

# 质粒 DNA 免疫小鼠制备 IGF 抗体的研究

刘春香, 刘菊, 赵光强, 郭淑华 (潍坊学院生物工程学院, 山东潍坊 261061)

**摘要** [目的] 用基因免疫法制备人类胰岛素样生长因子 (IGF) 的抗体, 从而检验基因免疫法的可行性。[方法] 通过 RT-PCR 法克隆到 IGF 基因, 将其连接到 pcDNA3.1A 载体上, 用含 IGF 基因的质粒通过皮下、肌肉注射 2 种途径免疫小鼠, 制备抗血清; 用 Western blot 法检测抗体特异性和抗体效价, 探索基因免疫法制备抗体的方法, 并进一步观察免疫次数及途径对抗体产生的影响。[结果] 基因免疫不同次数的小鼠体内均有抗体产生, 且皮下、肌肉不同免疫途径的血清均显示阳性结果, 其中皮下注射免疫抗体产生较早; 抗体效价可达到 1 500, 而且特异性较强。[结论] 通过基因免疫法制备 IGF 抗体是可行的, 而且效果较好。

**关键词** 基因免疫; IGF; 抗体

中图分类号 S865.1+3 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)30-13308-03

## Research of Immunization Mouse with Plasmid DNA for IGF Antibody Producing

LIU Chun-xiang et al (Biology Engineering Department of WEIFANG University, WEIFANG, Shandong 261061)

**Abstract** [Objective] The aim was to get Insulinlike Growth Factor antibody and detect the applying field of gene immunization. [Method] IGF gene were cloned by RT-PCR and ligated to plasmid pcDNA3.1A for mouse immune by intramuscular injection and intradermal injection to produce antibody in antiserum. The specificity and efficiency of the antibody were detected by Western blot for further studying the approach of gene immunity, as well as the effect of different times and approaches on the producing antibody. [Result] Antibodies could be detected in immune mice by both intramuscular injection and intradermal injection with different immune times. Antibody produced early with intradermal injection treatment. The efficiency of antibody reached 1 500 with high antibody specificity. [Conclusion] It was feasible and effective to produce antibody by mouse with gene immunization.

**Key words** Genetic immunization; IGF; Antibody

近年来, 采用 DNA 免疫法制备抗体的研究日渐增多。该方法可以有效避免大量分离和纯化抗原, 只需将编码抗原的 cDNA 克隆到真核表达载体上, 用重组质粒免疫动物, 即可产生针对该抗原的抗体。对于那些难以纯化或在纯化过程中结构易被破坏的蛋白, 基因免疫法可能是制备特异抗体的唯一方法。抗体制备后, 还可以作为纯化抗原的亲剂用来纯化目标蛋白。因此, 通过带有目的基因的纯化质粒 DNA 注射小鼠, 使其表达外源目的蛋白, 并以此蛋白为抗原诱导产生特异性免疫, 从而制备抗血清的研究具有重要理论和实践意义。目前, 国内外已有用基因免疫法制备高效价抗体的报道<sup>[1-3]</sup>, 但对于人的类胰岛素样生长因子 (IGF) 这样的成熟蛋白序列, 与小鼠基因同源性较高, 基因免疫法制备抗体还未见报道。为此, 笔者研究了基因免疫的特异性和方法的可行性, 为探索简便的多克隆抗体制备技术提供依据。

## 1 材料与方 法

**1.1 材料** 同系昆明种小白鼠(购自潍坊医学院实验动物中心), 雄性, 6~8 周龄, 平均 45 g。辣根过氧化物酶标记羊抗小鼠 IgG、标准 IGF 抗体、DAB 染色液试剂盒均购自北京博奥森生物技术有限公司; 硝酸纤维素膜购自北京天为时代生物科技公司; 载体构建用的限制性核酸内切酶基因、反转录酶、克隆载体等购自普洛麦格公司。其他试剂均为分析纯。测序分析委托北京爱博公司进行。

