

基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyxh.001768

人 NGAL 克隆表达及抗体的制备与鉴定

王石磊¹, 靳鑫¹, 魏杰¹, 张祥¹, 阳媛¹, 牛司强², 汪德强³

(1. 重庆医科大学检验医学院临床检验诊断重点实验室, 重庆 400016; 2. 重庆医科大学附属第一医院检验科, 重庆 400016;
3. 重庆医科大学感染性疾病分子生物学教育部重点实验室, 重庆 400016)

【摘要】目的:高效表达人中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(neutrophil gelatinase-associated lipocalin, NGAL)重组蛋白并制备其多克隆及单克隆抗体。**方法:**人工合成经密码子优化的 NGAL 基因, 构建原核表达重组质粒 pW28-NGAL, IPTG 诱导表达后分离纯化并分析在溶液中的聚集状态; 获得的 rhNGAL 抗原免疫兔子制备多克隆抗体, 免疫小鼠筛选高效价的特异性单克隆抗体并鉴定抗体亚型; Protein G 亲和柱纯化, 等温滴定量热法及非竞争 ELISA 法检测抗体的亲和力, SDS-PAGE 分析纯度; 最后运用 Western blot, 免疫荧光和免疫组化对抗体进行鉴定。**结果:**高效获得高纯度 NGAL 重组蛋白, 主要以单体形式存在; 成功制备多抗, 同时筛选获得 6 株高效价单克隆抗体; 其中, 25 号单抗为 IgG1 亚型, 余者均属 IgG2a 亚型, 且 19、35 号单抗的亲合常数分别为 3.06×10^9 、 2.14×10^9 。SDS-PAGE 分析表明纯度均大于 90%。进一步的鉴定结果表明制备的抗体皆具有良好免疫反应性及特异性, 且单抗的特异性明显高于多抗。**结论:**本研究利用密码子优化技术高效表达制备了 NGAL 重组蛋白, 获得了其高效价多克隆抗体和高特异性单克隆抗体, 为 NGAL 的病理生理作用等功能研究提供了良好的实验材料, 为 NGAL 临床免疫检测诊断试剂的国产化奠定了有力的基础。

【关键词】密码子优化; 中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白; 多克隆抗体; 单克隆抗体

【中图分类号】R392.11

【文献标志码】A

【收稿日期】2018-04-08

Prokaryotic expression and preparation of antibody of human neutrophil gelatinase-associated lipocalin

Wang Shilei¹, Jin Xin¹, Wei Jie¹, Zhang Xiang¹, Yang Yuan¹, Niu Siqiang², Wang Deqiang³

(1. Key Laboratory of Clinical Laboratory Diagnosis, College of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University; 2. Department of Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University;
3. Key Laboratory of Molecular Biology on Infectious Diseases Established by Ministry of Education)

【Abstract】Objective: To obtain human neutrophil gelatinase-associated lipocalin(NGAL) recombinant protein and its polyclonal and monoclonal antibodies, and to provide a powerful experimental basis for further functional research and clinical application of NGAL.

Methods: The coding region of NGAL mature peptide gene was codon-optimized, chemically synthesized, and then inserted into the prokaryotic expression vector pW28. Transfected *E.coli* B834 cells were induced by IPTG to produce rhNGAL. The recombinant protein was purified by Ni²⁺-NTA affinity chromatography column. The aggregation in solution was analyzed by Hiload Superdex 75 gel filtration column. Rabbits and BALB/c mice were immunized with the rhNGAL to produce polyclonal antibodies and high specificity monoclonal antibodies by hybridoma technology to identify antibody subtypes. After being purified by Protein G affinity column, the antibodies were detected by Isothermal Titration Calorimetry, non-competitive ELISA and SDS-PAGE analysis. Finally, Western blot, immunofluorescence and immunohistochemistry were used for antibody identification.

Results: NGAL recombinant protein was successfully expressed with high purity and mainly existed in monomer form. Recombinant procalcitonin was successfully expressed. Rabbit polyclonal antibody was also produced. Six hybridoma cell lines stably secreting mAbs were screened, hereinto the mAb25 was IgG1 subtype, and the others belonged to IgG2a subtype. The affinity constant of mAb19 and 35 was 3.06×10^9 and 2.14×10^9 , respectively. The SDS-PAGE analysis showed that the purity was higher than 90%. Excellent immuno-

作者介绍:王石磊, Email: 987877607@qq.com,

研究方向: 乙型肝炎肝炎的发病机理。

通信作者:汪德强, Email: wangdq@cqmu.edu.cn。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:31240082); 重庆市卫计委 2016 年医学科面上资助项目(编号:2016MSXM001); 重庆市教委科学技术研究资助项目(编号:KJ1702022)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20180530.1701.018.html>
(2018-05-31)

reactivity and specificity of the antibodies was showed by Western blot immunofluorescence and immunohistochemistry analysis. **Conclusion:** Highly purified rhNGAL protein, anti-NGAL polyclonal antibodies and specific monoclonal antibodies are obtained in this study. The findings lay the foundation for the further study on the function of NGAL in pathophysiology and other regions, and promotes the development of domestic NGAL clinical diagnostic reagents.

