

论著·基础研究

抗人中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白单克隆抗体识别的抗原表位区域鉴定*

何莹¹, 胡川闽², 陈安^{2△}

(1. 中国人民解放军空军第 986 医院检验科, 陕西西安 710054; 2. 陆军军医大学临床生化教研室, 重庆 400038)

摘要:目的 对抗人中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(NGAL)单克隆抗体 H5 识别的抗原表位区域进行鉴定。方法 设计 4 个 NGAL 截短体, 通过 PCR 扩增截短体 DNA 片段并克隆到 PET42a 质粒中表达 GST-NGAL 截短体融合短肽。以此为抗原鉴定 H5 识别的抗原表位区域。随后根据生物信息学预测结果, 化学合成 2 段潜在 B 细胞表位肽, 用 ELISA 和 Western blot 方法进一步鉴定。结果 H5 能与 NGAL 蛋白分子第 20~36 位氨基酸结合。结论 单克隆抗体 H5 的抗原表位结合位点存在于成熟 NGAL 蛋白分子氨基末端第 20~36 位氨基酸处, 其深入研究为建立高效灵敏的 NGAL 免疫学检测体系和进一步研究 NGAL 分子抗原表位结构奠定基础。

关键词:中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白; 单克隆抗体; 表位

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.21.001 中图分类号:R446.6

文章编号:1673-4130(2018)21-2593-03

文献标识码:A

Identification of antigenic epitope regions recognized by monoclonal antibodies against human neutrophil gelatinase-associated lipoprotein*

HE Ying¹, HU Sichuanmin², CHEN An^{2△}

(1. Department of Clinical Laboratory, the 986th Hospital of People's Liberation Army Air Force, Xi'an, Shaanxi 710054, China; 2. Department of Clinical Biochemistry, Army Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To identify the epitope region of monoclonal antibody H5 against human neutrophil gelatinase-associated lipoprotein (NGAL). **Methods** Four NGAL truncated DNA fragments were designed and amplified by PCR and cloned into PET42a plasmid to express GST-NGAL truncated fusion peptide. The antigen epitope region recognized by H5 was identified as antigen. Two potential B cell epitope peptides were synthesized and identified by ELISA and Western blot. **Results** H5 could bind to the amino acid of the NGAL protein at 20—36 position. **Conclusion** The antigen epitope binding site of monoclonal antibody H5 exists at at the amino terminal 20—36 amino acid of mature NGAL protein molecule, which lays a foundation for the establishment of a highly sensitive immunoassay system for NGAL and the further study of the epitope structure of NGAL molecule.

Key words: neutrophil gelatinase-associated lipoprotein; monoclonal antibody; epitope

人中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(NGAL)是由 198 个氨基酸组成的分泌型糖蛋白^[1]。研究显示, NGAL 生物学作用多样, 并与多种病理生理过程密切相关^[2-3]。近年来研究表明, 血清和尿液中的 NGAL 水平对于急性肾损伤的早期诊断有价值^[4-5]。NGAL 被认为是早期诊断急性肾损伤的良好生化标志物^[6-7]。目前, 检测 NGAL 的方法有免疫印迹法、放射免疫法、酶联免疫法等。所有方法都需要

基于获得特异性良好的 NGAL 单克隆抗体。在前期工作中, 陆军军医大学临床生化实验室以 293T 细胞表达的 NGAL 重组蛋白为免疫原制备获得多株 NGAL 单克隆抗体^[8], 本研究结合短肽表达和表位预测技术对效价最高的一株单克隆抗体 H5 进行抗原表位区域鉴定。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

大肠埃希菌 BL21(DE3)和 DH5 α 菌株购

* 基金项目: 国家高技术发展研究计划“863”计划资助项目(2011AA02A113)。

作者简介: 何莹, 女, 主治医师, 主要从事临床诊断研究。△ 通信作者, E-mail: chenana7281@yahoo.com。

自北京天根生物科技有限公司; pET42a 质粒购自 Novagen 公司; PCR 引物由 Invitrogen 公司合成; 表位肽 b1 和 b2 由上海吉尔公司合成。

