ELISA detection, the titer of antibody was more than 1:4 096; Western blot analysis showed that the antibody can bind with T $\alpha 1$ specifically. **Conclusion:** The prepared antibody against T $\alpha 1$ has good specificity and reactivity and can be used to detect the expression products of transgenic cyanobacteria which expressed T $\alpha 1$ gene.

Key words Thymosin $\alpha 1$ ELISA Western blot

胸腺素 $\alpha 1$ 作为哺乳动物重要免疫器官胸腺分泌的一种生物活性物质, 对于淋巴系统的发育和维持免疫系统的平衡, 以及对抗肿瘤、抗微生物感染等方面起重要作用^[1]。胸腺素 α 是胸腺素原N端的一段28肽, 利用基因重组的方法, 把编码胸腺素 $\alpha 1$ 的基因转移到蓝藻中, 使其在蓝藻中表达, 为口服含胸腺素 $\alpha 1$ 保健品的生产及其在临床上的应用奠定基础。制备胸腺素 $\alpha 1$ 特异性的抗体则对于重组蓝藻基因的表达产物的鉴定至关重要。有关此类抗体制备虽已有报道^[2], 但免疫时间长(1年), 制备过程繁琐。本文报道了用大鼠作为免疫动物, 采用皮下多点免疫的方法, 3个月后获得了较满意的抗胸腺素 $\alpha 1$ 抗体。现将实验结果报道如下:

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂 胸腺素 $\alpha 1$ 购自Sigma公司; 0.5 mg装; 牛血清白蛋白购自华美生物工程公司; 5 g装; 医用胸腺肽针剂购自市售产品, 规格20 mg/5 ml; 大鼠购自福建医科大学; 兔抗大鼠-HRP由厦门大学抗癌中心张长弓制备。

1.2 方 法

1.2.1 胸腺素 $\alpha 1$ 与BSA偶联复合体的制备 将1.5 mg T $\alpha 1$ 和2 mg BSA溶于1.8 ml PBS缓冲液(0.1 mol/L, pH7.4)中, 慢慢加入60%戊二醛25 μ l, 再加0.15 mol NaCl至T $\alpha 1$ 的终浓度为0.1 mg/ml。置25 $^{\circ}$ C恒温, 振荡器中轻微振荡2.5到3 h。

1.2.2 抗体血清制备 卡介苗致敏: 大鼠养在室内一段时间(2 w左右), 观察其健康状态良好后, 于每只大鼠后足掌各注射0.05 ml卡介苗(浓度为75 mg/ml); 卡介苗致敏2 w后, 取一定体积的BSA-T $\alpha 1$ 偶联产物做抗原, 与等体积完全佐剂混合, 经充分乳化后, 进行第1次免疫注射, 位点在大腿肌肉及腋窝, 剂量: 每点0.2 ml。2 w后, 第2次免疫, 注射位点在脊椎两旁各4个, 共8点, 每点0.2 ml腹股沟各1点, 每点0.2 ml。2 w后, 第3次免疫, 位点在背部脊柱旁各3个, 每点0.2 ml; 腹股沟及腋下各1点, 每点0.2 ml。以后, 每隔20~25 d用不完全剂与T $\alpha 1$ -BSA偶联复合物经乳化后进行背部多点免疫; 3个月最后1次免疫后的第7天断尾采血, 4 $^{\circ}$ C冰箱过夜, 离心获得血清。用ELISA法测定其效价, 证实达到要求后, 进行眼球取血, 分离血清, 并按每管30~50 μ l进行分装保存在-20 $^{\circ}$ C冰箱备用。

^①本工作由国家“863”课题资助(No. 819-04-03)

作者简介: 周克夫, 男, 34岁, 动物学硕士, 讲师。

1.2.3 抗血清的提纯 按杨贵贞^[3]方法,用硫酸铵盐提纯抗体。先后用 50%和 33%硫酸铵提纯,连续重复 3 次,充分透析后分装,存放在 -20℃冰箱保存。

1.2.4 抗体检测方法

1.2.4.1 ELISA 法测定抗体效价 主要参考余^[4]方法, Tα1 用 pH9.6 碳酸盐冲液稀释成 5 μg/ml 后,包被两排平板。封闭液用 pH7.4 PBS-Tween-20,加新西兰进口脱脂奶粉使其浓度为 5%。加一抗:抗免疫后的大鼠阳性血清用 pH7.4 PBS-Tween-20——奶粉作不同梯度稀释;阴性对照用未免疫的大鼠阴性血清。加酶标二抗:用 pH7.4 PBS-Tween-20——脱脂奶粉按 1:1 400 稀释酶标二抗-兔抗大鼠-HRP。加底物:加入 TMB 温育 10~15 min 后,加入 2 mol/L H₂SO₄ 终止反应。读数:用 BIO-RAD3550 酶标仪在测定波长 490 nm,参考波长 660 nm 下读取吸光值。

