

论著·基础研究

重组人脂蛋白相关磷脂酶 A2 的原核表达及单克隆抗体制备

欧兰香^{1,2}, 陈 振¹, 王佳颖¹, 解光宁^{1,2}, 王 岩¹, 朱之炜^{1△}

(1. 山东莱博生物科技有限公司, 山东济南 250100; 2. 山东省体外诊断用免疫原料制备与标记
工程技术研究中心, 山东济南 250100)

摘 要:目的 构建重组人脂蛋白相关磷脂酶 A2(Lp-PLA2)的原核表达质粒,制备重组人 Lp-PLA2,并通过免疫诱导获得人 Lp-PLA2 的单克隆抗体。方法 以人 cDNA 文库为模板,通过 PCR 的方法获得 PLA2G7 基因的编码区序列,并与原核表达载体 pET32a 进行连接,构建原核表达质粒,转化大肠杆菌 Rostta(DE3)。通过在 30 ℃ 0.2 mmol/L 异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)条件下诱导蛋白表达,经过纯化获得重组人 Lp-PLA2;免疫 Balb/c 小鼠,制备单克隆抗体;并通过酶联免疫吸附试验法测定效价,检测抗体特异性。结果 通过 Not I 和 Sal I 双酶切及测序证实原核表达质粒构建成功;经纯化得到 47×10^3 左右的蛋白,与 Lp-PLA2 抗体进行蛋白免疫印迹法杂交呈阳性,表明已得到重组人 Lp-PLA2。通过对小鼠免疫,最终获得单克隆抗体,效价为 $1 : 2 \times 10^6$,与纤维蛋白原、C-反应蛋白无交叉反应。结论 成功获得重组人 Lp-PLA2,并制备得到了效价较高的单克隆抗体,为后续 Lp-PLA2 检测试剂盒的开发奠定了基础。

关键词:脂蛋白磷脂酶 A2; 原核表达; 单克隆抗体

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2019.22.004

中图法分类号:Q556,R446.1

文章编号:1673-4130(2019)22-2703-05

文献标识码:A

Prokaryotic expression of recombinant human lipoprotein-associated phospholipase A2 and preparation of monoclonal antibodies

OU Lanxiang^{1,2}, CHEN Zhen¹, WANG Jiaying¹, XIE Guangning^{1,2}, WANG Yan¹, ZHU Zhiwei^{1△}

(1. Shandong Leibo Biotechnology Co., Ltd., Jinan, Shandong 250100, China; 2. Shandong Provincial
Engineering and Technology Research Center for Preparation and Marking of Immune
Raw Materials for in Vitro Diagnosis, Jinan, Shandong 250100, China)

Abstract: **Objective** To construct a prokaryotic expression plasmid of human lipoprotein-associated phospholipase A2 (Lp-PLA2), prepare recombinant human Lp-PLA2, and obtain monoclonal antibodies against human Lp-PLA2 by immunoinduction. **Methods** Human cDNA library was used as template, the coding sequence of PLA2G7 gene was obtained by PCR and linked with prokaryotic expression vector pET32a. The prokaryotic expression plasmid was constructed and then transformed into Escherichia coli Rostta (DE3). The recombinant human Lp-PLA2 was purified by inducing the expression of the protein under the condition of 0.2 mmol/L isopropylgalactoside (IPTG) at 30 ℃. The monoclonal antibody was prepared by immunizing Balb/c mice. The titer and the specificity of the antibody were determined by ELISA. **Results** The plasmid was identified by the double-enzyme digestion (Not I and Sal I) and sequencing. The purified protein was about 47×10^3 in size. The protein showed a positive result in the Western blot hybridization with the commercialized Lp-PLA2 antibody, indicating that the recombinant Lp-PLA2 has been achieved. By immunizing the mice, the Lp-PLA2 monoclonal antibodies was achieved with a titer at $1 : 2 \times 10^6$, and no cross-reaction with other biomarkers such as fibrinogen or C-reactive protein. **Conclusion** Human recombinant Lp-PLA2 was successfully obtained and monoclonal antibodies with high titer were prepared, which laid a foundation for the development of subsequent Lp-PLA2 detection kit.

