

doi: 10.3969/j.issn.1007-7146.2013.02.010

抗果蝇 MRJ 蛋白单克隆抗体的制备和鉴定

廖四芳, 刘 丹, 宋 文, 刘 明, 赵 阳, 唐 超, 吴秀山, 王跃群*

(湖南师范大学 蛋白质化学及鱼类发育生物学教育部重点实验室, 心脏发育研究中心, 湖南 长沙 410081)

摘 要: 制备抗果蝇 MRJ 蛋白单克隆抗体可用于研究果蝇 *mrj* 的生物学功能, 使用 IPTG 诱导重组质粒 pET28a-*mrj* 在大肠杆菌 *Rosetta* 中表达, 重组蛋白经过 Ni-IDA 凝胶柱亲和纯化后免疫 BALB/c 小鼠。然后取免疫好的小鼠的脾脏细胞与小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 融合, 经克隆和筛选获得了能分泌抗果蝇 MRJ 蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞株。腹水制备后获得单克隆抗体, 通过 ELISA 和 Western Blot 对所获得的抗体进行鉴定, 结果表明所制备单克隆抗体能够特异性结合于原核及真核细胞表达的 MRJ 蛋白, 可用于研究 *mrj* 基因的生物学功能。

关键词: *mrj*; 细胞融合; 单克隆抗体

中图分类号: Q511

文献标识码: A

文章编号: 1007-7146(2013)02-0154-05

Preparation and Identification of Anti-Drosophila MRJ Protein Monoclonal Antibody

LIAO Sifang, LIU Dan, SONG Wen, LIU Ming,
ZHAO Yang, TANG Chao, WU Xiushan, WANG Yuequn*

(The Center for Heart Development, Key Lab of MOE for Development Biology and Protein Chemistry, Hunan Normal University, Changsha 410081, Hunan, China)

Abstract: Preparation of anti-Drosophila MRJ protein monoclonal antibody could be used for research of *mrj* biological function in Drosophila. The recombinant plasmid pET28a-*mrj* in *Rosetta* was induced with IPTG to express MRJ recombinant protein. The recombinant protein purified by Ni-IDA gel column was used to immunized BALB/c mice. Then the spleen cells of immunized mice and mouse myeloma cells SP2/0 were used for cell fusion. A hybridoma cell line which secrete anti-*mrj* monoclonal antibodies was obtained through subcloning and screening progress. The monoclonal antibodies was identified by Elisa and Western Blot. The results show that the anti-*mrj* monoclonal antibodies can binding to MRJ protein of prokaryotic and eukaryotic cells specificity. It could be used for biology function research of *mrj* gene.

Key words: *mrj*; cell fusion; monoclonal antibody

MRJ (Mammalian relative of DnaJ) 属于第二类 DnaJ/热休克蛋白 (Hsp) 40 家族蛋白^[1,2]。DnaJ 蛋

收稿日期: 2013-02-15; 修回日期: 2013-02-22

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30930054, 31071999, 31272396)

作者简介: 廖四芳 (1987 -), 男, 湖南郴州人, 在读硕士研究生, 主要从事分子遗传学的研究工作。(电话) 18711063574; (电子邮箱) liaoshihua1987@163.com

* 通讯作者: 王跃群 (1964 -), 女, 博士导师, 教授, 主要从事心脏发育基因调控和疾病分子机制的研究。(电话) 0731-88872780; (电子邮箱) yuequnwang@yahoo.com

