

琥珀酰辅酶 A 转移酶硝基化酪氨酸位点 特异单克隆抗体的制备

何靖玄, 黄丽华, 黄妤, 张学文*

(湖南农业大学 生物科学技术学院, 湖南 长沙 410128)

摘要: 线粒体琥珀酰辅酶 A 转移酶(SCOT)含有 4 个酪氨酸残基, 其 4、76 位点酪氨酸(Tyr⁴、Tyr⁷⁶)的硝基化可导致其酶活性下降, 制备特定的抗体可对其硝基化水平和位点进行检测。应用淋巴细胞杂交瘤技术, 以化学合成的含琥珀酰辅酶 A 转移酶硝基化 Tyr⁴ 和 Tyr⁷⁶ 肽段为半抗原, 偶联钥孔血蓝蛋白(KLH)后, 作为免疫原免疫 Balb/c 小鼠, 分离免疫鼠的脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞融合, 获得了多株融合细胞。经对融合细胞多次筛选和检测, 最终获得 4 株单克隆抗体, 分别对应 SCOT Tyr⁴ 和 Tyr⁷⁶ 硝基化后表位, 其间接 ELISA 检测效价分别达到 1 128 000、1 32 000、1 512 000 和 1 4 096 000, 表明抗体具有较强特异性和灵敏度。

关键词: 线粒体琥珀酰辅酶 A 转移酶; 硝基化酪氨酸; 单克隆抗体

中图分类号: R392.11 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2011)04-0436-04

Development of monoclonal antibody against nitrated Tyr⁴ and Tyr⁷⁶ in succinyl CoA: 3-oxoacid CoA transferase

HE Jing-xuan, HUANG Li-hua, HUANG Yu, ZHANG Xue-wen*

(College of Bioscience and Biotechnology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: There are 4 tyrosine residues in succinyl CoA: 3-oxoacid CoA transferase (SCOT), in which nitration of Tyr⁴ and Tyr⁷⁶ will lead to change of the structure and decrease of enzymatic activity. In this study artificial synthetic peptides covering the SCOT Tyr⁴ and Tyr⁷⁶ region with the tyrosine nitrated were employed as hapten and conjugated to keyhole limpet hemocyanin (KLH) to immunize Balb/c mouse. The monoclonal antibodies against nitrated Tyr⁴ and Tyr⁷⁶ in SCOT are developed. After screening of massive cell lines, 4 antibodies against nitrated Tyr⁴ and Tyr⁷⁶ epitope of SCOT respectively were selected and determined by indirect ELISA. The result showed that the titer of the antibodies were 1 128 000, 1 32 000, 1 512 000 and 1 4 096 000 respectively. The results indicated that the antibodies obtained showed good specificity and sensitivity which will lay a foundation for further study of SCOT nitrotyrosine modification and its impact on physiology.

Key words: succinyl CoA: 3-oxoacid CoA transferase; nitrotyrosine; monoclonal antibody

线粒体琥珀酰辅酶 A 转移酶(succinyl CoA : 3-oxoacid CoA transferase, SCOT)在大部分肝外组织线粒体中均有表达^[1]。SCOT 功能异常可能导致血液内酮酸水平上升, 造成酮酸中毒^[2-4]。已有研究^[5-6]表明, 在糖尿病发生、发展过程中, SCOT

的酪氨酸硝基化水平上升, 同时其生物活性降低。

王媛等^[7]通过 LC-ESI-MS/MS 技术, 在过氧亚硝酸(ONOO⁻)处理后的重组纯化 SCOT 的 4 位、76 位、117 位及 368 位酪氨酸鉴定到了硝基化修饰。定点突变 4 位和 76 位酪氨酸为苯丙氨酸, 能够有

收稿日期: 2011-03-23

基金项目: 湖南省研究生科研创新项目(CX2009B140)

