·短篇论著·

唾液酸结合性免疫球蛋白凝集素 6 的生物信息学分析及多克隆抗体制备

王晨阳[1]，徐 鹏[1]，魏墨林[2]，张 玮[3]，曹海涛[4△]

1. 中国人民解放军陆军第八十二集团军医院中心实验室，河北保定 071000；2. 中国人民解放军陆军第八十二集团军医院卫勤处，河北保定 071000；3. 保定市人民医院健康管理中心，河北保定 071000；4. 中国人民解放军陆军第八十二集团军医院门诊部，河北保定 071000

摘 要：目的 表达并制备唾液酸结合性免疫球蛋白凝集素 6(Siglec-6)的多克隆抗体，并对其特异性进行鉴定。为下一步探讨 Siglec-6 在介导细胞信号转导和调节造血细胞及免疫细胞的功能，研究其在免疫调节和炎症反应中的作用奠定基础。**方法** 通过生物信息学分析方法预测 Siglec-6 蛋白的跨膜结构、理化特性、疏水性等因素，设计出两个多肽，两个多肽各自与血蓝蛋白(KLH)交联后对新西兰兔进行免疫，结果发现这两个多肽均可作为抗原免疫生物试剂，并成功获得高效价的抗 Siglec-6 多克隆抗体。通过酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测其效价，经过亲和层析纯化，用 Western blotting 测定抗体的特异度。**结果** 通过 ELISA 检测其效价分别为 1∶51 200 和 1∶12 800，Western blot 结果表明该方法所制备的抗体具有特异度。**结论** 该研究通过生物信息学方法成功预测了抗原表位，并据此预测成功制备了高效价、高特异度的抗 Siglec-6 多克隆抗体。

关键词：唾液酸结合性免疫球蛋白凝集素 6； 多克隆抗体； 生物信息学

DOI：10.3969/j.issn.1673-4130.2023.21.026 **中图法分类号：**R392；Q811.4

文章编号：1673-4130(2023)21-2686-03 **文献标志码：**A

唾液酸结合性免疫球蛋白凝集素(Siglec)一般是在免疫系统的细胞上表达[1]，由于其唾液酸配体的特异性，Siglecs 呈现多样化的特性，并且，表达在天然免疫细胞上的 Siglecs 大多数都是抑制性受体，通过对有关损伤模式分子(DAMPs)和病原体的相关模式分子(PAMPs)的调控来影响炎症反应，这个分子谱系含有许多与黏附及吞噬有关的分子，以及与含有 DAP12 转换子的酪氨酸依赖性活化基序(ITAM)相关受体，Siglecs 可以通过连接表达在同样细胞上的顺式配体和对唾液酸糖结合物衍生的病原体起反应，从而发挥抑制免疫细胞的功效[2]。它们可以帮助维持 B 淋巴细胞的耐受能力，并对常规 DC 前体和类浆细胞的 DC 前体前体的激活进行调控[3]，通过直接或间接的方式调节 T 细胞的功能[4]，Siglecs 通过影响免疫系统中的每一个细胞来调节免疫反应，与健康和疾病是密切相关的。

对于 Siglec-6 的基因结构和生物学功能，目前国内外所知甚少。本文通过对 Siglec-6 结构、基本物理化学性质、功能分类和抗原表位的分析，提出了一种新型的多肽抗原免疫新西兰兔方法，为进一步研究 Siglec-6 创造条件，生产出 Siglec-6 蛋白的多克隆抗体。

1 材料与方法

1.1 主要材料来源 新西兰兔(2 kg，购自从军事医学科学院的动物中心)；血蓝蛋白(KLH)、3，3′，5，5′-四甲基联苯胺(TMB)、戊二醛(购自西格玛公司)，弗氏全佐剂和不全佐剂；牛血清清蛋白(BSA)、甘氨酸(Glycine)、辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔 IgG(Vector 公司)；抗体亲和层析试剂盒(PIERCE 公司)；本实验室构建生产 TK-4T1 融合蛋白；预染蛋白相对分子质量的标准试剂采购自德国 Fermentas 公司(MBI)；PVDF 膜(德国 Schleicher & Schuell 公司)；化学发光试剂(ECL)从 PIERCE 公司采购。

1.2 生物信息分析过程 登录 NCBI 网站(http://www.ncbi.nlm.nih.gov)，利用“protein blast”方法对 Siglec-6 序列(NP_001236)进行同源性检索。采用 Geneious 软件和 Lasergene 软件分别对 Siglec-6 的蛋白质二级结构、抗原特异性、亲疏水性、与其他分子的结合位点、氨基酸组成的负荷带电属性等物理化学性质进行分析；用 NCBI 数据库 Blast 分析及 Geneious 软件进行同源性比较；用 Lasergene 软件对 Siglec-6 蛋白进行功能和分类预测。