**1.2 IGF 基因的克隆和表达载体的构建** 按照《分子克隆》方法和试剂盒说明<sup>[4]</sup>, 采用 Trizol 试剂盒提取人胎盘组织的总 RNA, 利用 AMV 反转录试剂盒将人总 RNA 反转录成 cDNA, 所采用的扩增引物为: P<sub>1</sub>(5'-CGAATTCACAATGGGAA-TCCCAAT-3'), P<sub>2</sub>(5'-GAAAGCTTGCAGTTTGTCTCACTTC-3')。

以 cDNA 为模板, 用 LA Taq 酶扩增 IGF 基因, 电泳后回

收 571 bp 目标带, 连接 pGEMT 载体, 转化大肠杆菌后进行酶切和 PCR 鉴定。选阳性菌落的质粒, 采用 EcoR 和 Hnd 双酶切载体, 电泳后回收 559 bp 小片段, 提取 pcDNA3.1A 质粒, 用同样的 2 种酶进行双酶切, 并对载体进行 CIAP 脱磷酸基处理, 将载体与 IGF 酶切产物连接, 转化大肠杆菌, 对阳性菌落进行双酶切检验和测序分析, 验证无碱基突变后大量提取质粒。

**1.3 重组质粒的大量提取和浓度、纯度分析** 挑取鉴定为阳性的单菌落接种于 100 ml 含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中, 37℃ 振荡培养过夜, 用质粒大量提取方法<sup>[4]</sup>提取 pcDNA 3.1-IGF, 提取后进行电泳检测, 浓度测定采用分光光度法, 样品 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 接近 1.8 时可以使用。样品浓度低于 2 ng/ml 时进行乙醇沉淀, 重新溶解; 样品浓度较大时, 用 PBS 稀释至使用浓度。

表 1 注射含基因 IGF 的重组质粒 DNA 的小鼠

Table 1 The mice injected with recombinant plasmid DNA of IGF gene

组别 Group	肌肉注射的小鼠编号 Code of mice intramuscular injection	皮下注射的小鼠编号 Code of mice with intradermal injection
初次免疫 First immunity	1, 11	2, 13
2 次免疫 Second immunity	4, 5	6, 14
3 次免疫 Third immunity	8, 9	10, 15
对照 Control	3, 7, 12	16, 17, 18

**1.4 小鼠免疫方案** 将提取的质粒溶于 0.01 ml/L PBS 溶液中至最终注射浓度为 1 ng/ml<sup>[2,5]</sup>。采用后腿肌肉和皮下 2 种免疫途径, 平均每只注射 50 μl PBS 或重组质粒 DNA 进行多点注射。初次免疫的小鼠免疫 2 周后取血; 2 次免疫的小鼠免疫 2 周后, 对小鼠加强免疫; 3 次免疫的小鼠每隔 2 周对小鼠免疫 1 次, 免疫 3 次<sup>[6-7]</sup>。设注射 PBS 溶液的组为对照组。注射含基因 IGF 的重组质粒 DNA 的小鼠见表 1。各组在最后一次免疫后 2 周对小鼠进行摘眼球采血。收集血清至 1.5 ml 离心管中, 将所采得的新鲜血液 4 000 r/min 离心 10

