

抗人线粒体核糖体小亚基蛋白 17 单克隆抗体的制备和鉴定

杨 斌 郝 飞* 杨希川 杨卫兵

(第三军医大学西南医院皮肤科, 重庆 400038)

摘要 以纯化人线粒体核糖体小亚基蛋白 17 (MRPS17)免疫 BALB/c 小鼠, 经细胞融合和 ELISA 法筛选成功获得 1 株抗 MRPS17 杂交瘤细胞。以所获特异性单抗作为一抗, 使用 Western 印迹、免疫组化和免疫荧光等方法检测标本中 MRPS17。结果显示: Western 印迹检测人骨骼肌组织、黑素瘤组织和体外培养 HeLa 细胞提取蛋白质, 在分子量约 13 kDa 处有一特异性条带, 与阳性对照纯化 MRPS17 相一致; 免疫组化检测石蜡切片标本显示人骨骼肌细胞和恶性黑素瘤细胞胞浆中强阳性着色; 细胞免疫荧光检测于培养的 HeLa 细胞, 可见细胞核周围胞浆部位颗粒状绿色荧光, 其分布与线粒体特异性荧光探针(MitoTracker Red CM-H2XROS)的荧光分布一致。说明成功制备了具有高度特异性并可适用于多种检测方法的抗人 MRPS17 单抗, 应用该单克隆抗体对人 MRPS17 进行了亚细胞水平定位, 为线粒体生物学相关研究提供了新的研究工具。

关键词 线粒体; 人线粒体核糖体小亚基蛋白 17; 单克隆抗体

线粒体核糖体(mitochondrial ribosome)位于线粒体基质内, 负责翻译合成线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA)编码的 13 种氧化磷酸化必需蛋白质, 在维持线粒体正常结构和功能中起重要作用。线粒体核糖体小亚基蛋白 17 (mitochondrial ribosomal protein S17, MRPS17)是线粒体核糖体蛋白的一种, NCBI UniGene 数据库相关数据(Cluster Hs.44298)表明: 在组织发育、分化、转化、癌变等多种病理或生理过程中, MRPS17 表达均有明显变化。分子遗传学分析表明 MRPS17 基因与 Russell-Silve 综合征基因遗传位点之间存在连锁关系^[1]。MRPS17 基因表达缺失的酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)表现为明显异常的小菌落(*petite colony*), 线粒体功能受损^[2]。宋志强等^[3]发现 MRPS17 基因在凝集性生长人毛囊毛乳头细胞和非凝集性生长人毛乳头细胞间存在明显表达差异。杨卫兵等^[4]研究证实 MRPS17 基因在人毛囊毛乳头细胞表达, 其表达可能与毛乳头细胞的分化和功能状态有关, 将 MRPS17 基因真核表达质粒转入人毛乳头细胞中可使其出现幼稚化改变。我们在以往的研究中对人 MRPS17 进行了表达纯化, 本研究拟在此基础上制备并鉴定 MRPS17 蛋白的单克隆抗体, 为后续相关线粒体生物学研究打下基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

纯化人 MRPS17 由本组制备(另文报道); 融合用聚乙二醇(分子量 4 000, 含 10% 二甲亚砜)、HAT 和 8- 氮杂鸟嘌呤购自美国 Sigma 公司; 单抗亚类鉴定试剂盒购自美国 Roche 公司; MitoTracker Red CM-H₂XROS 购自美国 Molecular Probe 公司; FITC 标记羊抗鼠 IgG 和 HRP 标记羊抗鼠 IgG 购自北京中山试剂公司。

1.2 细胞、动物和组织样本

BALB/c 小鼠(雌性, 20 g, 8~12 周龄)购自本校实验动物中心; SP2/0 小鼠骨髓瘤细胞和人 HeLa 细胞由本校临床微生物与免疫教研室提供; 人骨骼肌组织、恶性黑素瘤组织来自本院。

1.3 小鼠免疫、细胞融合及克隆化培养

以纯化的 MRPS17 融合蛋白为抗原免疫 BALB/c 小鼠, 时间为第 0、28、42 天, 所用总蛋白量为 250 μ g。末次免疫后第 3 天, 无菌取 BALB/c 小鼠

收稿日期: 2005-07-22 接受日期: 2005-09-30

国家自然科学基金(No.30300180)和重庆市自然科学基金(No.CSTC2004BB5043)资助项目

* 通讯作者。Tel: 023-68754416, Fax: 023-65462522, E-mail: haoifei@mail.tmmu.com.cn

脾细胞与骨髓瘤细胞 SP2/0 在聚乙二醇作用下进行细胞融合, 然后以含 15% 胎牛血清的 HAT 选择性培养基培养。细胞融合后第 10 天, 以纯化 MRPS17 为抗原, 用间接 ELISA 法检测培养上清液中的抗体, 选取吸光度(A)值较大的分泌抗体的杂交瘤细胞培养孔, 部分液氮冻存, 部分予以 3~4 次有限稀释克隆化培养, 直至克隆化细胞抗体阳性率为 100%。