Key words: lipoprotein-associated phospholipase A2; prokaryotic expression; monoclonal antibodies

脂蛋白磷脂酶 A2(Lp-PLA2)是近年来一种被广泛关注的新型炎症标志物。Lp-PLA2 蛋白包含 441 个氨基酸,相对分子质量为 45.5×10^3 ^[1],由 PLA2G7 基因编码^[2],该基因由 12 个外显子组成,位于人类 6

作者简介:欧兰香,女,研究员,主要从事医学诊断研究。△ 通信作者,E-mail:labresearcher@126.com。

本文引用格式:欧兰香,陈振,王佳颖,等.重组人脂蛋白相关磷脂酶 A2 的原核表达及单克隆抗体制备[J].国际检验医学杂志,2019,40(22): 2703-2707.

号染色体的 6p12-p21.1 区段。Lp-PLA2 是一类不依赖于钙离子的磷脂酶,能够降解氧化磷脂,并将它们降解为溶血磷脂及氧化游离脂肪酸等。这些降解产物会刺激机体分泌细胞因子和黏附因子,进而导致血管内皮功能异常^[3-4],最终形成早期动脉硬化斑块。检测血液中的 Lp-PLA2 水平,能够帮助预测冠心病或缺血性卒中的发生^[5-6]。本研究通过构建 Lp-PLA2 原核表达载体,通过诱导、纯化获得人 Lp-PLA2 重组蛋白,并通过重组抗原免疫得到 Lp-PLA2 的单克隆抗体,为后续 Lp-PLA2 免疫检测试剂盒的开发奠定基础。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株 质粒 pET32a(+)、大肠杆菌 DH5 α 、Rosetta(DE3)菌株由本实验室保存。

1.1.2 主要试剂 人单核细胞(THP-1)cDNA 表达文库为本实验室前期构建;pEASY-T1 Cloning Kit 购自北京金式金生物技术有限公司,Prime STAR 高保真 Taq 酶,T4 DNA 连接酶,限制性内切酶 Not I、Sal I,DNA 凝胶回收试剂盒购自大连宝生物工程有限公司;弗氏完全佐剂与不完全弗氏佐剂、降植烷、PEG4000、HAT 条件培养基购自 Sigma 公司;Protein A 购自美国 GE 公司;小鼠单抗 Ig 类/亚类鉴定试剂盒购自洛阳佰奥通实验材料中心;酶标板购自厦门云鹏科技发展有限公司。

1.1.3 实验动物 Balb/c 小鼠购自济南朋悦实验动物繁育有限公司。

1.2 方法

1.2.1 Lp-PLA2 基因的获得 在美国国立生物技术信息中心(NCBI)上检索得到人 Lp-PLA2 基因序列,并设计特异性引物在上、下游两端分别添加 Not I、Sal I 酶切位点,引物序列见表 1。以人类 cDNA 文库为模板,对 PLA2G7 基因进行扩增。反应程序如下:95℃ 5 min;95℃ 60 s,55℃ 40 s,72℃ 80 s,35 个循环;72℃ 5 min。通过电泳,回收 1 275 bp 的目的片段,与 pEASY-T1 中间载体进行连接,转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,将菌液涂布于含有卡那霉素的 LB 固体培养基上,37℃ 培养过夜。挑取单克隆,扩大培养后提取质粒,进行 PCR 和酶切鉴定,将筛选得到的阳性克隆送济南博尚生物有限公司进行测序。

表 1 PLA2G7 基因扩增引物序列

引物名称	引物序列(5'-3')	引物大小(bp)
PLA2G7 上游	ATA AGA ATG CGG CCG CTT	33
	GAC TGG CAA TAC ATA	
	ACG CGT CGA CAT TGT ATT TCT	
PLA2G7 下游	CTA TTC C	28

1.2.2 原核表达质粒 pET32-PLA2G7 的构建 使用 Not I、Sal I 分别对 pEASY-PLA2G7 与 pET32a

(+)进行双酶切,回收目的基因片段与原核表达载体片段,按照摩尔比 3 : 1 的比例进行混合,16℃ 连接 3 h,转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,将菌液涂布于含有卡那霉素的 LB 固体培养基上,37℃ 培养过夜。挑取单克隆,扩大培养后提取质粒,进行 PCR 和酶切鉴定,阳性克隆送济南博尚生物有限公司进行测序鉴定。提取质粒后,再转化大肠杆菌 Rosetta(DE3)感受态细胞。