1.3 Siglec-6 的设计与免疫原及包被原的合成 Siglec-6 位于人类第 19 号染色体 19q13.3 上，本文根据同源性、抗原性、亲疏水性等因素进行分析，分别设计了位于 N 端和 C 端的两个多肽，多肽合成和纯化由北京华大蛋白质研发中心有限公司采用固相多肽合成法合成，经质谱鉴定和高效液相色谱(HPLC)纯化，纯度为 98.0%。

1.4 Siglec-6 多克隆抗体的制备及纯化 取 200 μg 的多肽免疫原，用 0.9%的 NaCl 注射液稀释至 200～500 μL，然后添加等体积弗氏佐剂(初次免疫用弗氏全佐剂，加强免疫用弗氏不全佐剂)，将溶液和佐剂用混合设备混合均匀，从而形成油包水。将搅拌好的多

△ **通信作者**，E-mail：cht252@163.com。

肽免疫原在日本大耳白兔的背部选取 8～10 个点进行皮肤下注射。在首次免疫之后的第 4 周进行第一次加强免疫，之后每隔 2 周进行加强免疫 1 次，共完成加强免疫 3 次。最后一次免疫后的第 7 天，采用耳缘静脉取血，经过 ELISA 测定加强免疫后的抗体效价，在达到理想的抗体效价后，从新西兰兔的颈动脉采血，用采集到的血清进行亲和层析分离纯化，将纯化的抗体进行分装，保存到－70 ℃的超低温冰箱待用。

1.5　Siglec-6 多克隆抗体的效价测定　用包被液对抗原进行稀释（多肽偶联 BSA），使其浓度达到 2 μg/mL，每孔加入 100 μL，4 ℃，孵化过夜，洗液冲洗 2 次。之后用封闭液进行封闭，每孔加入 200 μL，37 ℃温箱孵育 2 h；再用洗液冲洗 1 次。兔的多抗血清从 200 倍稀释浓度开始以 2 倍浓度的梯度进行稀释（in PBS），阴性对照（negative）为未免疫的兔血清进行 200 倍稀释（in PBS），空白对照（blank）是 PBS；每孔加入 100 μL，37 ℃温箱孵育 1 h，洗液冲洗 3 次。然后加入稀释后的二抗（用 PBS 稀释 20 000 倍），每孔加入 100 μL，37 ℃温箱孵育 1 h，之后取出，再用洗液冲洗 3 次。进行显色，每孔加入 100 μL 显色液，显色 5～15 min。每个样品孔中添加入 50 μL 显色终止液，完成终止。用吸光光度计在波长（450～630）nm 下测量吸光度（A），保存并记录数据资料，进行作图深入分析。效价值为大于最大 A 值 50%的 A 值最小读数对应的稀释度值。

1.6　检测 Siglec-6 多克隆抗体特异性　首先对 Siglec-6 多克隆抗体进行纯化，然后针对 293T 融合表达的 Siglec-6 蛋白进行 Western blotting 检测以鉴定多克隆抗体的特异度。

2　结　　果

2.1　氨基酸序列相似性比对　在 NCBI 上检索 Siglec-6（NP_001236），同时检索到同源序列 rhSiglec-3、rhSiglec-5、rhSiglec-9、rhSiglec-10、rhSiglec-7、rhSiglec-11。用 NCBI 蛋白数据库 Blast 分析 Geneious 软件对 Siglec-6 及其同源蛋白序列进行比对，结果显示，同源序列之间相似性非常高，本文根据比对序列选取差异区域的 3 组序列：Pep-1 为 ERRFQLEGP，Pep-2 为 VQNTDDVNPVMV，Pep-3 为 VQPQEPKVTDT。同时，Geneious 软件和 Lasergene 软件分析 Siglec-6 亲疏水性抗原性、表面可及性及二级结构可知，本文选择的 3 条多肽都可以作为抗原表位。

2.2　多肽抗体的制备和效价　由于 Pep-2 和 Pep-3 都位于 N 端，本文选取 Pep-1 和 Pep-3 作为 Siglec-6 的多肽抗原序列，将设计的多肽序列合成后分别与 KLH 交联，并分别免疫新西兰兔，之后取血清进行倍比稀释，ELISA 测定 Pep-1 效价为 1∶51 200，Pep-3 效价为 1∶12 800，表明两组都获得高效价的多抗。采用亲和层析技术对抗血清进行纯化。

