

· 技术与方法 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.24.027

神经元特异核蛋白单克隆抗体的构建*

王丽红¹,张香娜¹,王楠楠¹,黄锦¹,杨百万¹,李兴¹,王光明^{2△}

(1.大理大学临床医学院 2012 级临床医学,云南大理 671000;2.大理大学附属医院病理科,云南大理 671000)

[摘要] 目的 根据 Pubmed 报道的 FOX3 cDNA 序列,构建神经元特异核蛋白(NeuN)单克隆抗体。方法 获得 FOX3 cDNA 序列,设计引物,PCR 扩增,利用 pcDNATM 3.3-TOPO TA 将纯化后的 PCR 产物插入真核表达载体中,得到 FOX3 蛋白,然后利用该蛋白免疫小鼠,免疫后小鼠的脾细胞与骨髓瘤细胞(SP2/0)进行融合,筛选后获得的杂交瘤细胞小鼠腹腔接种,收获腹腔积液后进行相关检测。结果 所获得的腹腔积液经免疫印迹检测,在(46~48)×10³ 处显示两条带,免疫荧光检测后细胞核显示阳性信号。结论 根据 FOX3 cDNA 序列构建的抗体与商业化的抗 NeuN 抗体在免疫荧光和免疫印迹上表现一致,NeuN 与 FOX3 为同一基因。

[关键词] 神经元特异核蛋白;FOX3;单克隆抗体

[中图分类号] R737.3;R361.3

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2016)24-3393-03

Construction of the monoclonal antibody of neuron-specific nuclear protein*

Wang Lihong¹,Zhang Xiangna¹,Wang Nannan¹,Huang Jin¹,Yang Baiwan¹,Li Xing¹,Wang Guangming^{2△}

(1. Grade 2012, Clinical Medicine of Clinical College, Dali University, Dali, Yunnan 671000, China;

2. Department of Pathology, Affiliated Hospital of Dali University, Dali, Yunnan 671000, China)

[Abstract] **Objective** To construct the monoclonal antibody of anti-NeuN basis on the sequence of FOX3 cDNA published on Pubmed. **Methods** The specific primers were designed basis on the sequence of FOX3 cDNA which was amplified with RT-PCR, then the PCR product was inserted into pcDNATM 3.3-TOPO TA to get the eukaryotic expression vector FOX3. The splenocyte from mice which were immunized with the protein of FOX3 was merged with SP2/0 cell line to gain hybridoma cell. The hybridoma cell was transplanted into the abdominal cavity of mice and the abdominal dropsy through selecting and used into immunofluorescence staining and immunoblotting. **Results** There were two specific bands from (46-48)×10³ through immunoblotting and positive cells through immunofluorescence staining. **Conclusion** The antibody anti-NeuN from the FOX3 cDNA sequence was showed the same information from the commercialized NeuN antibody, through checking with immunofluorescence staining and immunoblotting. The gene NeuN was as same as to gene FOX3.

[Key words] neuron-specific nuclear protein;FOX3;monoclonal antibody

在 1992 年, Mullen 等利用大鼠脑组织细胞核提取物免疫 BALB/c 小鼠, 获得对神经元特异的单克隆抗体: mAb A60, 该抗体识别所有脊椎动物神经元特异的核蛋白, 把该抗原命名为神经元特异核蛋白(neuron-specific nuclear protein, NeuN), 已广泛用于神经科学、发育生物学和干细胞研究领域以及临床病理诊断中^[1]。

然而, 目前市面上的 NeuN 抗体仅仅是 Mullen 等利用啮齿类动物脑组织蛋白提取物免疫动物获得的, 其应用仅仅局限于科研领域, 并且 NeuN 基因的 cDNA 序列无法获得。2009 年 Kim 等^[2]研究发现认为 NeuN 属于 Fox-1 基因家族, 命名为 Fox3。因此本研究在 2014 年 1 月至 2015 年 5 月根据 FOX3 的序列进行 FOX3 抗体的克隆, 经研究证实, FOX3 与 NeuN 为同一个基因, 因此达到 NeuN 抗体的国产化, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料 人脑组织来源于大理大学临床医学院司法鉴定中心进行尸检的脑组织石蜡标本, 材料使用获得本校医学伦理委员会和本院附属医院医学伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 tRNA 的提取和 cDNA 的合成, 引物设计和 PCR 扩增