白由两个结构域构成: N 末端的 DnaK 相互作用结构域和 C 末端的底物结合结构域。在大肠杆菌中 DnaJ 蛋白主要功能是参与热休克及稳定蛋白前体的非折叠构象的分子^[3]。DnaJ 相关蛋白在其他生物体中往往作为 HSP70 型分子伴侣的供体或受体而发挥其生物学作用^[4]。已有研究表明小鼠 MRJ 蛋白在小鼠胎盘中发育过程中起着极其重要的作用。它在胚胎和胎盘中都持续表达, *mrj* 纯合突变体小鼠在胚胎发育的第 8.5 天由于绒毛膜尿囊融合缺陷致死^[5]。人类 *mrj* 基因编码两个剪接体, 分别为 MRJ [L] 和 MRJ [S]。MRJ (S) 突变是导致亨廷顿疾病产生的主要原因^[6,7]。过表达 MRJ (S) 能有效抑制依赖于多聚谷氨酸的蛋白聚集作用和天冬氨酸活性, 并导致神经毒性细胞产生^[8]。MRJ (S) 还被报道参与了调控角蛋白 8/18 长纤丝的形成, 最新研究发现 MRJ (S) 可以抑制钙粘蛋白诱导的心肌肥大^[9]。

为了研究果蝇 MRJ 蛋白的生物学功能, 我们制备了抗果蝇 MRJ 蛋白单克隆抗体。首先在大肠杆菌 *Rosetta* 中表达果蝇 MRJ 重组蛋白, 将重组蛋白纯化后作为抗原免 BALB/c 小鼠, 取免疫后的小鼠脾脏细胞和小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 进行融合, 经过筛选和克隆后, 我们得到了一株能分泌抗 MRJ 蛋白抗体的杂交瘤细胞株, 并通过小鼠腹水制备获得了抗体, 然后对所得抗体的有效性进行了分析鉴定。鉴定结果表明所制备的 MRJ 单克隆抗体具有很好的特异性, 可以为 *mrj* 在果蝇发育中的功能研究提供条件。

1 材料和方法

1.1 试剂与仪器

试剂: pET28a-*mrj* 转 *Rosetta* 菌种由本实验室所保存。免疫佐剂 quickantibody 购自北京康碧泉公司; HAT 选择性培养基、HT 培养基、8-Azaguanine 和融合试剂 50% PEG 购自美国 Sigma 公司; 胎牛血清及 PR-MI 1640 培养基为 Hyclone 产品; 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记山羊抗小鼠 IgG 为鼎国生物技术有限公司产品; 8 周龄雌性健康 BALB/c 小鼠购自长沙市生物制品所, 本实验室饲养; 小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 由南京大学赠送, 融合前两星期复苏并经 8-Azaguanine 筛选; 其他试剂均为国产分析纯。

仪器: 二氧化碳培养箱 (Thermo); 倒置显微镜 (Olympus); 细胞培养耗材, 96 孔板、24 孔板、6 孔细胞培养板、移液枪 (Corning); 1 mL 的 A 蛋白层析柱 (上海生工生物技术有限公司)。

1.2 抗原制备及纯化

抗原制备: 参照文献 [10] 制备 MRJ 抗原。复苏 pET28a-*mrj* 转 *Rosetta* 菌种接种于具 Kana 抗性的 10 mL 液体培养基中, 37 °C 培养过夜, 次日以 1:50 转瓶进行扩大培养, 当菌液 OD₆₀₀ 达 0.6 时加入浓度为 5 mmol/L 的 IPTG, 37 °C 诱导 8 h 超声碎裂后进行考马斯亮蓝染色检验, 有目的蛋白的大量表达。

抗原大量制备及纯化: 以 5×10^{-4} mol/L 浓度的 IPTG, 37 °C 条件下大量诱导 (200 mL 菌液) 8 h 后收集样品, 超声裂解后将所得 MRJ 蛋白过 Ni-IDA 凝胶柱亲和纯化, 考马斯亮蓝染色后检测目的蛋白纯度高于 90%, 可用于单克隆抗体制备动物免疫的抗原。