2.3　对 Siglec-6 多克隆抗体特异度进行检测　为测定血清抗体的特异度，笔者把经过纯化后的抗体进行稀释，稀释浓度 1∶1 000，然后进行 Western blotting 检测，对印迹分析（参见图 1），结果表明，在转染后首次抽取的 293T 细胞蛋白组分中，所使用的多克隆抗体的特异性均可探测到单个相对分子质量为 90×10^3 的阳性染色条带（参见图 1），结果表明，制备的多克隆抗体在 293T 细胞中转染 48 h 后，均可检测到单一的相对分子质量为 90×10^3 的阳性染色条带，与 GFP-S6 蛋白相对分子质量的理论值相符，而免疫前阴性血清在转染后 48 h 提取的 293T 细胞蛋白组分中未检测到对应的条带，说明获得了特异度较好的抗 Siglec-6 多克隆抗体。

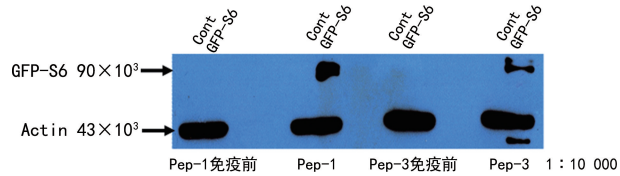

图 1　采用 Siglec-6 多克隆抗体检测 293T 细胞中 Siglec-6 和 EGFP 融合蛋白的表达

3　讨　　论

使用互联网的核酸和蛋白质数据库，对功能尚不明确的一些基因所编码的蛋白质的结构和功能进行深入的分析和预测，目前已成为探索蛋白质结构和功能的一种高效便捷的手段。有研究表明，在特定条件下，通过数据库和软件预测得到的蛋白质结构和功能和实验测定的结果相一致[5]。这些生物信息学方法在基因辨识、推测蛋白质生物功能、确定蛋白质的生理范围、预测蛋白质多维结构等方面都具有十分重要的作用。本文利用这些高效的方法，来对 Siglec-6 的抗原特异性、跨膜结构域、高级结构、亲疏水性、结合特异位点、氨基酸序列的正负电属性、所选择氨基酸偏移的酸碱性，以及合成多肽的难易等进行了综合分析[6]。本文对以上因素进行充分评估后，确定了针对 Siglec-6 不同表位的两条多肽，制备了针对 Siglec-6 不同表位的多克隆抗体。由于合成的多肽经过纯化后纯度高达 98.0%，且靶向 Siglec-6 表位的 C 端和 N 端，可能具有较高的效价和纯度，并且具有较强的特异度。

获得多肽抗体后，对该多抗的特异度和反应度进行了检测。除了抗体的效价外，还有另外一个检验抗体质量的重要标准，就是制备的抗体在不同条件下与抗原的结合能力。有些肽段形成的抗原决定簇在特殊条件下会受到变性和破坏，因此针对这些特殊肽段的抗体不会用 Western blotting 方法进行检测。本研究的结果显示，制备的 Siglec-6 多肽抗体可以用 Western blotting 成功的检测到（图 1），说明本文制备的抗体在不同条件下的抗原结合能力均能满足通常的实验要求。

人体的大量 Siglecs 表达在 B 细胞上包括 Siglec-2、5、6、9、10[7]，在艾滋病患者中，衰竭的 B 细胞高表

达很多抑制型受体，包括 Siglec-6。用 siRNA 敲除可以下调 Siglec，能使 B 细胞功能恢复[8]。虽然 Siglec-2/CD22 knockout 和 knockin 小鼠在最近几十年得以广泛的研究，但是经常得到相互矛盾的结论，因此 Siglecs 在 B 细胞中的功能还没有定论。对突变小鼠的研究表明，Siglec/SIAE/Lyn/SHP-1 路径对 B 细胞耐受和防止自身免疫都起着积极作用[9]。唾液酸乙酰酯酶在疾病中很少出现遗传性变型，揭示了它可以避免人类的自身免疫和慢性炎症混乱[10]，但是其在细胞中的生化功能仍然不完全了解。

对 Siglecs 的研究进一步证实了 Siglec-6 可能在感染和免疫疾病的诊断和治疗中发挥重要作用，具有广阔的应用前景。这也说明了 Siglec-6 单克隆抗体和多克隆抗体等相关产品的开发具有潜在的应用价值。综上所述，采用合成多肽技术，对不同 Siglec-6 表位的多克隆抗体进行制备，不但提供了一种简单、高效的方法，而且为 Siglec-6 相关产品的开发以及 Siglec-6 相关的基础和临床研究提供了一定的实验依据。

参考文献

[1] SHITENG D, JAMES C P. Siglecs as immune cell checkpoints in disease[J]. Annu Rev Immunol, 2020, 38(4): 365-395.

