

荧光标记 IgHV₁ 抗原九肽及其分离纯化^{*}

张燕玲^{**} 陈中举 刘雪平 黄金瑛

(天津医科大学检验系 天津 300203)

摘要 目的: 建立 IgHV₁ 抗原九肽荧光标记及分离纯化的方法。方法: 利用硫代磷酸化的原理以荧光试剂标记 IgHV₁ 抗原九肽, 用葡聚糖凝胶(Sephadex) G 15 层析柱及聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)对荧光标记的 IgHV₁ 抗原九肽进行分离纯化并以毛细管电泳技术进行鉴定。结果: 用毛细管电泳技术对纯化后样品进行鉴定, 其电泳图谱只出现单一峰。结论: 初步建立 IgHV₁ 抗原九肽荧光标记及分离纯化的方法。

关键词 IgHV₁ 抗原九肽 荧光标记 纯化

荧光标记蛋白的技术起源于上个世纪 40 年代, Coons 等^[1] 利用荧光标记抗体来检测相应的抗原, 随着现代荧光检测技术的发展, 荧光标记蛋白质及多肽在医学、分子生物学领域的应用也日益广泛。

IgHV₁ 是免疫球蛋白重链可变区(V_H) 有代表性的一个家族。IgHV₁ 的框架区 FR1 区的基因表达产物为一个抗原九肽, 其氨基酸序列为 QLVQSGAEV^[2], 此抗原九肽是正常 B 淋巴细胞、淋巴瘤细胞、B 淋巴细胞白血病(B-ALL) 细胞所共有的^[3]。

本文对人工合成的 IgHV₁ 抗原九肽进行荧光标记并纯化, 研究了荧光标记反应的条件及分离纯化的方法, 荧光标记的 IgHV₁ 可以利用激光扫描共聚焦显微技术、流式细胞技术对其进行观察和检测。为研究抗原肽在细胞中的表达, 研究抗原肽参与免疫应答等作了基础性的工作。

1 试剂和方法

1.1 试 剂

IgHV₁ 抗原九肽(QLVQSGAEV) (上海申能博彩生物科技有限公司合成)、蛋白激酶 A (PKA) (Promega 公司)、 γ -硫代腺苷三磷酸(ATP γ S) (Roch 公司)、荧光试剂 5(6)-羧-四甲基罗丹明-5 马来酰

亚胺(5(6)-TAMRA-5-maleimide) (Biotium 公司)。用于聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE) 的丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、Tris 碱、甘氨酸为 GIBCO 进口分装产品。其它试剂均为国产分析纯试剂。

1.2 方 法

1.2.1 IgHV₁ 抗原九肽的荧光标记 抗原九肽溶于 100mmol/L Tris-HCl (pH7.0) 制成浓度为 5.3 mmol/L 溶液, 荧光试剂为 3.2 mmol/L, ATP γ S 为 10mmol/L。标记反应体系为: 20 μ l 100 mmol/L MgCl₂, 35 μ l 10 mmol/L ATP γ S, 200 μ l 5.3 mmol/L 抗原九肽, 4 μ l 74 μ l PIPKA。反应温度 25 $^{\circ}$ C, 10 小时后, 在反应混合物中直接加入 400 μ l 3.2 mmol/L 5(6)-TAMRA-5-maleimide, 混匀, 4 $^{\circ}$ C 避光过夜。

1.2.2 标记后的纯化 利用葡聚糖凝胶(Sephadex G-15) 对游离荧光和标记荧光的抗原九肽进行分离, 100 mmol/L Tris-HCl (pH7.0) 为洗脱液。收集最先洗脱下来的荧光区带液体于 eppendorf 管中。

以 PAGE 电泳对所收集荧光标记的 IgHV₁ 抗原九肽作进一步的纯化, 凝胶浓度 22%, 电泳缓冲液为 30 mmol/L Tris-甘氨酸(pH 8.3), 电压 280V 电泳 2h。

PAGE 电泳后, 在 UV- II 型紫外分析仪下, 用刀片切下荧光结合的 IgHV₁ 抗原九肽的区带, 置于蒸馏水中浸泡后以 Amicon 超滤管离心去除凝胶。

1.2.3 毛细管电泳鉴定荧光标记抗原九肽的纯度 工作条件: 电压 18kV, 温度 20 $^{\circ}$ C, 进样时间 3 \times 3s (10KPa 压力进样), 运行 20min, 检测波长 220nm, 电