1.3 动物免疫

使用 quickantibody 作为免疫佐剂, 对小鼠腿部肌肉注射免疫, MRJ 重组蛋白 (1 μg/mL) 与免疫佐剂各 200 μL 混匀免疫 6-8 周龄 BALB/c 小鼠 4 只, 每只注射 100 μL。初次免疫后第 21 天同样的方法进行第二次免疫, 第 35 天尾静脉取少量血做效价检测, 间接 ELISA 检测效价滴度高于 1:8 000 则进行冲击免疫, 冲击免疫直接以不加佐剂的 MRJ 蛋白对小鼠冲击免疫一次, 每只 20 μg。冲击免疫后 96 h 内取脾脏细胞做细胞融合。

1.4 饲养层细胞制备

于细胞融合前一天, 准备饲养层细胞, 常选用小鼠腹腔渗出细胞, 其中主要是巨噬细胞和淋巴细胞。应用腹腔渗出细胞的好处是: 一方面做饲养细胞, 另一方面巨噬细胞可以吞噬死亡的细胞和细胞碎片, 为融合细胞的生长创造良好的环境。腹腔细胞的数目应适宜, 过少则不能提供杂交瘤细胞所需要的生长因子, 过多会阻碍杂交瘤细胞的贴壁, 一般以铺满孔底 30% 为好。

1.5 细胞融合

取已免疫小鼠的脾脏用不完全培养基制成细胞悬液, 计数。收集选择生长状态良好的 SP2/0 骨髓瘤细胞, 制成细胞悬液, 计数。将 SP2/0 骨髓瘤细胞与免疫小鼠的脾细胞以 1:10 在 50% 的 PEG1500 作用下融合^[8]。加 HAT 选择培养基重悬混匀后滴入到铺有饲养层细胞的 3 块 96 孔细胞培养板。放入 37 °C, 含 5% 的 CO₂ 培养箱中培养。

1.6 阳性杂交瘤细胞的筛选与亚克隆

杂交瘤细胞在 HAT 选择培养基中培养两星期后改用 HT 培养基进行培养。当杂交瘤细胞长到细胞培养孔体积的 1/10 时, 以重组果蝇 MRJ 蛋白作为抗

原 SP2/0 细胞培养上清作为阴性对照,用间接 ELISA 法检测杂交瘤细胞培养上清,筛选阳性细胞孔,并对阳性细胞孔进行亚克隆,经过 3 次亚克隆后,杂交瘤细胞阳性达 100%,即可获得能够稳定分泌 MRJ 蛋白抗体的细胞株,将此细胞株进行小鼠腹腔注射生产单克隆抗体。

1.7 腹水制备产生单克隆抗体

0.5 mL 弗氏完全佐剂腹腔注射 4 只雌性 BALB/c 小鼠,同时培养杂交瘤细胞,弗氏完全佐剂注射七天后,收集状态较好的杂交瘤细胞,洗涤后稀释注入小鼠腹腔,每只小鼠约 1×10^6 个,杂交瘤细胞注射 7-10 天后观察可见小鼠腹部肿大,则可以进行腹水采集。

1.8 腹水的纯化

采集复水后,12 000 r/min 离心 15 min,去掉沉淀等杂质。往离心后的腹水中加入等体积的 PBS,并添加硫酸铵固体至 50% 饱和,静置 2 h,12 000 r/min 离心 15 min,弃上清,用 PBS 重新溶解沉淀,然后再次加入硫酸铵固体至 45% 饱和,静置两个小时左右,12 000 r/min 离心 15 min 弃去上清,用少量 PBS 溶解沉淀,即得到较纯的抗体,对 PBS 透析除去硫酸铵,透析时间为 24 h,透析过程中更换透析液两至三次。

1.9 腹水效价的测定

1 mg/mL 的 MRJ 原核表达白每孔 100 μ L,包被 Elisa 酶标板过夜,以 SP2/0 细胞培养上清为阴性对照,用间接 Elisa 方法检测腹水的效价。同时 Western Blot 检测抗体使用于 Western Blot 的效价,用 MRJ 重组蛋白做抗原进行 SDS-PAGE 电泳,用制备的 MRJ 单克隆抗体作为一抗,设置抗体稀释浓度分别为 1:500; 1:1 000; 1:2 000; 1:3 000; 1:5 000。进行 Western Blot 检测。