1.2 仪器与试剂 超净工作台 SW-CJ-2D 购自苏州仪器设备厂; PCR 仪购自美国 MJ Research 公司; 蛋白电泳仪和凝胶成像系统 BIO-RAD 公司; Nco I 和 EcoR I 购自 New England Biolabs 公司; T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司; 其他分析纯化学试剂购自成都科龙化工试剂厂。

1.3 方法

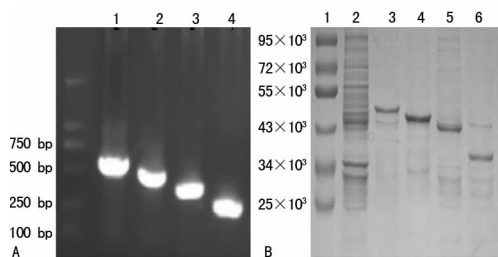
表 1 NGAL 基因分段扩增的引物序列(5'→3')

DNA 片段	上游引物(Nco I位点)	下游引物(EcoR I位点)
A	GAT GCC ATG GGT ATG CCC CTA GGT CTC CTG TG	CCG GAA TTC TTA TCA GCC GTC GAT ACA CTG GT
B	GAT GCC ATG GGT ATG CCC CTA GGT CTC CTG TG	CCG GAA TTC TTA TCA CCC GTA GAG GGT GAT CTT GA
C	GAT GCC ATG GGT ATG CCC CTA GGT CTC CTG TG	CCG GAA TTC TTA TCA ACT CTT AAT GTT GCC CAG CG
D	GAT GCC ATG GGT ATG CCC CTA GGT CTC CTG TG	CCG GAA TTC TTA TCA TTT CAG CTC ATA GAT GGT GG

1.3.2 抗人 NGAL 单克隆抗体识别的抗原表位区域鉴定 在 Western Blot 中分别以 a1~a4 为抗原, 根据 H5 与它们不同的反应, 推知其可能的抗原表位区域靠近 N 端(aa1~aa79)。进一步利用生物信息学工具 (http://tools.immuneepitope.org/tools/bcell/iedb_input) 分别对可能的抗原表位区域预测, 根据预测结果化学合成两段 N 端潜在 B 细胞表位肽: b1 (aa20~aa36) 和 b2(aa60~aa72), 用 ELISA 和 Western blot 方法进一步分析 H5 识别的抗原表位区域。

2 结果

2.1 GST-NGAL 截短体融合短肽表达载体的构建与表达 对构建的 PET42a-NGAL 截短体质粒进行双酶切鉴定, 可得到相应大小的截短体 DNA 片段(图 1A), 并对质粒测序。将测序结果正确的质粒转化入大肠埃希菌诱导表达 GST-NGAL 截短体融合短肽 a1~a4(图 1B)。



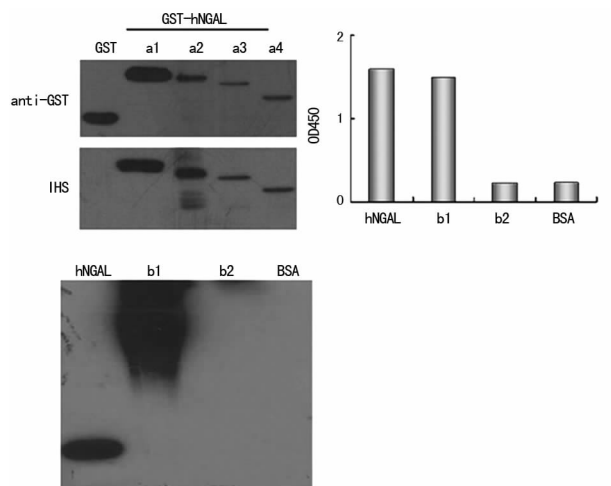
注: A 表示截短体 DNA 片段酶切鉴定。1 为截短体 A DNA 片段; 2 为截短体 B DNA 片段; 3 为截短体 C DNA 片段; 4 为截短体 D DNA 片段。B 表示截短体融合短肽凝胶电泳。1 为 Mark; 2 为空转对照; 3 为融合短肽 a1; 4 为融合短肽 a2; 5 为融合短肽 a3; 6 为融合短肽 a4