【Key words】codon optimization; neutrophil gelatinase-associated lipocalin; polyclonal antibody; monoclonal antibody

NGAL蛋白是由 Kjeldsen 等从人中性粒细胞 β 颗粒发现的一种分泌型糖蛋白,属于 lipocalin 蛋白家族。一级结构为 197 个氨基酸残基肽链,其中前 19 个氨基酸是前导序列(leader sequence),余下 178 个氨基酸为成熟肽段(mature peptide)。NGAL 具有脂质运载蛋白家族典型的桶装结构,可以结合和运输多种小分子物质,从而发挥重要的生物功能^[1]。2003 年, Singer 等^[2]首次提出 NGAL 与缺血型肾损伤密切相关。此后,更多的研究表明血液和尿液中 NGAL 可以作为判断急性肾损伤的早期诊断指标^[3-5]。近年来,国内外学者还发现它参与其他多种疾病的发生发展^[6-7],可作为肾脏疾病、肿瘤、炎症等多种疾病的一个新型敏感的生物标志物。目前 NGAL 的制备采用常规密码子编码,抗原表达效率比较低^[8]。本研究通过密码子优化人工合成 NGAL 的基因以提高原核表达量,并利用表达纯化的蛋白制备出有效的多克隆及单克隆抗体,为 NGAL 的进一步研究奠定有力的实验基础。

1 材料及方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株、细胞和实验动物 大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E. coli*) DH5 α 和 *E. coli* B834 由本实验室保存,载体质粒 pW28 由 pET-28a(购自 Novagen 公司)改造而来,人胚胎肾细胞 293 由本实验室保存。2 只新西兰雄兔、4 只 SPF BALB/c 雌性小鼠、5 只 SPF 雄性裸鼠购自重庆医科大学动物中心。

1.1.2 实验试剂及仪器 DL2000 DNA Marker、蛋白质 Marker、各种限制性内切酶(*Bam*H I 和 *Xho* I)、质粒抽提试剂盒、T4 DNA 连接酶及 Buffer 购自 Promega 公司,BCA 试剂盒购自碧云天公司。HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 二抗、BSA、购自 Bio-world 公司。荧光标记的山羊抗鼠 IgG 二抗及 DAPI 染剂购自武汉三鹰公司。IMDM 完全培养基(含 15%血清)、HAT、HT、2.2%甲基纤维素均购自 Sigma 公司。抗体亚型鉴定试剂盒购自 Southern Biotech。

ChemiDoc™ Touch 化学发光成像仪、蛋白质电泳及湿转

装置购自 Bio-Rad 公司, EPS-300 核酸电泳仪购自 Eppendorf 公司, PCR 仪、NANOD 1000 微量分光光度计购自 Thermo 公司,多功能微孔板检测仪购自 BioTek 公司,超声波处理系统购 SONICS 公司,蛋白质超滤系统购自 Micon 公司。Ni²⁺-NTA 亲和层析柱, Hiload Superdex 75 凝胶层析柱, Protein G 亲和层析柱及填料购自 GE Healthcare 公司。等温滴定量热仪购自 Malvern 公司。

