

分类号: _____ 密级: _____
UDC: _____ 编号: _____

学 位 论 文

玻连蛋白单克隆抗体的制备及在临床检测中的初步应用

Preparation of monoclonal antibody against vitronectin
and its primary application in clinical examination

张莉莉

指导教师姓名 刘莹 副研究员
安徽医科大学军事医学科学院放射与辐射医学研究所

申请学位级别 硕士 专业名称 病理学与病理生理学

提交论文日期 2015-03 论文答辩日期 2015-05

学位授予单位和日期 安徽医科大学 2015-06

答辩委员会主席 章金刚
评 阅 人 盲审

2015 年 05 月

安徽医科大学

ANHUI MEDICAL UNIVERSITY

硕士学位论文

**论文题目 玻连蛋白单克隆抗体的制备及在临床检测
中的初步应用**

**Preparation of monoclonal antibody against vitronectin and its
primary application in clinical examination**

作者姓名： 张莉莉

指导教师： 刘莹 副研究员

专业名称： 病理学与病理生理学

专业方向： 免疫病理学

论文工作时间： 2013年4月至2015年2月

学位论文独创性声明

本人所提交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确说明并表示谢意。

学位论文作者签名：张莉莉 日期：2015.5.18

学位论文使用授权声明

本人完全了解安徽医科大学有关保留、使用学位论文的规定：学校有权保留学位论文并向国家主管部门或其指定机构送交论文的电子版和纸质版，有权允许论文进入学校图书馆被查阅，有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索，有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。愿意将本人的学位论文提交《中国博士学位论文全文数据库》、《中国优秀硕士学位论文全文数据库》和《中国学位论文全文数据库》中全文发表，并可以以电子、网络及其他数字媒体形式公开出版，并同意编入CNKI《中国知识资源总库》，在《中国博硕士学位论文评价数据库》中使用和在互联网上传播。保密的学位论文在解密后适用本规定。

学位论文作者签名：张莉莉

导师签名：刘莹

日期：2015.5.18

日期：2015.5.18

目录

目录.....	1
英文缩略词表.....	2
中文摘要.....	4
英文摘要.....	6
1 引言.....	8
2 材料与方法.....	10
2.1 实验材料.....	10
2.2 实验方法.....	14
3 结果.....	24
3.1 His-VN 重组蛋白表达纯化结果	24
3.2 小鼠抗血清效价检测结果.....	25
3.3 杂交瘤细胞的生长情况.....	26
3.4 融合率及克隆化结果.....	27
3.5 Western blot 结果分析	28
3.6 抗体配对实验结果.....	29
3.7 ELISA 法检测不同肝病病人血清中的 VN.....	31
3.8 自制 VN mAb 与商品化 VN 检测试剂盒比较	32
4 讨论.....	33
5 结论.....	37
6 参考文献.....	37
附录.....	42
致谢.....	43
综述.....	44
参考文献.....	51

英文缩略词表 (Abbreviation)

英文缩写	英文全称	中文名称
AFP	α -fetoprotein	甲胎蛋白
AP	Ammonium persulfate	过硫酸铵
BCA	Bicinchoninic acid	二喹啉甲酸
BSA	Bovine serum albumin	牛血清蛋白
CHB	Chronic hepatitis B	慢性乙型肝炎
DMSO	Dimethyl sulfoxide	二甲基亚砷
CLU	Clusterin	丛生蛋白
ECL	Enhanced chemiluminescence	增强化学发光
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid	乙二胺四乙酸
HAMAs	Human anti-mouse antibodies	人抗鼠抗体
HAT	Hypoxanthine	次黄嘌呤
	Aminopterin	甲氨喋呤
	Thymidine	胸腺嘧啶核苷
HCC	Hepatocellular carcinoma	肝细胞肝癌
HRP	Horseradish peroxidase	辣根过氧化物酶
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside,	异丙基- β -D-硫代半
		乳糖苷
LC	Liver cirrhosis	肝硬化
mAb	Monoclonal antibody	单克隆抗体
OD	Optical density	光密度
PBS	Phosphate buffered saline	磷酸盐缓冲液

PEG	Polyethylene glycol	聚乙二醇
PVDF	Polyvinylidene fluoride	聚偏氟乙烯
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute-1640	洛斯维帕克纪念研究所-1640 培养基
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis	十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳
TBST	Tris buffered saline with Tween20	含有吐温 20 的 Tris 盐缓冲液
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine	四甲基二乙胺
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine	四甲基联苯胺
VN	Vitronectin	玻连蛋白

玻连蛋白单克隆抗体的制备及在临床检测中的初步应用

中文摘要

背景和目的: 肝细胞癌 (Hepatocellular carcinoma, HCC) 是我国最常见的恶性肿瘤之一。其早期诊断困难, 病程发展迅速, 目前尚没有有效的预防和治疗措施。因此, 寻找新的肝癌标志物分子, 开发临床检测用试剂, 将科研成果转化为临床产品, 具有重要的实际意义和应用价值。玻连蛋白 (Vitronectin, VN) 是在近些年的研究中发现的一种肝癌的潜在疾病标志物。研究表明其在肝癌进程的不同阶段, 表达水平有所不同。因此, 获得特异性针对 VN 的抗体, 对于深入研究 VN 与肝癌的关系, 了解其表达水平与疾病进程的关联性是十分必要的。目前, 国内尚没有针对 VN 蛋白的高质量的抗体和临床试剂盒。本研究拟开发具有自主知识产权的抗 VN 蛋白的单克隆抗体以及可配对抗体对, 并研发以夹心 ELISA 技术为基础的临床检测试剂盒原料。

方法: His-VN 重组蛋白在大肠杆菌中高效表达, 作为免疫原制备单抗。利用五周标准小鼠单抗制备佐剂免疫小鼠, 采用 ELISA 法初步筛选抗体, Western blot 对初步筛选得到的抗体进行特异性鉴定。用筛选得到的抗体对肝癌病人血清及正常人血清进行 ELISA 检测, 采取 ELISA 双抗夹心法和 ForteBio Octet Red 多通道生物分子相互作用系统筛选配对抗体, 并利用筛选出的抗体对正常人血清、乙肝病人血清及肝硬化病人血清临床样本进行检测。

结果:

1. 经过 ELISA 筛选得到 4 株针对 VN 的杂交瘤细胞株, 分别为 3D2, 4D11, 6G5 和 8D9。

2. 6G5 和 8D9 两株抗体可特异性识别肝癌病人血清中的 VN，并能够检测到肝癌病人血清中 VN 与正常人血清中 VN 的差异表达 ($P<0.05$)。
3. 6G5 和 8D9 两株杂交瘤细胞株经 ELISA 双抗夹心法和 Fortebio 法检测可成功配对。
4. 成功配对的两株杂交瘤细胞株 6G5 和 8D9 应用 ELISA 双抗夹心法检测正常人血清、乙肝病人血清及肝硬化病人血清，检测到 VN 差异表达 ($P<0.001$)。

结论：成功的制备出抗 VN 的单克隆抗体，筛选到的两株抗体可配对。筛选出的抗体可检测到正常人血清、乙肝病人血清、肝硬化病人血清及肝癌病人血清中 VN 差异表达，为进一步开发临床检测血清 VN 的肝癌预警试剂盒提供试剂和原料。

关键词：玻连蛋白 原核表达 单克隆抗体 ELISA 双抗夹心法 抗体配对

Preparation of monoclonal antibody against vitronectin and its primary application in clinical examination

Abstract

Background and Objective: Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the most common malignant cancers in China. Because of its difficulty in early stage diagnosis the rapid progress, there is no effective precaution and treatment measures for HCC. Therefore, it is of great significance to persue new molecular markers of liver cancer, develop clinical detection reagents and translate scientific research results into clinical products. Vitronectin as a potential disease marker of liver cancer was found in recent years. Research shows that the the expression level of VN is correlated with different stages of liver cancer, indicating that it is essential to study the relationship between VN and liver cancer exploiting highly specific antibodies against VN. Currently, there is no high quality antibodies and Clinical kit for VN protein. This study aims to develop proprietary VN monoclonal antibodies (mAbs), especially paired antibodies, and explore the possibility of providing the raw material for clinical diagnostic test kit based on sandwich ELISA.

Methods: His-VN recombinant protein highly expressed in *E. coli* was purified and immunized with ajuvant Quick Atibody-Mouse 5W into Balb/c mice for preparing monoclonal antibodies. Hybridoma cells were screened by ELISA and Western blot. The positive mAbs were further determined whether they could be match-paired utilizing sandwich ELISA assays of serum VN and recombinant VN, and Fortebio BLI assays of recombinant VN.

Results:

1. Four mAbs against VN were obtained by ELISA screening, named 3D2, 4D11, 6G5 and 8D9, respectively.
2. Two mAbs 6G5 and 8D9 can specifically recognize serum VN, and detected different expression level of VN in serum of patients with liver and the normal subjects ($P < 0.05$).
3. 6G5 and 8D9 mAbs were paired successfully by sandwich ELISA assay and Fortebio system screening.
4. When using paired 6G5 and 8D9 to test sera VN of normal individuals and patients with hepatitis and cirrhosis, dramatic difference ($P < 0.001$) were found between different liver diseases.

Conclusion: Four mAbs probing VN were successfully generated, among which 6G5 can pair with 8D9. Furthermore, different expression pattern of VN in various liver diseases were proved through sandwich ELISA assay with the matched pair of mAbs. The results suggested that our mAbs recognize VN with high specificity, which can be useful tools in clinical development of detection kit for early diagnosis of liver cancer.

Keywords: vitronectin/ Prokaryotic expression/ monoclonal antibody / sandwich ELISA/antibody pairs

玻连蛋白单克隆抗体的制备及在临床检测中的初步应用

1 引言

抗体(antibody)是指机体的免疫系统在抗原刺激下产生的、能够与相应抗原发生特异性结合的免疫球蛋白,通常由 B 淋巴细胞分化成的浆细胞所分泌。抗体在体内的分布非常广泛,除了存在于血清中以外,在组织液及外分泌液中也有抗体的存在。常规方法制备的血清抗体即多克隆抗体(polyclonal antibody)是针对多个不同抗原表位的混合物,在实际的科研工作中有着诸多不便。1975 年, Kohler 和 Milstein 首次利用杂交瘤技术成功制备了具有高特异性、理化性质均一的单克隆抗体^[1]。单克隆抗体的产生在一定程度上克服了多克隆抗体在实际应用过程中的不足,为抗体在生命科学中的应用做出了重大贡献。杂交瘤技术是将具有无限增殖能力的骨髓瘤细胞与特定抗原免疫的脾细胞二者合而为一,获得的杂交瘤细胞不仅可以分泌针对特定抗原的特异性抗体,而且可以在体外无限繁殖。即具有双亲细胞的特性。

近 40 年间单克隆抗体技术发展日渐成熟,其应用也从开始的基础研究逐渐发展为以治疗为主。通常情况下单克隆抗体多为鼠源性,也是最初被用于临床治疗的单克隆抗体。然而,鼠源性单抗用于治疗时常常被人体免疫系统识别产生人抗鼠抗体(human anti-mouse antibodies, HAMAs),抗体被快速清除而失去治疗作用甚至会引起过敏反应^[2,3],因此大大限制了单抗的实际应用。为了解决这一难题,嵌合型、人源化或全人化的单克隆抗体被研发出来。目前单克隆抗体被广泛用于蛋白结构与功能分析、免疫组化实验、蛋白芯片技术及药物研发等生物医药研究领域。临床上单抗被用于多种疾病的治疗,包括心血管疾病、恶性肿瘤、自身免疫性疾病及感染性疾病等^[2-6]。

肝细胞癌(Hepatocellular carcinoma, HCC)是我国最常见的恶性肿瘤之一。

其早期诊断困难，病程发展迅速，目前尚没有有效的预防和治疗措施。因此，寻找新的肝癌标志物分子，开发临床检测用试剂，将科研成果转化为临床产品，具有重要的实际意义和应用价值。玻连蛋白（Vitronectin, VN）是在近些年的研究中发现的一种肝癌的潜在疾病标志物。研究表明其在肝癌进程的不同阶段，表达水平有所不同^[7,8]。因此，获得特异性针对 VN 的抗体，对于深入研究 VN 与肝癌的关系，了解其表达水平与疾病进程的关联性是十分必要的。

玻连蛋白是一种具有重要功能的细胞外基质糖蛋白，最早于 1967 年被 Holmes 等人发现存在于血清中，当时被称为“alpha-one protein”^[9]。后来由于其具有促进细胞粘附与扩展的作用。所以被称为血清扩展因子^[10]。因其在结构上与 S 蛋白相似，故也曾被称为“S 蛋白”^[11]。1983 年作为 65kDa 和 75kDa 多肽混合物被 Hayman 等人发现并命名为“Vitronectin”，在非降解状态下，其 N 末端 65 000 片段通过二硫键与 C 末端 10 000 片段连接，因其与玻璃珠有高度亲和性以及有粘附细胞的特性，所以称为玻连蛋白^[12-13]。

玻连蛋白分布范围很广，不仅存在于细胞外基质，在血浆和血小板 α 颗粒中也有分布，在血浆或者血清中的含量为 200-400 μ g/ml^[14]。细胞外基质中的玻连蛋白与细胞膜上相应受体分子（主要是整合素（integrin）分子）结合后可发挥特定的生物学作用^[15]。在实体肿瘤中，VN 参与促进肿瘤及肿瘤相关细胞的迁移、增殖和形态变化^[16,17]。研究表明 VN 在肿瘤组织及正常组织中的差异表达使玻连蛋白可能成为新的诊断肿瘤的生物学标记^[7,8,18]。另外，有报道显示玻连蛋白与整合素 $\beta 3$ 表达下调与肝癌细胞凋亡前期反应关系紧密^[19]。因此获得具有较高特异性的 VN 单克隆抗体在对玻连蛋白的研究中显得尤为重要。

本研究中，我们通过原核表达系统重组表达了玻连蛋白，用纯化后的重组蛋白免疫 Balb/c 小鼠后，将 Sp2/0 骨髓瘤细胞与免疫小鼠脾细胞通过细胞融合，经过克隆化筛选获得的杂交瘤细胞株，并初步鉴定了抗体的特性。经过 ELISA 验证获得的抗体可识别 VN 蛋白在不同阶段肝病病人血清和正常人血清中的差异表达。本研究主要制备针对 VN 的高特异性单克隆抗体并进行临床样本检验，为玻连蛋白的进一步研究提供必要的工具。

2 材料与方法

2.1 实验材料

2.1.1 实验动物

Balb/c 小鼠（雌性，8~12 周）购自北京维通利华实验动物技术有限公司

2.1.2 细胞株

Sp2/0 小鼠骨髓瘤细胞株、大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞由本实验室保存

2.1.3 实验试剂及耗材

pET-28a-VN 重组质粒：与北京蛋白质组研究中心姜颖教授实验室联合制备

肝病病人及正常人血清：来自中国医学科学院肿瘤医院

预染标准蛋白分子量 Marker：北京中山金桥生物技术有限公司

五周标准小鼠单抗制备佐剂：北京康碧泉生物科技有限公司

PRIM1640 培养基：维森特生物技术有限公司

卡那霉素、注射用庆大霉素：哈药集团制药六厂

胎牛血清：美国 Hyclone 公司

聚乙二醇 (PEG)、HAT (50×)、HT (50×)、二甲基亚砷(DMSO)、四甲基联苯胺 (TMB)、乙二胺四乙酸二钠 (EDTA-2Na)、溴酚兰、十二烷基磺酸钠 (SDS)、丙烯酰胺、亚甲基双丙烯酰胺、过硫酸铵(AP)、甘氨酸、Tris-HCl、四甲基乙二胺 (TEMED)、胰蛋白酶、酵母提取物、琼脂粉、咪唑：美国 Sigma 公司

脱脂奶粉：美国 BD 公司

辣根过氧化物酶 (Horseradish peroxidase, HRP) 标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体：北京中山金桥生物技术有限公司

