

·论 著·

[文章编号]1000-8861(2016)08-0708-04; [DOI]10.13431/j.cnki.immunol.j.20160138

## 人抗P53蛋白单克隆抗体的制备及评价

宋军营,张钟允<sup>△</sup>,刘文弟<sup>\*</sup>,曾华辉,孙向东,闫敏,袁永,翟晋豫

**[摘要]** 目的 制备获得人P53蛋白单克隆抗体,并应用于免疫组化检测。方法 利用基因重组方法,将p53基因构建到原核质粒载体上并诱导表达,将收集获得的P53蛋白免疫小鼠,经细胞融合及亚克隆手段获得鼠源单克隆抗体,与商品化的抗体DO-1共同染色蜡块包埋的病理组织样本,比较二者的染色结果。结果 在筛选获得的与DO-1检测结果相近的5株抗体内,取检测结果最接近的1株抗体5E10,经Protein A/G株纯化抗体,与收集获得的数例癌症组织蜡块进行免疫组化验证,发现结果均与DO-1的结果无明显差异。结论 成功制备并筛选出1株人抗P53单克隆抗体,可用于免疫组化染色。

**[关键词]** 人P53蛋白;原核表达;单克隆抗体;免疫组化

**[中图分类号]** R392.1

**[文献标识码]** A

## Preparation and application of a monoclonal antibody against P53 protein of human

SONG Junying<sup>1,△</sup>, ZHANG Zhongyun<sup>1,△</sup>, LIU Wendi<sup>1,\*</sup>, ZENG Huahui<sup>1</sup>, SUN Xiangdong<sup>1</sup>, YAN Min<sup>1</sup>, YUAN Yong<sup>1</sup>, ZHAI Jinyu<sup>2</sup>

1. Zhengzhou Key Laboratory of Antibodyomics, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China; 2. Henan Engineering and Technology Research Center of Pathological Diagnostic Reagents, Zhengzhou 450001, China

\*Corresponding Author: LIU Wendi, E-mail: wendiliu@163.com

△These authors contributed equally to this work and share first authorship

**[Abstract]** The study performed to prepare a monoclonal antibody against human P53 protein, and evaluate its application in immunohistochemistry. The p53 gene was constructed into prokaryotic expression plasmid by gene recombination methods. P53 protein was expressed in *E. coil*, and then used to immunize Balb/c mice. P53 monoclonal antibody was prepared by using cell fusion and subcloning methods. Using the mAb and DO-1, IHC and specificity experiments were carry out on wax block organizations collected from hospital. Five antibodies against P53 protein were obtained, and one of them demonstrated most close quality to DO-1, named as 5E10. After purification by protein A/G. the McAbs (5E10) was used for immunohistochemistry and specificity experiments on primary colon carcinoma slice, which demonstrated no significant different as compared with the detection using DO-1. In conclusion, one monoclonal antibody (5E10) against P53 protein of human has prepared, which could be used in the IHC detection for human P53 protein.

**[Key words]** Human P53 protein; Prokaryotic expression; Monoclonal antibodies; Immunohistochemistry

P53蛋白是由393个氨基酸组成的一类磷酸化蛋白,相对分子质量为53 000,故称为P53蛋白。p53被称为基因卫士,是迄今发现与人类恶性肿瘤相关性最高的基因,也是肿瘤细胞中基因变异频率最高的靶基因,50%的肿瘤患者中均发现p53基因

有缺失或突变<sup>[1]</sup>。P53蛋白的表达水平受p53基因的影响,获取的癌症组织评估P53蛋白的表达情况对于癌症高危人群筛查、早期诊断、肿瘤病因的确定、预后判断以及治疗方案的制定均具有十分重要的意义。目前,P53蛋白在免疫组化检测方法中的应用已相当广泛。因为该野生型蛋白的半衰期短,在人体正常细胞的细胞核中几乎检测不到,而当p53基因发生突变后可导致其编码产物发生变化,从而使P53蛋白半衰期延长而增加<sup>[2-3]</sup>。由此,p53蛋白在细胞核内积累,并可以通过免疫学的方法检测出来。从20世纪末至今,参考数家临床医院与NordiQC质