1.10 果蝇 mrj 的表达情况的检测

分别提取野生型果蝇 R6 品系和 mrj 的 p 因子插入突变品系 15059 总蛋白,测定蛋白浓度后,上样量为 50 μ g 进行 SDS-PAGE 电泳,使用制备的 MRJ 单克隆抗体进行 Western Blot 检测。

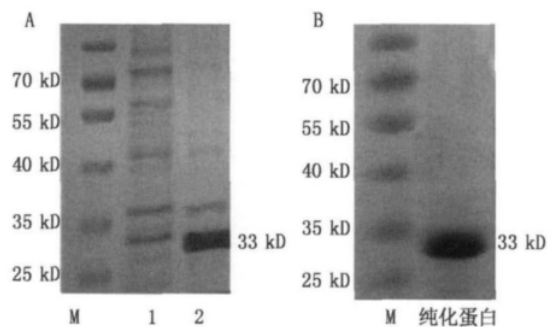
2 结果

2.1 MRJ 重组蛋白的诱导表达和纯化

MRJ 重组蛋白的诱导表达:复苏 pET28a-mrj 转 Rosetta 菌种,培养 12 h 后,按 1:50 转瓶,于 37 $^{\circ}$ C, IPTG 浓度 5×10^{-4} mol/L,诱导 8 h 收集菌液,超声破碎,并用考马斯亮蓝染色进行表达检测,检测结果可

见有目的蛋白表达,大小为 33 kD(图 1 A)。

MRJ 重组蛋白的大量诱导表达和纯化:复苏 pET28a-mrj 转 Rosetta 菌种,培养 12 h 后,按 1:50 转瓶,于 37 $^{\circ}$ C, IPTG 浓度 5×10^{-4} mol/L,大量诱导 200 mL 菌液,诱导 8 h 后收集菌液,超声裂解后将所得 MRJ 重组蛋白过 Ni-IDA 凝胶柱亲和纯化,考马斯亮蓝染色后检测结果,杂带基本去除,目的蛋白纯度高于 90%(图 1 B),可作为抗原用于单克隆抗体制备。



A: MRJ 重组蛋白的表达检测; M: SM0671 蛋白分子量标准; 1: pET28a-mrj 转化的 Rosetta 诱导前总蛋白; 2: pET28a-mrj 转 Rosetta 菌 IPTG 诱导后总蛋白; B: MRJ 重组蛋白纯化结果

A: Identification of MRJ fusion protein expression; M: SM0671 standard protein molecular weight marker; 1: Total protein of pET28a-mrj in Rosetta before induction; 2: Total protein of pET28a-mrj in Rosetta after IPTG induction; B: Purified MRJ fusion protein.