作者简介: 何靖玄(1986—), 男, 湖南长沙人, 硕士研究生; *通信作者, xuewen_zhang@126.com

效防止 ONOO⁻硝化处理后的 SCOT 生物活性降低,这一结果证明,Tyr⁴和 Tyr⁷⁶是酶蛋白硝基化并且在硝基化后能够使活性显著降低的主要位点,但是这 2 个酪氨酸位点在生物体内是否也发生了硝基化修饰并不清楚。虽然质谱技术可以有效地检测重组纯化蛋白中硝基化位点,但在检测组织样品复杂蛋白质混合物中的 SCOT 硝基化酪氨酸位点上则过于繁琐且效率低下^[8-9]。早在 1998 年,Smolenski 等^[10]就通过制备肽段特异性单克隆抗体的方法在体外和细胞模型中鉴定出血管扩张刺激磷蛋白 239 位丝氨酸的磷酸化修饰。笔者分别合成小鼠 SCOT 包含 Tyr⁴及 Tyr⁷⁶临近的肽段,并使用硝基化的酪氨酸制备成半抗原,偶联钥孔血蓝蛋白(KLH)后,免疫 Balb/c 小鼠,制备出了针对 SCOT Tyr⁴、Tyr⁷⁶硝基化特异性单克隆抗体。

1 材料与方法

1.1 材料

N-[γ -马来酰亚胺基丁酸]-磺基琥珀酰亚胺酯(Sulfo-GMBS)、钥孔血蓝蛋白(KLH)购自 Thermo 公司;G-25 葡聚糖凝胶柱和蛋白质 A 柱购自 GE Healthcare 公司;单克隆抗体亚类测试试剂盒购自 Southern Biotech 公司;HRP 标记的羊抗鼠酶标二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司;Balb/c 小鼠以及 Sp2/0 细胞均由中国科学院北京基因组研究所提供;半抗原合成由 GL 生物化学(上海)公司完成。

1.2 方法

1) 肽段合成。选取 SCOT 硝基化位点 Tyr⁴附近的氨基酸序列 KFYTDPVEAVKDIPN 作为半抗原,该肽段序列中的 Y 为硝基化的酪氨酸(Y^{-NO₂}),在肽段氨基末端添加半胱氨酸残基(C),用于半抗原偶联,得到肽段 CKFY^{-NO₂}TDPVEAVKDIPN,命名为 CN^{-NO₂}。同法,针对 SCOT 硝基化位点 Tyr⁷⁶附近肽段 IKRMISSYVGENAE 设计半抗原 CIKRMISSY^{-NO₂}VGENAE,并命名为 CE^{-NO₂}。

合成肽段 KFYTDPVEAVKDIPN 和 IKRMISSYVGENAE,分别命名为 KN 和 IE,用于半抗原筛选。

2) 肽段偶联。5 mg Sulfo-GMBS 溶解于 1 mL ddH₂O,立即加入 200 μ L 5 mg/mL KLH,经过 30 min

反应,通过交联葡聚糖凝胶柱 G-25 除去反应混合物中尚未与 KLH 偶联的 Sulfo-GMBS。合成肽段粉末 CN^{-NO₂},CE^{-NO₂}溶于偶联缓冲液(0.15 mol/L PBS, pH 7.2),使浓度为 0.1 mol/L。Bradford 法^[11]分别测定半抗原、活化 KLH 溶液浓度,半抗原分别与活化 KLH 等量混合后,室温反应 3 h,比较反应前后 412 nm 处吸收光值,如显著降低则判断偶联效率较高。

3) 小鼠免疫。免疫原(CE-NO₂-KLH,CN-NO₂-KLH,60 μ g)与等体积福氏完全佐剂混合乳化,皮下免疫注射 6 只 6 周龄雌性 Balb/c 小鼠,每种免疫原各 3 只。每 2 周进行 1 次免疫,3 次免疫后,每只小鼠通过 ELISA 测定其血清内抗体滴度,每免疫原组中拥有最高抗体滴度的小鼠腹腔注射 50 μ g 免疫原进行追加免疫。