1.2 方法

1.2.1 pW28-NGAL 重组质粒的构建 根据 GenBank(NM004012)得到人 NGAL 的 cDNA 序列,利用 OptimumGene™ 软件分析其稀有密码子并采用 *E. coli* 偏爱密码子优化人工合成基因序列,并分别在其 5' 和 3' 末端分别引入 *Bam*H I 和 *Xho* I 限制性酶切位点,如图 1 所示。合成的 NGAL 序列与 cDNA 相比,部分碱基不同但编码的氨基酸序列相同,可以使目的基因在大肠杆菌中更好地表达。将目的基因和 pW28 载体分别用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切。经糖原沉淀法纯化后的酶切产物用 T4 DNA 连接酶在 16 ℃ 连接 16 h,转化至 *E. coli* DH5 α 后涂布于 50 mg/L 卡那霉素的 LB 平板上 37 ℃ 过夜培养。挑取单克隆菌落放大后进行菌液 PCR 鉴定。选取阳性菌送至华大基因测序。

```
GGATCCGAAGATAGCACTCTGACCTGATTCGGGACCGCCGTGAGCAAGTGCCGCTGCAGCAAAAC
TTTCAGGATAATCAGTTCCAAGGCAATGGTATGTGGTTGGCTGGCGGGTAACGCCATTCTGCGTGAAG
ATAAGACCCGCAAAAAATGTATGCTACCATCTACGAAGTAAAGAGATAAATCATACAAGTTACGTC
GGTCTGTTTGTAAAGAAAAATGCGACTACTGGATTCGACCTTTGTTCCGGGCTGTACGCCGGGTGAA
TTCACGCTGGGCAACATCAAAAGCTATCCGGGTCTGACCTTTACTCTGTCGCGTGTGTGAGTACGAAGT
ACAAATCAGCATGCCATGGTCTTTTCAAGAAAGTGTCAAAAACCGTGAATCTCTCAAATACCCCTGTA
CGGTGCGACCAAGAACTGACGTCGGAAGTAAAGAAATTCATCCGCTTCAGTAAATCCCTGGGCT
GCCGGAATACATCGTGTTCCTCCGGTTCGATGATCAGTGATCAGCGGTCTCGAG
```

下划线部分为酶切位点;阴影部分为改变的碱基序列

图 1 密码子优化后设计的 NGAL 基因序列

1.2.2 NGAL 的表达 将测序成功的重组质粒转化至 *E. coli* B834 表达菌株中,涂布法铺于含 60 mg/L 卡那霉素的 LB 平板上,37 ℃ 恒温培养 16 h,挑取单菌落于 LB 液体培养基中,37 ℃,200 r/min,摇床培养至 A_{600 nm} 约为 0.2,加入诱导剂 IPTG(终浓度为 1 mmol/L)继续培养,4 h 后离心分离菌体,用 15% SDS-PAGE 蛋白电泳鉴定,选取目的基因表达量及诱导效果最佳的菌落。进行表达条件优化得:将已经初步放大

的菌液按 1 : 100 体积比接种至 LB 液体培养基中, 37 °C, 200 r/min, 摇床培养至 $A_{600\text{nm}}$ 约为 0.8 h, 加入诱导剂 IPTG (终浓度 0.3 mmol/L), 于 16 °C 恒温条件下诱导表达 16 h。

1.2.3 NGAL 的纯化 用 Binding Buffer (10 mmol/L PBS pH 8.0, 300 mmol/L NaCl) 重悬菌体, 充分混匀, 冰水浴中行超声破菌: 0 °C, 超声 4 s, 间隔 6 s, 振幅 28%, 超声时间 15 min。将破菌液高速低温离心, 取上清以 6 s/滴的流速穿过由 Binding Buffer 平衡过的 Ni^{2+} -NTA 亲和层析柱, 再用 250 mL Washing Buffer (30 mmol/L 咪唑, 10 mmol/L PBS pH 8.0, 300 mmol/L NaCl) 洗脱杂蛋白质, 最后用 50 mL Elution Buffer (500 mmol/L 咪唑, 10 mmol/L PBS pH 8.0, 300 mmol/L NaCl) 洗脱目的蛋白质。以 PBS 缓冲液超滤后利用凝胶层析法进一步纯化, 并分析 NGAL 在 PBS 溶液中的聚集状态。先用标准蛋白质: 溶菌酶 (14.4 kD), 胰凝乳蛋白酶原 (25 kD), 鸡卵清蛋白质 (43 kD), 牛血清蛋白质 (67 kD) 对 Hiload Superdex 75 凝胶层析柱进行标定, 然后再测定 NGAL 重组蛋白, 流速为 1.0 mL/min。将 NGAL 的洗脱液用 15% SDS-PAGE 电泳, 收集纯度高的部分进行超滤, 浓缩所得的蛋白再用 15% SDS-PAGE 电泳, Image J 软件灰度扫描分析纯度, BCA 法测定浓度, 最后分装冻存于 -80 °C 备用。另外, 根据洗脱曲线记录的标准蛋白质及 NGAL 洗脱体积, 计算出 NGAL 在 PBS 溶液 (10 mmol/L PBS, pH 7.4) 中的分子量大小并分析其在溶液中的聚集形式。