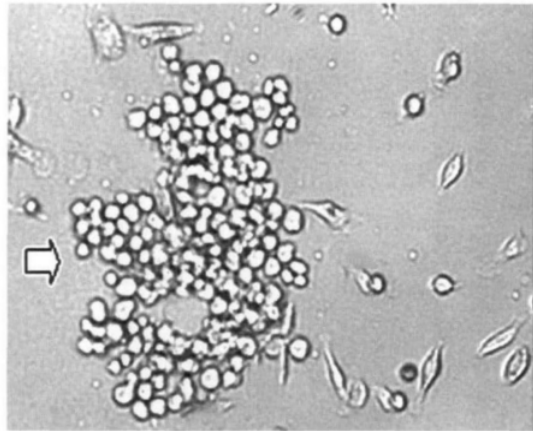
图 1 pET28a-mrj 重组蛋白纯化的表达和纯化

Fig. 1 The expression and purification of pET28a-mrj in Rosetta

2.2 杂交瘤细胞的筛选与克隆

细胞融合后,培养于添加了 HAT 的选择培养基的 96 孔板中,培养一天后半定量换液,培养基更换时应注意轻缓,第 5 天能在显微镜下看到明显的杂交瘤细胞克隆(图 2),第 7 天左右,杂交瘤细胞能长至铺满孔底约 1/10。此时进行 ELISA 检测养心细胞孔。取细胞培养上清对 MRJ 融合蛋白进行间接 Elisa 检测,筛选出能分泌抗体的杂交瘤细胞孔,有限稀释法对阳性孔进行亚克隆,经过 3 次亚克隆后,获得了能够稳定分泌抗 MRJ 融合蛋白单克隆抗体的细胞株。对杂交瘤细胞株按从 96 孔板-24 孔板-10 cm 培养皿的顺序扩大培养,部分细胞用于腹水制备单抗,部分细胞冻存备用。

2.3 单抗效价的检测



图中箭头所指示为杂交瘤细胞集落,其余形态细胞为饲养层细胞

Shown by the arrow in the figure are hybridoma cell colony, the rest of the cells are feed layer

图 2 杂交瘤细胞的筛选与克隆形成

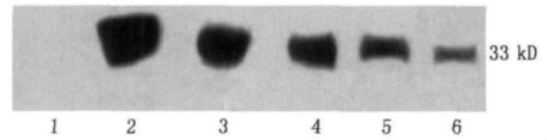
Fig. 2 Hybridoma screening and clone formation

以果蝇 MRJ 重组蛋白为抗原,SP2/0 细胞培养上清和空白孔作为阴性对照,间接 Elisa 法检测 MRJ 单抗腹水效价可达 1.0×10^5 (表 1)。以重组蛋白为抗原对腹水的效价进行 Western Blot 鉴定,腹水稀释梯度分别为 1:500 到 1:5 000,Western blot 检测结果显示效价可达 1:5 000,但在稀释比列为 1:1 000 和 1:2 000 效果较好(图 3)。

表 1 杂交瘤培养上清和腹水中抗 MRJ 单抗效价检测

Tab. 1 Titers of anti-*mrj* in the supernatants and ascites of Hybridoma cultures

	OD 值(490 nm)	OD value(490 nm)	
	稀 释 倍 数	MRJ 杂交瘤细胞株	SP2/0
	Dilution	MRJ Hybridoma cultures	
细胞培养上清	1:10	2.012	0.018
Supernatants	1:10 ²	0.971	0.014
	1:10 ³	0.320	0.009
腹水	1:10	2.104	0.072
	1:10 ²	1.893	0.047
	1:10 ³	1.742	0.028
	1:10 ⁴	0.832	0.008
	1:10 ⁵	0.620	0.005
	1:10 ⁶	0.276	0.003



抗体稀释倍数依次为: 1: 空白对照; 2: 腹水 1: 500; 3: 腹水 1: 1 000; 4: 腹水 1: 2 000; 5: 腹水 1: 3 000; 6: 腹水 1: 5 000

The detection of the antibody titers: 1: Control; 2: Ascites 1: 500; 3: Ascites 1: 1 000; 4: Ascites 1: 2 000; 5: Ascites 1: 3 000; 6: Ascites 1: 5 000

图 3 MRJ 单抗腹水效价 Western Blot 检测

Fig. 3 Western Blot identified of MRJ monoclonal antibodies

2.4 *mrj* 在果蝇品系中的表达检测

分别提取野生型果蝇 R6 品系和 *mrj* 的 p 因子插入突变品系 15059 总蛋白,以制备的 MRJ 抗体对 MRJ 的表达量进行 Western Blot 检测。结果显示野生型果蝇 R6 成体组织中 MRJ 蛋白(大小为 28 kd)的表达明显,p 因子插入突变品系 15059 的 MRJ 蛋白表达量很少(图 4)。