1.2.4.2 蛋白印迹检测 主要参考彭秀玲^[5]方法,其中按杨联萍^[6]方法进行 SDS-PAGE 电泳,再电转至 PVDF 膜上,其中 Tα1 部分凝胶电转 45 min 后切下,余下部分继续电转 25 min,一、二抗结合后, DAB 显色,照相。

1.2.4.3 用医用胸腺肽针剂代替 Tα1 比较提纯和未提纯抗血清的效果 以医用胸腺肽针剂代替 Tα1,按 40 μg/ml(以商品标明的规格)浓度,包被三排平板,第一排一抗加提纯抗体,第二排加未提纯的抗体,第三排以未免疫血清作阳性对照。下序过程同 1.2.4.1。

2 结果

2.1 抗体的制备 由于 Tα1 属小肽,其免疫原性

差,必须与一载体蛋白偶联后免疫动物,才能提高其免疫原性,把 Tα1 与 BSA 偶联后,免疫大鼠制得抗 Tα1 及抗 BSA 血清。抗原免疫前先用卡介苗致敏,具有明显调动大鼠免疫系统的作用,可能对后续 Tα1 抗原免疫时产生较强的免疫反应,并对产生高滴度的抗 Tα1 抗体有促进作用,我们认为这是制备抗体的一个关键步骤,在抗原免疫过程中,第 1,2,3 次免疫中,我们均用完全佐剂,第 4 次才开始采用不完全佐剂,这一点与一般免疫方法稍有不同^[3]。

选择大鼠作免疫动物有以下好处,其一,大鼠比较容易饲养,活力强,不易在免疫途中死亡;其二,个体适中,所用抗原量不大,由于其个体比小鼠大,因而血量相对多,制备的血清量大。我们通过上述方法从一只大鼠中可以获得 5~6 ml 的免疫血清。

2.2 抗体的鉴定

2.2.1 ELISA 检测 ELISA 具有其特异性强,灵敏度高的优点,在条件适宜下,能准确测定血清抗体效价,由于所制备的抗体偶联上 BSA,因此,在包被液和一、二抗稀释液中不应包含 BSA,本试验用进口新西兰脱脂奶粉作封闭,浓度为 5%,达到较好的效果,以未免疫血清作对照进行 ELISA 检测,测得 OD 值见表 1。一般医用胸腺肽含 Tα1 成分,以医用胸腺肽针剂代替纯品 Tα1 包被平板,用我们制备的抗体作为一抗体进行 ELISA 检测,均有阳性反应。经用同一厂家同一批次的针剂,以提纯未提纯的抗体作 ELISA 检测发现,经提纯的抗体其阳性反应明显比未提纯的抗体强。证明提纯抗体特异性,灵敏度均比未提纯的效果好。检测结果见表 2。

表 1 抗体效价 ELISA 检测结果

Tab. 1 Determination of ELISA of antibody titration

Item	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1 024	1:2 048	1:4 096
Positive serum	0.84	0.75	0.64	0.51	0.42	0.32	0.29	0.21	0.11
Negative serum	0.13	0.11	0.09	0.07	0.05	0.03	0.02	0.01	0.008
P/N	> 2.1	> 2.1	> 2.1	> 2.1	> 2.1	> 2.1	> 2.1	> 2.1	> 2.1

表 2 以医用胸腺肽针剂代替纯品 Tα1 检测抗体效价

Tab. 2 Determination of ELISA of antibody titration with thymosin instead of Tα1

Item	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1 024	1:2 048	1:4 096
Purified serum	0.75	0.68	0.60	0.55	0.51	0.48	0.41	0.31	0.20
Un-purified serum	0.65	0.58	0.49	0.41	0.35	0.22	0.18	0.11	0.09
Negative serum	0.15	0.11	0.09	0.07	0.05	0.03	0.02	0.01	0.009

(下转第 47 页)

达干扰素 mRNA^[7]。本实验从 ConA 和 PHA 刺激的人工接种新城疫病毒的 La Sota 疫苗免疫鸡脾淋巴细胞中克隆得到鸡干扰素基因,这一结果表明此时机体 T 淋巴细胞具有强烈的免疫活性,进一步证明此时机体细胞免疫在抵抗新城疫病毒感染中起重要作用。

一般认为,成纤维细胞分泌 β -干扰素,淋巴细胞分泌 γ -干扰素。二者在免疫反应中所起的作用、作用的靶细胞及作用方式都不尽相同。但鸡干扰素在这方面的研究仍在进行。1997年,Heller等报道,用鸡新城疫病毒刺激鸡胚成纤维细胞,可产生 I 型和 II 型两类不同的干扰素^[8]。在本实验中,我们在人工接种新城疫病毒的 La Sota 疫苗免疫鸡脾淋巴细胞中通过诱导培养,克隆得到了与鸡胚成纤维细胞干扰素基因序列完全相同的基因。所有这些结果都与人类、啮齿动物及其他哺乳动物干扰素的性质不同。我们相信随着研究的不断深入,资料的不断积累和兽医科技工作者的不断努力,这些疑问在不久