NaCl、KCl、KH₂PO₄、Na₂HPO₄·12H₂O、Na₂CO₃、NaHCO₃、NaN₃、吐温 20、醋酸钠、柠檬酸、双氧水、甘油、液体石蜡、浓盐酸、浓硫酸、β-巯基乙醇、甲醇、考马斯亮蓝 R250、冰醋酸：国药集团化学试剂有限公司

聚偏二氟乙烯膜 (polyvinylidene fluoride, PVDF)：Millipore

螺口细胞培养瓶 (25cm²、75cm²): NEST

离心管 (15ml、50ml): NEST

96 孔、24 孔、16 孔细胞培养板: NEST

细胞冻存管: 美国 Thermo 公司

VN 检测商品化试剂盒: 美国 Innovative Research 公司

IPTG、ECL 发光试剂盒: 美国 Thermo 公司

BCA 蛋白浓度测定试剂盒: 北京华兴博创生物技术中心

生理盐水、1ml、2ml 无菌注射器: 山东新华安得医疗用品有限公司

2.1.4 主要试剂配制

1) 磷酸盐缓冲液(PBS, 10×浓缩液): 250gNaCl, 6.25gKCl, 6.25gKH₂PO₄, 90.5g Na₂HPO₄·12H₂O,溶于 5L 超纯水中, 调整 pH 至 7.2。

2) 洗涤缓冲液: 0.2ml 吐温 20 加入到 1L 1×PBS 中。

3) 抗原包被缓冲液: 1.59gNa₂CO₃, 2.93gNaHCO₃,0.2gNaN₃ 溶于 1L 超纯水中, 调整 pH 至 9.6。

4) 封闭缓冲液 (ELISA): 5%脱脂奶粉 (5g 脱脂奶粉溶于 100ml 1×PBS), 封闭液现配现用。

5) 底物显色液的配制: A 液, 13.6g 醋酸钠,1.6g 柠檬酸,0.3ml 30%双氧水, 加至 500ml 超纯水中, 置于 4℃冰箱; B 液,0.2g 乙二胺四乙酸二钠,0.95g 柠檬酸,50ml 甘油,0.2g 四甲基联苯胺 (TMB) ,加至 500ml 超纯水中, 用棕色瓶保存于 4℃冰箱备用。

6) 终止液的配制: 取浓硫酸 27ml, 缓慢加入到 473ml 的超纯水中, 在滴加的过程中不能太快, 防止过热。

7) 液体培养基(LB):

胰化蛋白胨	10g
酵母提取物	5g
NaCl	10g

加入超纯水完全溶解, pH 调至 7.4, 定容至 1L, 经过高压灭菌后使用。

8) 固体培养基(LB): 在 LB 液体培养基中加入 15g 琼脂粉, 加入抗生素倒板。

- 9) 10%PRIM1640 完全培养基: PRIM1640 450ml
胎牛血清 56ml
庆大霉素 1ml
庆大霉素经 0.22 μ m 滤器后过滤使用。
- 10) 20%HAT 培养基: PRIM1640 400ml
胎牛血清 100ml
庆大霉素 1ml
HAT (50 \times) 干粉 1 瓶
庆大霉素经 0.22 μ m 滤器过滤后使用。
- 11) 20%HT 培养基: PRIM1640 400ml
胎牛血清 100ml
庆大霉素 1ml
HT (50 \times) 干粉 1 瓶
庆大霉素经 0.22 μ m 滤器过滤后使用。
- 12) 细胞冻存液: PRIM1640 60ml
DMSO 10ml
胎牛血清 30ml
配好后置于冰箱 4 $^{\circ}$ C 保存。
- 13) 1.5 mol/L Tris-HCl (PH8.8): 90.85g Tris-HCl 完全溶解于 400ml 左右的超纯水中, pH 值用浓盐酸调节至 8.8,定容到 500ml。
- 14) 1mol/L Tris-HCl (PH6.8):30.28g Tris-HCl 完全溶解于 400ml 左右的超纯水中, pH 值用浓盐酸调节至 6.8,定容到 500ml。
- 15) 30%聚烯丙酰胺: 58g 丙烯酰胺, 2g 亚甲基双丙烯酰胺完全溶解于 180ml 的超纯水中, 定容到 200ml。经滤纸过滤后放入广口瓶中, 于 4 $^{\circ}$ C 避光保存。
- 16) 10%SDS:5gSDS 加入到 40ml 的超纯水中至完全溶解后定容到 50ml。于室温保存。
- 17) 10%过硫酸铵: 1g 过硫酸铵于 10ml 的超纯水中完全溶解, 1ml 分装后置

4℃保存。

18) 10×电泳液: 120g Tris, 576g 甘氨酸, 20g SDS, 加入到 2L 超纯水中, 使用时稀释成 1×。即 10×电泳液 100ml, 加超纯水 900 ml。

19) 5×loading Buffer: 1ml 1M Tris-HCL (pH6.8), 10ml 甘油, 2ml 溴酚兰, 0.2ml β-巯基乙醇, 4ml SDS, 使用时稀释成 2×工作液。

20) 转膜缓冲液: 5.8g Tris, 2.9g 甘氨酸, 0.37g SDS 加入到 600ml 超纯水中充分溶解, 然后加 200ml 甲醇, 超纯水定容至 1000ml。

21) 染色液: 90ml 甲醇: 水 (1: 1) 和 10ml 冰醋酸的混合液中加入考马斯亮蓝 R250 0.25g。

22) 脱色液: 取 250ml 95%乙醇和 80ml 冰醋酸混匀, 超纯水定容至 1L。

23) 10×TBS: 24.23g Tris-HCl, 80.06g NaCl 溶于 800ml 超纯水中, 浓盐酸调 pH 至 7.5, 定容至 1L。

24) TBST: 0.5ml 吐温 20 加入到 1L 1×TBS 中。

25) Western Blot 封闭缓冲液: 5%脱脂奶粉 (5g 脱脂奶粉加入到 100ml 1×TBS 完全溶解), 封闭液现配现用。

2.1.5 主要仪器设备

- 1) CO₂ 培养箱 3111、酶联检测仪 Mk3: 美国 Thermo 公司
- 2) 超净工作台 DTY-1510: 北京德天佑科技发展有限公司
- 3) 低速台式离心机 RJ-TDL-5A: 无锡市瑞江分析仪器有限公司
- 4) 低温离心机 5810R: 德国 Eppendorf 公司
- 5) 电子天平 JM 5002: 余姚纪铭称重校验设备有限公司
- 6) 制冰机 FM70: 格兰特
- 7) 生物倒置相差显微镜 Coic XDS-1B: 重庆光电仪器有限公司
- 8) 恒温水浴锅 DHP-9082: 北京长安科学仪器厂
- 9) 洗板机 DEM-III: 北京拓普分析仪器有限公司
- 10) 4℃冰箱 BCD-236: 美菱
- 11) -20℃冰箱 BCD-257SLB: 海尔

- 12) -80℃超低温冰箱: Heto
- 13) 电泳仪 525BR、电泳槽 422 Electro-Eluter、半干转印仪 Trans-blot SD: 美国 Bio-Rad 公司
- 14) 凝胶成像仪 chemiscope2950Mini: 上海勤翔科学仪器有限公司
- 15) 纯水仪 cascada: 美国 PALL 公司
- 16) Ni-Sepharose™ 6 Fast Flow (17-5318-06) 、纯化仪 AKTA-PURE: 美国 GE 公司
- 17) 超声破碎仪 VCBOPB: 宁波新芝科技股份有限公司
- 18) 恒温培养箱 DHP-9082: 上海一恒实验仪器有限公司
- 19) 恒温震荡培养箱 THZ-C-1: 太仓市豪诚实验仪器制造有限公司
- 20) 恒温金属浴 H2O3-PRO: 金银杏生物科技有限公司
- 21) 脱色摇床 TS-2000A: 北京市新技术应用研究所
- 22) 液氮罐 741: 美国 Thermo 公司
- 23) 2.5μl、10μl、100μl、200μl、1000μl、12 道 300μl 微量加样枪: 德国 Eppendorf 公司
- 24) pH 计 PH211: iHANNA
- 25) 无菌眼科剪、弯头镊子、血球计数板: 山东新华安得医疗用品有限公司

2.2 实验方法

2.2.1 VN 蛋白的表达纯化

取 10μl pET-28a-VN 重组质粒导入到大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞中混合均匀, 放在冰上孵育 60min。将转入重组质粒的感受态细胞于 42℃ 热激 90 秒, 37℃ 孵育 30min,用三角玻璃棒涂布于含 50μg/ml 卡那霉素的 LB 平板上。平板倒放在 37℃ 恒温培养箱中, 培养至长出单克隆菌落。挑取单克隆菌落接种 LB 液体培养基中 (其中含有卡那霉素), 37℃ 震荡培养过夜。按照 1:100 的比例接种到 LB 液体培养基中, 放在 37℃ 恒温震荡培养箱中培养至对数生长期 ($A_{600} \approx 0.6$), 加入终浓度为 0.5 mmol/L 的异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (Isopropyl β-D-1-thio-galactopyranoside, IPTG) 37℃ 诱导培养 6h。4℃、10 000rpm 离心 10min 收集菌体, 用

PBS 洗涤两次后重悬菌体。冰上超声破碎，工作 4s，间隔 4s。离心分离上清和沉淀，上清经过 0.22 μ m 滤器过滤，然后通过镍柱 NiSepharoseTM 6 Fast Flow 进行亲和纯化，上清加 0.12ml 2M 咪唑溶液，样品的总体积为 10ml。1ml 镍琼脂糖凝胶 FF 预装柱，之后柱子用 10ml 平衡缓冲液（0.5M NaCl，20mM 咪唑，pH7.4）平衡，将 10ml 上清以流速约 0.5ml/min 上样，分管收集样品。然后用 15ml 平衡缓冲液洗柱并分管收集，洗去未结合到柱子上的蛋白。洗柱的流速可以稍快，流速约 1.5ml/min。接着用 5 ml 洗脱缓冲液（0.5M NaCl，500mM 咪唑，pH7.4）洗去吸附在柱子上的蛋白，分管收集，流速约 1.5ml/min。最后柱子用 5ml 平衡缓冲液平衡。纯化后的蛋白进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳（sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE）分析，并交由北京蛋白质组研究中心网络与信号转导实验室进行质谱鉴定，同时用 BCA 法测定蛋白浓度。

2.2.2 SDS-PAGE

1) 选择干净的玻璃板（一般选择 1.0mm 厚度），将玻璃板固定在灌胶支架上。固定玻璃板时，注意对齐、用力均匀且要防止漏胶。

2) 首先配制分离胶，为避免出现漏胶等情况，配胶时可以多配一块备用。取一干净的 50ml 离心管，12% 10ml 的分离胶按以下配方配制：

超纯水	3.3ml
30%聚烯丙酰胺	4.0ml
1.5 mol/L Tris-HCl (pH8.8)	2.5ml
10%SDS	100 μ l
10%过硫酸铵	100 μ l
TEMED	4 μ l

3) 分离胶配好混匀以后,用移液器快速加入玻璃胶板中，分离胶上层用超纯水封压，使胶的界限平整。室温放置 30min 左右，分离胶与水的界面出现一清楚的分界线，表明胶已凝结。

4) 将水倒出，准备好相应的梳子，配制浓缩胶，5% 3ml 的浓缩胶按以下配方配制：

超纯水	2.1ml
30%聚烯丙酰胺	0.5ml
1mol/L Tris-HCl (pH6.8)	0.38ml
10%SDS	30 μ l
10%过硫酸铵	30 μ l
TEMED	3 μ l

5) 配制好浓缩胶后, 用移液器快速将其注入胶板中, 并迅速插入梳子, 室温静置到胶凝固。在插入梳子的过程中小心平稳保证梳子底部水平并避免气泡。

6) 胶凝后小心将梳子拔出, 用流水将胶孔洗干净, 保证每个孔道没有堵塞。

7) 将配好的胶板放入电泳槽中固定, 内外槽中均加入 1 \times 电泳缓冲液。

8) 取 10 μ l 纯化的蛋白样品加入 2 μ l 5 \times loading buffer, 将样品于 100 $^{\circ}$ C 沸水中煮 5min, 12000rpm 离心 5 min, 取上清上样。

9) 用移液器取 10 μ l 样品加入胶板泳道中, 在空的泳道中加入 5 μ l~10 μ l 预染标准蛋白分子量 Marker。

10) 盖好盖子, 接通电源, 进行电泳, 电压在开始是设为 120V, 当进入分离胶后可以改为 160V, 在溴酚蓝指示剂接近凝胶底部边缘时, 停止电泳。

11) 电泳结束后, 用撬胶板撬开玻璃板, 将凝胶取出放入干净的培养皿中, 倒入考马斯亮蓝 R250 染色液, 染色 4h 左右。

12) 染色后用脱色液脱色过夜, 中间更换脱色液。脱色干净后对胶进行拍照分析。

2.2.3 BCA 法测定纯化蛋白的浓度

1) 原理: BCA 法是目前最常用的蛋白浓度检测方法之一。根据在碱性条件下, 蛋白可以将二价铜离子还原为一价铜离子, 一价铜离子与 BCA 试剂反应形成稳定的紫色复合物, 测定其在 562nm 处的吸收值, 根据吸光值结合标准曲线, 即可得到待测蛋白的浓度。与 Lowery 法相比, 此种方法灵敏度高, 方法简单且受干扰物质的影响较小。与 Bradford 法相比, 该方法具有不受去垢剂影响的优势。

2) 根据待测样品及标准品的数量, 配制适量工作液, BCA Reagent 和 Cu Reagent

体积比为 50:1，混合均匀后备用。

3) 标准蛋白溶液的配制：用超纯水对标准品作倍比稀释：先取 20 μ l 4000 μ g/ml BSA 与 30 μ l 超纯水混匀，BSA 浓度为 1600 μ g/ml，从中取出 25 μ l 作连续两倍倍比稀释。

4) 取一 96 孔酶标板，标准孔测定的加样量和比例方案如下：

编号	1	2	3	4	5	6	7	8
蛋白浓度 (μ g/ml)	0	25	50	100	200	400	800	1600
标准品体积 (μ l)	25	25	25	25	25	25	25	25
BCA 工作液 (μ l)	200	200	200	200	200	200	200	200

5) 样品孔处理：将样品用超纯水分别稀释 5 倍和 10 倍，加入 200 μ l BCA 工作液混匀，37 $^{\circ}$ C 孵育 30min。

6) 将酶标板放在酶标仪上，在 562nm 波长下测定吸光值。

7) 绘制标准曲线：X 轴为蛋白浓度 (μ g/ml)，Y 轴为对应 562nm 处的吸光值。根据标准曲线计算样品浓度，然后乘以稀释倍数（5 倍和 10 倍），就可以得到待测样品的实际浓度。两种稀释比例会有一定偏差，但一般不会太大。

2.2.4 杂交瘤细胞的制备

2.2.4.1 免疫

选取三只 8 周左右健康 Balb/c 雌性小鼠，免疫前采集少量尾血用作效价检测及筛选杂交瘤细胞时的阴性对照。His-VN 重组蛋白用生理盐水稀释，每只小鼠免疫抗原量为 20 μ g。充分混匀佐剂（采用五周标准小鼠单抗制备佐剂），无菌条件下取出与抗原等体积的佐剂迅速混匀，抗原与佐剂的混合过程应尽量快。混匀后抽入 1ml 无菌注射器中，尽快用于小鼠注射。用酒精棉球给小鼠后小腿部位消毒，通过后小腿肌肉注射免疫小鼠，每只小鼠的免疫剂量为 100 μ l。在第 21 天按照第一次免疫方案对小鼠加强免疫一针。第 35 天，用酒精棉球消毒小鼠尾部，剪断少许尾端，采集微量尾血采用 ELISA 法检测血清效价。若效价超过 1:25600，则在细胞融合前 3 天进行加强免疫，免疫所用抗原剂量减半，不使用佐剂，采取小鼠尾静脉

注射。加强免疫 3 天后取效价较高的小鼠脾细胞与生长达到对数期的 Sp2/0 小鼠骨髓瘤细胞进行细胞融合。

2.2.4.2 间接 ELISA 法检测 VN 重组蛋白免疫后小鼠血清效价

1) 纯化后的 His-VN 蛋白用包被液稀释至 $1\mu\text{g/ml}$ 的浓度, 取 $100\mu\text{l}$ 加入各孔中, 4°C 过夜。为了避免 His 标签抗体对筛选阳性克隆的影响, 同时选择 His-Clusterin (CLU) 重组蛋白包被检测板。