1.2.1.1 脑组织 cDNA 合成 切取 8 片 5 μm 石蜡包埋组织, 按照 EASYspin 石蜡包埋组织 RNA 快速提取试剂盒(艾德莱生物科技有限公司, 中国)的说明书进行总 RNA 提取, 按照 cDNA 合成试剂盒(Invitrogen 公司, 美国)的说明书进行 cDNA 的合成。

1.2.1.2 FOX3 引物设计 根据 pubmed 上人 FOX3 的 cDNA 序列(NM_001082575.2), 用 gene runner 软件设计引物, 正义链: 5'-ATG GCC CAG CCC TAC CCC CCC GCC CAG-3'; 反义链: 5'-TCA CAT GGT TCC AAT GCT GTA GGT CGC-3'。

1.2.1.3 真核表达载体的构建 依据如下条件进行 PCR 扩增, 扩增试剂购自 Invitrogen 公司。起始变性 95 °C 10 min, 循环 95 °C 10 s, 55 °C 退火 10 s, 72 °C 延伸 60 s, 循环 25 次。PCR 扩增后, PCR 产物经 OMEGA 公司(美国)的 Gel Extraction kit 纯化后, 利用 pcDNATM 3.3-TOPO TA Cloning kit(Invitrogen 公司, 美国)将纯化后的 PCR 产物插入真核表达载体中, 所获得的克隆经测序及电泳验证准确的载体命名为 pcDNA-FOX3。

1.2.2 重组蛋白 FOX3 的获得 载体 pcDNA-FOX3 转染 293

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81360206); 云南省中青年学术技术带头人后备人才基金(2014HB025); 云南省创新创业训练计划建设项目(S-CXCX-2014-6); 大理学院博士科研基金资助项目(KYBS201207)。 作者简介: 王丽红(1993-), 本科, 主要从事神经生物学的研究。 △ 通讯作者: Tel: 18313159589; Email: gmwang1991@hotmail.com。

细胞(CRL-1573,北京钧尧伟业生物科技有限公司),有限稀释,G418 筛选,获得单克隆。大量诱导表达生产,经过纯化,得到蛋白抗原用于免疫小鼠。

1.2.3 动物免疫及杂交瘤细胞的获得

1.2.3.1 动物免疫 将成功获得的 FOX3 抗原与氢氧化铝佐剂制成的混悬液免疫鼠龄为 8~12 周的雌性 BALB/c 健康小鼠 3 只。采取小鼠快速免疫方式,然后分离免疫后的小鼠脾脏细胞用于细胞融合。

1.2.3.2 细胞融合和单抗筛选 利用纯化的 FOX3 抗原进行 ELISA 检测,在 3 只小鼠中免疫反应最好的小鼠的脾细胞与骨髓瘤细胞(SP2/0)进行融合,融合后的细胞经过适当稀释,分置于 96 孔培养板中培养,待克隆生长到全孔的 1/6 时,标记单克隆及多克隆,培养 10~14 d 对单克隆进行 ELISA 检测。ELISA 检测后将 OD 值最高的单克隆再有限稀释接入 96 孔板中如上法所述再次亚克隆,此过程重复数次,直至阳性孔比率为 100%,即认为此为阳性单克隆^[3]。将筛选得到的阳性单克隆扩大培养,细胞数按 $(1\sim 2)\times 10^6$ /管进行冻存。同时收集细胞用于腹水制备。

1.2.4 腹腔积液制备和单克隆抗体检测

1.2.4.1 腹腔积液制备 细胞株采用小鼠腹腔接种法制备腹腔积液,细胞接种数量为 5×10^6 。接种 10~14 d 后收集腹腔积液。腹腔积液经 Protein G 柱纯化处理,浓缩后检测蛋白质浓度。

1.2.4.2 免疫荧光染色 小鼠的石蜡脑组织切片脱蜡到水后,0.3% 甲醇双氧水溶液(甲醇:30%过氧化氢=9:1)室温孵育 30 min,0.01 mol/L PBS 洗涤 5 min,3 次,然后用非免疫动物小鼠的血清 1:50 稀释,孵育 30 min,加入接种了杂交瘤细胞小鼠的腹腔积液稀释为 0.1 ng/mL 后,标本置于 4℃ 过夜孵育,0.01 mol/L PBS 洗涤 5 min,3 次,加入 0.01 mol/L PBS 稀释的 Alexa Fluor 594 标记的二抗(Thermo Fisher Scientific,美国)按体积比 1:1 000,室温孵育 30 min,0.01 mol/L PBS 洗涤 5 min,3 次,10% 丙三醇封片,荧光显微镜观察,染色结果与从美国 Millipore 公司(美国)购买的抗体“鼠抗人神经元特异核蛋白免疫组化单克隆抗体,MAB-0578”比较。