**基金项目:**河南中医学院省属科研业务费专项(2014KYY-WF-ZZCX3-06)

**作者单位:**450046 郑州,河南中医学院郑州市抗体组学重点实验室(宋军营,张钟允,刘文弟,曾华辉,孙向东,闫敏,袁永);450001 郑州,河南省肿瘤病理诊断试剂工程技术研究中心(翟晋豫)

**\*通信作者:**刘文弟,Tel: 0371-86566286, E-mail: wendiliu@163.com

△共同第一作者

控组织的推荐,首选的P53单克隆抗体是克隆号DO-1的单克隆抗体,其应用面也最广,那么能够开发1株可应用于市场的P53免疫组化单克隆抗体具有重要意义<sup>[4]</sup>。前人也有大量的研究资料显示出其开发获得了P53单克隆抗体,可是从其免疫组化验证结果来分析,实际检测效果并不理想。本研究在总结前人研究的基础之上,采用传统的单克隆抗体制备方法,制备适用于临床免疫组化检测用的P53单克隆抗体。

## 1 材料与方 法

**1.1 实验材料** p53全长cDNA载体购自Origene公司;Nde I、Xho I内切酶购自NEB公司;PCR高保真聚合酶购自TOYOBO。一步定向克隆试剂盒购于上海近岸生物;SP2/0细胞株由本实验室保存;免疫佐剂购于北京博奥龙免疫技术有限公司;PEG1450、HAT、HT试剂购于Sigma公司;食管癌石蜡组织与乳腺浸润性导管癌石蜡组织由河南省肿瘤医院惠赠;抗体亚型鉴定试剂盒购置于武汉三鹰公司;所用化学试剂皆为分析纯级。

**1.2 p53全长基因扩增与双酶切pET-28a质粒载体无缝克隆重组构建** 首先经NCBI数据库搜索p53全基因序列,对比购买的cDNA序列,依据序列设计上下游引物并合成。序列分别为上游序列:CTGGTGCCGCGCGCAGCCATATGATGGAGGAGCGCAGTCAG;下游序列:TCAGTGGTGGTGGTGGTGGTCTCGAGGTCTGAGTCAGGCCCTTC。PCR扩增体系按照预变性:94℃ 7 min,变性:94℃ 30 s,退火:55℃ 30 s,延伸:68℃ 60 s。并由变性至延伸阶段重复30个反应。切胶回收目的片段。同时将pET-28a依照NEB公司产品说明书的要求,在Buffer 3.1缓冲液条件下,经Nde I与Xho I内切酶在37℃下酶切2 h,切胶回收并与目的片段按照一步定向克隆试剂盒说明书要求进行重组连接,转染DH5 $\alpha$ 感受态细胞后涂含Kana抗生素平板,挑单克隆鉴定并送测序。

**1.3 P53蛋白诱导纯化与评价** 将测序正确的菌落提取质粒并转入BL-21菌中。经摸索,在2 mmol/L IPTG, 37℃诱导5 h后蛋白表达量最大,利用含6 mol/L尿素的pH8.0 Tris缓冲液经超声破碎,将收集获得的上清通过GE公司HisTrap FF crude (1 ml)柱纯化,获得目的蛋白,并利用Nanodrop测定蛋白浓度。将获得的蛋白按照200 ng/孔进行包被,依据ELISA间接法评价该蛋白与DO-1抗体是否发

生反应。

**1.4 P53蛋白免疫与细胞融合** 将获得的P53蛋白按照北京博奥龙快免佐剂说明书要求进行腿部肌肉注射免疫,每只小鼠免疫剂量为50  $\mu$ g,经过5周2针免疫后,采集尾血进行效价检测,在达到可以进行融合的基础上,取2只较好小鼠,融合前3天尾静脉抗原冲击免疫,冲击剂量为50  $\mu$ g。第3天取小鼠脾脏细胞与SP2/0细胞按1:5~1:10的比例在1 ml的PEG1450作用下进行细胞融合,融合后利用含HAT的完全培养基重悬,铺20块96孔板。