1.2.3 重组人 Lp-PLA2 蛋白的表达 将保存于 -80℃ 的 pET32a(+)-PLA2G7 菌液取出,接种于 LB 培养基中,37℃ 培养过夜。按照万分之一的比例将菌液集中于诱导培养基(NaCl 9 g,蛋白胨 11 g,酵母提取物 22 g,甘油 4 mL,卡那霉素 0.1 mg/mL)中,37℃ 培养 3 h,至吸光度(A)600 在 0.5~0.8 时,加入异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)诱导蛋白表达,30℃ 继续高速振荡培养 7 h。5 000 r/min 离心 10 min 收集菌体,经超声破碎后再离心,分离获得上清液,十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)检测蛋白表达情况。

1.2.4 重组人 Lp-PLA2 的纯化和鉴定 使用亲和镍柱层析法对含有 Lp-PLA2 的上清液进行初步纯化。洗脱缓冲液:Tris 20 mmol/L,NaCl 100 mmol/L,咪唑 500 mmol/L,甘油 10%,CHAPS 0.6% W/V,pH 8.5。初纯液通过经 GE-DEAE 柱进行 NaCl 梯度洗脱,收集洗脱组分,再经过 P-6DG 柱进行脱盐,收集洗脱组分。将得到的重组蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,通过半干法将蛋白转移到硝酸纤维素膜上;5%脱脂奶粉室温封闭 3 h 后;与兔抗人 Lp-PLA2 抗体(1 : 1 500 倍稀释)进行杂交,28℃ 孵育 3 h;取出硝酸纤维素膜,漂洗后,加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG(1 : 5 000 倍稀释),室温孵育 1 h;漂洗后使用 ECL 进行显色。

1.2.5 Lp-PLA2 单克隆抗体的制备 将制备得到的重组人 Lp-PLA2 与等体积的完全弗氏佐剂充分混合,对 Balb/c 小鼠进行皮下多点注射(50 μ g 抗原/只)。4 周后测定血清效价,选择免疫反应好的个体加强免疫,将抗原与不完全弗氏佐剂充分混合后,通过皮下多点注射(25 μ g 抗原/只),连续进行 6 次再免疫,细胞融合前连续加强免疫 2 次;之后取脾细胞与 Sp2/0 骨髓瘤细胞进行融合。融合细胞在 37℃ 培养 9~11 d,待培养孔中生长出较大的细胞克隆后,进行酶联免疫吸附试验(ELISA)筛选;将阳性克隆进行有限稀释后,进行 4 次克隆化培养,保存细胞。按照 0.5 mL/只的剂量使用降植烷处理小鼠,1 周后在腹腔内接种杂交瘤细胞(2 $\times$ 10⁶ 细胞/只),饲养 10 d 后收集腹水。腹水经硫酸铵沉淀后,使用 Protein A 进行亲和纯化。

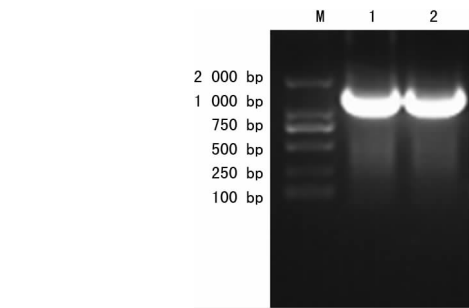
1.2.6 重组人 Lp-PLA2 单抗隆抗体的鉴定 用 pH 9.6 的碳酸盐缓冲液将重组人 Lp-PLA2 稀释到 0.25

μg/mL,包被酶标板,4℃过夜。第2天取出酶标板,按照小鼠单抗Ig类/亚类鉴定试剂盒说明书流程,对纯化得到的不同单克隆抗体进行亚类鉴定。为了挑选包被抗体和检测抗体的最佳组合,将不同单克隆抗体分别包被酶标板和酶(HRP)标记,进行两两配对的ELISA检测,筛选最佳抗体组合。用稀释液将纯化后的抗体进行倍比稀释,通过ELISA法检测抗体效价,对照为10 000倍稀释后的小鼠免疫前血清。用pH 9.6的碳酸盐缓冲液将人Lp-PLA2单克隆抗体稀释,包被酶标板,4℃过夜。第2天取出酶标板,TBST洗涤1次,5%BSA溶液37℃封闭2h;每孔分别加入纯化后的Lp-PLA2及C反应蛋白、纤维蛋白酶原的标准品,37℃孵育1h。孵育完成后取出酶标板,TBST洗涤3次,分别加入标记了HRP的人Lp-PLA2单克隆抗体100 μL(1:4 000稀释),37℃孵育1h。TBST洗涤5次,加入TMB底物,37℃显色20 min。取出后加终止液,在酶标仪上测定A₄₅₀读数,分析所制备的单克隆抗体的特异性。