2) 用 PBST 洗涤酶标板 3 次, 拍干。

3) 各孔加入 $200\mu\text{l}$ 封闭液, 置 37°C 封闭 2h。

4) 用 PBST 洗涤酶标板 3 次, 拍干。

5) 将免疫小鼠的血清稀释 100 倍后做 4 倍的倍比稀释, 稀释的比例依次为 $1:100, 1:400, 1:1600, 1:6400, 1:25600, 1:102400$, 以每孔 $100\mu\text{l}$ 加入抗原包被的酶标检测板中, 37°C 孵育 30min。

6) 用 PBST 洗涤酶标板 3 次, 拍干。

7) HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 按照 $1:5000$ 稀释, 每孔加入 $100\mu\text{l}$, 37°C 孵育 30min。

8) 用 PBST 洗涤酶标板 3 次, 拍干。

9) 将显色液 A 液和 B 液按照 $1:1$ 的比例混合, 显色液现配现用。每孔加入 $80\mu\text{l}$, 室温反应 $5\sim 10\text{min}$ 。

10) 各孔加入 $80\mu\text{l}$ 2mol/l H_2SO_4 终止液终止反应。将酶标板置酶标仪中, 在 450nm 波长下读取各孔的 OD 值, 以与阴性对照孔 (正常鼠血清) OD 值的比值大于 2.1 为限, 作为判断效价的临界值。

2.2.4.3 饲养细胞的制备

在体外环境下培养细胞时, 如果细胞量很少则不易存活, 加入其它细胞有助于少量细胞在体外培养时的生长, 这种细胞即为饲养细胞。饲养细胞在做细胞融合制备杂交瘤细胞时是非常需要的, 本研究选取的为正常小鼠腹腔巨噬细胞。

1) 在做融合前一天, 取一只正常的 Balb/c 小鼠眼眶采血后拉颈脱臼处死, 将采集的血液离心, 分离得到的血清作为后续实验的阴性对照。小鼠放在装有 75%

酒精的容器中浸泡 3~5min。

2) 小鼠移入超净工作台内, 固定四肢使其腹部朝上置于已消毒的塑料泡沫板上。

用消毒后的弯头镊子夹起小鼠腹部皮肤, 用无菌剪刀小心地剪一小口, 然后用镊子夹住两侧皮肤朝头尾两侧稍用力拉扯, 将小鼠腹膜尽量完全暴露出来。在腹膜上倒少量 75%酒精消毒。注意在剪小鼠腹部皮肤时, 防止将腹膜剪破, 避免腹腔内液体流出造成污染。

3) 根据融合所铺的板数计算 RPMI1640 基础培养基的用量, 吸取所需体积的培养基放在无菌离心管中。用 2ml 无菌注射器吸满 RPMI1640 基础培养基, 用无菌镊子夹起腹膜, 将培养基加入小鼠腹腔, 注射器重复抽吸 2~3 次, 随后将液体抽回, 放入无菌离心管中。此操作可以重复 2~3 次。

4) 每孔加入 100 μ l 至 96 孔细胞培养板中, 放于 CO₂ 培养箱中备用。在操作过程中注意防止污染, 同时观察饲养细胞的生长状态。

2.2.4.4 Sp2/0 小鼠骨髓瘤细胞的培养

细胞融合前 10 天左右, 复苏两支冻存的 Sp2/0, 放于 25cm² 细胞培养瓶中用 10% RPMI1640 培养基于 CO₂ 培养箱中培养, 注意细胞的生长情况。生长状态好的 Sp2/0 圆而透亮, 折光性强呈半贴壁生长。细胞复苏第二天换液, 根据细胞生长情况传代培养。在做细胞融合之前, 取 3 大瓶 (75cm² 细胞培养瓶) 对数生长期且状态良好的 Sp2/0, 用弯头玻璃管小心将其完全吹下收集到 50ml 离心管中, 1500rpm 离心 7min, 倒去上清, 加入 30ml RPMI1640 基础培养基制成细胞悬液并计数。

2.2.4.5 小鼠脾细胞的制备

根据免疫小鼠血清效价检测结果, 选择一只效价高的小鼠加强免疫后, 取加强免疫小鼠, 眼眶采血收集血清作为检测用阳性对照。小鼠脱颈处死后置于 75%酒精的容器中浸泡 3~5min, 在超净工作台中, 无菌条件下取出小鼠脾脏, 用 RPMI1640 基础培养基冲洗两遍脾脏, 然后放在盛有灭菌筛网的培养皿中, 加入 10ml 左右的 RPMI1640 基础培养基, 用研磨棒以顺时针方向小心将脾脏磨成单细胞悬液, 在研磨时用力小心均匀, 避免弄破细胞。然后将脾细胞悬液转至 50ml 离

心管中，吸去新的培养基冲洗培养皿并将液体转入离心管。1500rpm 离心 7min，倒去上清，加入 30mlRPMI1640 基础培养基重悬细胞，并计数。

2.2.4.6 细胞融合及培养

取 2×10^7 个 Sp2/0 细胞与 1×10^8 个脾细胞以 1:5 的比例混合，1500rpm 离心 7min，弃去上清。取一干净杯子加入 37℃温水，将离心后的细胞块轻轻地弹成糊状，离心管置于 37℃水浴。1mlPEG 融合剂在 1min 之内加入，在加入的同时缓慢搅拌细胞，使得细胞与融合剂混合均匀增加融合效率。加完融合剂等待反应 45sec，然后依次在 1min 内加入 1ml、2 min 内加入 5ml、2 min 内加入 10ml、2 分钟内加入 10ml 的 RPMI1640 基础培养基，以终止融合剂的作用。之后以 500rpm 离心 7min。

弃去上清，根据所铺板数加入所需体积的 20%HAT 培养基重悬细胞，混匀后以每孔 100 μ l 滴加到前一天铺好饲养细胞的培养板中，放于 CO₂ 培养箱中培养。融合后的第二天开始观察细胞，包括细胞状态、杂交瘤细胞的个数、是否有污染等。分别在培养的第 5 天，第 7 天和第 9 天用 20%HAT 培养基换液，第 10 天更换 20%HT 培养基。第 20 天更换 10% RPMI1640 完全培养。

2.2.4.7 杂交瘤细胞的筛选

通过倒置显微镜观察杂交瘤细胞的生长，细胞团长到视野的三分之一左右，细胞培养液颜色开始变黄，即可开始进行筛选工作。一般情况下选择融合后第 11 天采用间接 ELISA 筛选抗体，检测前 1 天细胞换液以提高检测的特异度。如果细胞数量较少时可以换液两天后检测便于抗体的积累。收集杂交瘤细胞上清不经稀释作为检测所用的一抗。间接 ELISA 检测方法同小鼠血清效价检测，具体步骤如下：

1) 重组 VN 蛋白用包被液稀释至 1 μ g/ml，每孔 100 μ l 加入酶标检测板中，4℃过夜，PBST 洗 3 次，拍干。

2) 每孔加入 200 μ l 封闭液，37℃孵育 2h，PBST 洗 3 次，拍干。

3) 将细胞上清 100 μ l/孔加入包被有抗原的检测板中。每块检测板的最后两孔作为对照，融合小鼠血清为阳性对照，正常小鼠血清为阴性对照，阳性对照血清用封闭液稀释 1:1000，每孔加入 100 μ l。置 37℃孵育 30min，PBST 洗 3 次，拍干。

4) 酶标二抗 1:5000 稀释，每孔加入 100 μ l，37℃孵育 30min。PBST 洗 3 次，

拍干。

5) 加入显色液显色 5~10min, 终止液终止反应。于 450nm 波长下读取 OD 值, 以大于阴性对照 OD 值 2.1 倍作为判断阳性的临界值。

2.2.4.8 杂交瘤细胞的克隆化及克隆化筛选

经过第一次 ELISA 筛选得到的阳性孔所分泌的抗体, 可能不是由同一个杂交瘤细胞分化的后代所分泌的。因此要获得分泌单一抗体的杂交瘤细胞株, 应当对阳性孔中的细胞进行克隆化。一般对细胞进行 2~3 克隆化培养, 细胞分泌抗体的能力得以稳定。克隆化的方法有多种, 本研究选择的方法为有限稀释法。克隆化细胞的筛选同样采用 ELISA 方法。在做克隆化培养的过程中及时冻存细胞, 避免细胞培养过程中出现污染、阳性克隆转阴等。

1) 有限稀释法: 将阳性孔细胞吹下, 计数。取 300 个细胞放入有 6ml 培养基的 15ml 离心管中混匀。将 96 孔细胞培养板按纵排分成 4 组, 第一组加入 100 μ l/孔, 然后离心管中培养基补全至 6ml, 混匀后加入第二组中, 按照此方法依次加入第三组和第四组。如此每组各孔分别为 5,3,1.8,1.08 个细胞。注意在克隆化之前培养板中加入饲养细胞, 对杂交瘤细胞的生长非常有帮助。

2) 细胞冻存: 将所需冻存的细胞扩大培养至一定的细胞数 (2×10^7 /ml), 选择生长状态良好的细胞吹下, 1500rpm 离心 3min, 倒干净上清。用冻存液将细胞重悬, 以 $1.5-2 \times 10^7$ /ml 加入到无菌冻存管中, 冻存管放入冻存盒中置 -80 $^{\circ}$ C 冰箱 24h, 第二天转入液氮罐中保存。

2.2.5 抗 VN mAb 的 Western blot 检测

经过克隆化选择能够稳定分泌抗体的杂交瘤细胞, 细胞培养到一定数目, 收集上清 (约 5ml) 作为一抗进行 Western blot 检测, 对抗体的特异性作初步鉴定并根据结果选择杂交瘤细胞株进行腹水诱生。实验中使用免疫小鼠血清作为阳性对照。

1) SDS-PAGE: 具体方法同重组蛋白表达纯化分析。

2) 电泳结束后分开玻璃板取出凝胶, 将梳齿等多余部分切除, 凝胶放入转膜缓冲液中平衡。

3) 取出与凝胶大小相同的 6 张滤纸和一张 PVDF 膜, 先放在甲醇溶液中浸泡

20 秒左右,然后将它们放入转膜缓冲液中平衡 3min。

4) 半干转印仪的阳极碳板上依次放置 3 层滤纸、PVDF 膜、凝胶、3 层滤纸,在进行每一步操作时用玻璃棒来回赶压去除气泡,拭去碳板上多余的液体,保证滤纸、凝胶及 PVDF 膜对齐,盖上阴极碳板。接通电源,恒压 22V,电转移 60min。

5) 转膜结束后,将 PVDF 膜放在加有 10ml 5%脱脂奶粉封闭液的塑料饭盒中,室温震荡孵育 1h, TBST 摇动洗 3 次,每次 10min。

6) 根据待检测细胞上清样品的多少,将 PVDF 膜切割相应的份数,然后将膜用笔做好标记置于塑料袋中,细胞上清分别加入到对应的塑料袋中。4℃过夜。

7) 次日将膜取出, TBST 摇动洗 3 次,每次 10min。

8) 加入酶标二抗(用封闭液按照 1:3000 稀释), 37℃孵育 1h。TBST 摇动洗 3 次,每次 10min。

9) 最后一次洗膜之前启动凝胶成像仪化学发光成像系统及连接的电脑,并打开凝胶图像采集分析处理软件。

10) 提前剪好合适大小的封口膜放于样品托盘上,将 PVDF 膜按顺序排列其上。配制 ECL 显色液(A 液和 B 液以体积比 1:1 混合),图像采集分析软件进行曝光采集图像。

2.2.6 腹水制备及纯化

根据 Western Blot 鉴定结果,选择分泌抗体特异性高且生长状态良好的杂交瘤细胞株进行腹水制备。

1) 注射杂交瘤细胞前 10 天,选择 8~10 周龄健康的雌性 Balb/c 小鼠,每只腹腔注射 500 μ l 液体石蜡致敏。

2) 离心收集杂交瘤细胞,用灭菌 PBS 将细胞洗两遍,取 1×10^6 左右的细胞用 500 μ l PBS 重悬注射于小鼠腹腔,七天后可见小鼠状态开始变差,腹腔肿大。

3) 注射细胞 10 天左右,用无菌注射器采集小鼠腹水,可以反复多次采集腹水至小鼠死亡。将收集到的腹水 4℃ 10 000rpm 离心 3min。离心后上清用饱和硫酸铵沉淀 2h, 4℃透析过夜,采用 AKTA-PURE 纯化系统对获得的腹水进行纯化。纯化后的抗体超滤浓缩进行 SDS-PAGE 分析。

2.2.7 筛选配对抗体

2.2.7.1 ELISA 双抗夹心法

纯化后的抗体采用 BCA 法测浓度后，一株抗体按 $1\mu\text{g/ml}$ 浓度包板，洗涤后加入不同浓度 ($25\mu\text{g/ml}$, $50\mu\text{g/ml}$, $100\mu\text{g/ml}$, $200\mu\text{g/ml}$, $400\mu\text{g/ml}$) 的重组蛋白 His-VN, $100\mu\text{l/孔}$ 。HRP 标记的另一株抗体进行梯度稀释 ($100\times$, $400\times$, $1600\times$, $6400\times$, $25600\times$) 后作为二抗加入 ELISA 检测板中。每个实验重复两次并进行反向验证。

2.2.7.2 Fortebio 系统筛选

纯化后的 8D9 抗体以 $20\mu\text{g/ml}$ 包被探针，PBS 清洗，His-VN 蛋白以 $20\mu\text{g/ml}$ 浓度结合，之后 PBS 清洗，用无关鼠抗 IgG $100\mu\text{g/ml}$ 封闭，PBS 清洗，再次用 8D9 包被，PBS 清洗后，探针与 6G5 孵育。将 8D9 和 6G5 顺序交换后反向检测。结果根据与阳性和阴性对照对比后的信号强弱进行判断。

2.2.8 ELISA 检测血清中 VN

1) 分别用肝癌病人血清及正常人血清包被于酶标检测板，每孔加入 $100\mu\text{l}$ ，纯化后的抗 VN mAb 以 200 倍稀释作为一抗加入到酶标检测板中，依次加入酶标二抗、显色液、终止液，读取 OD 值。

2) 用正常人血清、乙肝病人血清及肝硬化病人血清包板，每孔加入血清量为 $100\mu\text{l}$ ， 4°C 孵育过夜，洗涤后加入 HRP 标记的抗 VN mAb, $100\mu\text{l/孔}$ ， 37°C 孵育 30min，然后加入显色液、终止液，读取 OD 值。

2.2.9 与商品化 VN 检测试剂盒比较

实验分为三组进行，一组为商品化试剂盒检测，另两组分别用 HRP 标记的两株抗体代替试剂盒中二抗检测。

商品化 VN 检测试剂盒实验步骤如下：

1) 用 1ml 封闭液将标准品完全溶解，标准品浓度为 1000ng/ml 。然后用封闭液将标准品稀释到试剂盒工作浓度 40ng/ml 。

2) 每孔加入 $100\mu\text{l}$ 标准品、正常人血清及肝病病人血清样品，室温下以 300rpm 摇动孵育 30min，洗涤缓冲液洗 3 次。血清稀释比例稀释 1:50 000。

3) 一抗用封闭液溶解后，每孔加入 $100\mu\text{l}$ ，室温下以 300rpm 摇动孵育 30min，

洗涤缓冲液洗 3 次。

4) 加入 100 μ l 二抗, 室温下以 300rpm 摇动孵育 30min, 洗涤缓冲液洗 3 次。

5) 加入 TMB 显色液, 轻轻摇晃 5min, 待孔中变为蓝色, 反应结束后每孔加入 50 μ l 终止液终止反应。于 450nm 波长下读取 OD 值。

2.2.10 统计学处理 采用 GraphPad Prism 6 软件作图并分析数据, 组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示具有统计学意义。