**1.5 单克隆筛选与纯化** 利用ELISA间接法(抗原+一抗+酶标二抗)筛选可分泌与免疫原结合抗体的细胞株,再利用由医院获得的癌症组织蜡块免疫组化实验评价该细胞分泌的抗体,依据与阳性抗体(DO-1)免疫组化结果对照,选择染色位置正确、背景无非特异性染色、染色区域相同(与阳性对照相比)、抗体长期分泌能力不丢失的抗体细胞株,亚克隆复检后扩大培养,计数后按照 $2\times 10^6$ 个/只注入经石蜡油致敏的小鼠腹腔,待形成腹水后,及时收集腹水,并经过Protein A/G柱进行纯化,获得单克隆抗体。

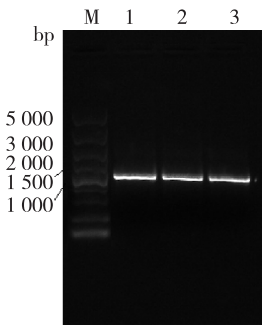
**1.6 单克隆抗体亲和力与亚型鉴定** 评价经亲和层析获得的抗体的主要性质。首先利用表达纯化的P53蛋白分别按照3.0、1.5、0.75、0.375 mg/L包被ELISA检测板条,调整P53纯化的抗体浓度至 $2\times 10^{-9}$  mol/L,按照不同浓度(1:1~1:256)与包被抗原进行反应,后加入标记辣根过氧化物酶的羊抗鼠IgG,经TMB底物显色,终止后OD<sub>450 nm</sub>下读数,经过公式 $K_A=(n-1)/(nAb'-Ab)$ 计算,得出亲和常数。同时将纯化出的P53抗体经抗体亚型鉴定试剂盒验证,分析抗体亚型。

**1.7 免疫组化验证** 以分别取自河南省肿瘤医院的不同组织蜡块样本进行试验,每个组织连续切6张片,其中3张片利用DO-1抗体鉴定,购置获得的DO-1抗体免疫组化抗体为工作液直接使用,自制抗体按照1:200~1:800比例稀释后摸索,选择较好的稀释比例对比与DO-1差别。试验过程通过leica Bond III型自动免疫组化仪进行,获取的结果进行统计并分析,评价上述制备获得的单克隆抗体。

## 2 结果

**2.1 p53基因PCR扩增结果及重组鉴定** p53基因经过PCR扩增反应后,由图1可知,其片段大小约1 200 bp,条带清晰且位置正确,决定切胶回收。重组后涂板挑菌后经过Nde I和Xho I双酶切鉴定结

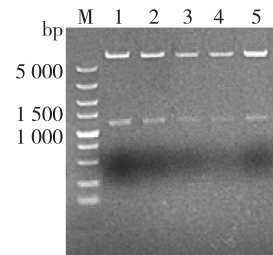
果如图2所示。由图2可知,在1 000~1 500之间出现目的条带,测序结果正确,进入下一步实验。



M) Marker; 1, 2, 3) three repeat holes of amplified p53 gene.

图1 p53基因扩增结果

Fig 1 The amplification results of human p53 gene

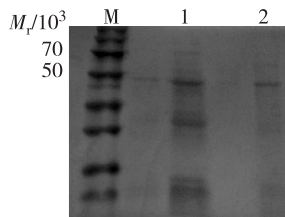


M) Marker; 1, 2, 3, 4, 5) five colonies picked out randomly.

图2 双酶切鉴定构建的载体

Fig 2 The identification of constructed vectors by double digestion

**2.2 P53蛋白纯化与评价** 通过扩大培养及IPTG诱导后,破碎菌体经纯化柱纯化获得蛋白如图3所示,目的蛋白大小与理论值相近。纯化后P53蛋白经0.01 mol/L PBS透析后,利用Nanodrop检测蛋白质质量浓度1.43 mg/ml。由ELISA反应结果(表1)可知该蛋白可作为制备P53单克隆抗体免疫原。



M) Marker; 1) the unpurified P53 protein; 2) the purified P53 protein.