1.3 统计学处理 本研究所有统计学分析均使用SPSS17.0进行,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两两比较采用t检验,以P<0.05为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 原核表达质粒的鉴定 以人THP-1 cDNA文库为模板,利用特异性引物扩增得到PLA2G7基因片段,见图1。与pEASY-T1连接后送公司进行测序;确定片段正确后,用于构建pET32a(+)-PLA2G7质粒。使用Not I、Sal I对已构建的重组质粒pET32-PLA2G7电泳后分离得到5.4 kb的载体片段及1 257 bp的目的序列片段,见图2。经测序,PLA2G7片段无碱基突变,与NCBI已公布的基因编码序列一致,说明载体构建成功,可用于后续实验。

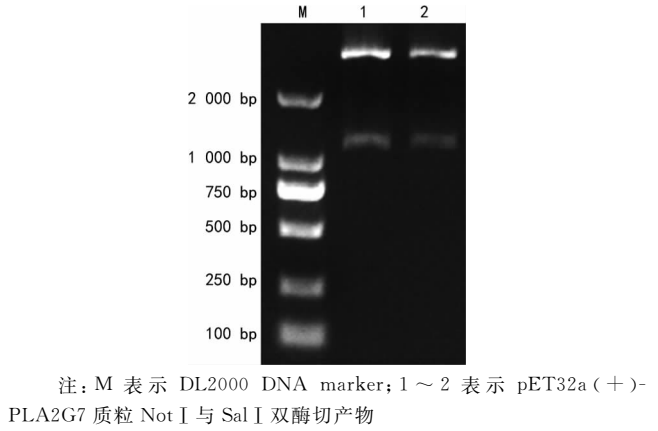


注:M表示DL2000 DNA marker

图1 PLA2G7基因PCR扩增图

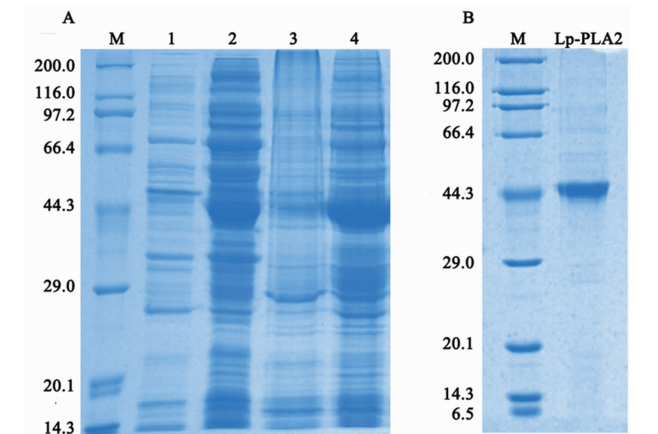
2.2 重组人Lp-PLA2的表达、纯化与鉴定 经过条件摸索,在本研究中,重组Lp-PLA2优化表达体系如下:37℃培养条件下,A₆₀₀为0.5~0.8时,加入0.2 mmol/L的IPTG,30℃培养7 h,重组人Lp-PLA2能够在DE3中以可溶蛋白的形式大量表达。经SDS-PAGE电泳检测,重组蛋白约为47×10³,与理论值基本一致,蛋白在上清中表达量最高,占菌体总蛋白的50%左右,见图3。这表明重组蛋白能够在大肠杆菌

中稳定表达,能够用于后续实验。将纯化后的重组人Lp-PLA2通过SDS-PAGE电泳将蛋白分离,通过半干法转印至硝酸纤维素膜上,与商业化的Lp-PLA2抗体杂交,显色后在47×10³处出现特异性条带,见图4,这表明纯化后的重组人Lp-PLA2具有较好的免疫学活性。



注:M表示DL2000 DNA marker;1~2表示pET32a(+)-PLA2G7质粒Not I与Sal I双酶切产物

图2 pET32-PLA2G7酶切电泳图



注:A图中M表示蛋白分子量标准,1表示未经IPTG诱导菌液,2表示IPTG诱导后的菌液,3表示沉淀,4表示上清;B图中M表示蛋白分子量标准,Lp-PLA2表示纯化后的重组人Lp-PLA2