1.2.4 抗 NGAL 多克隆抗体的制备 将制备的蛋白与等体积弗氏完全佐剂混匀乳化, 免疫 2 只重约 2 kg 的新西兰大白兔, 14 d 后用弗氏不完全佐剂乳化的蛋白加强免疫, 此后每周 1 次, 共 5 次。首次蛋白剂量 500 g, 其余 250 g。第 1 次免疫前采血并分离血清作为阴性对照, 末次免疫 10 d 后颈动脉采血分离血清, 加入叠氮化钠后于 -80 °C 保存。利用 Protein G 亲和层析法纯化多抗。SDS-PAGE 电泳分析纯度, BCA 法测抗体浓度。用标准的 ELISA 方法测定纯化前后的效价, 包被的抗原为纯化的 NGAL 蛋白, 一抗从 1:1 000 倍稀释至 1:1 024 000, 每样品设 2 个复孔, 二抗为 HRP 标记的山羊抗兔 IgG (5 000 倍稀释), 显色底物为 TMB。

1.2.5 抗 NGAL 单克隆抗体的制备 用纯化的蛋白作为免疫原对小鼠进行常规免疫。效价达标后, 冲击免疫。处死小鼠用常规方法进行融合。融合后的细胞转到半固体培养基中培养, 生长的单克隆挑到 96 孔培养板中进行培养并采用 ELISA 法初筛, 再以 Southern Biotech 公司抗体亚型测定试剂盒进行亚类鉴定, 筛选出 IgG 类型的高效价小鼠杂交瘤细胞株。使用腹腔诱生法制备含大量单克隆抗体的腹水并利用 Protein G 亲和柱纯化。SDS-PAGE 蛋白电泳分析其纯度, BCA 法测浓度。间接 ELISA 法测定纯化后抗体效价。利用等温滴定量热仪监测抗原抗体结合时的热量变化, 反映并分析抗体的亲和力; 非竞争 ELISA 法再次测定抗体亲和力。

1.2.6 抗人 NGAL 抗体的鉴定 293 细胞采用常规免疫荧光技术制片, 用激光共聚焦镜观察。HepG2 细胞裸鼠皮下成瘤后组织切片, 行常规免疫组化染色分析 (immunohistochem-

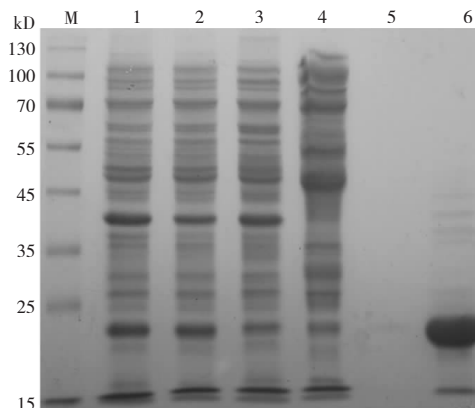
istry assay, IHC)。对 IPTG 诱导前后 pW28-NGAL 的总蛋白、纯化后的重组蛋白、293 细胞蛋白裂解液及小鼠肝癌组织行常规 Western blot 分析。

本研究所涉及的动物实验均符合重庆医科大学实验动物伦理委员会所制定的伦理学标准。

2 结果

2.1 蛋白表达与纯化

本研究将成功构建的 pW28-NGAL 重组质粒转入 *E.coli* B834 原核表达, 目的蛋白未经糖基化修饰, 因此表达的 NGAL 分子量约为 23 kD, 比理论值略小^[9]。SDS-PAGE 电泳如图 2 所示, 经密码子优化表达的 NGAL 目的蛋白实现了高效上清表达 (约 60 mg/L LB)。经过 Ni^{2+} 柱亲和和纯化, 500 mmol/L 咪唑条件下洗脱, 所得蛋白分子量与重组蛋白质表观分子量相符合; Image J 软件灰度扫描其纯度在 85% 以上。再经分子筛 Hiload Superdex 75 凝胶层析柱纯化后, 纯度可达 95%, BCA 法测得浓度为 30.4 mg/mL, 分装后冻存于 -80 °C 备用。



M: 蛋白 marker; 1: 破菌液; 2: 上清液; 3: 穿透液; 4: 0 mmol/L 咪唑洗脱液; 5: 30 mmol/L 咪唑洗脱液; 6: 500 mmol/L 咪唑洗脱液

A. Ni^{2+} 柱纯化后 SDS-PAGE 电泳图



M: marker; 1: Superdex 75 洗脱液

B. 分子筛纯化后 SDS-PAGE 电泳图

图 2 NGAL 纯化结果

2.2 NGAL 的聚集状态

用已知分子量的标准蛋白质对 Hiloader Superdex 75 凝胶层析柱进行定标,根据洗脱曲线将洗脱体积和蛋白相应分子量进行拟合可得: $\text{LogMW} = -0.01712 \times V_e + 6.01667$ 。同等条件下,过 NGAL 蛋白样品,其洗脱体积约为 96.6 mL(图 3)。结合公式算得其在溶液中分子量约为 23 kD,提示 NGAL 在 PBS 溶液(10 mmol/L PBS, pH 7.4)中主要以单体形式存在。与人体内天然存在的 NGAL 蛋白聚集形式一致^[10]。