**作者简介** 刘春香 (1974-), 女, 黑龙江望奎人, 博士, 副教授, 从事分子生物学方面的研究。

收稿日期 2008-07-14

min, 取上清, 重复1次, 4℃保存, 备用。长期保存的血清, 应加浓度15%甘油于-20℃保存。

### 1.5 抗体特异性检测和效价分析

**1.5.1 Western blot (SDS PAGE) 检测抗体特异性。**取冷冻保鲜的人体胎盘组织1g, 加入1ml 样品处理液<sup>[8]</sup>, 于冰上研磨处理。将混合液转入离心管中, 12 000 r/min 离心2 min。取上清, -20℃保存备用。向人体胎盘组织蛋白中, 加等体积上样缓冲液, 95℃变性3 min, 置冰上2 min。对提取的人体胎盘总蛋白用浓度15%凝胶进行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS PAGE)<sup>[8]</sup>。转膜采用连续缓冲液半干转移法。硝酸纤维素膜用前于连续缓冲液中浸泡, 并用玻璃棒驱除气泡, 上下各3层湿润滤纸。盖上带正电极的上盖, 恒流80 mA, 冰上转移2 h。转膜后, 浓度0.5%丽春红染色观察胎盘总蛋白的分离和转膜效果, 剪膜并标记方向, PBS 冲洗至无色, 用浓度3%BSA 封闭过夜(4 h)。以购买的标准IGF-1 抗体(一抗)为对照, 随机选择自制抗体(一抗)分别进行杂交、洗膜、二抗杂交、洗膜, 显色时将2种处理一起摆放, 加DAB显色液, 终止显色反应, 观察结果并照相。

**1.5.2 斑点印迹杂交检测抗血清效价和免疫效果。**将硝酸纤维素膜剪成多个小块, 分别标记鼠号、抗血清的稀释浓度。

用微量移液器将微量IGF-1 蛋白等量点到膜上, 然后采用半干转膜法将蛋白固定30 min。取出膜后, 封闭。用浓度3%BSA 配制的各小鼠一抗滴加到膜上, 分别进行杂交。其中, IGF-1 抗体以1:400 稀释为阳性对照, 以注射PBS 溶液小鼠的血清为阴性对照。以不加一抗的斑点为另一阴性对照, 注射IGF-1 的小鼠抗血清分别稀释200、500、1 000 倍点样。采用Western blot 方法, 进行杂交、显色。

## 2 结果与分析

**2.1 IGF-1 基因的克隆和重组子的鉴定**由图1可知, 经RT-PCR 方法扩增IGF-1 基因, 获得571 bp 目标片段。将该片段连接到pGEMT 载体上, EcoR 与 Hnd 双酶切检验结果与理论值相符, 切割出559 bp 目标序列, 结果见图2。经测序分析, 与Genbank 上登陆的人IGF-1 基因编码序列完全一致。再将获得的IGF-1 基因克隆到pcDNA3.1 上, 选择EcoRI 与 Hnd 双酶切表达载体和克隆载体, 回收559 bp 目标片段, 连接到表达载体上, 转化大肠杆菌, 提取质粒DNA 进行酶切检测, 结果见图3。从图3可以看出, 检测值与理论值相符, 有559 bp 的目标序列。经测序分析, 目标序列没有发生突变, 可以用于基因免疫。

