应用琼脂免疫扩散实验鉴定甲胎蛋白与热休克 70 蛋白的连接

丁 美[1]，赵 军[1]，张丽洁[2]，段钟平[1]，刘 霜[1]，陈 煜[1]

（1. 首都医科大学附属佑安医院北京市人工肝治疗培训中心，北京 100069；
2. 首都医科大学附属佑安医院病理中心，北京 100069）

摘要：目的：应用琼脂免疫扩散实验鉴定甲胎蛋白（alphafetoprotein，AFP）与热休克 70 蛋白（heat shock protein 70，HSP70）是否交联。方法：在含 0.1 mg/L 溴酚蓝的凝胶琼脂板上，进行 2 次琼脂免疫扩散实验，第 1 次是用 AFP-HSP70 交联蛋白和 AFP 抗体进行琼脂免疫扩散，把扩散后沉淀带处理后再次和 HSP70 抗体进行琼脂免疫扩散。结果：2 次均出现典型的沉淀带。结论：建立的方法简单、快捷，可适于临床和科研工作。

关键词：免疫学；甲胎蛋白；热休克 70 蛋白；琼脂扩散实验
中图分类号：R392 **文献标识码**：A **文章编号**：1674-2850(2009)12-2457-4

Determination of the cross-linking between AFP and HSP 70 by agar gel double immunodiffusion test

DING Mei[1], ZHAO Jun[1], ZHANG Lijie[2], DUAN Zhongping[1],
LIU Shuang[1], CHEN Yu[1]

(1. *Beijing Training and Treatment Center for Artificial Liver, Beijing Youan Hospital, Capital Medical University, Beijing* 100069, *China*;
2. *Department of Pathology, Beijing Youan Hospital, Capital Medical University, Beijing* 100069, *China*)

Abstract: Objective: To identify the cross-linking of alphafetoprotein (AFP) and heat shock protein 70 (HSP70) via agar gel double immunodiffusion test (AGID). Methods: Agar gel immunodiffusion test was conducted twice in agar gel plate with 0.1 mg/L bromophenol blue, first, agar gel immunodiffusion test was carried out with AFP-HSP70 cross-linking protein and AFP antibody, then the test was conducted again with the processed precipitation band and HSP70 antibody. Results: The typical band appeared in the two agar gel immunodiffusion test. Conclusion: The method is simple, accurate, and is suitable for the application on clinical diagnosis and research.

Key words: immunology; alphafetoprotein; heat shock protein 70; agar gel diffusion test

0 引言

AFP 与 HSP70 交联后是否形成复合物，其鉴定方法有很多种，选用琼脂免疫扩散实验鉴定 AFP 与 HSP70 是否交联。免疫共沉淀（co-immunoprecipitation）是用于研究抗原抗体相互作用的经典方法[1]，并在临床检测中广泛使用[2~3]，其原理是：如果用蛋白质 X 的抗体免疫沉淀 X，那么与 X 结合的蛋白质 Y 也能沉淀下来。这种方法常用于测定 2 种目标蛋白质是否结合，也可用于确定一种特定蛋白质的新作用。

双向琼脂扩散实验是医学微生物与免疫学中的一种常用血清学实验。其原理是利用可溶性抗原抗

基金项目：国家自然科学基金青年科学基金（30800517）；高等学校博士学科点专项科研基金（20070025009）
作者简介：丁美（1980—），女，检验师，主要研究方向：分子生物学、传染病. E-mail：dingmeizi@yahoo.com.cn

体在半固体琼脂凝胶内扩散，若抗原抗体对应，且二者比例合适，在其扩散的某一部分就会出现白色的沉淀线。由于介质琼脂凝胶在较低浓度凝固时呈乳白色，而抗原-抗体复合物的沉淀线也呈白色或乳白色，二者颜色接近，给观察带来一定的困难，所以在琼脂凝胶中附加一定浓度的溴酚蓝进行双向琼脂扩散实验，利用沉淀线与凝胶背景之间的反差，可明显提高双向琼脂扩散实验的敏感性[4]。