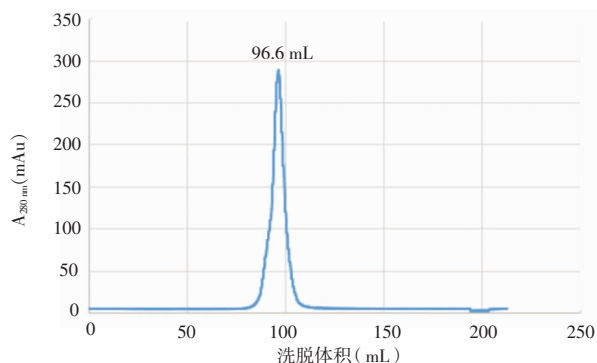
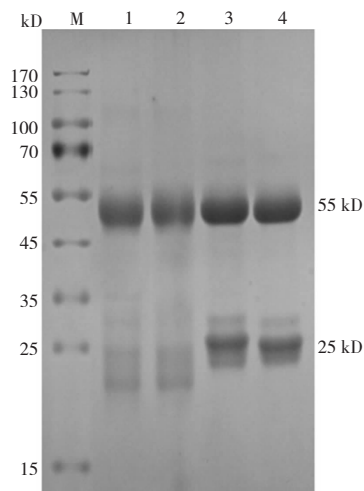


图 3 凝胶层析检测 NGAL 在溶液中的聚集形式

2.3 抗人 NGAL 抗体的制备

本研究以纯化的 rhNGAL 包板,对挑选的单克隆行 2 次间接 ELISA 筛选,得到 14 株高效价阳性杂交瘤细胞株。使用抗体分型检测试剂对细胞上清进行亚类鉴定,最后得到 6 株杂交瘤细胞株并大量培养及冻存,其中 25 号为 IgG1 亚型,8、11、19、23、35 号为 IgG2a 亚型。上清抗体效价最高的 2 株细胞经小鼠腹腔诱生法制腹水,产物用 Protein G 柱纯化,得到单抗 19、单抗 35。以样品孔 OD 值与阴性对照孔 OD 值之比大于 2.1 为判断标准,测得多抗 1、多抗 2、单抗 19、单抗 35 纯化前后的效价,见表 1;BCA 法测得纯化后的 4 只抗体浓度分别为 2.11、1.98、2.6 和 2.03 mg/mL;经 SDS-PAGE 电泳分析(图 4),抗体的纯度皆超过 90%,可以满足后续实验要求;等温滴定量热法(isothermal titration calorimetry, ITC)测得 NGAL 单克隆抗体 19、35 的亲合常数分别为 3.06×10^9 、 2.14×10^9 ,非竞争 ELISA 结果为 2.62×10^9 、 1.72×10^9 ,两者基本一致。



M: 蛋白 marker; 1: 多抗 1; 2: 多抗 2; 3: 单抗 19; 4: 单抗 35

图 4 抗 NGAL 抗体纯化结果

2.4 抗人 NGAL 抗体的鉴定

用纯化后的多抗 1、多抗 2、单抗 19 和单抗 35 分别在 293 细胞行免疫荧光染色,结果显示 4 支抗体皆可与细胞中的 NGAL 蛋白结合,呈现绿色荧光并主要分布于细胞浆中(图 5)。小鼠肝癌组织免疫组化结果可见所制抗体在小鼠成瘤组织切片中呈阳性反应,阳性在细胞内外均有分布,并主要定位于细胞浆(图 6),与报道的 NGAL 肿瘤组织的定位一致^[11]。

表 1 抗体效价滴度

抗体	纯化前效价	纯化后效价
多抗 1	1:32 000	1:64 000
多抗 2	1:128 000	1:1 024 000
单抗 19	1:16 000	1:1 024 000
单抗 35	1:16 000	1:512 000