3 结果

3.1 His-VN 重组蛋白表达纯化结果

SDS-PAGE 检测, 观察到含重组质粒 pET-28a-VN 的菌经 IPTG 诱导镍柱亲和纯化后, 在分子量 65 000~75 000 位置检测到纯化后的 His-VN 重组蛋白(图 1, 箭头所示)。蛋白条带清晰, 表明大部分杂蛋白被除去, 得到的 His-VN 重组蛋白纯度较高。出现的两个不同条带经质谱分析发现两者总离子流的特征几乎一样(图 2), 分子量较高的蛋白条带强度略微高一点, 推测两个条带都是同一个蛋白。分子量的差别可能是由于蛋白修饰、剪切等原因所致。

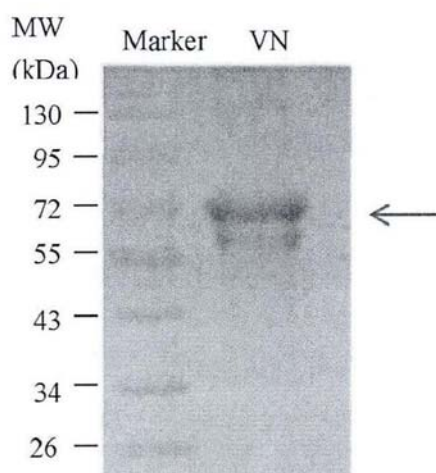
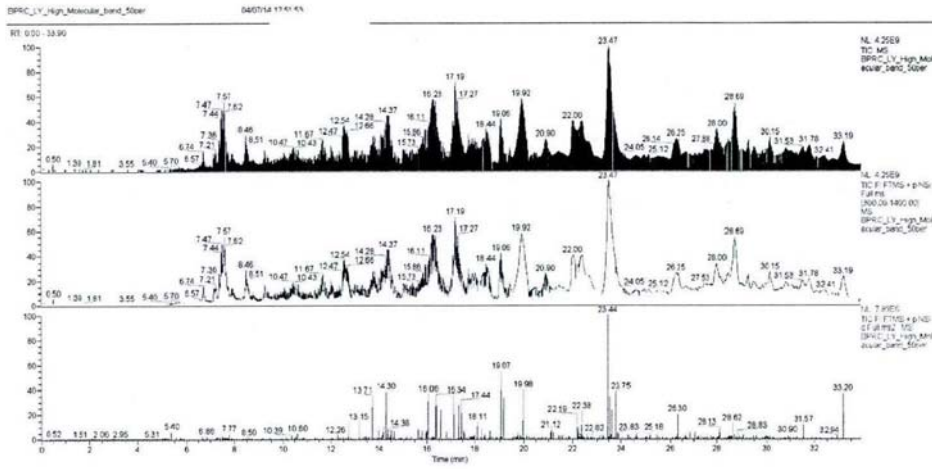
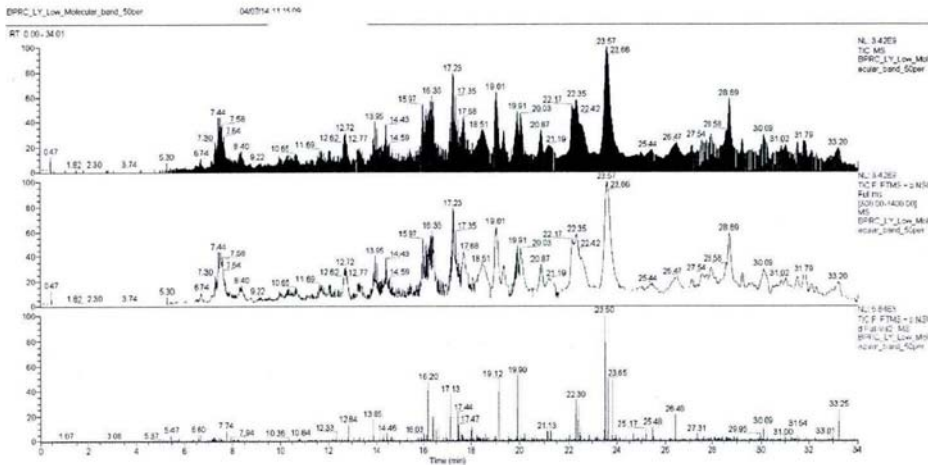


图 1 His-VN 重组蛋白的表达纯化

Fig.1 Expression and purification of His-VN recombinant protein



A



B

图 2 His-VN 重组蛋白质质谱分析

A: 分子量 72kDa 蛋白条带质谱分析 B: 分子量 65kDa 蛋白条带质谱分析

Fig.2 Mass Spectrometry for His-VN recombinant protein

A: Mass Spectrometry of 72kDa protein band B: Mass Spectrometry of 65kDa protein band

3.2 小鼠抗血清效价检测结果

根据佐剂说明书中推荐使用的抗原用量以 His-VN 重组蛋白为抗原，每只小鼠

免疫量为 20 μ g，免疫两次后取微量尾血采用间接 ELISA 法测效价。为了消除因 His 标签产生的抗体对效价判断的影响，同时选择了带有相同标签的无关重组蛋白 His- CLU 进行效价检测。选择 His- CLU 的另一个目的是观察 CLU 蛋白与 VN 产生的抗体是否有交叉反应，表 1 结果显示免疫小鼠血清针对 VN 的效价达到 10 万以上，可以用于细胞融合。CLU 蛋白与 VN 抗体无交叉反应，可用 His-CLU 重组蛋白筛选针对 His 标签的杂交瘤细胞株。

表 1 小鼠血清效价及交叉反应

Tab 1 Mouse serum titer determination and Cross-reaction

包被抗	血清稀释比例					阴性对照
	原	1:100	1: 6400	1:25600	1:102400	
His-VN	>2	1.532	0.860	0.261	0.101	0.030
His-CLU	>1	0.180	0.073	0.050	0.049	0.048

3.3 杂交瘤细胞的生长情况

细胞融合后观察细胞的生长情况，此时培养板中有未融合的小鼠脾细胞、未融合的 Sp2/0 小鼠骨髓瘤细胞以及小鼠腹腔巨噬细胞；融合的细胞中存在脾细胞与脾细胞的融合、Sp2/0 细胞与 Sp2/0 细胞之间的融合。脾细胞在体外不能传代，很快就会死亡，而 Sp2/0 细胞在 HAT 培养基中不能存活，故而培养数天以后只有脾细胞和 Sp2/0 细胞融合形成的杂交瘤细胞能够存活并传代。融合第 2 天通过倒置显微镜观察培养板中细胞有大有小，此时未融合的细胞还未完全死亡，视野中出现皱缩细胞、细胞碎片等。融合第 5 天观察融合的细胞聚集成小团，数量由几个到十几个不等，视野中出现大量黑色死细胞残余物，进行换液后视野变得稍清晰。融合第 7 天细胞团较之前增多，状态良好的杂交瘤细胞透亮、折光性强，细胞大小均匀，聚集成团紧密（如图 3 所示）。融合第 10 天，此时大部分融合细胞团已长至视野的三分之一左右，有的细胞团可能会稍小，杂交瘤细胞分泌抗体的能力与细胞生长的速度并不是成正比的，生长迅速的杂交瘤往往分泌抗体的能力弱或者不分泌抗体，相反生长稍缓的细胞团很可能分泌高特异性抗体。

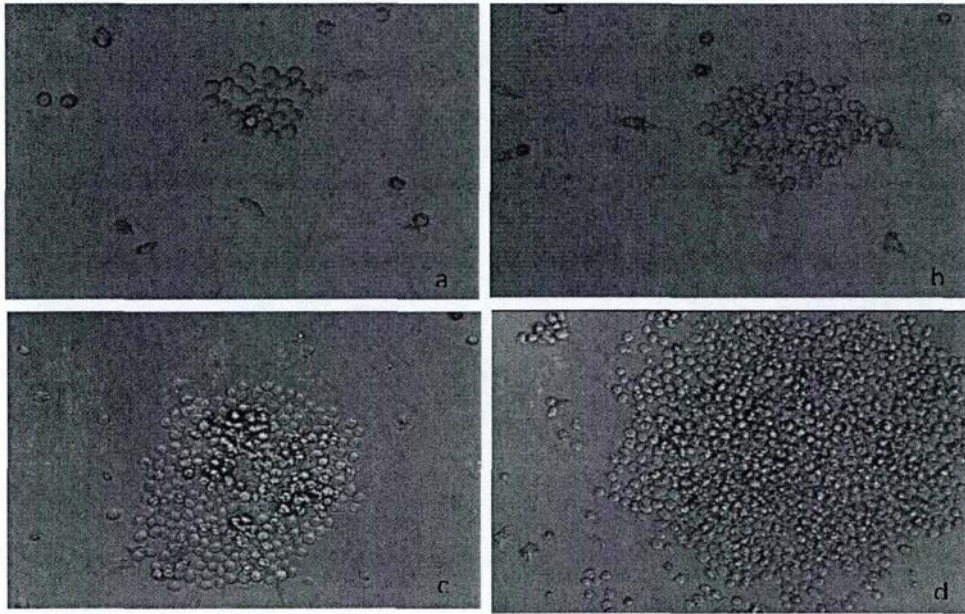


图 3 倒置显微镜下细胞融合后杂交瘤细胞生长情况 (40×)

a, b, c, d 分别为融合后第 5, 7, 9, 11 天杂交瘤细胞的生长情况

Fig 3 The growth state of hybridoma cells after cell fusion watched by inverted microscope

a, b, c, d: The fifth, seventh, ninth, eleventh day's of hybridoma cells after cell fusion

3.4 融合率及克隆化结果

经过对融合后第 7 天细胞的进行仔细观察, 记录每块板中融合细胞的个数, 6 块培养板中有细胞团生长的孔为 237 个, 融合率约为 42%。经过间接 ELISA 检测, 阳性孔为 30 个。第二天再次收集阳性孔上清进行 ELISA 检测, 并同时用 His-CLU 蛋白检测交叉反应, 结果如下 (表 2):

表 2 细胞融合初筛及交叉反应

Tab 2 The Preliminary screening of cell fusion and Cross-reaction

融合孔数	ELISA 初筛阳性孔数	ELISA 再次筛选阳性孔数	His-Clu 交叉反应
237	30	4	1

初步筛选得到的阳性细胞用有限稀释法进行克隆, 并将克隆剩余的细胞转 24 孔培养, 扩大培养至细胞量达到 $1.5-2 \times 10^7$ 及时冻存。第一次克隆的细胞在培养 11 天左右, 收集上清进行 ELISA 检测, 挑取细胞状态好、OD 值高的阳性单克隆再次克隆化, 确保筛选得到的杂交瘤细胞能够高效稳定的分泌特异性抗体 (表 3)。

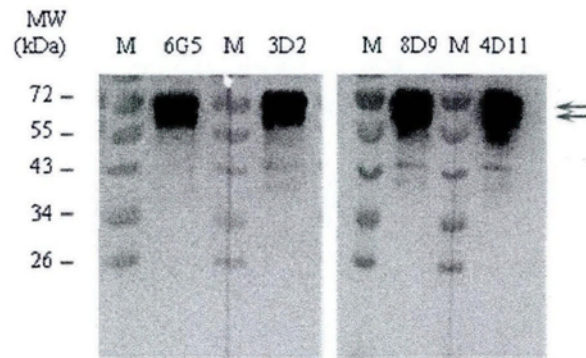
表 3 两次克隆化筛选结果

Tab 3 The results of two cloning screening

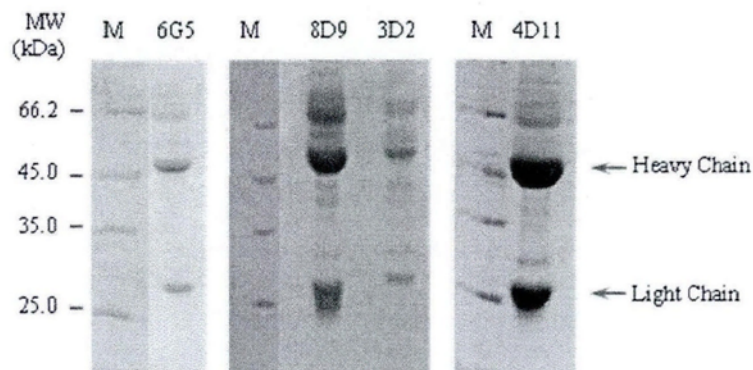
编号	第一次克隆孔数	阳性孔数	第二次克隆孔数	阳性孔数
3D2	96	35	96	83
4D11	96	50	96	85
6G5	96	94	96	94
8D9	96	94	96	94

3.5 Western blot 结果分析

经过两次 ELISA 筛选，得到四株杂交瘤细胞株 6G5，3D2，8D9 和 4D11。收集杂交瘤细胞的培养上清进行 Western blot 检测，结果显示四株均能检测到 His-VN 重组蛋白（图 4A）。四株杂交瘤细胞制备腹水，腹水经纯化后超滤浓缩，SDS-PAGE 结果显示腹水均得到有效浓缩（图 4B）



A



B

图 4 抗 VN 杂交瘤细胞上清用 VN 重组蛋白检测及纯化后腹水的 SDS-PAGE

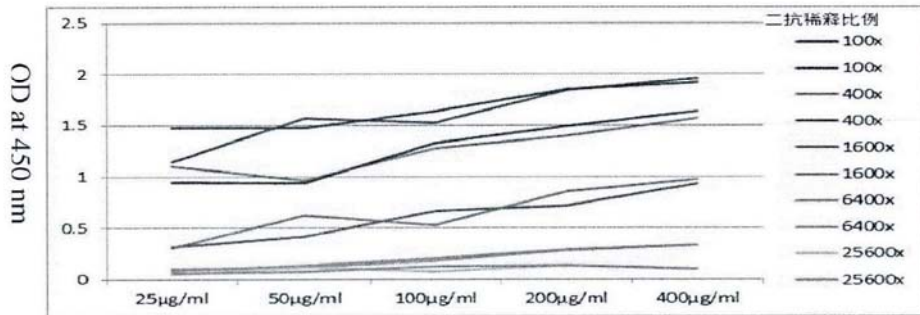
A: 用 VN 重组蛋白对抗 VN 杂交瘤细胞上清的检测 B: 纯化后的四株抗 VN 腹水用 SDS-PAGE 分析

Fig 4 Western-blot analysis of hybridoma supernatants with His-VN recombinant protein and SDS-PAGE analysis of purified ascites

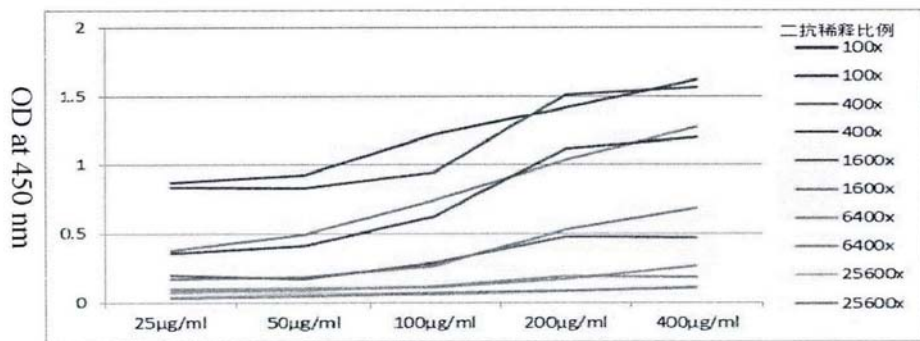
A: Detction of His-VN recombinant protein with hybridoma supernatants B: Analysis of purified ascites by SDS-PAGE

3.6 抗体配对实验结果

抗体的配对实验结果显示以 8D9 包板, 标记 HRP 的 6G5 作为二抗时, OD 值随着抗原浓度的增加而升高, 随着二抗的稀释而降低, 呈现较好地浓度依赖关系 (图 5A), 反之以 6G5 包板, 标记 HRP 的 8D9 作为二抗时, 结果相同 (图 5B)。结果表明两株抗 VN 的单克隆抗体 8D9 和 6G5 识别抗原 VN 的不同表位。



