

• 论 著 •

CD47 分子胞外区蛋白单克隆抗体的制备与鉴定

梁栋伟¹, 刘集鸿²

(1. 佛山市南海区第二人民医院检验科, 广东佛山 528200; 2. 惠州市第一人民医院检验科, 广东惠州 516000)

摘要: 目的 制备和鉴定抗人 CD47 分子胞外区蛋白单克隆抗体。方法 聚合酶链反应扩增人 CD47 胞外区基因序列, 重组至原核表达载体 pET-32a(+) 中, 利用大肠埃希菌表达系统表达 CD47 胞外区蛋白。用纯化的 CD47 胞外区蛋白免疫小鼠, 采用常规方法进行细胞融合, 经克隆化培养后, 筛选能够特异性分泌鼠抗人 CD47 单克隆抗体的杂交瘤细胞株。采用酶联免疫吸附法、Western blot 和流式技术检测抗体效价及特异性。结果 成功构建人 CD47 原核表达载体, 在 BL21(DE3) 中获得表达, 经十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳、Western blot 鉴定后, 采用层析柱法获得纯化的 CD47 胞外区蛋白。以纯化蛋白为免疫原, 成功制备具有较强亲和力的单克隆抗体。结论 成功制备了针对 CD47 分子胞外区蛋白的高亲和力单克隆抗体, 为进一步研究 CD47 的生物学功能奠定了基础。

关键词: CD47; 基因表达; 单克隆抗体**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2015.21.019**文献标识码:** A**文章编号:** 1673-4130(2015)21-3125-03**Preparation and identification of monoclonal antibody against extracellular region of human CD47 protein**Liang Dongwei¹, Liu Jihong²

(1. Clinical Laboratory, the Second People's Hospital of Nanhai District, Foshan, Guangdong 528200, China;

2. Clinical Laboratory, the First People's Hospital of Huizhou City, Huizhou, Guangdong 516000, China)

Abstract: Objective To prepare and identify anti-CD47 monoclonal antibodies. **Methods** The gene fragment of CD47 was amplified by polymerase chain reaction and cloned into prokaryotic expressing vector pET-32a(+). Purified reconstructed protein was used to immunize BALB/c mice. The immunized spleen cells were isolated and fused with Sp2/0 cells. After screened, hybridomas secreting anti-CD47 monoclonal antibody were acquired. Biological activities of antibodies were investigated by Western blot and flow cytometry. **Results** The recombinant CD47 extracellular domain protein was successfully expressed in BL21, and certificated by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis and Western blot. Data of flow cytometry detection demonstrated that the antiserum had high affinity to CD47 protein. **Conclusion** Recombinant CD47 and its monoclonal antibody, with high affinity, were successfully prepared, which could provide reliable tools for the future study of CD47.

Key words: CD47; gene expression; monoclonal antibody

CD47 又称整合素相关蛋白(IAP), 是广泛表达于细胞膜表面的免疫球蛋白样蛋白, 可与抑制性受体信号调节蛋白 α 链(SIRP α)相结合, 进而调节细胞的迁移、吞噬、免疫自稳功能及神经元网络^[1]。CD47 与 SIRP α 结合引起 SIRP α 氨基酸序列中的酪氨酸磷酸化, 转导抑制性信号而降低巨噬细胞的吞噬活性。肿瘤细胞表面高表达 CD47, 因此可通过这一机制逃避免疫监视作用, 抑制巨噬细胞对肿瘤细胞的吞噬和清除作用^[2-4]。

1 材料与方法

1.1 主要材料 原核表达载体 pET-32a(+)、大肠埃希菌 BL21(DE3)、卵巢癌细胞 SKOV3 由本实验室保存。次黄嘌呤-甲氨蝶呤-胸腺嘧啶核苷(HAT)培养基、聚乙二醇(PEG)4000 购自美国 Sigma 公司。杜尔伯科改良伊格尔(DMEM)高糖培养基、胎牛血清购自美国 Gibco 公司。Taq 酶、限制性核酸内切酶购自日本 Takara 公司。T4 DNA 连接酶购自美国赛默飞公司。胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒购自美国 Axygen 公司。抗组氨酸(His)抗体及羊抗鼠二抗购自美国 KPL 公司。