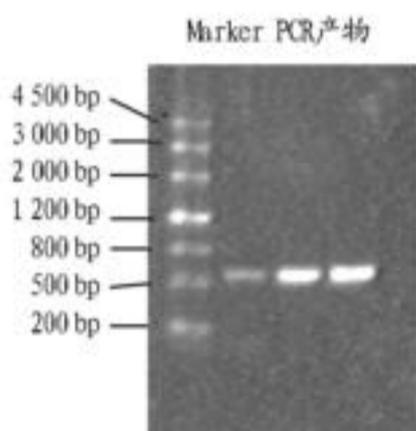


图1 RT-PCR 扩增的人IGF-1 基因

Fig.1 RT-PCR amplification of human IGF-1 gene

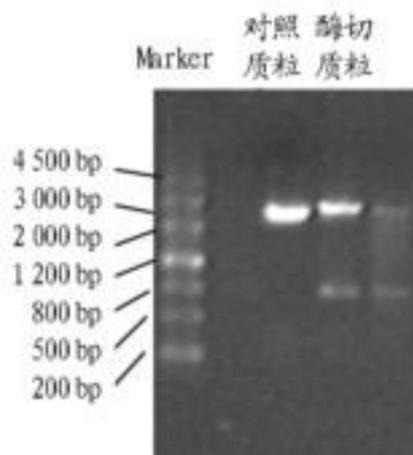


图2 pGEMT-IGF1 质粒的双酶切

Fig.2 Double enzyme digestion of pGEMT-IGF1 plasmid

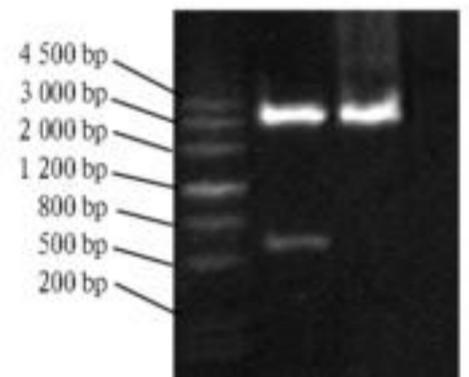


图3 pcDNA3.1-IGF1 质粒的双酶切验证

Fig.3 Enzymes product of pcDNA3.1-IGF1 plasmid digested by EcoR and Hnd

**2.2 小鼠血清抗体特异性结果**采用SDS PAGE 法电泳人体胎盘总蛋白, 转膜后经丽春红染色发现蛋白质已经得到分离并转移到膜上, 用购买的标准抗体作为阳性对照, 与自制的抗体分别杂交。从图4可以看出, 蛋白质杂交带只有1条, 在靠近电泳正极处, 而且阳性对照与被测抗体杂交结果完全一致。这说明该试验制备的抗体达到商用IGF-1 抗体的特异性标准。



注: 左、右分别为标准抗体、自制抗体。

Note: Left: Standard antibody; Right: Producing antibody.

图4 胎盘蛋白的Western blot 结果

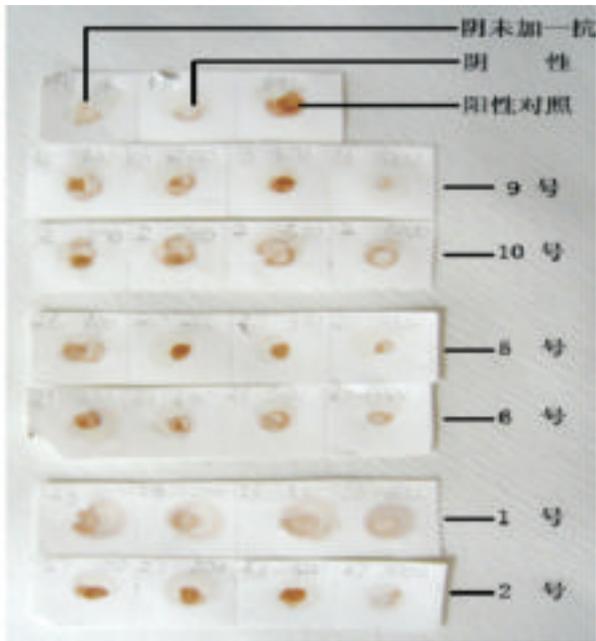
Fig.4 Western blot results of embryonic disc protein

**2.3 小鼠血清抗体效价检测结果**采用斑点印记法检测自制小鼠抗体的效价, 发现免疫处理的小鼠均不同程度地显示

阳性, 对照组均呈现阴性。从图5可以看出, 未加IGF-1 一抗和注射PBS 溶液的小鼠血清斑点印迹都很浅, 而且颜色深度一致, 说明未注射IGF-1 重组质粒的小鼠体内没有产生抗体, 且阴性对照与稀释了1 000 倍血清斑点印迹显色程度类似, 说明1:1 000 的稀释倍数下不能检测抗体效价。通过肌肉注射的1、5、9 号和通过皮下注射的2、6、10 号在1:500 的稀释条件下均呈棕红色阳性结果, 说明注射了IGF-1 重组质粒的小鼠体内产生特异性抗体; 初次免疫的1、2 号小鼠, 2 次免疫的5、6 号小鼠和3 次免疫的9、10 号小鼠, 其抗体效价几乎一致, 都为1:500。由此可以推断, 小鼠抗血清效价为1:500。