A



B

图 5 ELISA 双抗夹心法筛选配对抗体

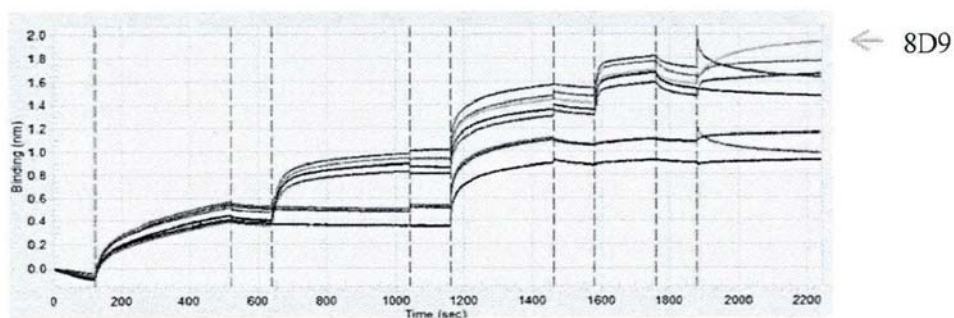
A: 8D9 包板, 6G5 HRP+作为二抗 B: 6G5 包板, 8D9 HRP+作为二抗

Fig 5 Screening of pairing antibody by double sandwich ELISA method

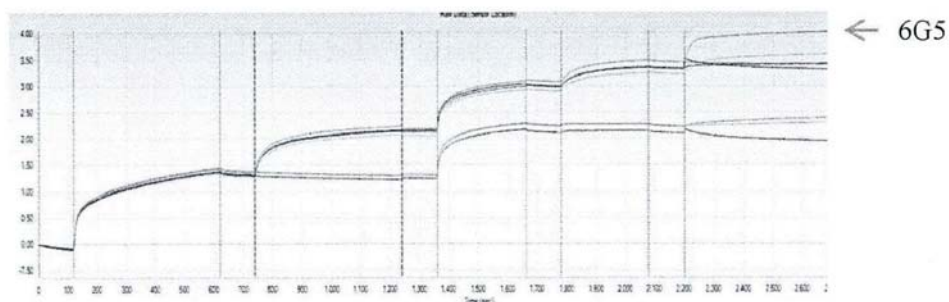
A: Plates coated with 8D9, followed by detection using HRP-conjugated 6G5 as secondary antibody

B: Plates coated with 6G5, followed by detection using HRP-conjugated 8D9 as secondary antibody

Fortebio 法实验结果显示用 8D9 包被探针，6G5 作为二抗检测时，出现强阳性信号（图 6A），反之，用 6G5 包被探针，8D9 作为二抗检测时，也出现强阳性信号（图 6B），结果表明两株抗体识别 VN 蛋白的不同表位，与 ELISA 筛选的结果一致。



A



B

图 6 Fortebio Octet 系统筛选配对抗体

A: 6G5 包被探针，8D9 作为第二种抗体检测 B: 8D9 包被探针，6G5 作为第二种抗体检测

Fig 6 Screening of pairing antibody using Fortebio Octet system

A: Probe coated with 6G5, 8D9 as the secondary antibody B: Probe coated with 8D9, 6G5 as the secondary antibody

3.7 ELISA 法检测不同肝病病人血清中的 VN

取 23 例肝癌病人血清及 23 例正常人血清包板, 分别用 HRP 标记的 6G5 和 8D9 两株抗体检测。经 ELISA 检测显示, 6G5 和 8D9 两株 VN mAb 对肝癌病人血清及正常人血清的识别具有统计学差异 (图 7), $P < 0.05$ 。

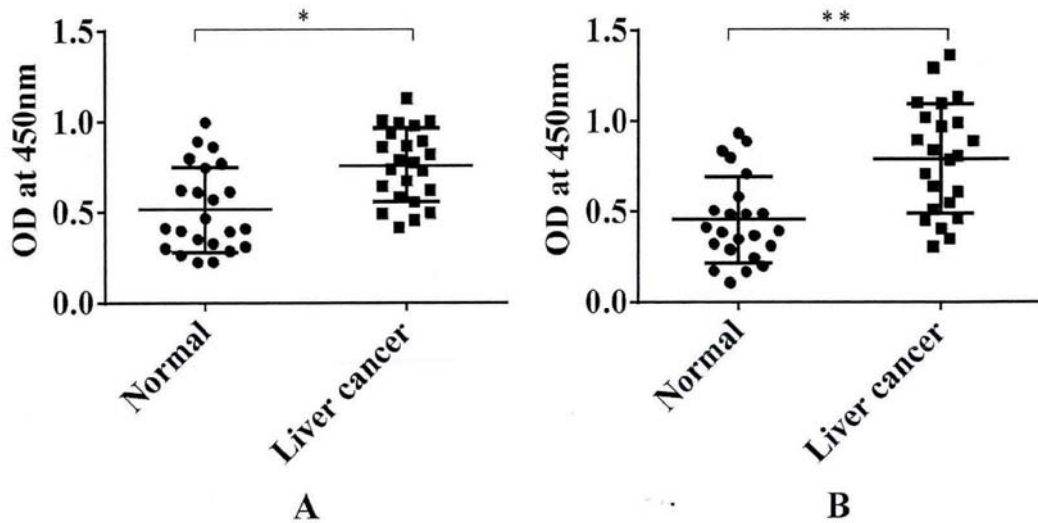


图 7 肝癌病人血清和正常人血清 ELISA 检测

A: 肝癌病人血清和正常人血清包板, HRP 标记的 6G5 检测

B: 肝癌病人血清和正常人血清包板, HRP 标记的 8D9 检测

Fig 7 Detection of VN in serum from patients with liver cancer and normal subjects by ELISA

A: Plates coated with serum from patients with liver cancer and normal subjects respectively, followed by detection using HRP-conjugated 6G5

B: Plates coated with serum from patients with liver cancer and normal subjects respectively, followed by detection using HRP-conjugated 8D9

取正常人血清、乙肝病人血清及肝硬化病人血清各 29 例包板，分别用 HRP 标记的 6G5 和 8D9 两株抗体检测。经 ELISA 检测显示，6G5 和 8D9 两株 VN mAb 对不同肝病病人血清及正常人血清的识别具有统计学差异（图 8）， $P < 0.001$ 。

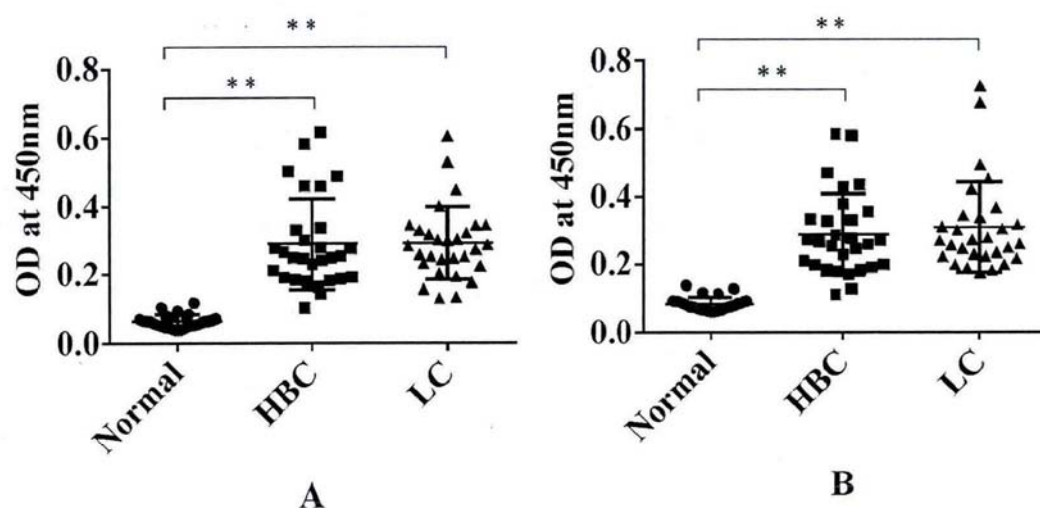


图 8 肝病病人血清和正常人血清 ELISA 检测

A: 肝病病人血清和正常人血清包板，HRP 标记的 6G5 检测

B: 肝病病人血清和正常人血清包板，HRP 标记的 8D9 检测

Fig 8 Detection of VN in serum from patients with liver cancer and normal subjects by ELISA

A: Plates coated with serum from patients with liver cancer and normal subjects respectively, followed by detection using HRP-conjugated 6G5

B: Plates coated with serum from patients with liver cancer and normal subjects respectively, followed by detection using HRP-conjugated 8D9

3.8 自制 VN mAb 与商品化 VN 检测试剂盒比较

随机选取正常人血清、乙肝病人血清、肝硬化病人血清及肝癌病人血清各 4 例，分别用商品化 VN 检测试剂盒、HRP 标记的两株单抗代替试剂盒中二抗进行检测，结果显示替代后抗体检测的整体 OD 值较试剂盒稍低。结果如下表（表 4）：

表 4 VN mAb 与商品化试剂盒比较
Tab 4 Comparison of VN mAb and commercial kits

	编号	商品化试剂盒	6G5 代替试剂盒中二抗	8D9 代替试剂盒中二抗
Normal	73	1.395	0.557	0.565
	75	1.289	0.624	0.267
	77	1.350	0.572	0.350
	79	1.427	0.643	0.479
CHB	1	2.489	0.718	1.064
	11	2.197	0.778	0.876
	21	2.253	0.876	0.954
	29	2.321	0.824	1.063
LC	31	2.200	0.892	0.874
	35	2.188	1.003	0.992
	37	2.235	1.017	0.963
	49	2.317	1.052	0.914
HCC	20	1.712	0.846	0.925
	30	1.766	0.792	0.819
	40	1.863	0.757	0.872
	50	1.969	0.833	0.883

4 讨论

通过杂交瘤细胞技术获得杂交瘤细胞株的报道始于 1975 年, 1986 年单克隆抗体首次报道用于临床实践中。到目前为止, 单克隆抗体已广泛用于疾病的检测和治疗, 包括肿瘤、移植排斥反应、自身免疫性疾病以及感染性疾病^[20-22]。单克隆抗体不论是在基础研究中还是在疾病的诊断与治疗方面, 其作用都是不可或缺的。

尽管新的单克隆抗体制备技术所制备的抗体优于传统杂交瘤技术制备的抗体,

更适用于临床应用。但是同样的，新的单抗制备技术要求较高的技术，更好的实验设备，资金投入大。而传统杂交瘤技术操作可行性强，实验所需硬件设施要求不高，资金投入相对较少，且制备的单克隆抗体在特异性和亲和力方面不输于新的抗体制备技术。因此，在体外诊断试剂盒的研发和蛋白质功能的研究中，杂交瘤依然是常用的单克隆抗体制备方法。

常规情况下选择天然蛋白作为单克隆抗体制备的免疫抗原，但由于天然蛋白表达量很低，且纯化困难。而重组蛋白表达量高，纯化方便。因此，在实际单抗制备时常选择重组蛋白作为免疫抗原。尽量使用纯度较高的抗原，因为抗原纯度高，抗原刺激小鼠产生抗体的能力越强，通过融合获得高特异性单抗的几率相应的也会增加。同时高纯度的抗原在抗体筛选时可以节省一定的工作量。为了得到高纯度的蛋白抗原，本研究选择 His 融合标签进行重组蛋白的表达。His 标签是目前蛋白表达中最常用的一种标签，其序列由 6 个组氨酸组成，分子小，蛋白纯化过程中基本不改变蛋白结构和溶解性，对蛋白的生物学活性几乎没有影响，并且使蛋白纯化极为方便。刘洋洋^[23]等在制备 S100A9 单克隆抗体中也选择了 His 标签用于蛋白的表达纯化，获得了纯度高、特异性强的重组蛋白。

目前用于单抗制备的实验动物主要有 Balb/c 小鼠和 Lou/c 大鼠，也有免疫兔子制备单抗的报道^[24,25]。主要是根据融合所用的骨髓瘤细胞的来源选择实验动物。大鼠虽然产生血清及腹水的量高于小鼠，但大鼠单抗制备比小鼠单抗制备困难。免疫兔子所需抗原量较大，受骨髓瘤细胞系的限制及制备成本高，实际应用并不广泛。本研究中选择单抗制备常用的 Balb/c 小鼠作为免疫动物，与小鼠骨髓瘤细胞系 Sp2/0 进行细胞融合。小鼠免疫是单抗制备过程中非常重要的步骤，好的免疫效果不仅血清效价高而且使得获得高特异性抗体的几率大大增加。常用免疫方案为使用弗氏佐剂，采用腹腔注射法免疫小鼠三次，每次可溶性抗原用量为 50 μ g~100 μ g，然后取血测效价，效价达到一万以上，加强免疫后进行细胞融合。本研究中采用五周快速小鼠单抗制备佐剂替代传统弗氏佐剂，所用免疫抗原量为 5 μ g~20 μ g，小鼠后小腿肌肉注射免疫小鼠两次，然后测小鼠血清效价，效价达到一万以上，加强免疫后进行细胞融合。与使用弗氏佐剂相比，新型免疫佐剂抗原用量

少、免疫频率低、操作简单且小鼠血清效价高。加强免疫选择尾静脉注射，使得抗原迅速达到脾脏。

融合之前保证 Sp2/0 骨髓瘤细胞达到对数期生长，细胞圆而亮，大小均一，透光性强。优质的骨髓瘤细胞是保证融合效率的关键，其次脾细胞与杂交瘤细胞的比例也在很大程度上影响融合率，根据以往的实验经验，本研究选择脾细胞与杂交瘤细胞比例 5:1，实验结果表明融合效率比较理想。融合过程是一个随机的过程，脾细胞和骨髓瘤细胞在融合剂的作用下，会出现几种不同的融合情况，包括脾细胞与脾细胞的融合、Sp2/0 与 Sp2/0 之间的融合和脾细胞与 Sp2/0 的融合。加入融合剂之前尽量弃去培养基，防止融合剂被稀释影响融合效率。轻弹离心管充分混匀脾细胞与骨髓瘤细胞，使得每个细胞都能接触到融合剂，也会提高融合的效果。融合剂会使细胞比较脆弱，因此加入融合剂的同时需要轻柔搅拌，以免细胞损坏。融合操作的每一步都在 37℃ 水浴的条件下进行，可以防止温度过低对细胞的损伤。

杂交瘤细胞的筛选方法有很多，包括酶联免疫吸附试验（ELISA）、免疫荧光技术、放射免疫法等。本研究中结合实验条件选择最常用的 ELISA 法。融合细胞筛选时，细胞培养上清中的抗体含量没有免疫鼠血清中的抗体含量丰富，在检测之前使抗体积累一定时间，然后收集上清检测。第一次筛选得到的阳性杂交瘤细胞，有可能来自两个或者数个杂交瘤细胞，因此融合阳性孔中杂交瘤细胞所分泌的抗体不是专一性的。若要获得绝对专一性的单克隆抗体，就要进行克隆化。另外，一开始筛选出的杂交瘤细胞分泌抗体的能力不稳定，在细胞培养过程中这种能力有可能丢失，而且融合阳性孔中有可能存在不分泌抗体的杂交瘤细胞，这种情况也需要对杂交瘤细胞克隆化。要获得能够稳定分泌抗体的杂交瘤细胞，一般要进行两到三次的克隆化，如果杂交瘤细胞分泌抗体的能力仍然不稳定，可以多次克隆化。克隆化指单个细胞通过扩大培养后所有细胞均分泌单一抗体。克隆化的方法包括有限稀释法、直接接种法、半固体琼脂法、显微操作法以及荧光细胞分离法等。本研究选择使用最广泛也是比较简单的有限稀释法进行克隆化。

单克隆抗体制备周期比较长，大约需要 3~6 个月的时间。整个过程中用到了生物化学与分子生物学和免疫检测的技术和方法。涉及免疫抗原的制备、实验动

物的免疫、效价检测、细胞融合、筛选、克隆化、抗体的鉴定、腹水制备等多个实验流程。实验的每一步都至关重要，无论哪里出现问题都将会影响单克隆抗体的成功制备。关于细胞融合，因为涉及到较长时间的细胞培养，实验过程中可能会出现污染的问题，细胞一旦出现污染将会影响到整个实验进展，给实验工作带来不必要的麻烦。为避免污染需要严格无菌操作，并且在培养基中加入抗生素，培养过程中及时冻存细胞保种。