1.2 方法

1.2.1 CD47 cDNA 克隆 培养 SKOV3 细胞, 采用 Trizol 法提取细胞总 mRNA, 通过逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)扩增 CD47 cDNA 基因序列。依据 GenBank 中人 CD47 基因序列设计胞外区引物, 上游引物 5'-CGC GGA TCC ATG TGG CCC CTG GTA GCG GCG CTG T-3', 下游引物: 5'-AAG GAA

AAA AGC GGC CGC ATT TTC ATT TGG AGA AAA CCA TG-3'(划线部分分别为 BamH I 和 Not I 酶切位点)。以扩增获得的 cDNA 序列为模板进行 PCR 扩增。PCR 扩增程序: 94 °C 5 min, 94 °C 50 s, 52 °C 35 s, 72 °C 50 s 循环 29 次, 72 °C 5 min。以 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定及回收、纯化基因片段。

1.2.2 pET-32a(+) - CD47 重组质粒的构建及鉴定 采用 BamH I 和 Not I 限制性核酸内切酶对回收、纯化的 PCR 产物及原核表达载体 pET-32a(+) 进行双酶切, 采用 T4 连接酶对酶切产物进行连接, 构建 pET-32a(+) - CD47 重组质粒。重组质粒转化至大肠埃希菌 BL21(DE3), 单克隆扩大培养后提取质粒, 经 BamH I 、Not I 双酶切鉴定的阳性克隆送至 Invitrogen 公司测序。

1.2.3 CD47 蛋白的原核表达及鉴定 将测序正确的菌株接种于含氨苄西林的 Luria-Bertani(LB)培养基, 37 °C 振荡培养至光密度值 0.6~0.8, 加入异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)37 °C 过夜诱导表达, 取 1 mL 菌液离心收集菌体, 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析目的蛋白的表达情况, 并用抗 His 抗体进行 Western blot 检测。

1.2.4 CD47 蛋白的纯化 阳性菌扩大培养并诱导表达后, 离心收集菌体, 用磷酸盐缓冲液(PBS)重悬后超声破碎, 离心收集上清, 上样于 Ni-Seproase 6FF 亲和柱, 经洗脱缓冲液洗脱后取少量上清液, 用 12% 的 SDS-PAGE 验证目的蛋白的纯化效

果。其余纯化蛋白转移至超滤管中进行浓缩,采用 Bradford 法测定蛋白浓度。浓缩后的蛋白-80℃冻存。

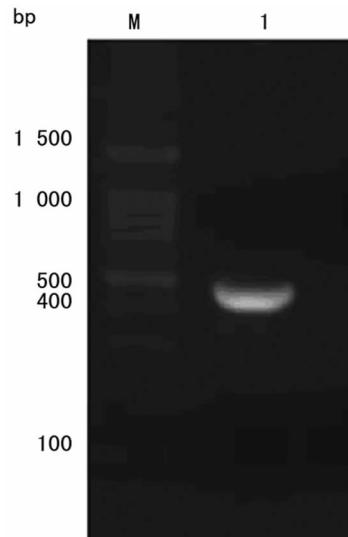
1.2.5 CD47 免疫小鼠及单克隆抗体(单抗)的制备 以纯化的 CD47 蛋白为抗原免疫 BALB/c 小鼠,免疫剂量为 100 微克/只,免疫方式为皮下多点免疫,间隔 2 周免疫 1 次,共免疫 3 次;第 3 次免疫后断尾取血,采用间接酶联免疫吸附法(ELISA)检测抗体滴度;选取抗体滴度高的小鼠,腹腔注射 100 μg CD47 蛋白加强免疫 1 次;3 d 后处死小鼠取脾脏,采用 PEG 法进行脾细胞、Sp2/0 细胞融合;采用 HAT 培养基加压筛选阳性克隆,以有限稀释法进行单克隆化,单克隆细胞经扩大培养后获得阳性杂交瘤细胞;将阳性杂交瘤细胞接种至 BALB/c 小鼠,制备并纯化抗 CD47 抗体。

1.2.6 抗 CD47 单抗异性检测 采用 Western blot 法检测抗 CD47 单抗对膜表面 CD47 的特异性。常规方法培养 SKOV3 细胞,细胞经预冷的放射免疫沉淀法(RIPA)蛋白裂解液处理后,采用 SDS-PAGE 分离获得的膜蛋白,转膜后用 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h,以制备的单抗作为一抗孵育 1 h,磷酸盐吐温缓冲液(PBST)洗膜 3 次,以辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠 IgG(1:5 000)作为二抗室温孵育 30 min, PBST 洗膜 3 次,最后用化学发光法显色检测。