[2] DÂLIA R R, PATRICIA R I, MARÇAL G, et al. Role of Siglecs in viral infections: a double-edged sword interaction[J]. Mol Aspects Med, 2023, 90(4): 101113.

[3] BEATA O, MIROSŁAWA F S. Seminal plasma glycoproteins as potential ligands of lectins engaged in immunity regulation[J]. Int J Environ Res Public Health, 2022, 19(17): 10489.

[4] BAX M, KUIJF M L, HEIKEMA A P, et al. Campylobacter jejuni lipooligosaccharides modulate dendritic cell-mediated T cell polarization in a sialic acid linkage-dependent manner[J]. Infect Immun, 2011, 79(7): 2681-2689.

[5] RICHA D, JYOTI P S. Protein function prediction using functional inter-relationship [J]. Comput Biol Chem, 2021, 95(12): 107593.

[6] EDGAR A H, MARK A B, KELLY K L. Bridging protein structure, dynamics, and function using hydrogen/deuterium-exchange mass spectrometry[J]. Protein Sci, 2020, 29(4): 843-855.

[7] ALBERTO J E, LORRAINE V K, ZIV G O, et al. Disease modification and biomarker development in Parkinson disease: revision or reconstruction? [J]. Neurology, 2020, 94(11): 481-494.

[8] KARDAVA L, MOIR S, WANG W, et al. Attenuation of HIV-associated human B cell exhaustion by siRNA downregulation of inhibitory receptors[J]. J Clin Invest, 2011, 121(7): 2614-2624.

[9] MENEZES J CJ MDS, DIEDER ICH M F. Bioactivity of natural biflavonoids in metabolism-related disease and cancer therapies[J]. Pharmacol Res, 2021, 167(5): 105525.

[10] VINAY S M, SHIV P. Sialic acids and autoimmune disease[J]. Immunol Rev, 2016, 269(1): 145-61.

（收稿日期：2023-03-02　修回日期：2023-05-26）

（上接第 2669 页）

[33] METTRICK K, HASSAN K, LAMONT I, et al. The Iron-chelator, N, N′-bis (2-hydroxybenzyl) Ethylenediamine-N, N′-Diacetic acid is an effective colistin adjunct against clinical strains of biofilm-dwelling Pseudomonas aeruginosa[J]. Antibiotics (Basel), 2020, 9(4): 144.

[34] NAIR A, PERRY A, PERRY J D, et al. In vitro effects of combined iron chelation, antibiotics and matrix disruption on clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa[J]. J Antimicrob Chemother, 2020, 75(3): 586-592.

[35] THI MTT, WIBOWO D, REHM BHA. Pseudomonas aeruginosa Biofilms[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(22): 8671.

[36] ZHANEL G G, GOLDEN A R, ZELENITSKY S, et al. Cefiderocol: a siderophore cephalosporin with activity against Carbapenem-resistant and multidrug-resistant Gram-negative bacilli[J]. Drugs, 2019, 79(3): 271-289.

[37] LOUPIAS P, LAUMAILLE P, MORANDAT S, et al. Synthesis and study of new siderophore analog-ciprofloxacin conjugates with antibiotic activities against Pseudomonas aeruginosa and Burkholderia spp[J]. Eur J Med Chem, 2023, 245(Pt 2): 114921.

[38] SETHUPATHY S, PRASATH K G, ANANTHI S, et al. Proteomic analysis reveals modulation of iron homeostasis and oxidative stress response in Pseudomonas aeruginosa PAO1 by curcumin inhibiting quorum sensing regulated virulence factors and biofilm production[J]. J Proteomics, 2016, 145: 112-126.

[39] PANG Z, RAUDONIS R, GLICK B R, et al. Antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa: mechanisms and alternative therapeutic strategies[J]. Biotechnol Adv, 2019, 37(1): 177-192.

[40] YADAV S, SINGH A K, AGRAHARI A K, et al. Making of water soluble curcumin to potentiate conventional antimicrobials by inducing apoptosis-like phenomena among drug-resistant bacteria[J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 14204.

[41] HABASH M B, GOODYEAR M C, PARK A J, et al. Potentiation of tobramycin by silver nanoparticles against pseudomonas aeruginosa biofilms[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2017, 61(11): e00415-17.

[42] XIU W, REN L, XIAO H, et al. Ultrasound-responsive catalytic microbubbles enhance biofilm elimination and immune activation to treat chronic lung infections[J]. Sci Adv, 2023, 9(4): eade5446.

（收稿日期：2023-02-03　修回日期：2023-05-28）