**2.4 不同免疫方式的比较**就免疫方式来看, 虽然抗体效价几乎一致, 但从显色程度来分析, 不同的免疫方式之间有很大差别。初次免疫的1、2 号小鼠相比, 2 号比1 号斑点显色深。这说明注射等量的质粒DNA, 皮下注射要比肌肉注射免疫速度快、效果好。但随着免疫次数的增加, 免疫效果差异不再明显。就肌肉注射方式而言, 初次免疫的2 号小鼠, 2 次免疫的5 号小鼠以及3 次免疫的9 号小鼠, 随着免疫次数的增加, 斑点显色越来越深, 免疫效果越来越好。而以皮下

注射方式免疫的小鼠则不同,初次免疫的2号、2次免疫的6号以及3次免疫的10号小鼠,以单一稀释倍数来看,尽管免疫次数增加,但显色情况没有多大变化。其他小鼠的斑点印迹也显示类似的规律。



注:由左到右一抗的比例分别为1:100、1:200、1:500、1:1000。

Note: From left to right, the ratios of antibodies are 1:100, 1:200, 1:500 and 1:1000, respectively.

图5 斑点杂交效价检测

Fig.5 Effective detection on dot protein blotting

### 3 讨论

外源基因在小鼠体内可以表达,并且产生异体生物的蛋白质。该蛋白质可刺激机体产生免疫反应,形成特异性抗体。不同蛋白的免疫源性不同。试验表明,小鼠和人IGF-1基因这样氨基酸序列同源性较高、氨基酸序列较短的基因可以刺激机体产生免疫应答。由此推测,核酸免疫的成功率较高。影响成功的关键因素为抗原本身的性质<sup>[3]</sup>。由于基因的分泌型表达对免疫反应很重要<sup>[9]</sup>,该试验所选基因为分泌型表达。

DNA免疫常用的接种方式为纯DNA肌肉注射,操作简便。然而随着研究的深入,发现该接种方式存在弊端,主要是仅有少部分肌细胞摄取DNA,且DNA暴露于组织间液核酸酶的攻击之下易造成降解,DNA用量要求相对较大。有报道指出,脂质体、聚乙烯胺等可以保护DNA,提高转染效率,

然而脂质体的价格较高,使得许多研究只能停留在实验室水平<sup>[10]</sup>;基因枪法也可以提高免疫效率。提高质粒浓度和改变免疫方式都可以达到提高免疫应答的目的。

该试验观察了含IGF-1基因的重组质粒DNA经肌肉和皮下2种途径,对小鼠进行股四头肌和皮下注射免疫。经免疫印迹法试验,检测到表达蛋白能被IGF-1抗原所识别,刺激机体产生抗体,且肌肉注射与皮下注射诱导产生抗体的效价相似,但速度不同,皮下注射要比肌肉注射免疫速度快。这可能与抗原提呈细胞含量不同有关。皮下组织抗原提呈细胞较为丰富,肌肉组织提呈抗原的效率较低<sup>[11]</sup>。但有些报道认为,皮下免疫效果不如肌肉注射<sup>[12]</sup>。这可能与所选基因的表达有关。肌肉注射方式免疫效果受免疫次数的影响,免疫次数较多则效果较好;而皮下注射方式免疫效果快,初次免疫即可产生较明显的免疫效果。因此,对于分泌型蛋白或免疫原性较高的蛋白,可以采用高浓度质粒皮下免疫的方式快速制备科学研究用的抗体。若不考虑时间因素,则多次肌肉注射成功率较高。