图 1 GST-NGAL 截短体融合蛋白表达载体的构建与表达

2.2 抗人 NGAL 单克隆抗体 H5 识别的抗原表位区域鉴定 分别以 a1~a4 为抗原, H5 为一抗, 抗 GST 单克隆抗体为对照作 Western blot 分析。经分析发

1.3.1 NGAL 截短体 PCR 引物及短肽的设计和合成 根据 NGAL 序列共设计了 4 个 NGAL 截短体, 分别命名为 A(1~594 bp)、B(1~477 bp)、C(1~357 bp) 和 D(1~237 bp)。根据截短体分别设计引物扩增截短体 DNA 片段(表 1), 在 5' 端和 3' 端分别引入 Nco I 位点和 EcoR I 位点。用扩增的截短体 DNA 片段构建重组 PET42a-NGAL 质粒并转化入大肠埃希菌中表达 GST-NGAL 截短体融合短肽, 分别命名为 a1 (aa1~aa198)、a2 (aa1~aa159)、a3 (aa1~aa119)、a4 (aa1~aa79)。

现, H5 与 4 段短肽均可结合(图 2A), 提示其抗原表位可能定位于 NGAL 蛋白片段的 N 端 1~79 氨基酸处。为进一步分析 H5 抗原结合表位, 利用生物信息学预测出在 NGAL 蛋白 1~79 氨基酸区间存在 2 段潜在 B 细胞抗原表位, 分别位于 aa20~aa36 和 aa60~aa72 处。化学合成这两段表位肽 b1 和 b2 并偶联 BSA, 以此为抗原进行间接 ELISA 试验。结果表明 H5 能与全长 NGAL 及 b1 结合, 而不与 b2 及纯的 BSA 结合(图 2B); 同时做 Western blot 法, 与 ELISA 结果一致(图 2C), 确定 H5 抗原结合位点在 NGAL 蛋白第 20~36 位氨基酸处。



注: A 表示分别以截短体融合短肽 a1~a4 为抗原的 Western blot 分析; B 表示分别以合成短肽 b1 和 b2 为抗原的 ELISA 分析; C 表示分别以合成短肽 b1 和 b2 为抗原的 Western blot 分析

图 2 抗人 NGAL 单克隆抗体 H5 识别的抗原表位区域鉴定

3 讨论

NGAL 属于 Lipocalin 家族, 生物学作用多样并

与多种病理生理过程密切相关。2011 年美国哥伦比亚大学 Barasch 研究小组用 Luciferase-2 和 mCherry 双荧光报告基因揭示了缺血和中毒性肾损伤时 NGAL 在肾组织中基因表达活性显著增高,并将这一研究成果发表在 Nature Medicine 上,成为 NGAL 作为新型肾损伤生物学标志物的理论依据^[9]。近年多项国内外研究也表明,各种因素引起的急性肾损伤 NGAL 水平升高显著,其升高的时间远远早于经典的肾损伤生化标志物如肌酐、尿素氮等^[10-13]。随着 NGAL 作为新型 AKI 生化标志物得到临床认可,建立特异度高和灵敏度高的免疫学检测方法十分重要。而建立可靠免疫学方法的基础是得到高特异性抗 NGAL 抗体。