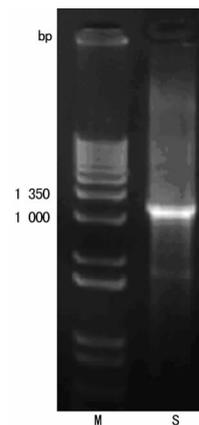
1.2.4.3 免疫印迹检测 大鼠、小鼠和人的脑组织用蛋白质裂解液(包括封闭液,洗涤液等购自北京博奥森生物技术有限公司)裂解后离心,按美国 Bio-Rad 公司的蛋白浓度测定试剂盒和上样缓冲液处理后 SDS-PAGE 电泳,转膜后在摇床上用封闭液封闭 30 min,接种了杂交瘤细胞小鼠的腹腔积液稀释为 0.04 ng/mL 后 4℃ 过夜孵育,洗涤液洗涤 5 min,3 次,加入抗体稀释液稀释的 Alexa Fluor 594 标记的二抗(1:2 500)室

温摇床上孵育 30 min,洗涤液洗涤 5 min,3 次,蛋白印迹检测系统(ChemiDocMP,Bio-Rad 公司,美国)检测结果与 MAB-0578 比较。

2 结 果

2.1 基因克隆及抗体构建基本情况 根据 FOX3 cDNA 序列设计的特异引物,经 PCR 扩增,凝胶电泳分析后可见 1 200 bp 左右的目的条带,见图 1。PCR 扩增得到的产物经胶回收试剂盒纯化后插入 pcDNATM 3.3-TOPO TA 载体中进行克隆,转化大肠杆菌后挑取 15 个克隆,分离质粒,送测序公司测序。测序结果与 Pubmed 上发表的 FOX3 cDNA 序列进行比对,得到 1 个克隆的序列与 FOX3 cDNA 序列完全一致,另外有两个克隆的序列与 FOX3 cDNA 序列比对后,分别出现 1 个和 2 个无义突变,其余的 12 个克隆均出现突变。

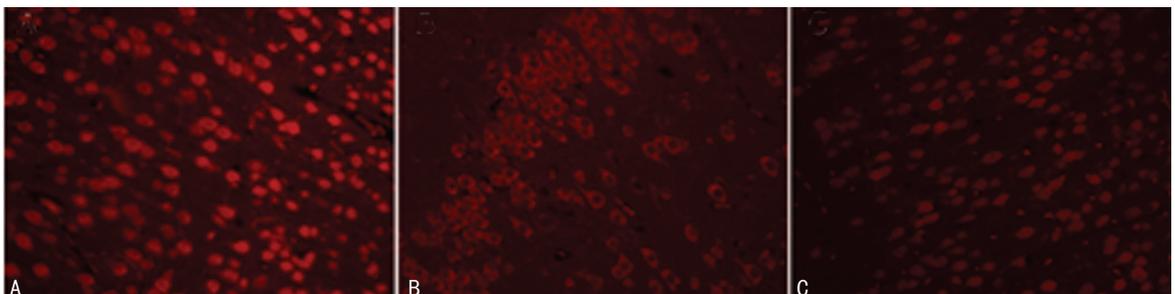
用序列完全正确的克隆转染 293 细胞,G418 筛选后经 PCR 和免疫荧光检测,能够被 Neun 抗体识别的细胞克隆扩增后分离蛋白,然后用耦联有 Neun 抗体的磁珠进行纯化,洗脱后浓缩,得到的重组蛋白 FOX3 进行动物免疫。免疫动物的脾脏细胞与骨髓瘤细胞(SP2/0)融合后,进行筛选,得到了 12 个克隆;该 12 个克隆的细胞扩增后对雌性 BALB/c 健康小鼠进行腹腔接种,10~14 d 后收集腹腔积液、纯化、浓缩,得到的样品用于后续的免疫荧光和免疫印迹。



M:Marker;S:样本。

图 1 FOX3 全长 cDNA PCR 扩增

2.2 免疫荧光检测结果 上述筛选得到的 12 个克隆经免疫荧光染色检测,有两个杂交瘤细胞克隆所产生的腹腔积液(含单克隆抗体),其染色结果与 MAB-0578 完全一致,见图 2,均主要表现为细胞核阳性,其余克隆表现为细胞质阳性,称为阴性克隆。