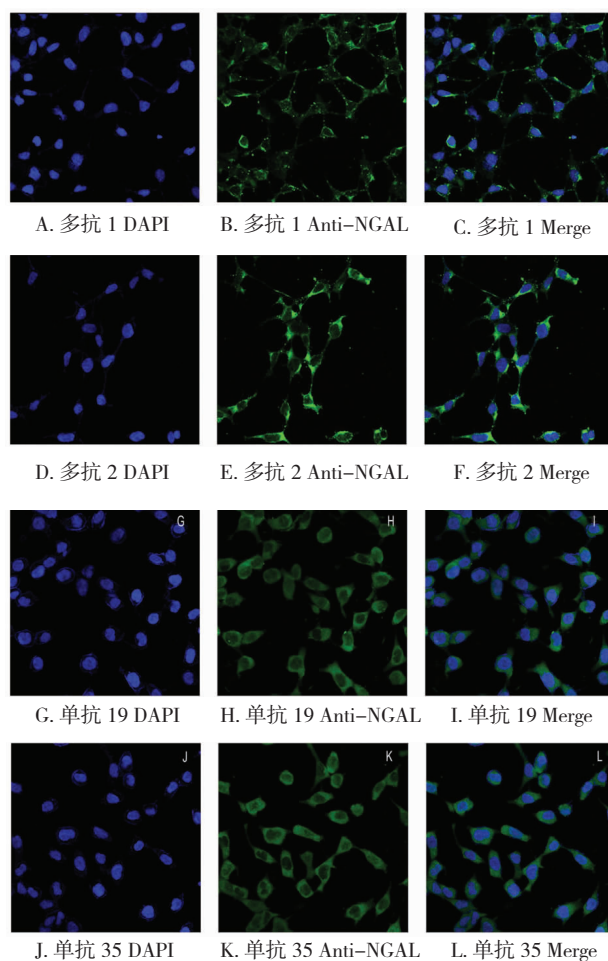


图 5 抗 NGAL 抗体免疫荧光结果 (400 ×)

分别以 IPTG 未诱导、诱导的细菌总蛋白、纯化后的蛋白、293 细胞裂解液及小鼠肝癌组织为研究对象,采用兔抗 rhNGAL 多克隆抗体或鼠抗 rhNGAL 单克隆抗体为一抗,进行免疫印迹分析,Western blot 结果显示,在约 23 kD 处均出现清晰可见的条带(图 7)。该结果表明,所制备的抗 NGAL 抗体

可同 rhNGAL 及天然 NGAL 蛋白呈现强的特异性反应。上述实验共同证实抗 NGAL 抗体都具有较好的特异性及免疫反应性,且单抗的特异性远强于多抗。

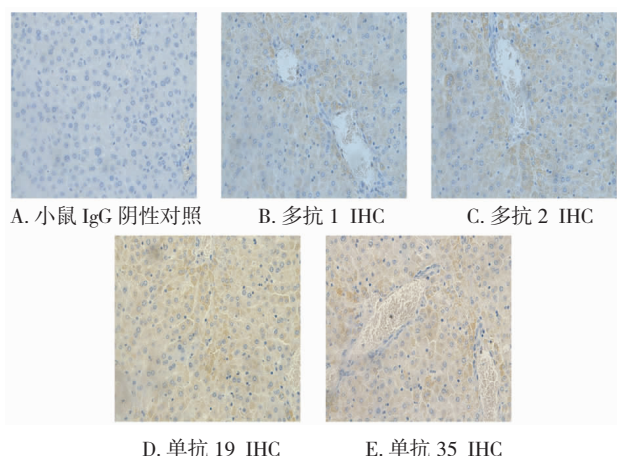
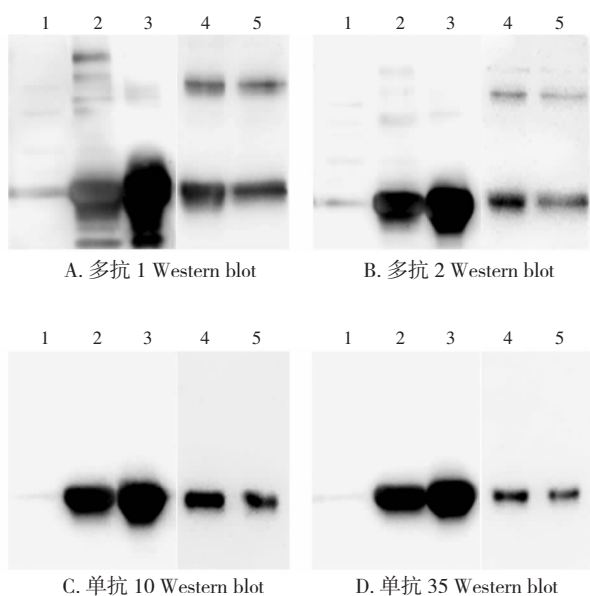


图 6 单克隆抗体的免疫组化染色 (400×)