1 材料与方法

1.1 材料

硝酸纤维素（nitrocellulose，NC）膜；HSP70单克隆抗体（Santa Crus公司）；羊抗兔IgG-HRP，二氨基联苯胺（diaminobenzidine，DAB）显色试剂盒（北京中杉金桥生物技术有限公司）；ECL化学发光试剂盒（E2500 HyGLO HRP Detection Kit）；X光胶片（Kodak公司）；透析袋（MD 44114直径22 mm）；BCA蛋白定量Kit（Pierce公司）；胎牛血清购自Gibco/BRL公司；磷酸钙转染试剂盒、硫酸铜、S2细胞培养基、脂质体Lipofectamine 2000均购买自Invitrogen公司；酵母提取物、胰蛋白胨购自华美生物工程公司；丙烯酰胺、过硫酸铵、尿素、限制内切酶、蛋白分子量均购自宝泰克生物公司。

1.2 HSP70的提取与鉴定

根据大肠杆菌在热激条件下HSP70表达明显增加的特性，准备从热激的大肠杆菌中分离HSP70，培养大肠杆菌 *E. coli* BL 21，挑取单个BL 21菌落放入LB培养基中，37℃恒温水平摇床中振摇过夜。把培养过夜的菌液转移到100 mL培养基中，继续37℃恒温水平摇床中振摇4 h左右，使培养基的浓度达到光密度（optical density，OD）值0.9. 然后将菌液放到42℃恒温水平摇床中热激培养4 h，终止培养。收集热激后的菌体，－80℃反复冻融3次，裂解菌体。经SDS-PAGE电泳，免疫印迹（Western Blot）鉴定后纯化蛋白。

1.3 AFP在果蝇Schneider-2细胞中的表达、鉴定与纯化

构建AFP-pBIP-V5-His表达载体后在Schneider-2（S2）果蝇细胞中磷酸钙转染，当细胞生长达到对数期（2×10^6～4×10^6个/mL）或转染后1～4 d时，培养基中加入终浓度达500 μmol/L的$CuSO_4$溶液（例如：诱导3 mL培养基，加15 μL 100 mmol/L $CuSO_4$溶液），诱导24 h后检测蛋白，经SDS-PAGE电泳，Western Blot鉴定后用选择培养基保存表达AFP的稳定S2细胞株，从而大量培养表达AFP的稳定S2细胞，利用His可与Ni^{2+}螯合的特性，使His标签蛋白结合在Ni-NTA纯化介质上，未结合的蛋白被洗涤下去，结合在介质上的蛋白经过一定浓度的咪唑或低pH值缓冲液温和洗脱，得到高纯度的AFP.

1.4 AFP和HSP70在体外的连接

采用戊二醛作交联剂的一步法，使AFP和HSP70的氨基分别与戊二醛的两个醛基结合。取已纯化定量的AFP 1 mL（1 g/L）和HSP70 1 mL（1 g/L）混合在一起。装入透析袋，用0.01 mol/L，pH值为7.2磷酸盐缓冲液（phosphate buffered saline，PBS）4℃透析18 h，换液3次；加入2.5%戊二醛20 μL，室温（20±5)℃放置2 h；4℃ 0.01 mol/L，pH值为7.2 PBS透析过夜，换液3次；移入0.05 mol/L，pH8.0 Tris-HCl缓冲液中，4℃透析过夜，换液3次；收集透析液分装，－20℃保存，即为AFP-HSP70复合物。

1.5 AFP与HSP70连接后的鉴定

凝胶琼脂板的制备：称取1 g精制琼脂粉，加入100 mL蒸馏水，置沸水浴中充分溶解后，加25 mg/L溴酚蓝溶液0.4 mL，混匀。取约3.5～4.0 mL液体趁热倒入一张洁净玻片上，待凝固后用直径5 mm的打孔器按六角形打孔，孔径3 mm左右，周围孔与中间孔间的距离为3 mm左右。用注射针头挑出孔内琼脂块。加样中间孔加AFP-HSP70交联蛋白，周围孔可根据实验需要加抗AFP抗体（已知抗体），于4℃下保温24～48 h，观察两孔之间有一白色的抗原抗体沉淀带，此沉淀带为AFP抗