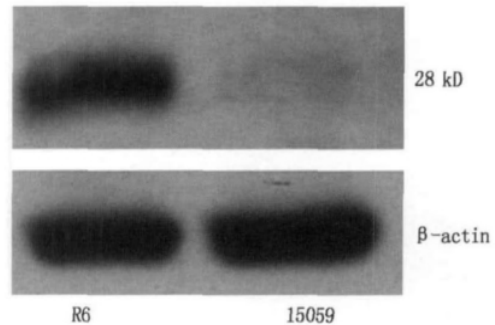


图 4 *mrj* 在果蝇品系中的表达 Western Blot 检测

Fig. 4 Western Blot analysis of *mrj* expression in *Drosophila Melanogaster*

3 讨论

小鼠骨髓瘤细胞 SP20 能在体内外培养并无限增殖,而免疫后的小鼠脾细胞具有分泌抗体的能力,但脾细胞是原代细胞,在体外只能短期培养。采用融合剂聚乙二醇(PEG)将这两种细胞融合成杂交瘤细胞,细胞融合后使用 HAT(H-次黄嘌呤、A-氨基喋呤、T-胸腺嘧啶)选择系统培养筛选,只有杂交瘤细胞存活下来,并且这种细胞能无限增殖,又能产生特异性的抗体。经过亚克隆后获得单克隆细胞系,该单克

隆细胞系能产生大量单一的高纯度抗体,即单克隆抗体。单克隆抗体制备过程中最关键的步骤是细胞融合,影响细胞融合的因素有很多:包括参与融合的细胞状态、细胞融合时水浴温度和时间、融合后细胞密度和人为操作等^[11]。细胞融合后培养箱的温度和二氧化碳浓度对杂交瘤细胞生长生长具有直接的影响,二氧化碳浓度过高可直接导致杂交瘤细胞凋亡。

Wnt/ β -catenin 信号途径主要调控生物发育过程和细胞的稳定,由于其在复杂信号传导中的关键地位,Wnt/ β -catenin 对细胞增殖、迁移和分化及去分化都有很重要的影响^[12,13]。DKK1 (dickkopf 1 homologue) 是 Wnt/ β -catenin 信号途径的一个关键性抑制因子可介导细胞降解 β -catenin^[14]。有研究报道缺失 DNAJB6,能异常地激活 DKK1 的表达,这可能是导致细胞增殖,细胞间质转化和细胞迁移的一个原因^[15]。有关 *DnaJ* 蛋白在果蝇中的作用的研究还非常少,果蝇作为一种经典的生物学研究模式动物,具有明显的优势:生命周期短、繁殖力强以及便于进行表型分析等。近年来果蝇被更广泛地应用于研究人类疾病发生的机制^[16]。目前关于果蝇 *mrj* 基因功能的报道只有一篇文献报道在视网膜神经细胞和其它神经细胞中,过表达 *mrj* 抑制多聚 Q 蛋白的毒性。而在多聚 Q 蛋白表达之前,过表达 dHDJ1,一种果蝇 J 蛋白表达抑制物,会显著地促进细胞间质的聚集^[7]。本研究通过杂交瘤技术制备了抗果蝇 MRJ 蛋白单克隆抗体可以为深入研究 *mrj* 在果蝇胚胎期的表达分布及其在血液发育过程中的作用提供条件。