收稿日期: 2004 04 16 修回日期: 2004 07 05

^{*} 天津市高等学校科技发展基金资助项目(020131)

^{**} 电子信箱: zhwang@mail.zlnet.com.cn

泳缓冲液 50mmol/L H₃PO₄-KH₂PO₄ (pH4.0)。每次测定间依次用重蒸水、0.2mol/L NaOH、重蒸水、电泳缓冲液各冲洗 2min。

2 结 果

2.1 荧光标记 IgHV₁ 抗原九肽反应

首先使 IgHV₁ 抗原九肽序列的第五位丝氨酸在 PKA、ATP 与 S 的作用下硫代磷酸化, 使抗原九肽带上亲核型的硫原子, 第二步荧光试剂 5(6)-TAMRA-5-maleimide 在 pH7.0 条件下可以选择性标记巯基(硫原子), 硫原子与荧光试剂发生亲核反应, 将后者共价结合在抗原九肽上。

2.2 标记后的纯化

标记荧光的抗原九肽的分子量约为 1780 (IgHV₁ 抗原九肽为 1073.7, 荧光试剂 5(6)-TAMRA-5-maleimide 为 594.66), 处于 Sephadex G 15 的分离范围(0-1500), 故荧光标记的抗原九肽可以在凝胶柱中经洗脱液的洗脱与游离荧光、未标记荧光的抗原九肽分离。

对收集于 eppendorf 管中的荧光标记抗原九肽进一步纯化, 以游离荧光为对照, 用 PAGE 电泳再次纯化荧光标记的抗原九肽(结果如图 1)。切下荧光标记抗原九肽区带于 Amicon 超滤管中离心去除凝胶。

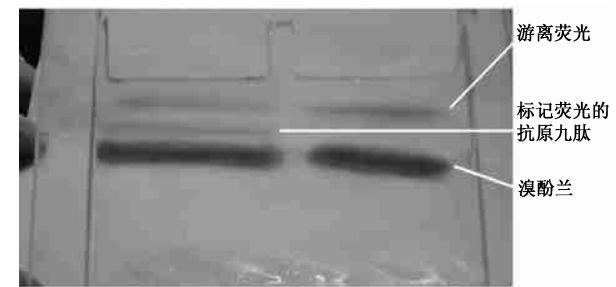


图 1 PAGE 电泳结果

2.3 毛细管电泳鉴定荧光标记抗原九肽的纯度

2.3.1 毛细管电泳条件的建立 波长选择: IgHV₁ 抗原九肽溶于 100mmol/L Tris-HCl (pH7.0) 缓冲液, 在 Spectrum 752 型紫外可见分光光度计上作 200~400nm 的全波长扫描, 在 220nm 处有一高的吸收峰(图 2), 故选择 220nm 作为毛细管电泳的检测波长。

缓冲液及其 pH 值的选择: 通过比较磷酸盐缓冲液 H₃PO₄-KH₂PO₄ (pH4.0), Tris-HCl 缓冲液

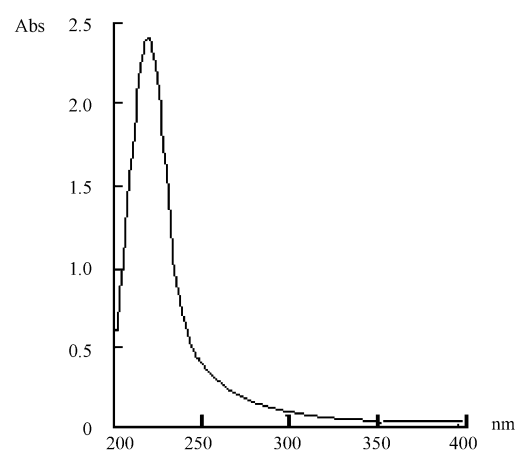


图 2 全波长扫描

(pH7.0), Tris-甘氨酸缓冲液(pH 8.3)在毛细管电泳上的分离结果, 认为 50mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH4.0)作为电泳缓冲液时的分离效果较好。这可以解释为在 pH4.0 的环境下荧光标记的抗原九肽、未标记荧光的抗原九肽、游离荧光有着电荷/质量比的差异。

电压选择: 升高电压, 会使分离效率和分离度增加, 分离时间缩短, 但过高的电压会产生过量的热, 这些热量不能及时散失, 使径向温度梯度加大, 反而使分离效率和分离度下降。通过比较 16、17、18、19、20kV 时的分离结果, 认为电压为 18kV(此时的电流为 53μA) 时, 分离效果最佳。