体与 AFP-HSP70 结合形成。把沉淀带切割下来研碎，使抗原抗体复合物充分解离出来，10 000 r/min 离心 51∶100 稀释的 HSP70 抗体，4℃下保温 24～48 h，观察结果在两孔之间有一白色的抗原抗体沉淀带，此沉淀带为 HSP70 抗体与 AFP-Ab-AFP-HSP70 结合形成。由此证明 AFP 与 HSP70 已交联在一起。

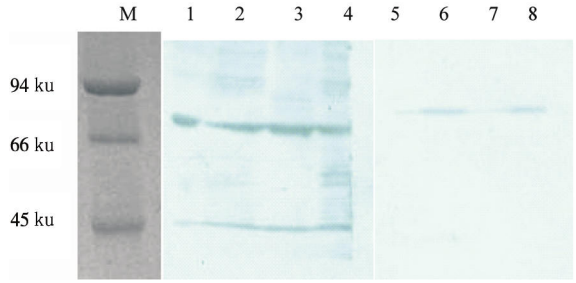
2　实验结果

2.1　HSP70 蛋白的鉴定与纯化结果

从热激的大肠杆菌中能够分离 HSP70 蛋白，并纯化后鉴定，结果如图 1 所示。

2.2　AFP 在果蝇 Schneider-2 细胞中的表达、鉴定与纯化结果

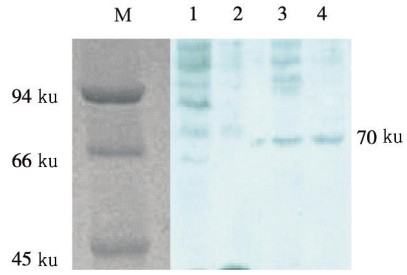
构建 AFP-pBIP-V5-His 表达载体后在 Schneider-2（S2）果蝇细胞中磷酸钙转染，用 500 μmol/L $CuSO_4$ 溶液诱导蛋白后，用选择培养基保存表达 AFP 蛋白的稳定 S2 细胞株，并用 His 标签洗脱纯化后鉴定，如图 2 所示。



注：M 为小分子量标准蛋白；1，3 为热激后的菌体；2，4 为未热激的菌体；5，6，7，8 为纯化后的 HSP70

图 1　HSP70 蛋白的表达与纯化结果

Fig. 1　Result of HSP70 protein expression and purification



注：1－空载体表达结果；2－空 S2 细胞表达结果；3－AFP-pMT-BiP-his 48 h 表达结果；4－AFP-pMT-BiP-his 72 h 表达结果

图 2　AFP 在果蝇 Schneider-2 细胞中的表达、鉴定与纯化结果

Fig. 2　Result of AFP protein expression, identification and purification in Schneider-2 cells

2.3　AFP 与 HSP70 连接后的鉴定

AFP 蛋白和 HSP70 蛋白经戊二醛交联后，首先用 AFP 抗体做免疫琼脂扩散，发现两孔之间有 AFP 抗体与 AFP-HSP70 蛋白形成的沉淀带，把沉淀带切割下来研碎，使抗原抗体复合物充分解离出来，再用 HSP70 抗体做免疫琼脂扩散，现两孔之间有 HSP70 抗体与 AFP-Ab-AFP-HSP70 蛋白形成的沉淀带，如图 3、图 4 所示。

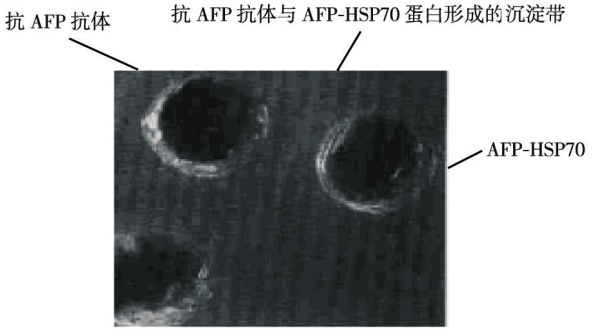


图 3　AFP 抗体与 AFP-HSP70 复合物扩散结果

Fig. 3　Result of the agar immunodiffusion test with AFP-HSP 70 cross-linking protein and AFP antibody