图3 重组人Lp-PLA2的表达和纯化

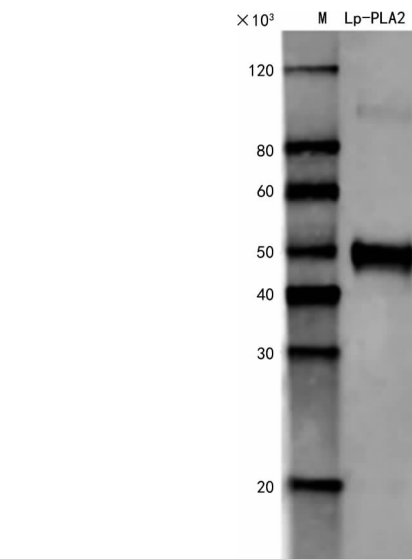


图4 重组人Lp-PLA2的蛋白免疫印迹检测

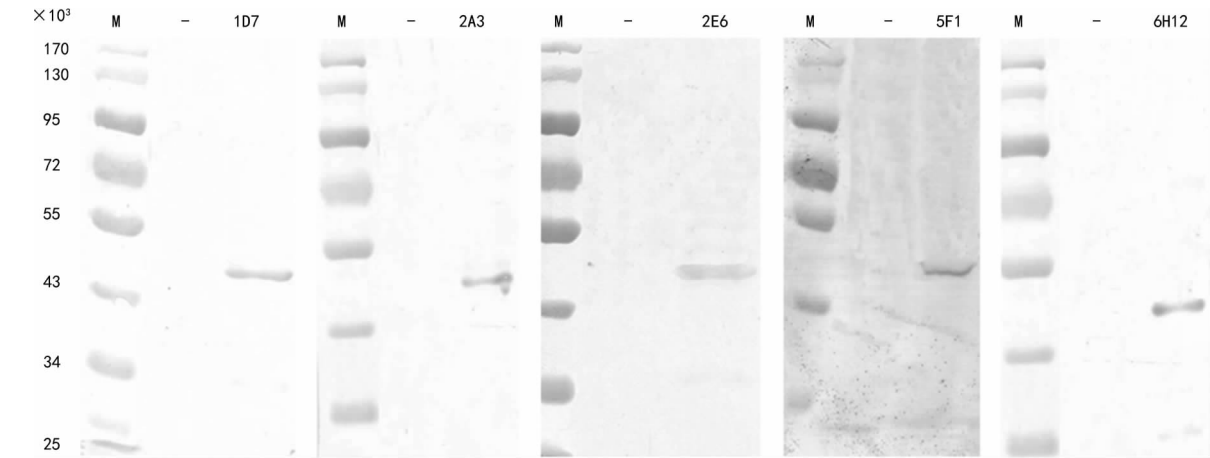
2.3 重组人 Lp-PLA2 单克隆抗体的鉴定 经过一系列筛选,共得到 5 株单克隆抗体(1D7、2A3、2E6、5F1 和 6H12),经过蛋白免疫印迹验证,它们都能特异性识别 Lp-PLA2 蛋白,见图 5。使用抗体分型试剂盒对所述单克隆抗体进行亚型鉴定,其中 1D7、2E6、5F1 和 6H12 为 IgG2b 亚型,轻链为 κ 链,2A3 为 IgG2a 亚型,轻链为 λ 链。对 5 株抗体进行两两配对的双抗体夹心 ELISA 检测分析显示,使用 2E6 作为包被抗体、5F1 为检测抗体时,具有较高的检测灵敏度,见表 2。通过间接 ELISA 法检测,本实验所制备得到的 Lp-PLA2 抗体效价可达 $1:2\times 10^6$ 以上,见图 6。将该抗体包被酶标板,对 Lp-PLA2 蛋白、纤维

蛋白原、C-反应蛋白进行 ELISA 检测,发现抗体不会与纤维蛋白原、C-反应蛋白等发生交叉反应,具有较好的特异性,见图 7。

表 2 单克隆抗体的配对筛选

Coating 抗体	Capture 抗体				
	1D7	2A3	2E6	5F1	6H12
1D7	—	0.879	0.976	1.039	0.317
2A3	0.412	—	0.721	1.012	0.263
2E6	0.143	1.213	—	2.471	0.115
5F1	1.246	0.699	1.623	—	0.567
6H12	0.967	0.738	0.513	0.799	—