1.2.7 流式技术检测单抗对 CD47 的结合能力 常规方法培养 SKOV3 细胞,收集细胞并调整细胞浓度至 1×10^7 /mL,每个反应管计入 100 μL 细胞悬液;以未免疫小鼠血清为阴性对照,其余反应管中分别加入适量的筛选获得的抗 CD47 单抗,4℃反应 30 min, PBS 洗 3 次;重悬细胞后每管加入 1 μL 藻红蛋白(PE)标记的山羊抗鼠二抗,4℃避光反应 30 min, PBS 洗 3 次,50 μL PBS 重悬细胞后上机检测。

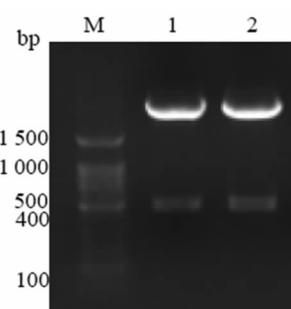
2 结 果

2.1 表达载体的构建与鉴定 PCR 扩增 CD47 胞外区,扩增产物进行 1.5% 琼脂糖电泳,电泳结果显示目的片段大小为 436 bp,与预期值相符(见图 1)。回收的 PCR 扩增产物与表达载体 pET-32a 经双酶切、连接后构建 pET-32a(+)-CD47 重组质粒,重组质粒转化感受态细胞,培养后挑取单克隆进行酶切,酶切产物 1.5% 琼脂糖凝胶电泳结果显示电泳条带与预期值相符(见图 2)。选取阳性克隆进行测序鉴定,测序结果与 Gen-Bank 中的序列一致,确定重组表达载体 pET-32a(+)-CD47 构建正确。



M:DNA 分子标记物;1:CD47 胞外区基因扩增产物。

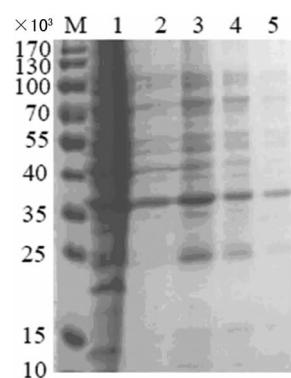
图 1 CD47 胞外区基因的克隆



M:DNA 分子标记物;1~2:不同的重组质粒克隆。

图 2 pET-32a(+)-CD47 重组质粒双酶切鉴定

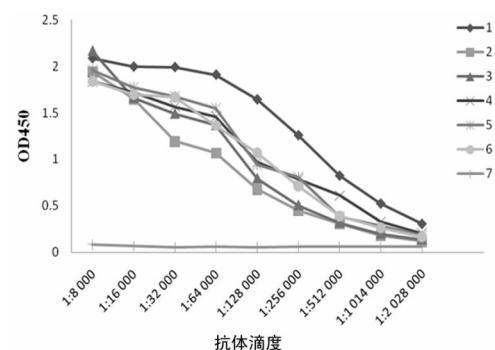
2.2 融合蛋白的表达及鉴定 测序正确的表达载体经转化、培养、诱导等处理后,采用 SDS-PAGE 进行培养上清融合蛋白表达检测。结果显示,在相对分子质量为 36×10^3 处有明显的条带,与预期值相符。表达菌裂解上清经亲和柱层析、洗脱后得到纯化蛋白,SDS-PAGE 电泳结果见图 3。



M:蛋白分子标记物;1:诱导表达的转化菌破碎上清;2~5:纯化的 CD47 蛋白。

图 3 CD47 纯化蛋白的鉴定

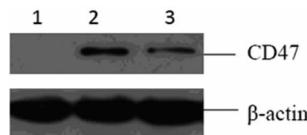
2.3 抗 CD47 单抗滴度检测 将 CD47 纯化蛋白经皮下多点免疫的方式免疫 BALB/c 小鼠,第 3 次免疫后采集尾静脉血,间接 ELISA 检测抗 CD47 抗体滴度,结果见图 4。