玻连蛋白最早在血清中被发现，近年来对其研究越来越多。玻连蛋白在肝癌患者血清中高表达^[20]，肝细胞癌侵袭和转移过程中玻连蛋白表达持续性上调^[26]，但也有文献表明，侵袭性肝癌患者癌组织中玻连蛋白及其受体整合素表达明显下调^[27]。胰腺癌患者血清中玻连蛋白表达量升高^[28]；研究表明冠状动脉疾病患者血浆中玻连蛋白高表达并且与疾病程度相关^[29-31]；另外玻连蛋白在子宫内膜异位症患者血清中存在差异表达，提示其对内异症的早期诊断具有一定的临床意义^[30]；玻连蛋白在病变组织及正常组织中的表达差异使其成为一种潜在的诊断疾病的生物学标记^[17,33-34]；肝细胞玻连蛋白的表达与丙肝病毒感染铁超载导致的肝纤维化有关^[35]；玻连蛋白 N-糖基化聚糖特异位点的变化与肝细胞癌的发生有密切关系，使得玻连蛋白成为诊断肝细胞癌的重要聚糖标志^[36,37]。生物学标记物的鉴定在肝细胞癌的早期检测、治疗及提高病人生存率方面至关重要^[36]。目前，玻连蛋白的检测方法主要有 ELISA^[17,39]、Western Blot、免疫组织化学^[40,41]等技术，对于血清玻连蛋白的检测通常采用 ELISA 法。上述各种检测方法都依赖于针对玻连蛋白的特异性抗体。因此制备抗 VN 单克隆抗体及相应的以抗体配对 ELISA 技术为基础的临床检测具有重要的理论和应用价值。

本研究中通过细胞融合技术成功获得针对 VN 的 4 株杂交瘤细胞株，其中 8D9、6G5 两株经过 ELISA 双抗夹心法验证，成功配对。两株 VN mAb 对肝癌病人血清及正常人血清的识别具有统计学差异，与文献报道的肝癌患者血清中 VN 高表达相一致。分别用 HRP 标记两株抗体后检测不同阶段肝病病人血清及正常人血清，结果显示对 4 种血清的识别具有统计学差异，推测 VN 在肝病病人血清中的表达高于正常人血清。两株抗体与商品 VN 检测试剂盒的比较，所得出的数值稍低。

推测可能的原因为实验中包板所用一抗为试剂盒自带，与本研究中自制抗体可能存在空间位阻，以及自制抗体未能多次克隆有关。实验中存在的不足之处为由于实验条件及时间的限制，获得的特异性抗体株较少，用于检测的临床样本量也不多，应该扩大样本量进一步研究。配对 mAb 的成功制备，为以后 VN 蛋白功能研究和开发 VN 的临床检测试剂盒提供重要的基础。

5 结论

成功的制备出抗 VN 的单克隆抗体。制备出的两株杂交瘤细胞株配对成功。配对抗体检测正常人血清、乙肝病人血清、肝硬化病人血清及肝癌病人血清中 VN 差异表达，提示 VN 可能成为一种潜在的诊断肝病的生物学标记，本研究为开发检测 VN 预警肝癌的临床试剂盒提供了实验依据和原料抗体。

6 参考文献

1. Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity[J]. *Nature*, 1975, 256(5517):495-497.
2. Catapano AL, Papadopoulos N. The safety of therapeutic monoclonal antibodies: implications for cardiovascular disease and targeting the PCSK9 pathway[J]. *Atherosclerosis*, 2013, 228(1): 18-28.
3. Hull B. Aberrantly elevated TSH level due to human anti-mouse antibodies (HAMA) interference with thyrotropin assay[J]. *J S C Med Assoc*, 2012, 108(1): 12-13.
4. Fontanella C, Ongaro E, Bolzonello S, et al. Clinical advances in the development of novel VEGFR2 inhibitors[J]. *Ann Transl Med*, 2014, 2(12):123-133.
5. Beerli RR, Bauer M, Fritzer A, et al. Mining the human autoantibody repertoire: Isolation of potent IL17A-neutralizing monoclonal antibodies from a patient with thymoma[C]// *MAbs*, 2014, 6(6): 1608-1620.

6. Funakoshi T, Suzuki M, Tamura K. Infectious complications in cancer patients treated with anti-EGFR monoclonal antibodies cetuximab and panitumumab: A systematic review and meta-analysis[J]. *Cancer Treat Rev*, 2014, 40(10): 1221-1229.
7. Jaskiewicz K, Chasen MR, Robson SC. Differential expression of extracellular matrix proteins and integrins in hepatocellular carcinoma and chronic liver disease[J]. *Anticancer Res*, 1993, 13(6A): 2229-2237.
8. Edwards S, Lalor PF, Tuncer C, et al. Vitronectin in human hepatic tumours contributes to the recruitment of lymphocytes in an $\alpha v \beta 3$ -independent manner[J]. *Br J Cancer*, 2006, 95(11): 1545-1554.
9. Holmes R. Preparation from human serum of an alpha-one protein which induces the immediate growth of unadapted cells in vitro[J]. *J Cell Biol*, 1967, 32(2): 297-308.
10. Barnes D, Wolfe R, Serrero G, et al. Effects of a serum spreading factor on growth and morphology of cells in serum - free medium[J]. *J Supramol Struct*, 1980, 14(1): 47-63.
11. Barnes DW, Mousetis L, Amos B, et al. Glass-bead affinity chromatography of cell attachment and spreading-promoting factors of human serum[J]. *Anal Biochem*, 1984, 137(1): 196-204.
12. Tollefsen DM, Weigel CJ, Kabeer MH. The presence of methionine or threonine at position 381 in vitronectin is correlated with proteolytic cleavage at arginine 379[J]. *J Biol Chem*, 1990, 265(17): 9778-9781.
13. Hayman EG, Pierschbacher MD, Ohgren Y, et al. Serum spreading factor (vitronectin) is present at the cell surface and in tissues[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1983, 80(13): 4003-4007.
14. Bittorf SV, Williams EC, Mosher DF. Alteration of vitronectin. Characterization of changes induced by treatment with urea[J]. *J Biol Chem*, 1993, 268(33): 24838-24846.
15. Janik ME, Przybylo M, Pochee E, et al. Effect of $\alpha 3 \beta 1$ and $\alpha v \beta 3$ integrin

glycosylation on interaction of melanoma cells with vitronectin[J]. *Acta Biochim Pol*, 2010, 57(1): 55.

16. Heyman L, Kellouche S, Fernandes J, et al. Vitronectin and its receptors partly mediate adhesion of ovarian cancer cells to peritoneal mesothelium in vitro[J]. *Tumour Biol*, 2008, 29(4): 231-244.

17. Heyman L, Leroy - Dudal J, Fernandes J, et al. Mesothelial vitronectin stimulates migration of ovarian cancer cells[J]. *Cell Biol Int*, 2010, 34(5): 493-502.

18. Bloemendal HJ, de Boer HC, Koop EA, et al. Activated vitronectin as a target for anticancer therapy with human antibodies[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2004, 53(9): 799-808.

19. Wu Y, Zuo J, Ji G, et al. Proapoptotic function of integrin beta(3) in human hepatocellular carcinoma cells[J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(1): 60-9.

20. Hansel TT, Kropshofer H, Singer T, et al. The safety and side effects of monoclonal antibodies[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2010, 9(4): 325-338.

21. Gerber DE. Targeted therapies: a new generation of cancer treatments[J]. *Am Fam Physician*, 2008, 77(3): 311-319.

22. Drewe E, Powell RJ. Clinically useful monoclonal antibodies in treatment[J]. *Am J Clin Pathol*, 2002, 55(2): 81-85.

23. 刘洋洋, 李晓玲, 左威, 等. S100A9 蛋白单克隆抗体的制备及初步鉴定[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2014 (9): 956-959.

24. 倪庚, 沈金儿, 热米拉, 等. 抗 Crylc 蛋白兔单克隆抗体的制备和鉴定[J]. *中国食品学报*, 2012, 12(2): 131-136.

25. Yu MA, Cho JG, Kim KI, et al. Generation of Med28 Specific Monoclonal Antibodies[J]. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother*, 2015, 34(1): 30-35.

26. Chen RX, Song HY, Dong YY, et al. Dynamic Expression Patterns of Differential Proteins during Early Invasion of Hepatocellular Carcinoma[J]. *PloS one*, 2014, 9(3): e88543

27. Wu PP, Kuo SC, Huang WW, et al. (-)-Epigallocatechin Gallate Induced Apoptosis in Human Adrenal Cancer NCI-H295 Cells through Caspase-dependent and Caspase-independent Pathway[J]. *Anticancer Res*, 2009, 29(4): 1435-1442.
28. 周金桥, 刘秋红, 高景, 等. 胰腺癌血清差异蛋白表达谱[J]. *基础医学与临床*, 2012, 32(4): 433-436.
29. Ekmekci H, Ekmekci OB, Sonmez H, et al. Evaluation of fibronectin, vitronectin, and leptin levels in coronary artery disease: impacts on thrombosis and thrombolysis[J]. *Clin Appl Thromb Hemost*, 2005, 11(1): 63-70.
30. Ekmekçi ÖB, Ekmekçi H. Vitronectin in atherosclerotic disease[J]. *Clin Chim Acta*, 2006, 368(1): 77-83.
31. Ekmekçi H, Güngör ÖZ, Ekmekçi OB, et al. Significance of vitronectin and PAI-1 activity levels in carotid artery disease: comparison of symptomatic and asymptomatic patients[J]. *Minerva Med*, 2013, 104(2): 215-223.
32. 戴淑真, 刘海霞, 王斌, 等. 检测子宫内膜异位症患者血清中差异表达蛋白的研究[J]. *中国误诊学杂志*, 2006, 6(21): 4099-4101.
33. Ferrín G, Ranchal I, Llamozza C, et al. Identification of candidate biomarkers for hepatocellular carcinoma in plasma of HCV - infected cirrhotic patients by 2 - D DIGE[J]. *Liver Int*, 2014, 34(3): 438-446.
34. Lee JY, Kim JY, Park GW, et al. Targeted mass spectrometric approach for biomarker discovery and validation with nonglycosylated tryptic peptides from N-linked glycoproteins in human plasma[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2011, 10(12): M111.009290.
35. Montaldo C, Mattei S, Baiocchini A, et al. Spike - in SILAC proteomic approach reveals the vitronectin as an early molecular signature of liver fibrosis in Hepatitis C infections with hepatic iron overload[J]. *Proteomics*, 2014, 14(9):1107-1115.
36. Lee HJ, Cha HJ, Lim JS, et al. Abundance-ratio-based semiquantitative analysis

of site-specific N-linked glycopeptides present in the plasma of hepatocellular carcinoma patients[J]. *J Proteome Res*, 2014, 13(5): 2328-2338.

37. Lee HJ, Na K, Choi EY, et al. Simple method for quantitative analysis of N-linked glycoproteins in hepatocellular carcinoma specimens[J]. *J Proteome Res*. 2010,9(1):308-318.

38. Zhu W, Li W, Yang G, et al. Vitronectin silencing inhibits hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo[J]. *Future Oncology*, 2015, 11(2): 251-258.

39. Lee CC, Shyu KG, Lin S, et al. Cell adhesion regulates the plasminogen activator inhibitor-1 gene expression in anchorage-dependent cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 291(1): 185-190.

40. Ryschich E, Khamidjanov A, Kerkadze V, et al. Promotion of tumor cell migration by extracellular matrix proteins in human pancreatic cancer[J]. *Pancreas*, 2009, 38(7): 804-810.

41. Wasmuth S, Lueck K, Baehler H, et al. Increased vitronectin production by complement-stimulated human retinal pigment epithelial cells[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2009, 50(11): 5304-5309.

附录

个人简历

张莉莉，1987年11月出生，安徽宿州市萧县人

2007.9-2012.7 安徽医科大学临床医学专业

2012.9-至今 安徽医科大学攻读病理学与病理生理学硕士学位

攻读硕士期间发表论文及专利

1. 张莉莉, 郝露, 左威, 等. EN01 多克隆抗体的制备与初步鉴定[J]. 免疫学杂志, 2014, 30(7): 654-656.
2. Liu Y, Wang YD, Liu J, Zuo W, Hao L, Zhang LL, Zhen B. High throughput monoclonal antibody generation by immunizing multiple antigens[J]. Science China Life Sciences, 2014, 57(7): 710-717.
3. 张莉莉, 郝露, 左威, 等. Ras 相关 C3 肉毒毒素底物 1 (Rac1) 多克隆抗体的制备及应用[J]. 细胞与分子免疫学杂志. (已接收)
4. 刘莹, 刘静, 左威, 郝露, 张莉莉, 甄蓓. 多种抗原免疫高通量制备单克隆抗体及其杂交瘤细胞株的方法 专利申请号: 2013101528975

致谢

时间过的飞快，转眼间三年的硕士时光，如白驹过隙。三年来我从对科研的知之甚少到逐渐熟悉，学到了很多有用的东西，这离不开很多人对我的帮助。

首先感谢我的恩师刘莹副研究员在这三年来在学习对我的悉心指导、培养与教诲，引领我走进科研的殿堂。在生活上恩师对我的关心和帮助让我铭记在心。

由衷感谢抗体工程实验室姜俊义博士给予无私的帮助以及在实验方面的指导，感谢柳刚在抗体配对实验中给予的大力协助，同时感谢实验室全体老师、同学对我关心和帮助。

感谢我的培养单位——军事医学科学院放射与辐射医学研究所和北京蛋白质组研究中心，为我提供良好的科研平台和宝贵的学习机会，感谢科技处各位领导老师三年来的帮助，尤其感谢北京蛋白质组研究中心隆凯云老师对我论文发表情况的支持和帮助。

衷心感谢参与论文评阅的各位教授及各位答辩委员在百忙之中给予的认真评议和细心点评。

最后真诚感谢我的家人，特别是我的父亲和母亲在我读研这三年期间给予我的鼓励支持和关心。

深深感谢我的同学和朋友们在学习上对我的关心和帮助，生活上对我的陪伴。

桃李不言，下自成蹊。亲爱的老师、同学、亲人、好友们感谢你们这三年对我的付出，你们辛苦了！谢谢你们！

综述

玻连蛋白生物学功能及 ELISA 试剂盒在临床检测中的应用

摘要：玻连蛋白（Vitronectin,VN）是一种具有多种功能的黏连糖蛋白，参与促进细胞粘附与扩展、凝血及免疫调节等过程。酶联免疫吸附实验（enzyme-linked immunosorbent assay , ELISA)是一种广泛应用于生物基础研究及临床检测的实验诊断方法。具有可靠的特异性、敏感性且重复率高。本文将对玻连蛋白的生物学功能及 ELISA 试剂盒在临床检测中的应用作一综述。

关键词：玻连蛋白，ELISA 试剂盒，临床检测

1 VN 生物学功能

玻连蛋白（Vitronectin,VN）是一种具有多种功能的黏连糖蛋白，在体内分布广泛，具有多种功能区域和易变的分子结构。VN 属于细胞外基质蛋白，可以与肝素及整合素受体 $\alpha\beta 3$ 及 $\alpha\beta 5$ 等结合发挥相应的生物学功能^[1,2]。VN 参与细胞粘附、迁移和扩散、免疫防御及肿瘤进展等，接下来将从以下几方面对其生物学功能进行综述。

1.1 VN 的命名、结构和分布

玻连蛋白（Vitronectin,VN）最早于 1967 年被 Holmes 等人发现存在于血清中，当时被称为“alpha-one protein”^[3]。后来由于其具有促进细胞粘附与扩展的作用。所以被称为血清扩展因子^[4]。因其在结构上与 S 蛋白相似，故也曾被称为“S 蛋白”^[5]。