4) 杂交瘤细胞的融合和克隆及筛选。追加免疫注射 3 d 后,取 2 只小鼠脾细胞,采用常规 PEG 法,与 SP2/0 骨髓瘤细胞融合制备杂交瘤细胞。1 000 r/min、5 min 离心收集杂交瘤细胞后,加入 10 mL 血清和 25 mL 半固体培养基,充分混匀,于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 培养箱中培养。5 d 后,通过显微操作挑出生长趋势良好的单个杂交瘤细胞,于 96 孔细胞培养板(含 1%HT)培养。14 d 后,以免疫原 CE-NO₂-KLH、CN-NO₂-KLH 作为抗原,PBS 作为阴性对照,通过间接 ELISA 方法测定杂交瘤细胞培养液上清效价。采取分步筛选法筛选杂交瘤细胞,分别以免疫原、KLH、硝基化半抗原肽段和未硝基化半抗原肽段作为抗原,取培养上清液进行间接 ELISA 抗体检测筛选,并且使用商品化试剂盒测试其亚类。

5) 腹水制备和抗体纯化。雌性 Balb/c 小鼠腹腔注射 1 mL 石蜡油,(1 \times 10⁶~1 \times 10⁷)个/mL 杂交瘤细胞。生长 1 周后收集腹水,使用蛋白 A 凝胶亲和层析柱纯化抗体。纯化后的抗体通过 Tris-HCl 调节 pH 至 7.0,使用 Bradford 方法定量并用洗脱缓冲液稀释至 1 mg/mL,储存于 50%甘油中,-20 $^{\circ}$ C 冰箱冻存。

6) 抗体滴度测定。用间接 ELISA 方法^[12]测定。纯化重组 SCOT 蛋白经过 100 μ mol/L ONOO⁻硝基化后,0.4 μ g/mL 包被聚苯乙烯微孔板,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,5%脱脂奶粉 37 $^{\circ}$ C 封闭 2 h,纯化抗体从 1:1 000 开始,作 2 倍梯度稀释,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h;辣根过氧化物

酶标记二抗 37 °C 孵育 1 h, 稀释度 1 : 5 000; 使用新鲜准备的 TMB 显色底物室温显色 30 min 后, 2 mol/L 硫酸终止反应, 读取其 $A_{450/620}$ 。抗体滴度曲线由 Sigmaplot 10.0 软件绘制构建, 以 1/2 最高吸光度时所对应抗体稀释倍数为纯化抗体效价。

2 结果

2.1 硝基化 Tyr⁴和 Tyr⁷⁶位点 SCOT 肽段偶联

为了增强半抗原免疫原性, 合成肽段 CE-NO₂, CN-NO₂ 与活化 KLH 偶联, 采用异型双功能交联剂 Sulfo-GMBS 连接 KLH 的氨基和肽段半胱氨酸残基上的巯基。经过 3 h 的充分反应, 两反应混合物在 412 nm 处的吸光度值分别下降了 78.0% 和 69.5%, 这一显著降低说明 KLH 与肽段已充分偶联。

2.2 单克隆抗体特异性筛选及亚类鉴定

第 3 次免疫后 1 周, 以 KN/CN-NO₂, IE/CE-NO₂ 作为包被抗原, 每只小鼠的血清通过间接 ELISA 的方法检测其与相应抗原的反应。所有小鼠的血清均能够较好地与相应的硝基化肽段反应, 而 CN 组中有 2 只小鼠血清对未硝基化肽段 KN 表现出明显反应, CE 组中有 1 只小鼠血清能够和未硝基化肽段 IE 反应。选取对硝基化肽段表现出最高反应水平, 同时对未硝基化肽段表现出低反应水平的小鼠脾细胞用于细胞融合。

融合 5 d 后进行显微观察, 挑选具有较强生命活性的杂交瘤细胞克隆继续培养, 培养上清通过间接 ELISA 进行筛选。以 KLH-CE-NO₂/CN-NO₂ 作为包被抗原, 分别有 14 个克隆株培养上清能够识别各自的抗原。