1~6:不同的免疫小鼠检测结果;7:阴性对照小鼠检测结果。

图 4 抗 CD47 单抗滴度检测

2.4 抗 CD47 单抗特异性检测 利用常规法进行细胞融合,采用间接 ELISA 筛选阳性克隆,阳性克隆经有限稀释法进行单克隆化,单克隆细胞进行扩大培养,直至抗体分泌阳性率为 100%,最终获得 2 株稳定的抗人 CD47 杂交瘤细胞株,分别命名为 5A6、9H3。Western blot 检测结果显示,这 2 株杂交瘤细胞分泌的单抗均能识别 SKOV3 细胞膜表面 CD47 蛋白(见图 5)。流式技术检测结果显示,2 株单抗均能识别 SKOV3 细胞膜表面 CD47 蛋白(见图 6)。



1:阴性对照;2:5A6株单抗;3:9H3株单抗。

图 5 Western blot 检测抗 CD47 单抗特异性

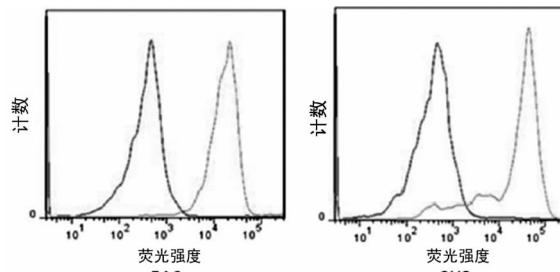


图 6 流式技术检测单抗对 SKOV3 细胞膜表面 CD47 蛋白的识别

3 讨 论

CD47 是与机体免疫系统密切相关的膜蛋白, 可结合整合素、信号调节蛋白 A 等配体, 具有多种免疫调控作用^[5-6]。CD47 与配体结合后, 通过产生抑制性信号降低巨噬细胞的吞噬活性, 增强肿瘤细胞的免疫逃逸功能, 肿瘤细胞也可通过上调 CD47 表达以逃避免疫系统的清除作用。白血病、乳腺癌、膀胱癌、卵巢癌等恶性肿瘤细胞均高表达 CD47, 且 CD47 的高表达与肿瘤患者的预后呈负相关^[7-9]。

CD47 与 SIRPa 的结合不依赖于蛋白糖基化。因此, 本研究制备了 CD47 胞外区蛋白原核表达系统, 采用纯化蛋白免疫小鼠, 并利用传统的杂交瘤技术, 经 3 次筛选及 2 次克隆化培养后, 最终获得了 2 株稳定分泌抗 CD47 单抗的杂交瘤细胞株。ELISA、Western blot、流式技术检测结果显示, 所制备的单抗具有良好的特异性和高度的亲和力, 为进一步研究 CD47 的生物学功能奠定了基础。

抗 CD47 单抗疗法为肿瘤免疫治疗提供了新的探索途径。前期的研究发现, 抗 CD47 单抗能够通过阻断 CD47-SIRPa 信号通路, 促进巨噬细胞对肿瘤细胞的吞噬作用, 选择性地杀伤肿瘤细胞, 并且对大多数正常细胞无杀伤作用^[10-11]。随着对

(上接第 3124 页)

噬作用, 是肺炎链球菌的主要侵袭力, 使患者 WBC、NEU 水平明显升高。铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌和流感嗜血杆菌同为革兰阴性菌, 存在于细菌细胞壁中的脂多糖作为内毒素, 对宿主具有毒性作用, 但只在细菌死亡溶解或菌细胞被破坏后才被释放。各种细菌内毒素的毒性作用虽然较弱, 但也可引起炎性指标水平不同程度的升高, 故本研究中上述 3 种革兰阴性菌感染患者均出现 hs-CRP、WBC 水平升高。由于细菌、真菌培养时间较长, 故在获得药敏实验检测结果前, 临床医生只能凭经验使用抗菌药物。而本文结果提示, 可根据患者 hs-CRP、WBC、NEU 升高水平及时判断细菌感染或定植, 从而决定是否使用抗菌药物, 做到合理用药, 使非细菌感染者避免接受抗菌药物治疗。

参考文献

- 杨晓峰, 杨新宏, 刘秋霞, 等. CRP、WBC、异型淋巴细胞检测在儿童感染性疾病中的应用[J]. 承德医学院学报, 2012, 129(2): 141-142.
- 刘春秀. C 反应蛋白定量检测与白细胞计数的敏感性比较[J]. 中