M: 蛋白 marker; 1: 未诱导破菌液; 2: IPTG 诱导破菌液; 3: 纯化后的 NGAL; 4: 293 细胞裂解液; 5: 小鼠肝癌组织

图 7 NGAL 抗体特异性鉴定

3 讨论

NGAL 主要存在于中性粒细胞、单核巨噬细胞和脂肪细胞。生理状况下,NGAL 在血、尿液中的浓度极低。肾损伤、肿瘤、炎症、缺血、外科手术等都能诱导 NGAL 表达量上调^[12]。基础和临床研究都表明,NGAL 与缺血型急性肾损伤密切相关,即在肾脏发生急性损伤时,NGAL 在血、尿中的含量明显升高,

而从肾脏缺血到 NGAL 出现只小于 2 h。当治疗后,血清中的 NGAL 的水平可以明显下降^[3]。因此,NGAL 可以作为急性肾损伤的早期诊断指标之一。近年来,大量研究比较了 NGAL 与血清肌酐(Serum creatinine, Scr)、半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C(cystatin C, Cys C)、 α 1-微球蛋白(α -Microglobulin, α 1-MG)、微量清蛋白(microalbuminuria, Alb)、N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶(N-acetyl- β -D-glucosaminidase, NAG)等常用指标在肾损伤的反应作用,基本确认 NGAL 是目前最具有应用前景的早期肾损伤标志物^[13-15]。NGAL 还可以联合血浆 B 型钠尿(B-type-natriuretic peptide, BNP)来预测及评价心衰术后肾功能衰竭发生风险,预测敏感度为 90%,特异度为 99%^[16]。此外,其他如食管癌、乳腺癌、肺腺癌及细菌感染等疾病的 NGAL 值也有不同程度的升高^[17-20]。现已有的 NGAL 高灵敏度检测方法主要有化学发光微粒子免疫分析法、双抗体夹心免疫荧光层析法、胶乳增强免疫比浊法等。但仪器、抗体等试剂均被国外垄断,需进口,成本昂贵,购买周期长,使用受限。而 NGAL 作为一项有意义的检验指标,值得在临床应用上更进一步推广。研制国产试剂可大大降低成本,本研究的主要目的即是为此试剂的国产化做前期工作。

目前,国内何莹等^[21]用 293 细胞真核表达纯化的 rhNGAL 做抗原表达的 rhNGAL 经过糖基化修饰,但表达量极低、纯化非常难、制备成本高昂。Barasch 等^[8]构建的 NGAL 原核质粒在大肠杆菌中由于表达量低(小于 10 mg/mL),有大量的包涵体形成,抗原准备的效率比较低,成本也很高。在此,作者首先基于生物信息学分析 NGAL 蛋白成熟肽段的基因序列,将其中的稀有密码子替换成大肠杆菌偏爱密码子但保持氨基酸序列不变,使目的基因能在大肠杆菌中更高效地表达出目的蛋白,NGAL 表达效率由 Barasch 等报道的 10 mg/L 大幅度提高到 60 mg/L。纯化所得的重组 NGAL 蛋白在溶液中主要以单体形式存在,与真核表达制备的抗原一致,预示抗原具有良好的生物学活性。

本研究利用高效制备的具有生物学活性的高纯度 NGAL 获得了高效价的 2 株兔多克隆抗体和 2 株小鼠单克隆抗体。由于 ITC 对单抗亲和力的检测效能远高于常规的非竞争性 ELISA 法,故而单抗 19 和单抗 35 的亲合常数分别为 3.06×10^9 、 2.14×10^9 。

此外,本研究组将获得的 NGAL 抗体在 293 细胞中做免疫荧光检测,结果表明制备的抗体能特异性地识别真核细胞内的 NGAL 蛋白,可用于细胞内源性检测。随后通过免疫组化检测 NGAL 在小鼠肝癌组织中的表达,结果发现在肝癌组织中阳性染色主要位于细胞质,与免疫荧光结果中 NGAL 在细胞内的定位一致。为进一步验证所制 NGAL 抗体的特异性,本研究对大肠杆菌破菌液、293 细胞蛋白裂解液及小鼠肝癌组织进行 Western blot 分析,结果表明所制备的抗体与原核表达的 rhNGAL、真核细胞及小鼠组织中的天然 NGAL 抗原均可以发生特异性结合。因此,本研究所制的抗体效价高、特异性强,均具有广泛的应用前景。其中,制备的多抗成本低廉且亲和力较高,而单抗则拥有更强的特异性。

综上所述,深化了解 NGAL 蛋白对其相关疾病临床上的诊断、治疗和预后具有重要的意义,而这依赖于大量的 NGAL 蛋白及其抗体。本研究制备出拥有自主产权的高产量 NGAL 重组蛋白及高质量多克隆和单克隆抗体,有利于 NGAL 的进一步功能研究及其临床免疫检测试剂盒的国产研发。