经过进一步培养, 并通过分步筛选法对单克隆杂交瘤细胞特异性进行筛选。首先, 通过间接 ELISA 法, 观察所有克隆株与 KLH-硝基化肽段偶联物之间的反应, 以吸光度值 0.5 作为阳性阈值, CN 组中有 5 株克隆, 而 CE 组中有 11 株克隆能够与 KLH-硝基化肽段偶联物反应。随后, 观察克隆与 KLH 之间的反应, 确保其不会与 KLH 反应, 以吸光度值 0.1 作为阴性阈值, CN 组中有 4 株克隆, 而 CE 组中有 3 株克隆表现出大于 0.1 的吸光度值, 被认为能够与 KLH 反应。随后, 检测克隆

与硝基化肽段 CN-NO₂/CE-NO₂, 未硝基化肽段 KN/IE 之间的反应。由于肽段分子较小, 造成包被效率不高, CN 组和 CE 组中分别有 2 株克隆表现出对硝基化肽段有大于 0.1 的吸光度值, 而所有的克隆均未检测到与未硝基化蛋白之间有明显的反应。经过筛选, CN 组和 CE 组分别有 2 株克隆能够与 CE/CN-NO₂, KLH-CE/CN-NO₂ 反应, 不与 IE/KN, KLH 反应, 以细胞株号命名, 分别为 CE-9、CE-14、CN-10、CN-11。经商品化试剂盒检测, 4 株抗体均是 G1 亚类。

2.3 抗体滴度

经过间接 ELISA 鉴定, 在高抗体浓度(稀释度 1 : 1 000)下, CN-10、CN-11、CE-9 和 CE-14 均能和 ONOO⁻ 硝基化 SCOT(SCOT-NT) 强烈反应, 随着抗体浓度的降低, CE-9、CE-14 与 SCOT-NT 的反应水平迅速下降, $A_{450/620}$ 分别在 1 : 128 000 和 1 : 32 000 达到最高值的 1/2; 而在所有抗体稀释倍数下, CN-10、CN-11 和 SCOT-NT 的反应水平均保持了比 CE-9 和 CE-14 更高的反应水平, 并分别于 1 : 512 000 和 1 : 4 096 000 达到最高值的 1/2。

3 讨论

本研究以小鼠 SCOT 蛋白序列 Tyr⁴和 Tyr⁷⁶ 临近具有较高抗原性的肽段作为半抗原, 并将正常的酪氨酸替换为硝基化酪氨酸, 以制备针对硝基化 Tyr⁴和 Tyr⁷⁶ 的单克隆抗体。由于半抗原肽段仅为 14、15 个氨基酸片段, 且仅具备抗原性不具备免疫原性, 无法激发淋病 B 细胞产生免疫应答。为了增强其免疫原性, 半抗原通过异性双功能交联剂 sulfo-GMBS 与载体蛋白 KLH 偶联, 经过紫外分光光度法观测确定交联方法可靠, 交联效率高。KLH 具有较强的免疫原性, 将其与不具有免疫原性的半抗原肽段偶联免疫小鼠将会产生针对目标肽段的抗体, 但是同时可能激发 B 淋巴细胞产生针对 KLH 自身抗原决定簇的抗体, 相对减少了针对半抗原的抗体产生增加阳性克隆筛选的难度和工作量^[13]; 所以在筛选过程中, 使用了多种抗原来确定制备的抗体在识别相应硝基化肽段的同时不会和 KLH、未硝基化肽段反应。经过筛选, 4 株抗体 CE-9、CE-14、CN-10 和 CN-11

分别识别 SCOT 上硝基化 Tyr⁷⁶ 和 Tyr⁴ 且不会和其他筛选蛋白反应,具有较高的特异性。经过间接 ELISA 法检测,4 株的抗体效价分别达到 1 128 000, 1 32 000, 1 512 000 和 1 4 096 000,均为 G1 亚类。

酪氨酸硝基化是一种重要的选择性蛋白质,翻译后修饰并可能导致多种蛋白质生物活性的降低,甚至失活^[14-16],研究并鉴定特定的酪氨酸位点硝基化对于研究蛋白质硝基化与疾病发生、发展机理有重要意义。制备 SCOT Tyr⁴ 和 Tyr⁷⁶ 酪氨酸特异性单克隆抗体可以进一步完善 3NT 检测方法,提出除了质谱技术以外的另一条技术途径,对于阐释 NO 介导的 SCOT 结构和功能损伤以及 3NT 在机体生理病理过程中所起的作用具有指导意义。