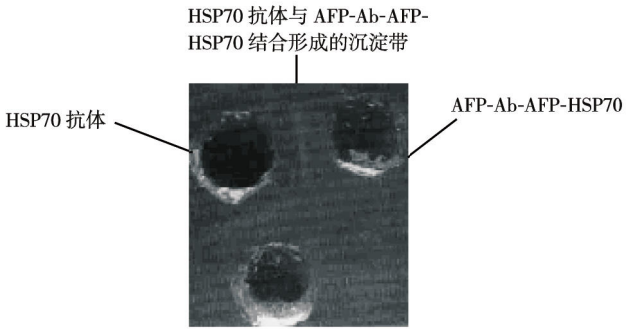


图 4　HSP70 抗体与 AFP-Ab-AFP-HSP70 复合物扩散结果

Fig. 4　Result of the agar immunodiffusion test with AFP-Ab-AFP-HSP70 cross-linking protein and HSP70 antibody

3 讨论与结论

琼脂糖是一种含有硫酸基的多糖体，高温时能溶于水，遇冷后凝成凝胶，内部形成一种多孔的网状结构，而且孔径很大，可允许大分子物质（分子量可达百万以上）自由通过。琼脂糖具有很好的化学稳定性，凝胶后含水量大，透明度好，来源方便，因此是一种很好的扩散介质。抗原和抗体的分子量一般都在20 ku以下，在凝胶中基本呈自由扩散形式。当抗原与相应抗体经扩散后在凝胶中相遇，形成抗原抗体复合物。由于复合物的分子量增大，颗粒增大，因而不再继续扩散而产生线状或带状沉淀[5]。研究根据免疫共沉淀的原理和方法，用两次琼脂糖胶双向扩散的方法，验证AFP和HSP70连接是否成功。首次琼脂糖胶双向扩散用AFP抗体与AFP-HSP70复合物结合，出现沉淀。如果AFP-HSP70连接成功，则沉淀中应有AFP成分。所以将沉淀带的蛋白再解离，与HSP70抗体再次进行琼脂糖胶双向扩散，再次可见沉淀带，说明AFP和HSP70连接成复合物。证明应用琼脂糖胶双向扩散实验能够鉴定AFP与HSP70是否连接成功，为下一步工作奠定了基础。

[参考文献] (References)

[1] 范坤晓，陈如玉. 鸡新城疫琼脂扩散试验抗原的研究[J]. 浙江农业学报，1992，4 (4)：194～197.
FAN K X，CHEN R Y. Studies on agar gel precipitin antigen of newcastle disease virus[J]. Acta Agriculturae Zhejianggensis，1992，4(4)：194～197. (in Chinese)

[2] CARRIER S P，BOULANGER P，BANNISTER G L. Equine infectious anemia：sensitivity of the agar-gel immunodiffusion test，and the direct and the indirect complement-fixation tests for the detection of antibodies in equine serum[J]. Can. J. Comp. Med.，1973，37(2)：171～176.

[3] BARROUIN-MELO S M，POESTER F P，RIBEIRO M B，et al. Diagnosis of canine brucellosis by ELISA using an antigen obtained from wild Brucella canis[J]. Res. Vet. Sci.，2007，83(3)：340～346.

[4] 张文平，钟有添，王小丽. 实验教学中双向琼脂扩散法的改进[J]. 赣南医学院学报，2005，25 (2)：283～284.
ZHANG W P，ZHONG Y T，WANG X L. Modified double diffusion method in experiment teaching[J]. Journal of Gannan Medical University，2005，25(2)：283～284. (in Chinese)

[5] ZHANG Y P，LI J，KOU Z，et al. Isolation and identification of duck parvovirus 04Nb strain and sequence analysis of rep gene[J]. Virologica Sinica，2006，21(2)：173～177.