CD47-SIRPa 信号通路在免疫和中枢神经系统中作用机制研究的深入, 为部分发病机制尚不清楚的疾病提供了新的研究途径, 但相关研究仍需进一步深入。

参考文献

- Matozaki T, Murata Y, Okazawa H, et al. Functions and molecular mechanisms of the CD47-SIRP alpha signaling pathway [J]. Trends Cell Biol, 2009, 19(2): 72-80.
- Chao MP, Alizadeh AA, Tang C, et al. Anti-CD47 antibody synergizes with rituximab to promote phagocytosis and eradicate non-Hodgkin lymphoma [J]. Cell, 2010, 142(5): 699-713.
- Nagahara M, Mimori K, Kataoka A, et al. Correlated expression of CD47 and SIRPA in bone marrow and in peripheral blood predicts recurrence in breast cancer patients [J]. Clin Cancer Res, 2010, 16(18): 4625-4635.
- Chao MP, Alizadeh AA, Tang C, et al. Anti-CD47 antibody synergizes with rituximab to promote phagocytosis and eradicate non-Hodgkin lymphoma [J]. Cell, 2010, 142(5): 699-713.
- Willingham SB, Volkmer JP, Gentles AJ, et al. The CD47-signal regulatory protein alpha (SIRPa) interaction is a therapeutic target for human solid tumors [J]. PNAS, 2012, 109(17): 6662-6667.
- 鞠宝辉, 黄宇婷, 田菁, 等. 抗 CD47 单克隆抗体对卵巢癌细胞靶向治疗的体外研究 [J]. 中国肿瘤临床, 2013, 40(8): 440-443.
- Kim D, Wang J, Willingham SB, et al. Anti-CD47 antibodies promote phagocytosis and inhibit the growth of human myeloma cells [J]. Leukemia, 2012, 26(12): 2538-2545.
- Chao MP, Alizadeh AA, Tang C, et al. Therapeutic antibody targeting of CD47 eliminates human acute lymphoblastic leukemia [J]. Cancer Res, 2011, 71(4): 1374-1384.
- Chao MP, Weissman IL, Majeti R. The CD47-SIRPalpha pathway in cancer immune evasion and potential therapeutic implications [J]. Curr Opin Immunol, 2012, 24(2): 225-232.
- 杨梅, 吴敬波, 张智慧. CD47 与淋巴瘤相关性的研究进展 [J]. 肿瘤预防与治疗, 2014, 42(6): 285-288.
- 王颖超, 冯磊, 殷楚云, 等. 抗 CD47 抗体联合阿糖胞苷靶向治疗 NOD/SCID 小鼠单核细胞白血病的研究 [J]. 中国当代儿科杂志, 2013, 7(15): 577-582.

(收稿日期: 2015-05-08)

国民康医学, 2012, 24(18): 2204-2205.

- 叶应妩, 王毓三, 申子瑜. 全国临床检验操作规程 [M]. 3 版. 南京: 东南大学出版社, 2006.
- 陈倩如, 陆国标. 228 例痰培养病原菌分布及细菌耐药性分析 [J]. 当代医学, 2013, 19(1): 27-28.
- 刘文, 吴治. 我院痰培养标本中病原菌的临床分布及耐药性分析 [J]. 微生物学杂志, 2013, 33(2): 97-100.
- 王洪涛. 呼吸内科住院患者痰培养和药敏试验结果临床分析 [J]. 基层医学论坛, 2013, 17(28): 3733-3734.
- 刘雄, 李兵, 覃李红. 痰培养致病菌构成与耐药性分析 [J]. 热带医学杂志, 2014, 14(9): 1195-1197.
- 樊成. C-反应蛋白与儿科肺部感染相关性分析 [J]. 微量元素与健康研究, 2013, 30(5): 22-23.
- 王世恒, 朱秀华, 张帆. 106 株真菌的分类和耐药性分析 [J]. 中华医院感染学杂志, 2004, 3(3): 250-251.
- 李培, 苏欣, 施毅. 再谈下呼吸道分离出念珠菌的意义 [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2014, 11(5): 689-690.

(收稿日期: 2015-07-28)