参考文献:

- [1] Fukao T, Song X Q, Mitchell G A, et al. Enzymes of ketone body utilization in human tissues: Protein and messenger RNA levels of succinyl-coenzyme A (CoA): 3-ketoacid CoA transferase and mitochondrial and cytosolic acetoacetyl-CoA thiolases[J]. *Pediatr Res*, 1997, 42(4): 498-502.
- [2] Lori Laffel. Ketone Bodies: A review of physiology, pathophysiology and application of monitoring to diabetes [J]. *Diabetes Metab Res Rev*, 1999, 15(6): 412-426.
- [3] Okuda Y, Kawai K, Ohmori H, et al. Ketone body utilization and its metabolic effect in resting muscles of normal and streptozotocin-diabetic rats[J]. *Endocrinol Jpn*, 1991, 38(3): 245-251.
- [4] Ikeda T, Ishimura M, Terasawa H, et al. Uptake of ketone bodies in perfused hindquarter and kidney of starved, thyrotoxic and diabetic rats [J]. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1993, 203(1): 55-59.
- [5] Illarion V, Marcondes T S, Murad F. Diabetes-associated nitration of tyrosine and inactivation of succinyl-CoA: 3-oxoacid CoA-transferase[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2001, 281(6): 2289-2295.
- [6] Marcondes S, Turko I V, Murad F. Nitration of succinyl-CoA: 3-oxoacid CoA-transferase in rats after endotoxin administration[J]. *PNAS USA*, 2001, 98(13): 7146-7151.
- [7] Wang Y, Peng F, Tong W, et al. The nitrated proteome in heart mitochondria of the db/db mouse model: Characterization of nitrated tyrosine residues in SCOT [J]. *J Proteome Res*, 2009, 9(8): 10.
- [8] Rebrin I, Brègère C, Kamzalov S, et al. Nitration of tryptophan 372 in Succinyl-CoA: 3-Ketoacid CoA transferase during aging in rat heart mitochondria [J]. *Biochemistry*, 2007, 46(35): 10130-10144.
- [9] Abello N, Kerstjens H A, Postma D S, et al. Protein tyrosine nitration: Selectivity, physicochemical and biological consequences, denitration, and proteomics methods for the identification of tyrosine-nitrated proteins[J]. *J Proteome Res*, 2009, 8(7): 3222-3238.
- [10] Smolenski A, Bachmann C, Reinhard K, et al. Analysis and regulation of vasodilator-stimulated phosphoprotein serine 239 phosphorylation in vitro and in intact cells using a phosphospecific monoclonal antibody[J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(32): 20029-20035.
- [11] Zor T, Selinger Z. Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies[J]. *Anal Biochem*, 1996, 236(2): 302-308.
- [12] Shinohara T, Okada M, Suzuki K, et al. Quantitative analysis for soluble elastin in circulation and cell culture fluids using monoclonal antibody-based sandwich immunoassay[J]. *J Immunoassay Immunochem*, 2005, 26(3): 189-202.
- [13] Fasciglione G F, Marini S, Bannister J V, et al. Hapten-carrier interactions and their role in the production of monoclonal antibodies against hydrophobic haptens[J]. *Hybridoma*, 1996, 15(1): 1-9.
- [14] Alvare B, Sueta G F, Freeman B A, et al. Kinetics of peroxynitrite reaction with amino acids and human serum albumin[J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(2): 842-848.
- [15] Beckmann J S, Ye Y Z, Anderson P G, et al. Extensive nitration of protein tyrosines in human atherosclerosis detected by immunohistochemistry[J]. *Biol Chem Hoppe Seyler*, 1994, 375(2): 81-88.
- [16] Halliwell B. What nitrates tyrosine? Is nitrotyrosine specific as a biomarker of peroxynitrite formation in vivo?[J]. *FEBS Lett*, 1997, 411(2-3): 157-160.

责任编辑: 王赛群