的将来会得到阐明。

4 参考文献

- 1 Isaacs A, Lindenmann J. Virus interference. I. The Interferon[J]. Proc R Soc Lond Eer B, 1957; 147: 258
- 2 Bazer F W. Mediators of maternal recognition of pregnancy in mammals [J]. Proc Soc Exp Biol Med, 1992; 199: 373
- 3 Steinmann G G, Rosenkaimer F, Leitz G. Clinical experience with interferon- α and interferon- γ [J]. Int Rev Exp Pathol, 1993; 34B: 193
- 4 Sekellick M J, Fenandion A F, Hopkins D A *et al.* Chicken interferon gene: cloning, expression and analysis[J]. J Interferon Res, 1994; 14: 71
- 5 刘胜旺,陈洪岩,卢景良 *et al.* 人工感染新城疫病毒引起 La Sota 疫苗免疫雏鸡细胞免疫功能及血液 IgG 的动态变化[J]. 中国畜禽传染病, 1998; 20(1): 18
- 6 Dgby M R, Lowenthal J W. Cloning and expression of the chicken interferon- γ gene[J]. J Interferon Cytokine Res, 1995; 15: 939
- 7 Agarwal S K, Cloud S S, Bums de J. Interferon activity of mitogen-induced chicken splenic lymphocytes which do not express interferon mRNA[J]. Vet Micro, 1996; 57: 269
- 8 Heller E D, Levy A M, Vaiman R *et al.* Chicken-embryo fibroblasts produce two types of interferon upon stimulation with newcastle disease virus [J]. Vet Micro, 1997; 59: 298

[收稿 1998-04-29 修回 1998-06-29
(编辑 张慧)

(上接第 44 页)

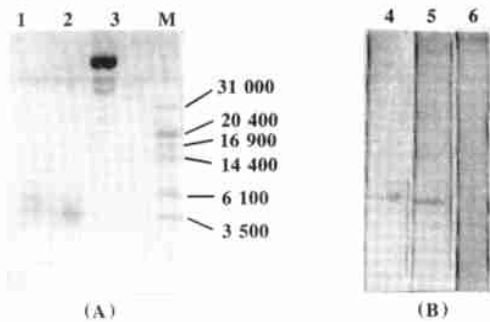


图 1 SDS PAGE 电泳结果和 Western blot 分析
Fig. 1 Results of SDS PAGE(A) and Western blot(B) analysis

Note: 1, 4. medical thymosin; 2, 5. T α 1; 3, 6. BSA.

2.2.2 Western blotting 鉴定 医用胸腺肽针剂、纯品 T α 1、BSA 按上述蛋白印迹检测方法,SDS-PAGE 电泳后经考马斯亮蓝染色,结果见图 1(A)。另一部分电泳后电转至 PVDF 膜上进行蛋白印迹,由于分子量相差悬殊,因此采用分批电转时间过长而有所损失。经我们多次试验证明,分批电转的效果较理想。蛋白结果见图 1(B)。由图 1 可以看出,分别在 3~4, 3 及 60-70 kD 附近均有明显的免疫亲和反应。多数厂家的医用胸腺肽针在 3~4 kD 有明显反应带。

结果证明所制备的抗血清能专一地识别胸腺 T α 1 及含 T α 1 组份的复合蛋白。同时含有抗 BSA 抗体。

3 讨论

本工作不仅为检测转基因蓝藻表达产物提供了灵敏度高,特异性强的抗体,同时所制备的抗体还可用于医用胸腺肽针剂成分的检测。

致谢:本项工作得到彭宣宪教授的精心指导,以及厦门大学抗癌中心张长弓老师给予无私的帮助,在此一并表示衷心的感谢。

4 参考文献

- 1 曹颖瑛. 胸腺素的研究进展[J]. 国外医学·免疫学分册, 1999; 22(1): 27
- 2 王震熙,吴章桂,张胜 *et al.* SPA-ELISA 改良法在检测胸腺素基因表达产物中的应用[J]. 浙江医科大学学报, 1989; 18(3): 106
- 3 杨贵贞. 医用免疫学[M]. 长春:吉林人民出版社, 1981: 430-432
- 4 余,谢少文,杨贵贞 *et al.* 临床免疫技术[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1982: 161-162, 201-202
- 5 彭秀玲,袁汉英,谢毅 *et al.* 基因工程实验技术[M]. 第 2 版,长沙:湖南科学技术出版社, 1997: 248-261
- 6 杨联萍,孔祥平,易学瑞 *et al.* SDS-PAGE 电泳对小分子多肽的分析[J]. 生物工程进展, 1998; 18(6): 49

[收稿 2000-04-13 修回 2000-05-23
(编辑 张慧)