1983年作为65kDa和75kDa多肽混合物被Hayman等人命名为“Vitronectin”，因其与玻璃珠有高度亲和性以及有粘附细胞的特性，所以称为玻连蛋白^[6]。

cDNA序列分析显示，VN的基因结构中有8个外显子和7个内含子，VN具有多个功能区域。Arg-Gly-Asp(RGD)区：具有细胞黏附作用，多种具有RGD区的粘附蛋白都是通过此区域与整合素结合发挥作用。肝素结合区：此区域在一般情况下由于VN分子呈折叠状态而被遮蔽起来，只有在VN分子发生变构成为伸展状态时才暴露出肝素结合位点来，该位点可以与肝素以及其它糖胺聚糖分子结合发挥相应的功能。蛋白水解区：VN主要的合成部位在肝脏，以单链的形式存在，而在血浆中以单链和双链两种形式存在，这是由于在Arg-379/Ala-380N部位水解所致，末端65 000与C末端10 000片段通过二硫键连接的双链形式^[7]。酸性氨基酸区：氨基酸序列位于第53到64位，并包含两个硫酸化位点，分别为Tyr-56和Tyr-59。血红素同源区：该结构也存在于血红素结合蛋白及基质胶原蛋白中。正是由于VN具有多个结构区域，所以它才会发挥多种不同的生物学功能。

VN在人体血清、血浆及血小板 α 颗粒中均有分布，在血浆或者血清中的含量为200-400 $\mu\text{g/ml}$ ^[8]。肝脏为合成VN的主要部位，除此之外，尿道和视网膜也有VN合成和分泌^[9-10]。Berglund等人发现恶性肿瘤时肝脏、心、肺、肾、扁桃体、十二指肠及骨骼肌等组织中VN表达升高^[11]。

1.2 VN参与细胞粘附、迁移和扩散

整合素属于糖蛋白受体家族，由 α 和 β 两个亚基组成，为 α 和 β 两种亚单位以非共价形式形成跨膜的异质二聚体复合物，其可以通过识别并结合细胞外基质中的蛋白配体介导细胞间的粘附作用。整合素配体包括纤连蛋白(FN)、VN、胶原蛋白以及层连蛋白等。VN与纤连蛋白一样都属于粘附蛋白家族，具有粘附蛋白共有的Arg-Gly-Asp(RGD)区域，VN就是通过RGD区域与受体结合发挥作用。整合素通过识别VN的RGD序列并发生特异性结合，从而影响细胞的粘附。

除了整合素以外，VN还可与尿激酶受体结合(uPAR)。uPAR与细胞外基质蛋

白 VN 及其它细胞表面分子具有很高的亲和力, uPAR 与 VN 结合可以激活细胞内的信号转导途径, 这在很大程度上增加了 uPAR 在细胞增殖、存活、粘附和迁移中的作用^[12]。

内皮细胞的增殖、迁移和重建在血管形成过程中至关重要, $\alpha v\beta 3$ 整合素和 uPA-uPAR 复合物是内皮细胞粘附和迁移的关键调控因子^[13]。VN 可以与 $\alpha v\beta 3$ 整合素和 uPA-uPAR 复合物结合, 从而介导细胞间的粘附作用。 $\alpha v\beta 3$ 整合素和 uPA-uPAR 复合物在细胞粘附过程中起到协同作用^[14,15], 研究表明足细胞中 VN 与 uPA-uPAR 复合物的结合发挥粘附作用时需要 $\alpha v\beta 3$ 整合素的激活^[16,17]。

整合素通过 RGD 结构域结合介导细胞的扩散和迁移运动。整合素发挥细胞间作用的主要决定因素在于 β 亚基的不同^[7]。 $\alpha v\beta 3$ 及 $\alpha v\beta 5$ 整合素在介导细胞的扩散和迁移过程中作用不同。 $\alpha v\beta 3$ 不仅促进细胞向 VN 迁移而且促进向其他具有 RGD 序列粘连蛋白或者多肽迁移。 $\alpha v\beta 5$ 与 VN 结合有促进癌症细胞间的粘附的作用, 但是在细胞的迁移和扩散过程中几乎不起作用。若是能够在这些癌症细胞中表达 $\alpha v\beta 3$, 那么癌细胞则具有了 $\beta 3$ 亚基的促进细胞扩散与迁移的功能。

1.3 VN 参与免疫防御

VN 除了参与细胞迁移、组织修复及膜攻击复合物形成外, 在感染过程中促进中性粒细胞浸润和增强炎症反应。补体系统通常被认为是抵抗病原入侵的天然免疫应答中的第一道防线。磷酸变位酶 1 (Gpm1) 是真菌感染时参与免疫调节的蛋白之一^[18], Gpm1 与纤溶酶原结合激活尿激酶 (uPa), 然后激活纤溶酶降解宿主细胞外基质 (ECM) 蛋白和 C3b^[19]。在免疫及组织逃逸过程中发挥重要作用^[20]。多种病原菌通过 VN 结合到人体细胞表面及细胞外基质成分, 发生免疫逃逸或者组织入侵^[21]。

病原微生物通过与 VN 的肝素结合区域结合, 暴露 N-末端的整合素结合位点以便于细胞表面其它受体和配体的相互作用^[22,23]。许多病原菌蛋白都是通过肝素结合结构域与 VN 结合发挥作用^[21]。Gpm1 作为 VN 的配体, 真菌通过 Gpm1 与人

内皮细胞表面的 VN 结合介导免疫逃逸^[24]。

VN 构象不稳定, 纤溶酶原激活物抑制剂 1(plasminogen activator inhibitor 1, PAI-1), 凝血酶 - 抗凝血酶 III 以及补体 C5b-9 与 VN 结合, 诱导其构象改变, 使得 VN 的肝素结合区域露出 N 末端生长调节素 B (SMB 域) 并形成二硫键连接的 VN 多聚体^[25]。VN 的 SMB 结构域的含有精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸 (RGD) 序列, RGD 序列为细胞粘附位点, VN 通过此位点与整合素 $\alpha V\beta 3$, $\alpha V\beta 5$, $\alpha V\beta 1$ 和 $\alpha IIb\beta 3$ 特异性结合。

VN 在不同阶段抑制补体终末复合物的形成。补体 C5b-7 与 VN 形成膜攻击复合物的早期结构, 占据 C5b-7 进一步形成 SC5b-7 补体复合物结合位点, 补体 SC5b-7 与补体 C8 和补体 C9 分别形成补体复合物 SC5b-8 与 SC5b-9, 这两种补体复合物为不可溶性, 而 VN 与 SC5b-7 形成的为可溶性的膜攻击复合物。另外, VN 阻止 C9 多聚体的形成并限制补体复合物中 C9 分子的数量。在清除大肠杆菌的过程中补体 C9 分子的数量影响 C5b-9 补体复合物的形成, 因此, 通过 VN 限制 C9 多聚体的形成可能成为一种新的免疫逃逸途径^[26, 27]。

1.4 VN 与肿瘤进展

尿激酶型纤溶酶原激活物 (uPA) 和尿激酶型纤溶酶原激活物受体 (uPAR) 通过调控一系列信号分子的活性, 加速细胞外基质蛋白水解从而增强细胞粘附、增殖及侵袭^[15]。表明 uPA 系统在多种病理条件下, 特别是肿瘤进展过程中扮演重要角色^[28]。研究发现 uPAR 在肿瘤的侵袭与转移过程中起着不可忽视的作用, 在进展期及生存率较低的肿瘤病人体内 uPAR 的水平升高^[29,30]。uPAR 介导的 VN 粘附启动不同细胞内信号通路, 增强丝裂酶原活化蛋白激酶活性 (MAPK) ^[31,32], 这些 VN 参与的转移和促分裂信号转导提示 uPAR 可能促进肿瘤的生长和转移。新的研究显示 uPAR 通过与 VN 的反应能够促进肿瘤的生长^[33]。在尿激酶型纤溶酶原激活物 (uPA) 存在下, VN 可以与 uPAR 结合, 形成 uPA-uPAR-VN 三元复合物。uPA-uPAR-VN 三元复合物的晶体结构决定 VN 与 uPAR 的结合并不受 VN 与 $\alpha v\beta 3$

整合素之间结合的影响^[34,35]。在三元复合体中 uPA 和 VN 分别结合到 uPAR 的不同结构域, uPA 和 VN 不直接相结合^[36,37]。与 uPA-uPAR 复合物类似, 纤溶酶原激活物抑制因子 1 (PAI-1) 也可以与 VN-uPAR 复合物反应, PAI-1 的 VN 结合位点与 uPAR 和 $\alpha v\beta 3$ 整合素重叠, 三者竞争性结合 VN 的 SMB 结合区^[38]。VN-uPAR 之间的相互作用促进多种细胞间的粘附^[17, 35]。在乳腺癌细胞中, 这种细胞间的黏附作用可以通过 MRJ (与 uPAR 相互作用的热休克蛋白) 进一步增强^[39]。

VN 受体 $\alpha v\beta 3$ 整合素和 uPAR 在侵袭性肿瘤中均呈高表达^[40]。VN 发挥促进细胞的转移作用, 需要同时与 $\alpha v\beta 3$ 整合素和 uPAR 相结合, 与两者的结合分别通过结合 VN 的 RGD 序列和 SMB。事实上, VN 与细胞的结合可以诱导丝氨酸蛋白酶激酶的激活, 继而导致细胞膜突出及细胞转移, 在这种细胞转移的过程中 VN 的诱导作用是必不可少的^[15]。最近的研究表明, uPA-uPAR 之间的相互作用也可以刺激细胞的转移, 并且 $\alpha v\beta 3$ 整合素和 VN 的结合可能介导 uPA-uPAR 之间的信号传导^[41]。VN 参与多种肿瘤细胞迁移过程, 阻断 VN 的作用有可能对肿瘤起到一定的治疗作用^[42]。肝细胞癌患者血清中 VN 高表达, VN 通过与 $\alpha v\beta 3$ 整合素结合使得 Ras/MAPK/ERK 信号通路激活, 影响肝癌的肝癌进展, 提示 VN 可能成为诊断肝细胞癌的一种新的生物学标记^[43,44]。卵巢癌细胞可以通过增强 VN 和 $\alpha v\beta 3$ 整合素的反应从而促进癌细胞的运动^[45]。

1.5 VN 与疾病的关系

VN 可以与 PAI-1 结合, 两者的结合阻断了 VN 与 $\alpha v\beta 3$ 整合素的结合, 并参与调控多种细胞活动^[46]。J Zhong 等人发现 VN 与 PAI-1 的结合可以对心肌纤维化起到保护作用, 并可导致 $\alpha v\beta 3$ 整合素作用的降低^[47]。PAI-1 与 uPAR 和整合素竞争性结合 VN, 从而抑制 uPAR 和整合素介导的细胞活动^[48]。正常情况下, 细胞外基质中的 VN 含量较低, 而在慢性炎症性肝病中 VN 的表达升高, 且主要分布在肝窦中, 提示 VN 与肝脏纤维化可能有关^[49]。VN 为原发性肝癌及转移性肝癌如大肠癌肝转移的主要的细胞外基质成分, VN 在炎性及恶性肝组织白细胞募集及定位过程

中扮演重要角色^[50,51]。另外,也有报道 VN 与肺纤维化关系密切^[52]。在动脉血栓形成的过程中 VN 作用尚不十分明确^[53]。

本文仅综述了 VN 在细胞运动、免疫防御、肿瘤进展过程中发挥的生物学作用。VN 是一种具有多种功能的细胞外基质蛋白,还参与其它多种病理生理过程,如止血作用、创伤修复、血管生成、组织重建等等。VN 具有多个功能区域,随着研究的进行,会有更多的功能被发现, VN 也可能成为治疗疾病新的生物学标记物。

2 ELISA 试剂盒在临床检测中的应用

2.1 ELISA 实验原理、分类和概况

2.1.1 ELISA 实验原理

ELISA 法以抗原、抗体之间的特异性免疫反应为基础,结合具有高效催化作用的酶对底物的催化反应,使之成为免疫学实验中检测抗原、抗体最常用的检测方法。该方法于 1971 年由瑞典学者 Engvall E 和 Perlmann P 以及荷兰学者 Van Weemen BK 和 Schuurs AH 先后报道。ELISA 实验的原理是将抗原或者抗体固定在固相载体上(常用的固相载体为聚苯乙烯微量检测板),然后通过洗涤多余的反应物,每次加入反应物都需要孵育一段时间,最后通过酶标记的抗原或者抗体进行显色,观察反应颜色并进行吸光度的测定来判断反应结果。

2.1.2 ELISA 实验分类和概况

随着 ELISA 实验技术的发展,目前主要有以下几种类型:间接法,主要用于检测抗体;双抗夹心法,用于检测抗原;竞争法,用于检测小分子抗原以及半抗原;捕获包被法,主要用于检测 IgM 抗体;另外还有双位点一步法以及以亲和素和生物素为基础的 ABS-ELISA 法。这几种方法中以间接法和双抗夹心法最为常用。

ELISA 实验并不需要昂贵的仪器设备,可同时处理大量待检样本,操作简便、快速^[54, 55]。此外,ELISA 法在应用的限制方面与其它仪器分析法基本相当甚至更少一些^[56]。ELISA 实验以其敏感性高,特异性高并且稳定性较好的优点广泛用于免疫学、分子生物学及分析化学等领域。另外,随着生物医学的发展,越来越多

的商品化 ELISA 试剂盒用于生物化学领域的实验研究和临床检测。

2.2 ELISA 双抗夹心法

ELISA 双抗夹心法 (Sandwich ELISA) 涉及到两个识别同一抗原不同位点的特异性抗体, 是 ELISA 法中最为有效的检测方法^[57]。该方法是将一抗 (primary antibody) 包被于微量滴定板中作为捕获抗体, 然后加入待检测抗原 (主要为血清等体液或者细胞上清等), 之后加入酶标记的二抗 (enzyme-conjugated secondary antibody), 经过洗涤、孵育后, 加入显色液, 抗原抗体形成的夹心复合物在酶的存在下可以被显色液识别显示颜色的变化^[58]。目前用于 ELISA 实验的酶主要有辣根过氧化物酶 (HRP)、碱性磷酸酶和 β -半乳糖苷酶^[59]。实验中的试剂所吸附的载体通常以微量滴定板为固相载体, 然而, 也有用试纸, 膜, 吸管等其他固体基质的^[60]。商品化 ELISA 检测试剂盒通常采用的方法就是双抗夹心法, 至今用于临床检测的 ELISA 试剂盒已经有很多种。

2.3 ELISA 试剂盒的临床应用

ELISA 试剂盒 (ELISA Kit), 也被成为酶联免疫试剂盒或者酶联免疫吸附测定试剂盒。商品化 ELISA 试剂盒因其价格相对比较昂贵, 所以从问世以来一直到 1999 年期间在发展中国家的应用仍不普遍^[61]。目前 ELISA 试剂盒在临床检测中的应用越来越广泛, 主要用于疾病相关的蛋白和食物源性病原菌的检测。Rafaella 等人利用抗循环阴级抗原抗体诊断血清中的血吸虫感染^[62]。ELISA 检测发现乳腺癌患者血清中的硫氧化还原蛋白 (The human cytosolic thioredoxin, Trx) 含量较高, 有助于乳腺癌的早期诊断和预后, 结合已知的乳腺癌标志物 CEA 和 CA15-3, 提示 Trx 可能是一种新的诊断乳腺癌的生物学标记物, 三者的结合将会提高乳腺癌诊断的敏感性和特异性^[63]。胰腺粘液性囊腺瘤有发展为胰腺上皮癌的潜在危险, 因此对于胰腺粘液性囊腺瘤的早期诊断、早期防护及早期治疗至关重要。胰腺浆液性囊

腺癌无恶变的危险，其形态上与粘液性囊腺瘤相似，因此寻找区分两种腺瘤的标记物显得尤为重要。通过 ELISA 检测发现血管表皮生长因子 (VEGF-A) 在浆液性囊腺瘤患者胰液中表达较高，对病理学诊断具有非常重要的意义^[64]。通过检测流感 a(h3)病毒核蛋白 (NP) 能够直接比较病毒的复制能力和红细胞凝集活性^[65]。利用试剂盒研究脑脊液中 α -突触核蛋白确定其在帕金森病痴呆、阿尔兹海默病和路易氏小体痴呆等脑退行性病变中的意义^[66]。另外，ELISA 试剂盒也被用于食物中多种致病菌及大肠杆菌肉毒毒素和内毒素的检测^[57,67-69]。Zhao 等人利用 ELISA 试剂盒研究血透患者血液中抗血小板因子 4/肝素抗体在血透维持期的临床意义^[70]。膀胱癌检测中对尿液的检验具有重要意义，最近 Rosser 等人通过使用商品化 ELISA 试剂盒进一步明确了尿液中包括 IL-8 在内的 8 种与膀胱癌诊断相关的生物学标记物，为膀胱癌的确诊提供了重要依据^[71]。

随着免疫学技术的发展和 ELISA 试剂盒进一步的研发及优化，相信 ELISA 试剂盒在今后的科研领域将会发挥越来越重要的作用，并为多种疾病的检验、诊断及判断预后提供有力的工具，更广泛的用于临床应用中。

参考文献

1. Santoni G, Spreghini E, Lucciarini R, et al. Involvement of $\alpha\beta 3$ integrin-like receptor and glycosaminoglycans in *Candida albicans* germ tube adhesion to vitronectin and to a human endothelial cell line[J]. *Microb Pathog*, 2001, 31(4): 159-172.
2. Spreghini E, Gismondi A, Piccoli M, et al. Evidence for $\alpha\beta 3$ and $\alpha\beta 5$ integrin-like vitronectin (VN) receptors in *Candida albicans* and their involvement in yeast cell adhesion to VN[J]. *J Infect Dis*, 1999, 180(1): 156-166.
3. Holmes R. Preparation from human serum of an alpha-one protein which induces the immediate growth of unadapted cells in vitro[J]. *J Cell Biol*, 1967, 32(2): 297-308.
4. Barnes D, Wolfe R, Serrero G, et al. Effects of a serum spreading factor on growth and morphology of cells in serum - free medium[J]. *J Supramol Struct*, 1980,

14(1): 47-63.