1.4 诱生腹水

BALB/c 小鼠腹腔注射无菌液体石蜡 0.5 ml/只, 1 周后将扩大培养的阳性杂交瘤细胞接种至 BALB/c 小鼠腹腔(1×10^5 个/只), 1~2 周后收集腹水, 离心取上清液, -70°C 冻存。

1.5 抗人 MRPS17 抗腹水效价检测及亚类鉴定

2 $\mu\text{g/ml}$ MRPS17, 每孔 0.1 ml 包被酶标板作间接 ELISA 法检测抗体滴度。一抗为经倍比稀释的腹水, 二抗为 1:10 000 HRP 标记羊抗鼠 IgG, 经显色液显色, 测定 450 nm 处 A 值。抗体亚类取杂交瘤细胞培养上清液以单抗亚类试剂盒确定。

1.6 组织蛋白提取及免疫印迹法(Western 印迹)

人骨骼肌组织、黑素瘤组织及体外培养 HeLa 细胞经超声粉碎离心取上清液, 测定蛋白质浓度。取细胞和组织提取的 20 μg 总蛋白经 SDS-PAGE 电泳后电转移至硝酸纤维素膜(100 V, 1 h), 以含 50 g/L 脱脂奶粉的 TBST 缓冲液封闭后, 1:3 000 抗 MRPS17 腹水单抗 4°C 温育过夜, 洗膜, 1:10 000 HRP 标记羊抗鼠 IgG 室温温育 1 h, 洗膜, DAB 显色。设纯化 BSA 为阴性对照, 纯化 MRPS17 为阳性对照。

1.7 免疫组织化学

取人骨骼肌组织、黑素瘤组织石蜡包埋切片进行免疫组化染色, 经微波抗原修复后按常规方法进行染色, 一抗为 1:1 000 抗 MRPS17 腹水单抗。

1.8 细胞免疫荧光

人 HeLa 细胞培养于含玻片的 6 孔板中, 当细胞生长至合适密度时弃培养基, 加入用含血清 DMEM 培养基新鲜配置的 200 nmol/L MitoTracker Red CM-H2XRos 工作液置细胞培养箱内避光培养 0.5 h; PBS 洗玻片 3 次, 3.7% 甲醛(含血清 DMEM 培养基配置)摇晃作用 3 min 固定细胞; 含 0.2% Triton X-100 的 PBS 洗 3 次, 1:2 000 抗 MRPS17 腹水单抗 37°C 温育 1 h; PBS 洗 3 次后用 1:100 FITC 标记羊抗鼠 IgG 于 37°C 温育 1 h; PBS 洗 3 次后缓

冲甘油封片并用 Leica TC-SS-SP2 型激光共聚焦扫描显微镜观察, 不加任何处理的培养细胞作为对照。FITC 和 Mito Tracker Red 分别采用蓝色和绿色激光激发, 发射光为波长 599 nm 的红光和 516 nm 的绿光, 结果计算机存档。

2 结果

2.1 抗 MRPS17 杂交瘤细胞建株及单抗制备

细胞融合后以间接 ELISA 法筛选阳性克隆细胞, 获得一株杂交瘤细胞株, 进行有限稀释克隆化培养, 连续亚克隆 3 次, 第 3 次亚克隆后间接 ELISA 法检测阳性率达 100%。此株杂交瘤细胞液氮冻存半年, 复苏后仍生长良好, 并能持续稳定分泌单抗。用杂交瘤细胞(1×10^5 个/只)接种 BALB/c 小鼠腹腔诱生腹水, 约 2 周后采集腹水, 均呈血性。

2.2 抗 MRPS17 单抗效价及亚类测定

将小鼠腹水抗体作倍比稀释后, 以 ELISA 间接法测定抗体滴度, 抗 MRPS17 腹水单抗效价为 1:32 000。抗 MRPS17 单抗亚类取杂交瘤细胞株培养上清液确定, 属 IgG2a 亚类, κ 型。

2.3 Western 印迹检测 MRPS17

从人骨骼肌组织、黑素瘤组织及体外培养 HeLa 细胞提取蛋白质, 以抗 MRPS17 腹水单抗作 Western 印迹检测。各样本均于相对分子量约 13 kDa 处出现一条阳性条带, 与阳性对照纯化 MRPS17 处于同一水平, 而纯化 BSA 样本孔显示阴性结果, 表明抗 MRPS17 单抗仅针对 MRPS17, 具有高度的特异性(图 1)。