注:—表示未进行此组检测



注:M 表示蛋白分子量标准;—表示:pET32a(+)空白质粒阴性对照

图 5 Lp-PLA2 单克隆抗体的蛋白免疫印迹检测

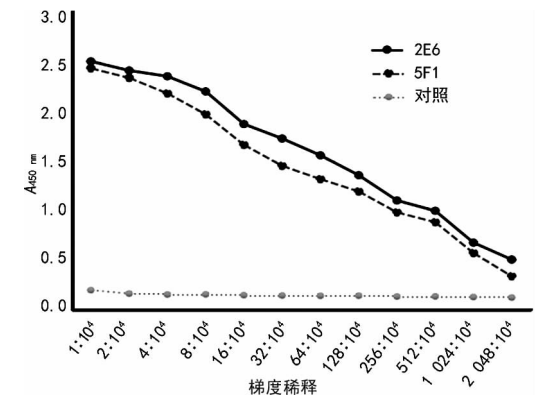


图 6 Lp-PLA2 抗体效价分析

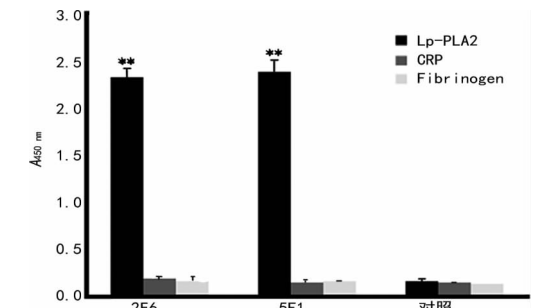


图 7 Lp-PLA2 单克隆抗体与其他心血管标志物的交叉反应性

3 讨 论

心血管疾病是一种在全球范围内危及人类生命安全的疾病,其发生、发展与动脉硬化的产生具有密不可分的关系,而 Lp-PLA2 在动脉硬化斑块形成过程中又发挥了重要作用^[7-9]。在体内,Lp-PLA2 与高密度脂蛋白和载脂蛋白 A1 呈负相关^[10]。Lp-PLA2 能够水解磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺等甘油酸酯的 sn-2 位磷脂键^[11],产生游离型氧化脂肪酸和溶血卵磷脂。因此,又被称为血小板活化因子乙酰水解酶(PAF-AH)^[12]。Lp-PLA2 的水解产物很多都能够刺激炎症因子,如细胞黏附因子、细胞因子等的产生,引发血管内皮损伤,使得黏附在内皮细胞上的单核细胞数量增加,血管内皮通透性改变,当单核细胞通过受损内皮进入血管内膜后,会形成巨噬细胞并吞噬氧化型低密度脂蛋白,产生动脉粥样硬化斑块;巨噬细胞分泌的炎症因子也会加速动脉硬化斑块的形成。2005 年美国食品药品监督管理局已批准将 Lp-PLA2 作为动脉硬化和缺血性卒中的风险评价因素^[5]。

目前,已有课题组利用 DNA 重组技术在不同生物(如大肠杆菌、昆虫、酵母)中进行过 Lp-PLA2 的表达研究,但存在不表达或表达量较低的情况^[13]。在本研究的前期实验过程中发现 Lp-PLA2 主要以包涵体

的形式被分泌出来。通过使用含有硫氧还蛋白(trxA)和便于蛋白生产、纯化的双融合伴侣原核表达载体 pET32a^[14],从而增加重组 Lp-PLA2 的可溶性。使用相对较低的温度(30 ℃)诱导蛋白表达,并在培养基中适当提高抗菌药物水平(0.1 mg/mL 的卡那霉素),这些方式也有助于提高外源蛋白表达水平^[15]。

4 结 论

本研究获得大量高纯度的人 Lp-PLA2 重组蛋白,并通过该蛋白免疫得到对应的具有高特异性的单克隆抗体,为后续 Lp-PLA2 检测试剂盒的开发奠定了基础。

参考文献

[1] 黄美容. 脂蛋白相关磷脂酶 A2 的原核表达及多克隆抗体的制备[J]. 中国生物制品学杂志, 2011, 24(4): 93-96.