5. Hayman EG, Engvall E, A'Hearn E, et al. Cell attachment on replicas of SDS polyacrylamide gels reveals two adhesive plasma proteins[J]. *J Cell Biol*, 1982, 95(1): 20-23.

6. Hayman EG, Pierschbacher MD, Ohgren Y, et al. Serum spreading factor (vitronectin) is present at the cell surface and in tissues[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1983, 80(13): 4003-4007.

7. Stockmann A, Hess S, Declerck P, et al. Multimeric vitronectin. Identification and characterization of conformation-dependent self-association of the adhesive protein[J]. *J Biol Chem*, 1993, 268(30): 22874-22882.

8. Bittorf SV, Williams EC, Mosher DF. Alteration of vitronectin. Characterization of changes induced by treatment with urea[J]. *J Biol Chem*, 1993, 268(33): 24838-24846.

9. Zhang D, Hudson AE, Delostrinos C F, et al. Dual sources of vitronectin in the human lower urinary tract: synthesis by urothelium vs. extravasation from the bloodstream[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2011, 300(2): F475-F487.

10. Hageman GS, Mullins RF, Russell SR, et al. Vitronectin is a constituent of ocular drusen and the vitronectin gene is expressed in human retinal pigmented epithelial cells[J]. *FASEB J*, 1999, 13(3): 477-484.

11. Berglund L, Björling E, Oksvold P, et al. A gene-centric Human Protein Atlas for expression profiles based on antibodies[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2008, 7(10): 2019-2027.

12. Montuori N, Selleri C, Ragno P. The urokinase-receptor in infectious diseases[J]. *Infez Med*, 2012, 20(Suppl 2): 13-8.

13. Galvagni F, Orlandini M, Oliviero S. Role of the AP-1 transcription factor FOSL1 in endothelial cells adhesion and migration[J]. *Cell Adh Migr*, 2013, 7(5): 408-411.

14. Alexander RA, Prager GW, Mihaly-Bison J, et al. VEGF-induced endothelial cell migration requires urokinase receptor (uPAR)-dependent integrin redistribution[J]. *Cardiovasc Res*, 2012, 94(1): 125-135.
15. Smith HW, Marshall CJ. Regulation of cell signalling by uPAR[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010, 11(1): 23-36.
16. Wei C, Möller CC, Altintas MM, et al. Modification of kidney barrier function by the urokinase receptor[J]. *Nat Med*, 2008, 14(1): 55-63.
17. Wei Y, Waltz DA, Rao N, et al. Identification of the urokinase receptor as an adhesion receptor for vitronectin[J]. *J Biol Chem*, 1994, 269(51): 32380-32388.
18. Luo S, Skerka C, Kurzai O, et al. Complement and innate immune evasion strategies of the human pathogenic fungus *Candida albicans*[J]. *Mol Immunol*, 2013, 56(3): 161-169.
19. Poltermann S, Kunert A, von der Heide M, et al. Gpm1p is a factor H-, FHL-1-, and plasminogen-binding surface protein of *Candida albicans*[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(52): 37537-37544.
20. Barthel D, Schindler S, Zipfel PF. Plasminogen is a complement inhibitor[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(22): 18831-18842.
21. Singh B, Su YC, Riesbeck K. Vitronectin in bacterial pathogenesis: a host protein used in complement escape and cellular invasion[J]. *Mol Microbiol*, 2010, 78(3): 545-560.
22. Hallström T, Siegel C, Mörgelin M, et al. CspA from *Borrelia burgdorferi* inhibits the terminal complement pathway[J]. *MBio*, 2013, 4(4): e00481-13.
23. Singh B, Jalalvand F, Mörgelin M, et al. *Haemophilus influenzae* protein E recognizes the C - terminal domain of vitronectin and modulates the membrane attack complex[J]. *Mol Microbiol*, 2011, 81(1): 80-98.
24. Lopez CM, Wallich R, Riesbeck K, et al. *Candida albicans* uses the surface protein Gpm1 to attach to human endothelial cells and to keratinocytes via the adhesive

protein vitronectin[J]. *PloS one*, 2014, 9(3): e90796.

25. Gil-Navarro I, Gil ML, Casanova M, O'Connor JE, et al. The glycolytic enzyme glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Candida albicans* is a surface antigen[J]. *J Bacteriol*, 1997, 179(16): 4992-4999.

26. Preissner KP, Podack ER, Müller - Eberhard HJ. SC5b - 7, SC5b - 8 and SC5b - 9 complexes of complement: ultrastructure and localization of the S - protein (vitronectin) within the macromolecules[J]. *Eur J Immunol*, 1989, 19(1): 69-75.

27. Preissner KT, Wassmuth R, Muller-Berghaus G. Physicochemical characterization of human S-protein and its function in the blood coagulation system[J]. *Biochem. J*, 1985, 231: 349-355.

28. Ulisse S, Baldini E, Sorrenti S, et al. The urokinase plasminogen activator system: a target for anti-cancer therapy[J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2009, 9(1): 32-71.

29. Duffy MJ. The urokinase plasminogen activator system: role in malignancy[J]. *Curr Pharm Des*, 2004, 10(1): 39-49.

30. Choong PF, Nadesapillai AP. Urokinase plasminogen activator system: a multifunctional role in tumor progression and metastasis[J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2003, 415 Suppl: S46-S58.

31. Madsen CD, Ferraris GM, Andolfo A, et al. uPAR-induced cell adhesion and migration: vitronectin provides the key[J]. *J Cell Biol*, 2007, 177(5): 927-939.

32. Eastman BM, Jo M, Webb DL, et al. A transformation in the mechanism by which the urokinase receptor signals provides a selection advantage for estrogen receptor-expressing breast cancer cells in the absence of estrogen[J]. *Cell Signal*, 2012, 24(9): 1847-1855.

33. Pirazzoli V, Ferraris GM, Sidenius N. Direct evidence of the importance of vitronectin and its interaction with the urokinase receptor in tumor growth[J]. *Blood*, 2013, 121(12): 2316-2323.

34. Waltz DA, Chapman HA. Reversible cellular adhesion to vitronectin linked to

urokinase receptor occupancy[J]. *J Biol Chem*, 1994, 269(20): 14746-14750.

35. Sidenius N, Sier CF, Blasi F. Shedding and cleavage of the urokinase receptor (uPAR): identification and characterisation of uPAR fragments in vitro and in vivo[J]. *FEBS Lett*, 2000, 475(1): 52-56.

36. Huai Q, Zhou A, Lin L, et al. Crystal structures of two human vitronectin, urokinase and urokinase receptor complexes[J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2008, 15(4): 422-423.

37. Huai Q, Mazar AP, Kuo A, et al. Structure of human urokinase plasminogen activator in complex with its receptor[J]. *Science*, 2006, 311(5761): 656-659.

38. Sidenius N, Blasi F. The urokinase plasminogen activator system in cancer: recent advances and implication for prognosis and therapy[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2003, 22(2-3): 205-222..

39. De Bock CE, Lin Z, Mekkawy AH, et al. Interaction between urokinase receptor and heat shock protein MRJ enhances cell adhesion[J]. *Int J Oncol*, 2010, 36(5): 1155-1163.

40. Loridon-Rosa B, Vielh P, Cuadrado C, et al. Comparative distribution of fibronectin and vitronectin in human breast and colon carcinomas. An immunofluorescence study[J]. *Am J Clin Pathol*, 1988, 90(1): 7-16.

41. Smith HW, Marra P, Marshall CJ. uPAR promotes formation of the p130Cas-Crk complex to activate Rac through DOCK180[J]. *J Cell Biol*, 2008, 182(4): 777-790.

42. Schiller HB, Szekeres A, Binder BR, et al. Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor 2 receptor limits cell invasion by controlling $\alpha V\beta 3$ integrin expression and proteolytic processing of urokinase-type plasminogen activator receptor[J]. *Mol Biol Cell*, 2009, 20(3): 745-756.

43. Ferrín G, Ranchal I, Llamaza C, et al. Identification of candidate biomarkers for hepatocellular carcinoma in plasma of HCV - infected cirrhotic patients by 2 - D

DIGE[J]. *Liver Int*, 2014, 34(3): 438-446.

44. Uematsu F, Takahashi M, Yoshida M, et al. Distinct patterns of gene expression in hepatocellular carcinomas and adjacent non - cancerous, cirrhotic liver tissues in rats fed a choline - deficient, l - amino acid - defined diet[J]. *Cancer Sci*, 2005, 96(7): 414-424.

45. Reuning U. Integrin $\alpha\beta 3$ promotes vitronectin gene expression in human ovarian cancer cells by implicating rel transcription factors[J]. *J Cell Biochem*, 2011, 112(7): 1909-1919.

46. Stefansson S, Lawrence DA. The serpin PAI-1 inhibits cell migration by blocking integrin alpha V beta 3 binding to vitronectin[J]. *Nature*. 1996, 383(6599):441-443

47. Zhong J, Yang HC, Kon V, et al. Vitronectin-binding PAI-1 protects against the development of cardiac fibrosis through interaction with fibroblasts[J]. *Lab Invest*, 2014, 94(6): 633-644.

48. Stefansson S, Lawrence DA. Old dogs and new tricks, proteases, inhibitors, and cell migration[J]. *Science Signaling*, 2003, 2003(189): pe24.

49. Koukoulis GK, Shen J, Virtanen I, et al. Vitronectin in the cirrhotic liver: an immunomarker of mature fibrosis[J]. *Hum Pathol*, 2001, 32(12): 1356-1362.

50. Jaskiewicz K, Chasen MR, Robson SC. Differential expression of extracellular matrix proteins and integrins in hepatocellular carcinoma and chronic liver disease[J]. *Anticancer Res*, 1992, 13(6A): 2229-2237.

51. Edwards S, Lalor PF, Tuncer C, Adams DH. , et al. Vitronectin in human hepatic tumours contributes to the recruitment of lymphocytes in an alpha v beta3-independent manner[J]. *Br J Cancer*, 2006, 95(11):1545-1554.

52. Lazar MH, Christensen PJ, Du M, et al. Plasminogen Activator Inhibitor-1 Impairs Alveolar Epithelial Repair by Binding to Vitronectin[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2004, 31(6): 672-678.

53. Obi AT, Diaz JA, Ballard - Lipka NL, et al. Plasminogen activator - 1 overexpression decreases experimental postthrombotic vein wall fibrosis by a non - vitronectin - dependent mechanism[J]. *J Thromb Haemost*, 2014, 12(8): 1353-1363.

54. Krska R, Schubert-Ullrich P, Molinelli A, et al. Mycotoxin analysis: an update[J]. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 2008, 25(2): 152-163.

55. Zhang H, Wang S, Fang G. Applications and recent developments of multi-analyte simultaneous analysis by enzyme-linked immunosorbent assays[J]. *J Immunol Methods*, 2011, 368(1): 1-23.

56. Kolosova AY, Shim WB, Yang ZY, et al. Direct competitive ELISA based on a monoclonal antibody for detection of aflatoxin B1. Stabilization of ELISA kit components and application to grain samples[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2006, 384(1): 286-294.

57. Zhao X, Lin CW, Wang J, et al. Advances in rapid detection methods for foodborne pathogens[J]. 2014 , 24(3):297-312.

58. Law JW, Ab Mutalib NS, Chan KG, et al. Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations[J]. *Front Microbiol*, 2015, 5: 770.

59. Yeni F, Acar S, Polat ÖG, et al. Rapid and standardized methods for detection of foodborne pathogens and mycotoxins on fresh produce[J]. *Food Control*, 2014, 40: 359-367.

60. Foley SL, Grant K. Molecular techniques of detection and discrimination of foodborne pathogens and their toxins[M]//*Foodborne diseases*. Humana Press, 2007: 485-510.

61. Devi KT, Mayo MA, Reddy KL, et al. Production and characterization of monoclonal antibodies for aflatoxin B1[J]. *Lett Appl Microbiol*, 1999, 29(5): 284-288.

62. Grenfell RF, Coelho PM, Taboada D, et al. Newly established monoclonal antibody diagnostic assays for *Schistosoma mansoni* direct detection in areas of low endemicity[J]. *PloS one*, 2014, 9(1): e87777.

63. Park BJ, Cha MK, Kim IH. Thioredoxin 1 as a serum marker for breast cancer and its use in combination with CEA or CA15-3 for improving the sensitivity of breast cancer diagnoses[J]. *BMC Res Notes*, 2014, 7(1): 7.

64. Yip-Schneider MT, Wu H, Dumas RP, et al. Vascular endothelial growth factor, a novel and highly accurate pancreatic fluid biomarker for serous pancreatic cysts[J]. *J Am Coll Surg*, 2014, 218(4): 608-617.

65. van Baalen CA, Els C, Sprong L, et al. Detection of nonhemagglutinating influenza A(H3N2) viruses by enzyme-linked immunosorbent assay in quantitative influenza virus culture[J]. *J Clin Microbiol*. 2014 ,52(5):1672-1677.

66. de Lyon HC. Detection of disease-associated α -synuclein in the cerebrospinal fluid: a feasibility study[J]. *Clin Neuropathol*, 2014, 33(5): 329-334.

67. Arora P, Sindhu A, Dilbaghi N, et al. Biosensors as innovative tools for the detection of food borne pathogens[J]. *Biosens Bioelectron*, 2011, 28(1):1-12.

68. Campbell GA, Mutharasan R. Piezoelectric-excited millimeter-sized cantilever (PEMC) sensors detect *Bacillus anthracis* at 300spores/mL[J]. *Biosens Bioelectron*, 2006, 21(9): 1684-1692.

69. Fusco V, Quero GM, Morea M, et al. Rapid and reliable identification of *Staphylococcus aureus* harbouring the enterotoxin gene cluster (egc) and quantitative detection in raw milk by real time PCR[J]. *Int J Food Microbiol*, 2011, 144(3): 528-537.

70. Zhao D, Sun X, Yao L, et al. The clinical significance and risk factors of anti-platelet factor 4/heparin antibody on maintenance hemodialysis patients: a two-year prospective follow-up[J]. *PloS one*, 2013, 8(4): e62239.

71. Rosser CJ, Ross S, Chang M, et al. Multiplex protein signature for the detection of bladder cancer in voided urine samples[J]. *J Uro*, 2013, 190(6): 2257-2262.