2.4 免疫组化检测 MRPS17 蛋白

应用抗 MRPS17 单抗对 3 名正常人骨骼肌及 5 例皮肤黑素瘤患者组织切片作免疫组化检测, 结果显示各标本骨骼肌细胞和黑素瘤细胞胞浆中均呈明显强阳性着色(图 2)。

2.5 免疫荧光检测 MRPS17

用激光共聚焦扫描显微镜进行观察可见人 HeLa



图 1 骨骼肌组织、黑素瘤组织及 HeLa 细胞提取蛋白 Western 印迹分析

1: 纯化 BSA; 2: 纯化 MRPS17; 3: 黑素瘤组织; 4: 正常骨骼肌组织; 5: HeLa 细胞; M: marker。

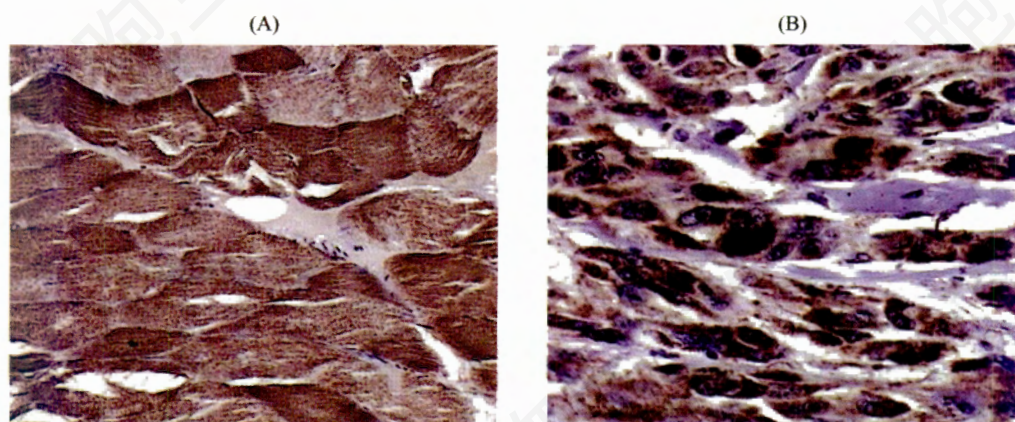


图2 MRPS17 免疫组化检测

A: 正常骨骼肌细胞胞浆 MRPS17 强阳性表达呈深棕色(400×); B: 黑素瘤细胞 MRPS17 强阳性表达呈深棕色(400×)。

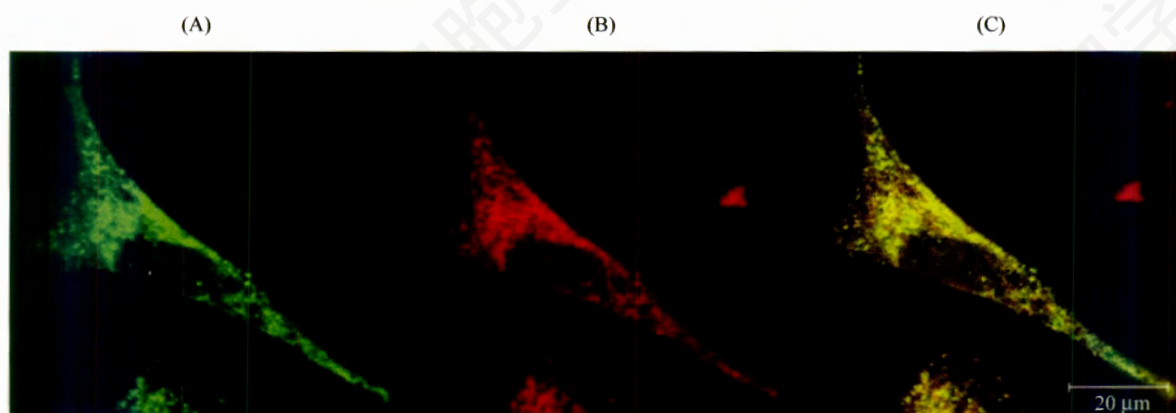


图3 免疫荧光检测 MRPS17

A: MRPS17 在 HeLa 细胞胞浆内阳性表达呈绿色点状荧光(400×); B: MitoTracker Red CM-H₂XROS 于 HeLa 细胞胞浆内, 在核周呈红色点状荧光(400×); C: 双通道激发下, 红光和绿光重叠形成黄色荧光, 颗粒状分布于胞浆中(400×)。

细胞中 FITC 受蓝色激光激发发出绿色荧光(图 3A), MitoTracker Red CM-H₂XROS 受绿色激光激发发出红色荧光(图 3B), 两种荧光均位于胞浆内, 在细胞核周围呈点状分布, 两者分布范围基本相同, 细胞核内未见荧光分布。同时采用蓝色和绿色激光双通道激发, 观察到红光和绿光重叠后形成的黄色荧光, 分布范围不变(图 3C)。