参考文献

- [1] OHTSUKA K, HATA M. Mammalian HSP40/DNAJ homologs: cloning of novel cDNA and a proposal for their classification and nomenclature[J]. *Cell Stress Chaperones*, 2000, 5(2): 98-112.
- [2] SEKI N, HATTORI A, HAYASHI A, et al. Cloning, tissue expression, and chromosomal assignment of human MRJ gene for a member of the DNAJ protein family[J]. *J Hum Genet*, 1999, 44(3): 185-189.
- [3] WATSON E D, HUGHES M, SIMMONS D G, et al. Cell-cell adhesion defects in Mrj mutant trophoblast cells are associated with failure to pattern the chorion during early placental development[J]. *Dev Dyn*, 2011, 240(11): 2505-2519.
- [4] NANDURI J, YUAN G, KUMAR G K, et al. Transcriptional responses to intermittent hypoxia[J]. *Respir Physiol Neurobiol*, 2008, 164(1-2): 277-281.
- [5] HUNTER P J, SWANSON B J, HAENDEL M A, et al. Mrj encodes a DnaJ-related co-chaperone that is essential for murine placental development [J]. *Development*, 1999, 126(6): 1247-1258.
- [6] CHUANG J Z, ZHOU H, ZHU M, et al. Characterization of a brain-enriched chaperone, MRJ, that inhibits Hunting-tin aggregation and toxicity independently[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(22): 19831-19838.
- [7] FAYAZI Z, GHOSH S, MARION S, et al. A Drosophila ortholog of the human MRJ modulates poly-glutamine toxicity and aggregation[J]. *Neurobiol Dis*, 2006, 24(2): 226-244.
- [7] IZAWA I, NISHIZAWA M, OHTAKARA K, et al. Identification of Mrj, a DnaJ/Hsp 40 family protein, as a keratin8/18 filament regulatory protein[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(44): 34521-34527.
- [8] DAI Y S, XU J, MOLKENTIN J D. The DnaJ-related factor Mrj interacts with nuclear factor of activated T cells c3 and mediates transcriptional repression through class II histone deacetylase recruitment[J]. *Mol Cell Biol*, 2005, 25(22): 9936-9948.
- [9] 雷旻音, 杨哲, 黄婷, 等. 果蝇血液发育标记基因 *mrj* 的多克隆抗体制备及检测[J]. *湖南师范大学自然科学学报*, 2012, 35(4): 55-58.
LEI Minyin, YANG Zhe, HUANG Ting, et al. Preparation and assay of polyclonal antibody of blood development marker gene *mrj* in *Drosophila melanogaster*[J]. *Journal of Natural Science of Hunan Normal University*, 2012, 35(4): 55-58.
- [10] 温新宇, 舒翠玲, 于鸣, 等. 抗人 CD38 单克隆抗体的制备、鉴定及其功能的初步研究[J]. *免疫学杂志*, 2003, 19(1): 69-74.
WEN Xinyu, SHU Cuiling, YU Ming, et al. Preparation characterization and function assay of monoclonal antibodies to human CD38[J]. *Immunological Journal*, 2003, 19(1): 69-74.
- [11] HUANG C L, LIU D, ISHIKAWA S, et al. Wnt1 overexpression promotes tumour progression in non-small cell lung cancer[J]. *Eur J Cancer*, 2008, 44(17): 2680-2688.
- [12] DIMEO T A, ANDERSON K, PHADKE P, et al. A novel lung metastasis signature links Wnt signaling with cancer cell self-renewal and epithelial-mesenchymal transition in basal-like breast cancer[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(13): 5364-5373.
- [13] FILLMORE R A, MITRA A, XI Y, et al. Nmi (N-Myc interactor) inhibits Wnt/ β -catenin signaling and retards tumor growth[J]. *Int J Cancer*, 2009, 125(3): 556-564.
- [14] MENEZES M E, MITRA A, SHEVDE L A, et al. DNAJB6 governs a novel regulatory loop determining Wnt/ β -catenin signalling activity[J]. *Biochem J*, 2012, 444(3): 573-580.
- [15] 万永奇, 谢维. 科学与人类疾病研究的重要模型——果蝇[J]. *生命科学*, 2006, 18(5): 425-429.
WAN Yongqi, XIE Wei. *Drosophila*: an important model organism for understanding basic biological and human disease mechanisms[J]. *Chinese Bulletin of life sciences*, 2006, 18(5): 425-429.