图3 P53重组蛋白纯化结果

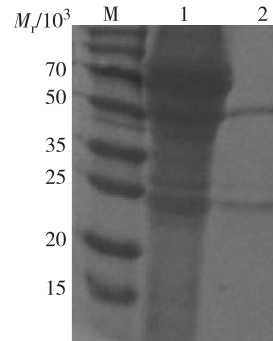
Fig 3 The purification results of P53 recombinant protein

表1 ELISA间接法评P53蛋白

Tab 1 The assessment of P53 protein by indirect ELISA method

Item	DO-1	Mouse serum (1:500)	PBS(0.01 mol/L)
P53 protein	1.565	0.108	0.042

**2.3 单克隆抗体筛选及抗体纯化结果** 杂交瘤细胞培养上清经过ELISA鉴定,共获得阳性细胞株53株,在对此53株细胞培养上清进行免疫组化验证后,有4A3、6H7、7B7、7C12、5E10共5株单克隆抗体与DO-1抗体进行免疫组化实验验证结果的对比结果类似。经Protein纯化后的结果见图4,蛋白浓度经紫外分光光度计检测,质量浓度为2.1 mg/ml,纯度利用Bandscan软件分析达到约85%。



M) Marker; 1) ascites; 2) after purification.

图4 P53单克隆抗体5E10小鼠腹水纯化结果

Fig 4 The result of P53 mAb 5E10 purification from ascites

**2.4 单克隆抗体性质鉴定** 5E10抗体的亲和力鉴定结果如图5所示。最终计算获得的亲和力常数 $K_d$ 平均值为 $2.174 \times 10^9$  L/mol。经抗体亚型鉴定试剂盒鉴定5E10抗体,结果为IgG2a亚型,Kappa链。制备腹水与纯化结果如图4所示。

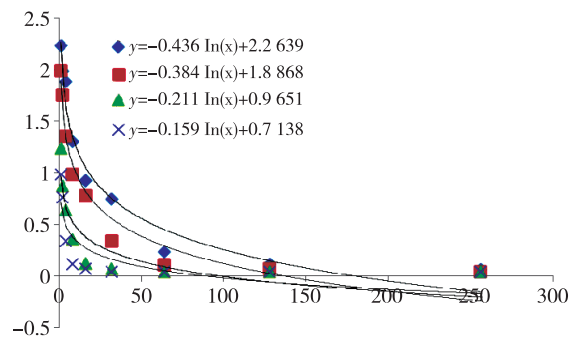


图5 抗体亲和力对数与方程式

Fig 5 Logarithm and equation for antibody affinity

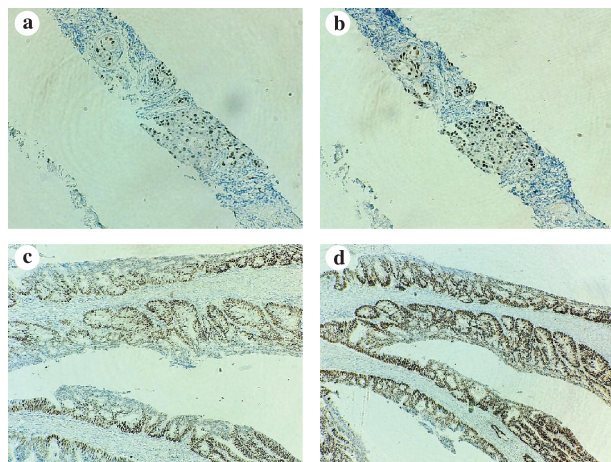
**2.5 免疫组化验证结果** 由河南肿瘤医院获得的组织经免疫组化验证,判读标准参考《中国抗癌协会乳腺癌诊治指南与规范(2008年)》,采用Allred评分系统,半定量计分法描述结果。5E10免疫组化实验抗体稀释浓度为1:500。统计结果如表2所示。100倍显微镜下观察,选取部分免疫组化图如图6所示。由图6、表2可知,抗体5E10与DO-1结果相符,说明自制抗体5E10与国外优秀免疫组化抗体的检测结果近似,可做进一步分析研究。



表2 临床组织样本检测统计结果

Tab 2 The statistical result of clinical tissue samples detection

Name	Cases	Number	mAb DO-1	5E10
Esophageal cancer	35	25	3-8	3-8
		10	0-2	0-2
Breast invasive ductal carcinoma	33	28	3-8	3-8
		5	0-2	0-2



a) IHC result of breast cancer (DO-1); b) IHC result of breast cancer (5E10); c) IHC result of esophageal cancer (DO-1); d) IHC result of esophageal cancer (5E10).