NGAL 蛋白是由 198 个氨基酸组成的小分子分泌型糖蛋白,前 20 个氨基酸为信号肽,当 NGAL 一旦分泌出胞信号肽就被水解^[1]。经过生物信息学分析预测 NGAL 蛋白至少存在 15 个可作为糖基化位点和磷酸化位点的氨基酸残基。哺乳动物表达系统能使蛋白质在表达过程中正确折叠、组装和糖基化^[14]。为获得结构正确的抗 NGAL 单克隆抗体,本实验室用 293T 细胞表达系统代替大肠埃希菌表达系统表达 NGAL 重组蛋白,并以此作为免疫原制备获得多株抗 NGAL 单克隆抗体。抗原表位是抗原、抗体结合的结构基础,明确的表位对于定点改造蛋白质分子,降低抗体制备成本等都有积极意义。在大多数免疫测定中,捕获抗体和检测抗体应针对抗原中不同的表位以提高检测灵敏度。因此,本研究选取效价最高的 1 株抗 NGAL 单克隆抗体 H5 进行抗原表位区域鉴定。通过 ELISA 和 Western blot 分析,H5 能与 NGAL 蛋白分子第 20~36 位氨基酸结合,证明 H5 的抗原表位结合位点存在于水解掉信号肽后 NGAL 蛋白分子的氨基末端;也表明在 NGAL 蛋白分子的氨基末端至少存在 1 个 B 细胞抗原决定簇。后续的工作中需要对其他 NGAL 单克隆抗体进行抗原表位区域鉴定,筛选出针对 NGAL 分子不同表位的单抗,为建立高效灵敏的 NGAL 免疫学检测体系和进一步研究 NGAL 分子的抗原表位结构奠定基础。

4 结 论

单克隆抗体 H5 的抗原表位结合位点存在于成熟 NGAL 蛋白分子氨基末端第 20~36 位氨基酸处,其深入研究为建立高效灵敏的 NGAL 免疫学检测体系和进一步研究 NGAL 分子抗原表位结构奠定基础。

参考文献

[1] KJELDEN L,JOHNSEN A H,SENGEL H,et al. Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein asso-

- ciated with human neutrophil gelatinase[J]. Biol Chem, 1993,268(14):10425-10432.
- [2] NIELSEN B S,BORREGAARD N,BUNDGAARD J R, et al. Induction of NGAL synthesis in epithelial cells of human colorectal neoplasia and inflammatory bowel diseases[J]. Gut,1996,38(3):414-420.
- [3] MONIER F,SURLA A,GUILLOT M,et al. Gelatinase isoforms in urine from bladder cancer patients[J]. Clin Chim Acta,2000,299(1/2):11-23.
- [4] MISHRA J,MA Q,PRADA A,et al. Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury [J]. J Am Soc Nephrol,2003,14(10):2534-2543.
- [5] MISHRA J,DENT C,TARABISHI R,et al. Neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute renal injury after cardiac surgery[J]. Lancet,2005, 9466(365):1231-1238.
- [6] KOYNER J L,GARG A X,COCA S G,et al. Biomarkers predict progression of acute kidney injury after cardiac surgery[J]. J Am Soc Nephrol,2012,23(5):905-914.
- [7] RONCO C,CRUZ D,NOLAND B W. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin curve and neutrophil gelatinase-associated lipocalin extended-range assay:a new biomarker approach in the early diagnosis of acute kidney injury and cardio-renal syndrome [J]. Semin Nephrol, 2012, 32(1):121-128.
- [8] 何莹,郑怡麟,陈安,等. 抗人 NGAL 单克隆抗体的制备及其定量检测方法的建立[J]. 免疫学杂志,2013,29(1): 50-54.
- [9] PARAGAS N,QIU A,ZHANG Q,et al. The Ngal reporter mouse detect the response of the kidney to injury in real time [J]. Nat Med,2011,17(2):216-222.
- [10] 李海英,谢小兵. 狼疮性肾炎新标志物:中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白[J/CD]. 中华临床实验室管理电子杂志,2015,3(2):87-90.
- [11] 郑静,何海兰,张国英. 人中性粒细胞明胶酶相关性脂质运载蛋白对 ICU 儿童浓度症致急性肾损伤的预测诊断价值[J]. 第三军医大学学报,2017,39(2):199-200.
- [12] SHYAM R,PATEL M L,SACHAN R,et al. Role of urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a biomarker of acute kidney injury in patients with circulatory shock[J]. Indian J Crit Care Med,2017,21(11):740-745.
- [13] MOLEDINA D G,PARIKH C R. Phenotyping of acute kidney injury;beyond serum creatinine[J]. Semin Nephrol,2018,38(1):3-11.
- [14] GAO Y,HUANG Y F. Advances in eukaryotic expression systems [J]. Zhonghua Nan Ke Xue,2002,8(4): 292-294.