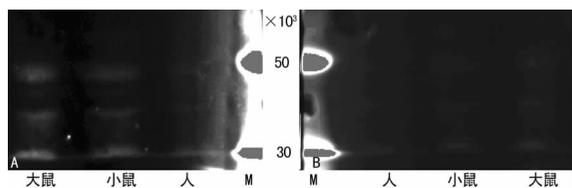


A:鼠抗人神经元特异核蛋白免疫组化单克隆抗体;B:阴性克隆,细胞质着色;C:阳性克隆,主要在细胞核着色。

图 2 免疫荧光染色检测结果($\times 200$)

2.3 免疫印迹检测结果 经免疫荧光筛选,可以识别大鼠、小鼠和人神经组织的神经元的产生腹腔积液的两个杂交瘤细胞

克隆,本研究选择 1 个克隆对大鼠、小鼠和人神经组织提取物进行免疫印迹检测,其结果与 MAB-0578 完全一致,见图 3。



A: 构建的抗体为 1 抗; B: MAB-0578 的抗体为 1 抗; M: Marker。

图 3 脑组织蛋白提取物免疫印迹检测

3 讨论

mAb A60 抗体可以识别所有脊椎动物神经元特异的核蛋白 NeuN, 已在神经科学、发育生物学和干细胞研究领域以及临床病理诊断中得到广泛应用^[4-5]。但是由于该抗体是通过脑组织蛋白提取物免疫动物获得的, 因此无法得到该基因的核酸序列, 使得依赖于基因核酸序列的相关研究受到一定的限制。

2009 年 Kim 等^[2]通过体外细胞实验研究发现: Fox3 阳性细胞表达的蛋白能够完全被 NeuN 抗体识别, 另外 Fox3 的 siRNA 转染可以抑制 NeuN 在神经干细胞上的表达, 从而认为 NeuN 属于 Fox-1 基因家族, 命名为 Fox3, 但是二者是否完全一致还有待探讨^[6]。虽然 FOX3 转染和 FOX3 沉默均可以用 NeuN 抗体进行检测并得到了期望的结果, 但是两者之间还有可能为上下游关系, 也就是说存在这样的情况: 基因 FOX3 的表达与否可以调控 NeuN 的表达。因此为了确定 FOX3 和 NeuN 为同一个基因, 本研究以 FOX3 基因的 cDNA 序列为起点, 经过一系列的分子生物学操作, 构建 FOX3 抗体, 然后与商业化的 NeuN 抗体进行比较性研究。

抗体的构建包括单克隆抗体和多克隆抗体, 但是前提必须能够获得抗原分子。在本研究中, 由于 NeuN 的基因序列未知, 无法获得 NeuN 抗原分子, 因此只能根据文献报道^[2]: NeuN 属于 Fox-1 基因家族, 命名为 Fox3, 但是商品化的 FOX3 抗原仍然无法获得, 然而 Fox3 基因的序列可以从 pubmed 数据库获得, 并且该 cDNA 序列预期编码的蛋白质大小与 NeuN 相似。因此, 本研究通过分子生物学的方法, 把 Fox3 cDNA 序列进行扩增, 插入载体中, 构建真核表达质粒, 转染细胞后经过筛选等, 获得了抗原, 该抗原可以被 NeuN 抗体识别。然后用 FOX3 重组蛋白免疫小鼠, 得到可以产生 FOX3 抗体的脾细胞。为了保留脾细胞产生抗体的能力以及获得无限增殖的能力, 把脾细胞与骨髓瘤细胞进行融合, 这样获得的杂交瘤细胞保留了产生抗体的能力和无限增殖的能力。经过一系列的筛选, 初步筛选准确的杂交瘤细胞克隆腹腔接种后获得腹腔积液。利用免疫荧光和免疫印迹检测, 本研究所构建的单克隆抗体与商品化的抗体一致。