图6 P53自制抗体5E10与DO-1抗体对比结果( $\times 100$ )

Fig 6 The comparison between human P53 mAb 5E10 and DO-1 in IHC detection( $\times 100$ )

### 3 讨论

随着国内外学者深入对P53蛋白功能的研究及P53蛋白作为抗肿瘤药物的研究,抗人P53蛋白特异性单克隆抗体将提供有效的免疫分析和药物检测手段。大量研究报道揭示<sup>[5-7]</sup>,p53基因与细胞癌变的关系及P53蛋白的亚型及分泌情况决定了P53蛋白与众多癌症中均有相关性。P53蛋白的免疫组化以其直观性、客观性、准确性等优点依旧是当下医院病理科常用的诊断手段。虽然国内有大量学者在研究P53蛋白及利用其制备获得的抗体进行免疫组化相关实验<sup>[8-9]</sup>,但是从实验结果或报道来看,仅可作为一般型科研试剂使用。随着抗体制备水平的提高与进

步,免疫组化抗体逐渐由多抗到单抗,由一般到优良,更加特异的抗体、更加清晰的背景更容易受到医院病理科大夫的接受,所以为了更好的评价实验中制备出的若干株抗体,应用这些抗体进行临床一线的病理组织实验结果表明,5E10可特异性地鉴别癌症组织蛋白中的内源性P53蛋白,并具有较高的结合活性和检测灵敏度,与目前临床使用的DO-1抗体相近,这为肿瘤的诊断、防治及治疗提供了有效方法和应用前景,并为国内抗体生产提供了理论基础和技术实践。

### 【参考文献】

- [1] 王晓英,朱柯蕙,高苏蒙. p53基因突变检测技术的研究进展[J]. 中国生物制品学杂志, 2013, 26(10): 1522-1525.
- [2] Andersen TI, Holm R, Nesland JM, et al. Prognostic significance of TP53 alterations in breast carcinoma[J]. Br J Cancer, 1993, 68(1): 540-548.
- [3] Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, et al. P53 mutations in human cancers[J]. Science, 1991, 253(5015): 49-55.
- [4] 王启鸣,贺春语,马智勇,等. 人食管鳞状细胞癌组织中iNOS、VEGF及P53蛋白的表达[J]. 郑州大学学报: 医学版, 2008, 43(2): 199-202.
- [5] 李天永,任玲淑,马灵. Ki-67、P53在基底细胞样乳腺癌中的表达及意义[J]. 临床和实验医学杂志, 2013, 12(13): 1003-1004.
- [6] 贾振军,李其海. 胃癌组织中P53表达与分化程度、Ki-67表达的关系[J]. 山东医药, 2015, 55(38): 79-80.
- [7] 张红,牛韵韵,胡曼平. 食管癌中p53、p21、p16、cyclinD1、CDK4免疫组化检测[J]. 免疫学杂志, 2003, 19(4): 312-314.
- [8] 武军华,魏文清,贾培媛,等. 肿瘤抑制蛋白质P53单克隆抗体的制备及其免疫活性分析[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2011, 25(5): 479-482.
- [9] 刘彩云,寿成超,孙素莲,等. P53融合蛋白的原核表达及其单克隆抗体的制备[J]. 解剖学报, 1999, 30(1): 61-64.

(收稿日期:2016-02-29;修回日期:2016-04-15)

(编辑 李海鸥)

## 封面图片说明

封面图片提供人:冉海莹,中级实验师,第三军医大学科研部生物医学分析测试中心。

封面图片说明:牛肺动脉内皮细胞(BPAEC),蓝色为细胞核,红色为线粒体,绿色代表F-肌动蛋白。