[2] MAIOLINO G, LENZINI L, PEDON L, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2 single-nucleotide polymorphisms and cardiovascular events in patients with coronary artery disease[J]. J Cardiovasc Med, 2015, 16(1): 29-36.

[3] 周平, 罗云, 邢娜, 等. 肿瘤坏死因子 α 介导动脉粥样硬化发生机制的研究进展[J]. 世界中医药, 2015(8): 1163-1168.

[4] 倪文娟, 王云枝. Lp-PLA2、YKL-40 和 2 型糖尿病及其大血管病变发病的相关性研究[J]. 糖尿病新世界, 2015, 18(15): 38-40.

[5] 中国老年学学会心脑血管病专业委员会. Lp-PLA2 临床应用专家建议[J]. 中华心血管病杂志, 2015, 43(10): 9-11.

[6] YANG L, LIU Y, WANG S, et al. Association between Lp-PLA2 and coronary heart disease in Chinese patients[J]. J Int Med Res, 2017, 45(1): 159-169.

[7] 王贤进, 赵艳芳. Lp-PLA2 与冠心病的相关性研究进展[J]. 医学综述, 2016, 22(17): 3363-3366.

[8] ŠTEFANIC P, KOPOLOVETS I, HERTELYOVÁ Z, et al. Lipoprotein associated phospholipase A2 as a marker of vulnerable atherosclerotic plaque in patients with internal carotid artery stenosis[J]. Georgian Med News, 2017, 267(1): 27-34.

[9] YANG Y, XUE T, ZHU J, et al. Serum lipoprotein-associated phospholipase A2 predicts the formation of carotid artery plaque and its vulnerability in anterior circulation cerebral infarction[J]. Clin Neurol Neurosurg, 2017, 160(1): 40-45.

[10] CASAS J P, NINIO E, PANAYIOTOU A, et al. PLA2G7 genotype, lipoprotein-associated phospholipase A2 activity, and coronary heart disease risk in 10 494 cases and 15 624 controls of European ancestry[J]. Circulation, 2010, 121(21): 2284-2293.

[11] KARABINA S, NINIO E. Plasma PAFAH/PLA2G7 genetic variability, cardiovascular disease, and clinical trials[J]. Enzymes, 2015, 38(1): 145-155.

[12] SEEMA G, MADHU S V, SHILPA S. Lipoprotein associated phospholipase A2 activity & its correlation with oxidized LDL & glycaemic status in early stages of type-2 diabetes mellitus[J]. Indian J Med Res, 2015, 141(1): 107-114.

[13] 李苏亮, 齐欣, 王建军, 等. Lp-PLA2 的重组表达及单克隆抗体的制备[J]. 中国血液流变学杂志, 2013, 13(1): 20-23.

[14] SOFIA C, ANDRÉ A, ANTÓNIO C, et al. Fusion tags for protein solubility, purification and immunogenicity in Escherichia coli; the novel Fh8 system[J]. Front Microbiol, 2014, 5(1): 63.

[15] 苏鹏, 龚国利. 优化大肠杆菌表达外源蛋白的研究进展[J]. 生物技术通报, 2017, 33(2): 16-23.

(收稿日期: 2019-02-20 修回日期: 2019-05-04)

(上接第 2702 页)

[16] THATCHER N, CHANG A, PARIKH P, et al. Gefitinib plus best supportive care in previously treated patients with refractory advanced non-small-cell lung cancer: results from a randomised, placebo-controlled, multicentre study (iressa survival evaluation in lung cancer)[J]. Lancet, 2005, 366(9496): 1527-1537.

[17] SHI Y, AU J S, THONGPRASERT S, et al. A prospective, molecular epidemiology study of EGFR mutations in Asian patients with advanced non-small-cell lung cancer of adenocarcinoma histology (PIONEER)[J]. J Thorac Oncol, 2014, 9(2): 154-162.

[18] AZUMA K, OTA K, KAWAHARA A, et al. Association of PD-L1 overexpression with activating EGFR mutations in surgically resected non-small-cell lung cancer[J]. Ann Oncol, 2014, 25(10): 1935-1940.

[19] ISHIBA T, USHER J L, ELSHIMALI Y, et al. Frequencies and expression levels of programmed death ligand 1 (PD-L1) in circulating tumor RNA (ctRNA) in various cancer types[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 500(3): 621-625.

(收稿日期: 2019-02-22 修回日期: 2019-05-06)