### 参考文献

- [1] WOLFF J A, MALONE R W, WILLIAMS P, et al. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo [J]. *Science*, 1990, 247: 1465 - 1468.
- [2] 车小燕, 钱其军, 刘思行, 等. 特异性靶向的戊肝嵌合DNA疫苗的构建及免疫效果研究 [J]. *第一军医大学学报*, 2002, 22(2): 97 - 101.
- [3] 杨丽琛, 朱祯, 杨晓光, 等. 利用DNA免疫法制备植物选择标记基因hpt表达蛋白抗体的研究 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2003, 19(3): 248 - 251.
- [4] 萨姆布鲁克, E.F. 弗里奇. 分子克隆实验指南 [M]. 北京: 科学出版社, 1992.
- [5] YASEMIN BULUT, HAKAN BULUT, MEHMET ZIYA DOYMAZ. Immunization of mice with plasmid DNA encoding hepatitis B virus core antigen (HBcAg) [J]. *Turk J Med Sci*, 2003, 33: 61 - 63.
- [6] 高慧, 孙强, 黄正芳, 等. 地方株HPV16L1基因免疫小鼠诱发的抗体反应 [J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2005, 25(3): 226.
- [7] 张志方, 张春艳, 潘敬运, 等. 基因免疫制备抗人ElyS单克隆抗体及单抗特性分析 [J]. *中国病理生理杂志*, 2002, 18(6): 625 - 629.
- [8] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛, 等. 生化实验方法和技术 [M]. 2版. 北京: 高等教育出版社, 1997: 100 - 106.
- [9] MICHAEL A B, STEPHEN A F. Biological features of genetic immunization [J]. *Ilseier Sci Ltd*, 1997, 15(8): 788 - 791.
- [10] LEMKINE G F, DEMENEIX B A. Polyethylene imines for in vivo gene delivery [J]. *Gen Ther*, 2001, 3(2): 178 - 182.
- [11] 郭虹, 陈冠今, 郑焕钦, 等. 含弓形虫ROP1基因真核表达重组质粒DNA免疫小鼠的研究 [J]. *中国人兽共患病杂志*, 1999, 15(6): 11 - 13.
- [12] 周旭, 李益民, 侯玲, 等. 轮状病毒DNA疫苗的制备及抗体应答 [J]. *中国生物制品学杂志*, 1999, 12(2): 72 - 74.
- [9] DARRAHP R, JUNGK A. Phosphatase activity in the rhizosphere and its relation to the depletion of soil organic phosphorus [J]. *Biology Fertility Soils*, 1991, 3: 199 - 204.
- [10] RENGEL Z. Root exudation and microflora populations in the rhizosphere of crop genotypes differing in the tolerance to micronutrient deficiency [J]. *Plant Soil*, 1992, 196: 255 - 260.
- [11] MARIINL TOLEDO MV. Root exudates of zeans and production of auxins, berellins and cytokinins by *Acetobacter chroococcum* [J]. *Plant and Soil*, 1988, 1(10): 149 - 155.
- [12] MARSCHNER P, CROWLEY D E. Root exudation and physiological status of a root colonizing fluorescent pseudomonad in mycorrhizal and non-mycorrhizal pepper (*Cap sicum annum L.*) [J]. *Plant Soil*, 1997, 189: 11 - 20.

(上接第10280页)

- [3] 孙瑞莲, 朱鲁生, 赵秉强, 等. 长期施肥对土壤微生物的影响及其在养分调控中的作用 [J]. *应用生态学报*, 2004, 15(10): 1907 - 1910.
- [4] 中国科学院南土所微生物室. 土壤微生物研究方法 [M]. 北京: 科学技术出版社, 1985: 51, 248 - 275.
- [5] 杜秉海. 微生物实验 [M]. 北京: 北京农业大学出版社, 1994: 49 - 52.
- [6] 鲁如坤. 土壤-植物营养学 [M]. 北京: 化学工业出版社, 1998.
- [7] WEMBOURGF R, BILLES G. Stimulating carbon transfers in the plant rhizosphere [C] // HARLEY J L, RUSSELL R S, eds. *The soil-root interface*. London: Academic Press, 1979: 183 - 196.
- [8] LYNCH J M, WHIPPS J M. Substrate flow in the rhizosphere [J]. *Plant Soil*, 1990, 129: 1 - 10.