NeuN 抗原主要分布在神经元的细胞核内, 而在本研究构建的克隆中, 免疫组化染色时部分克隆表达在细胞质内, 认定为阴性克隆, 只有在细胞核内表达的才确定为阳性克隆。阳性克隆在免疫印迹检测中, 与 Mullen 等的报道的结果一致: 有 $(46\sim 48)\times 10^3$ 两条带, 因此可以确定由 FOX3 基因的 cDNA 序列构建的抗体与商品化的 NeuN 抗体为同一抗体, 也就是说 NeuN 与 FOX3 基因为同一基因。基因 NeuN (或者 FOX3) 在各种神经肿瘤中的表达特性预示着该抗体可以在病理诊断中发挥作用^[6-8], 但是本研究构建的抗体经过一系列的检测才能够在临床病理诊断中应用。另外, 文献介绍 NeuN 在胚胎发育、干细胞分化、神经元的功能等方面具有重要作用^[9-11]。通过本研究, 确定了 NeuN 基因与 FOX3 基因为同一个基因, 为后续的研究提供了相关的信息。在引起神经元死亡的缺血性中风中, NeuN 作为判断神经元是否“健康”以及治疗后疗效检测的

指标^[12]。对缺血 90 min 然后再灌流小鼠的研究中发现, 短时间的灌流, 在 TTC 染色还未能检测到皮质损伤时, NeuN 的表达就已经发生改变^[13-14]。甲氧磷酸异己酯或氰戊菊酯(一种神经毒剂)暴露, 神经元上 NeuN 的表达也发生改变^[15]。因此需要通过大量的研究以阐明 NeuN 在神经元的发育等方面的功能。

参考文献

- [1] D'albora H, lombide P, Ojeda SR. intrinsic neurons in the rat ovary: an immunohistochemical study[J]. Cell Tissue Res, 2000, 300(1): 47-56.
- [2] Kim KK, Adelstein RS, Kawamoto S. Identification of neuronal nuclei (NeuN) as Fox-3, a new member of the Fox-1 gene family of splicing factors[J]. J Biol Chem, 2009, 284(45): 31052-31061.
- [3] 曹雪涛. 免疫学技术及其应用[M]. 北京: 科学出版社, 2010: 191-196.
- [4] 周青波, 张帆, 苏冠琴. 中枢神经细胞瘤临床病理及免疫组化研究[J]. 内蒙古医科大学学报, 2015, 37(2): 131-137.
- [5] 欧阳小明, 梅开勇, 郝卓芳. 脑实质内神经鞘瘤临床病理分析[J/CD]. 中华临床医师杂志(电子版), 2015, 9(3): 405-409.
- [6] Hahn YK, Masvekar RR, Xu R, et al. Chronic HIV-1 tat and HIV reduce rbfox3/NeuN: evidence for sex-related effects[J]. Curr HIV Res, 2015, 13(1): 10-20.
- [7] Guo JH, Ma W, Yang JW, et al. Expression pattern of NeuN and GFAP during human fetal spinal cord development[J]. Childs Nerv Syst, 2015, 31(6): 863-872.
- [8] Gusel'nikova VV, Korzhevskiy DE. NeuN as a neuronal nuclear antigen and neuron differentiation marker[J]. Acta Naturae, 2015, 7(2): 42-47.
- [9] Sarnat HB. Immunocytochemical markers of neuronal maturation in human diagnostic neuropathology[J]. Cell Tissue Res, 2015, 359(1): 279-294.
- [10] Sato H, Terakawa Y, Tsuyuguchi N, et al. Embryonal tumor with abundant neuropil and true rosettes in the brainstem: case report[J]. J Neurosurg Pediatr, 2015, 16(3): 291-295.
- [11] 张雨平, 黄其林, 赵聪敏. 大鼠不同发育期脑神经元核抗原的表达研究[J]. 重庆医学, 2010, 39(21): 2901-2903.
- [12] 梅开勇, 叶子英, 林汉良. 胚胎发育不良性神经上皮性肿瘤的临床病理分析[J]. 重庆医学, 2012, 41(9): 842-845.
- [13] 宋冲, 楚亚楠, 贺桂琼, 等. 梓醇对 APP/PS1 双转基因小鼠焦虑行为和脑内神经元的影响[J]. 重庆医科大学学报, 2013, 38(6): 598-601.
- [14] Wang J, Jahn-Eimermacher A, Brückner M, et al. Comparison of different quantification methods to determine hippocampal damage after cerebral ischemia[J]. J Neurosci Methods, 2015, 240(240): 67-76.
- [15] 刘学红, 张泳, 陈健尔. 神经元核心抗原和神经元特异性烯醇化酶在人胚胎脊髓发育阶段的表达[J]. 解剖学报, 2013, 44(5): 694-698.