3 讨论

MRPS17 基因最初由我国学者在造血干细胞中发现, 当时将其命名为造血干细胞(hematopoietic stem/progenitor cell, HSPC)相关基因 HSPC011。2001 年进行的哺乳动物线粒体核糖体蛋白质组学研究中发现该基因的表达产物为线粒体核糖体 28S 小亚基蛋白组分之一^[5], 因其氨基酸序列与大肠杆菌属核糖体 30S 小亚基蛋白 S17 高度相似且具有同源

性, 后将其命名为 mitochondrial ribosomal protein S17 (MRPS17)。本研究组在已获得 MRPS17 全长 cDNA 克隆及原核表达蛋白的基础上, 进一步以纯化 MRPS17 为抗原, 通过杂交瘤技术建立了抗 MRPS17 杂交瘤细胞株, 此株杂交瘤细胞液氮冻存半年, 复苏后仍生长良好, 并能持续稳定分泌单抗, 说明该杂交瘤细胞株性能稳定, 建株成功。

应用此细胞株制备的抗 MRPS17 单抗, 经 Western 印迹法检测表明: 富含线粒体的骨骼肌组织及黑素瘤组织样本均于相对分子质量约 13 kDa(与 MRPS17 理论相对分子量基本一致)处出现一条阳性条带, 与阳性对照纯化 MRPS17 Western 印迹结果一致, 而纯化 BSA 样本孔显示阴性结果, 表明抗 MRPS17 单抗仅针对 MRPS17, 具有高度的特异性。

应用抗 MRPS17 单抗行免疫组化检测组织样本, 结果显示 MRPS17 在骨骼肌细胞和黑素瘤细胞中均

有强阳性表达, 为胞浆蛋白。进一步应用抗 MRPS17 单抗结合线粒体特异性探针 MitoTracker 进行免疫荧光检测体外培养的人 HeLa 细胞, 结果显示 HeLa 细胞胞浆中有丰富的 MRPS17 表达(绿色颗粒状荧光), 并且其分布与细胞内线粒体的分布(红色颗粒状荧光)基本一致, 说明 MRPS17 为线粒体蛋白, 此结果直观准确地显示了 MRPS17 的亚细胞定位, 与线粒体核糖体蛋白质组学研究结果一致^[5]。

我们在研究中应用所制备的抗 MRPS17 单抗进行 Western 印迹、免疫组化和免疫荧光检测结果显

示该单抗有高度的特异性, 可适用于多种检测方法, 可用于对 MRPS17 进行亚细胞水平精确定位, 结果直观可靠, 为进一步研究 MRPS17 在各种疾病病理生理过程中所起的作用及相关的线粒体生物学研究提供了新的技术手段。

参考文献 (References)

- [1] Sylvester JE *et al. Genet Med*, 2004, **6**: 73
- [2] Hanlon SE *et al. Yeast*, 2004, **21**: 1241
- [3] 宋志强等. *中华皮肤科杂志*, 2003, **36**: 513
- [4] 杨卫兵等. *中华皮肤科杂志*, 2003, **36**: 699
- [5] Cavdar Koc E *et al. J Biol Chem*, 2001, **276**: 19363

Preparation and Characterization of Monoclonal Antibody against Human Mitochondrial Ribosomal Protein S17

Bin Yang, Fei Hao*, Xi-Chuan Yang, Wei-Bin Yang

(Department of Dermatology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract BALB/c mice were immunized with purified mitochondrial ribosomal protein S17(MRPS17). Spleen cells were fused with SP2/0 cells using polyethylene glycol and hybridoma cells were selected by HAT medium and screened with ELISA. After rounds of cloning with limited dilution method, one hybridoma cell line was obtained which stably secret monoclonal antibody of IgG2a. The obtained antibody was used for samples assay by Western blot, immunohistochemical and immunofluorescence staining. Western blot showed that the antibody specifically recognized about 13 kDa protein. Immunohistochemical staining showed strong positive signals located in the cytoplasm of muscle cells and melanoma cells. Immunofluorescence staining showed green fluorescence mainly in the formation of a spotted distribution inside the cytoplasm of HeLa cells, which was identical to the distribution of mitochondria shown by mitochondrion-selective stains (MitoTracker Red CM-H2XRos). These results indicated that a MRPS17 monoclonal antibody with high specificity was developed, which could be used in Western blot, immunohistochemical and immunofluorescent techniques.

Key words mitochondria; human mitochondrial ribosomal protein S17; monoclonal antibody

Received: July 22, 2005 Accepted: September 30, 2005

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30300180) and Natural Science Foundation of Chongqing City (No.CSTC2004BB5043)

*Corresponding author. Tel: 86-23-68754416; Fax: 86-23-65462522, E-mail: haofei@mail.tmmu.com.cn