2.3.2 毛细管电泳对荧光标记抗原九肽的鉴定结果 对未经 sephadex 凝胶柱分离的荧光反应体系混合液体进行毛细管电泳, 如图 3。同时在相同条件下对未标记的抗原九肽、纯化后的荧光标记抗原九肽及游离荧光分别进行毛细管电泳, 结果如图 4、5、6。

如图 3~ 图 6 所示, 未标记的抗原九肽(图 4)、

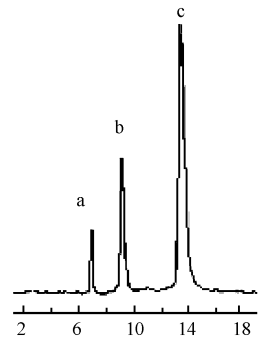


图 3 混合物

纯化后的荧光标记抗原九肽(图5)及游离荧光(图6)的出峰时间分别为7.020', 9.670', 14.010', 与图3中的a峰(7.056'), b峰(9.012'), c峰(14.320')的出峰时间基本相符, 所以对应荧光反应体系的毛细管电泳图3中a峰应为未标记的抗原九肽, b峰为荧光标记的抗原九肽, c峰为游离荧光。

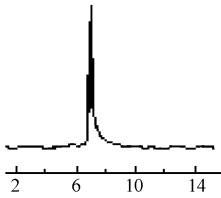


图4 未标记肽

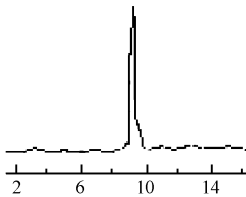


图5 纯化后标记肽

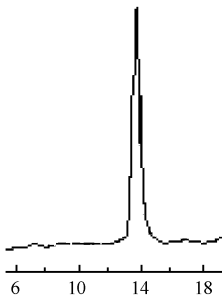


图6 游离荧光

过夜的荧光反应体系中, 生成了荧光标记抗原九肽(b峰), 但还有部分抗原九肽未与游离荧光相结合(a峰)。电泳纯化后的荧光标记抗原九肽的电泳图谱(图5)显示只出现一个峰, 这说明本文对荧光标记抗原九肽的分离纯化方法基本可行。

3 讨论

荧光标记蛋白及肽段大多利用与氨基酸残基上的基团结合。但有的氨基酸不含这类基团或所含基团由于其它原因不能与荧光标记试剂相结合, 这就给研究相应的蛋白及肽带来了困难。Fadden等^[4]和Hsi等^[5]报道一种荧光标记分析蛋白质丝氨酸磷酸化的方法, 利用磷酸化丝氨酸残基易发生

β 消除反应, 生成去氢丙氨酸残基, 将二硫乙醇(ethanedithiol, EDT)加成到产生的双键上, 产生一个巯基, 再与标记巯基的荧光试剂结合。另外还有先将荧光标记在氨基酸上, 利用标记上荧光的氨基酸合成肽的方法, 但这种方法价格较昂贵^[6]。

本文以IgHV_I抗原九肽QLVQSGAEV为例研究了荧光标记反应。我们参照车发云等的文献报道^[7], 用 γ -硫代腺苷三磷酸(ATP γ S)代替ATP, 在蛋白激酶A的催化下使底物肽硫代磷酸化, 即使丝氨酸上的羟基硫代磷酸化, 带上能与荧光试剂共价结合的亲核型硫原子, 在pH7.0的环境下荧光试剂5(6)-TAMRA-5-maleimide可以选择性标记巯基, 而此时肽链上的氨基通常被质子化, 不与荧光试剂反应。这种硫代磷酸化后荧光标记的方法不仅对丝氨酸有效, 对苏氨酸和酪氨酸同样有效。在对标记后的抗原九肽纯化过程中我们用凝胶层析及PAGE电泳进行纯化及再纯化, 得到了基本满意的效果。本文利用毛细管电泳技术对标记后的抗原九肽作出峰时间的判定即定性分析, 还可以利用毛细管电泳技术对标记反应的进程进行监测。

荧光标记的IgHV_I抗原九肽可用于活细胞内的单分子行为观测, 在激光扫描共聚焦显微镜下观察荧光标记的抗原肽分子如何进入抗原呈递细胞, 并由相应的MHC呈递到细胞表面, 如何与对应的细胞毒T细胞的T细胞受体作用^[2], 还可以观察到肽与蛋白、细胞等在分子水平作用的过程^[8]。荧光标记与激光扫描共聚焦技术的联合应用, 给利用荧光标记的肽进行生物学研究和医学研究提供了很大的发展空间。