参 考 文 献

- [1] Singer E, Markó L, Paragas N, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: pathophysiology and clinical applications[J]. *Acta Physiol (Oxf)*, 2013, 207(4): 663–672.
- [2] Chakraborty S, Kaur S, Guha S, et al. The multifaceted roles of neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL) in inflammation and cancer[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1826(1): 129–169.
- [3] Paragas N, Qiu A, Zhang Q, et al. The Ngal reporter mouse detects the response of the kidney to injury in real time[J]. *Nature Medicine*, 2011, 17(2): 216–222.
- [4] Gaspari F, Cravedi P, Mandalà M, et al. Predicting cisplatin-induced acute kidney injury by urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin excretion: a pilot prospective case-control study[J]. *Nephron Clinical Practice*, 2010, 115(2): c154–160.
- [5] Haase M, Bellomo R, Devarajan P, et al. Accuracy of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in diagnosis and prognosis in acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis[J]. *Am J Kidney Dis*, 2009, 54(6): 1012–1024.
- [6] Nuntagawat C, Leelawat K, Tohtong R. NGAL knockdown by siRNA in human cholangiocarcinoma cells suppressed invasion by reducing NGAL/MMP-9 complex formation[J]. *Clinical & Experimental Metastasis*, 2010, 27(5): 295–305.
- [7] 马玉国, 赵红丽, 任秀华, 等. 急性肾损伤的检测指标 NGAL 的研究进展[J]. *国际检验医学杂志*, 2013, 34(14): 1842–1844.
- [8] Barasch J, Hollmen M, Deng R, et al. Disposal of iron by a mutant form of lipocalin 2[J]. *Nature Communications*, 2016, 7: 12973.
- [9] Bolignano D, Donato V, Lacquaniti A, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in human neoplasias: a new protein enters the scene[J]. *Cancer Lett*, 2010, 288(1): 10–16.
- [10] Makris K, Rizos D, Kafkas N, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a new biomarker in laboratory medicine[J]. *Clin Chem Lab Med*, 2012, 50(9): 1519–1532.
- [11] Zhang Y, Fan Y, Mei Z. NGAL and NGALR overexpression in human hepatocellular carcinoma toward a molecular prognostic classification[J]. *Cancer Epidemiology*, 2012, 36(5): e294–299.
- [12] Chakraborty S, Kaur S, Guha S, et al. The multifaceted roles of neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL) in inflammation and cancer[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1826(1): 129–169.
- [13] Heise D, Rentsch K, Brauer A, et al. Comparison of urinary neutrophil glucosaminidase-associated lipocalin, cystatin C, and $\alpha 1$ -microglobulin for early detection of acute renal injury after cardiac surgery[J]. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2011, 39(1): 38–43.
- [14] Nielsen SE, Schjoedt KJ, Astrup AS, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) and kidney injury molecule 1 (KIM1) in patients with diabetic nephropathy: a cross-sectional study and the effects of lisinopril[J]. *Diabet Med*, 2010, 27(10): 1144–1150.
- [15] Fu WJ, Xiong SL, Fang YG, et al. Urinary tubular biomarkers in short-term type 2 diabetes mellitus patients: a cross-sectional study[J]. *Endocrine*, 2012, 41(1): 82–88.
- [16] Prabhu A, Sujatha DI, Ninan B, et al. Neutrophil gelatinase associated lipocalin as a biomarker for acute kidney injury in patients undergoing coronary artery bypass grafting with cardiopulmonary bypass[J]. *Ann Vasc Surg*, 2010, 24(4): 525–531.
- [17] Zhang H, Xu L, Xiao D, et al. Upregulation of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in oesophageal squamous cell carcinoma: significant correlation with cell differentiation and tumour invasion[J]. *Journal of Clinical Pathology*, 2007, 60(5): 555–561.
- [18] Bauer M, Eickhoff JC, Gould MN, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) is a predictor of poor prognosis in human primary breast cancer[J]. *Breast Cancer Research & Treatment*, 2008, 108(3): 389–397.
- [19] Roudkenar MH, Halabian R, Ghasemipour Z, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin acts as a protective factor against H2O2 toxicity[J]. *Archives of Medical Research*, 2008, 39(6): 560–566.
- [20] Flo TH, Smith KD, Sato S, et al. Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron[J]. *Nature*, 2004, 432(7019): 917–921.
- [21] 郑怡麟, 陈安, 易维京, 等. 抗人 NGAL 单克隆抗体的制备及其定量检测方法的建立[J]. *免疫学杂志*, 2013, 29(1): 50–54.

(责任编辑: 张辉洁)