参考文献

- [1] 孙龙安, 李龙, 林钢. 医学特种检验与实验室诊断. 北京: 人民军医出版社, 2002. 3~5
- [2] Gricks C S, Rawlings E, Foroni L, et al. Somatic mutated regions of immunoglobulin on human B cell lymphomas code for peptides that bind to autologous major histocompatibility complex class I, providing a potential target for cytotoxic T cell. *Cancer Research*, 2001, 61: 5145~5152
- [3] 林宁晶, 朱平, 张新, 等. 组合免疫球蛋白基因片段诱发抗淋巴瘤的体液免疫反应. *中华医学杂志*, 2002, 23: 68~72
- [4] Fadden P, Haystead T A J. Quantitative and selective fluorophore labeling of phosphoserine on peptides and proteins: Characterization at the attomole level by capillary electrophoresis and laser induced fluorescence. *Anal Biochem*, 1995, 225(1): 81~88
- [5] Hsi K L, O'neil S A, Dupont D R, et al. Visualization of proteins

by modification of lysines, cysteines, and phosphorylated serines facilitates sample preparation for microsequencing. Anal Biochem, 1998, 258(1) : 38~ 47

[6] Michael S B, Robert H V, Britta M, et al. Human primary and memory cytotoxic T lymphocyte responses are efficiently induced by means of CD40 activated B cells as antigen presenting cells: potential for clinical application. Blood, 2002, 99(9) : 3319~ 3325

[7] 车发云, 夏其昌. 磷酸化底物肽的硫代磷酸化及荧光标记. 生物化学与生物物理学报, 2000, 32(1) : 69~ 73

[8] Fiona A B, David J B, Alexander N O, et al. Synthesis and Properties of (6, 7 Dimethoxy-4 coumaryl) alanine: A fluorescent peptide label. Anal Biochemistry, 1999, 270: 15~ 23

Fluorescent Labeling and Purification of IgHV₁ Antigen Peptide

ZHANG Yarr ling CHEN Zhong ju LIU Xue ping HUANG Jirrying

(Tianjin Medical University Detection Department Tianjin 300203, China)

Abstract Objective To establish a method of fluorescent labeling and purification of IgHV₁ antigen peptide(nine amino acid). Methods The IgHV₁ antigen peptide was conjugated with fluorescence in the principle of thiophosphorylation and purified with Sephadex-G15 chromatography and PAGE, and then identified by capillary electrophoresis (CE) system. Result The sample that has been purified by Sephadex chromatography and PAGE was identified by CE system. Only one peak was demonstrated in the CE graph. Conclusion The method of fluorescent labeling and purification of IgHV₁ antigen peptide was preliminarily established.

Key words IgHV₁ antigen peptide (nine amino acid) Fluorescent labeling Durification

《生物化学与生物物理进展》2005 年征订启事

《生物化学与生物物理进展》是国内外公开发行的全国性学术期刊, 由中国科学院生物物理研究所和中国生物物理学会共同主办。主要报道生物化学、分子生物学、生物物理学及神经科学等领域的国内外最新进展, 设有微型述评、综述与专论、研究报告、技术与方法、研究快报等十几个栏目。本刊自 1974 年创刊以来, 始终以推动生命科学发展和促进国家经济建设为宗旨, 不断提高学术、编辑和出版质量。经过二十余年的不懈努力, 已成为一个在我国生命科学、基础医学及其他相关领域具有一定影响、深受广大读者欢迎及专家好评的学术期刊。1999 年荣获首届中国期刊奖提名奖。被 SCIE、CA 等国际权威检索系统收录。ISI 最新出版的期刊引征报告表明, 本刊 2003 年影响因子(即 SCI 影响因子) 为 0. 241。

本刊国际连续出版物号: ISSN 1000- 3282, 国内统一刊号: CN 11-2161/Q, 邮发代号: 2-816。本刊为月刊(每月 20 日发行), 国际标准开本(210mm× 297mm), 96 页, 每本订价 ¥ 25. 00 元(全年 300. 00 元)。若错过邮局订阅, 请直接与编辑部联系, 地址: 北京朝阳区大屯路 15 号中国科学院生物物理研究所, 邮政编码: 100101, 电话: 010-64888459, E-mail: prog@sun5. ibp. ac. cn, 网址: <http://www. pibb. ac. cn>