

◇技术与方法◇

基于肺癌细胞特异性结合肽检测肺癌的免疫酶法

张云^{1,2}, 王华素^{1,2}, 夏觅真², 王怡², 薛绍礼²

摘要 以肺腺癌 A549 细胞为筛选靶标, 人胚肺二倍体 helf 细胞作反相吸附细胞, 从噬菌体随机十二肽库中筛选出与肺癌细胞特异性结合的噬菌体多肽, 用其替代一抗, 酶标抗噬菌体抗体作二抗, 建立检测肺癌细胞的免疫酶染色法。对噬菌体随机十二肽库进行 4 轮筛选和 ELISA 鉴定后, 用亲和力和特异性最好的 5 号噬菌体克隆建立了检测肺癌细胞的免疫酶法。

关键词 噬菌体展示肽库; A549 细胞; 肺癌; 免疫酶法

中图分类号 R-331

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2014)09-1329-05

噬菌体展示技术指利用分子生物学技术将外源蛋白质分子或肽段的基因插入噬菌体基因组 DNA 中, 使外源基因编码的分子表达于噬菌体衣壳表面^[1]。插入随机的寡核苷酸则可构建表达有各种外源蛋白的蛋白质或多肽文库, 表达在噬菌体表面的外源蛋白或多肽具有相对独立的空间结构和生物活性^[2]。该研究以肺腺癌 A549 细胞作为筛选靶标, 人胚肺二倍体 helf 细胞做反相吸附细胞, 对噬菌体随机十二肽库进行全细胞筛选, 旨在得到与肺癌细胞特异性结合的噬菌体多肽, 用其替代一抗, 酶标抗噬菌体抗体作二抗, 建立检测肺癌细胞的免疫酶染色法 (immunoenzymatic assay, IEA)。

1 材料与方法

1.1 主要材料 人肺腺癌 A549 细胞和人胚肺成纤维 helf 细胞来自本实验室自存; DMEM 培养基购自美国 Gibco 公司; 新生牛血清购自杭州四季青公司; TMB 和 DAB 均购自武汉博士德生物工程有限公司。ER2738 宿主菌、噬菌体随机十二肽库 (Ph. D. -12TM Phage Display Peptide Library Kit) 购自 New England Biolabs 公司, 100 μ l, 1×10^{13} pfu/ml;

HRP/Anti-M13 单克隆抗体购自美国 GE 公司; 肺腺癌组织样本由安徽医科大学第一附属医院惠赠。

1.2 实验方法

1.2.1 噬菌体十二肽库的全细胞筛选 取对数生长期 A549 细胞和 helf 细胞, 胰酶消化后接种于 6 孔板中, 待细胞长满 80% ~ 90% 时, 弃培养上清液, PBS 洗涤; 加入含 1% BSA 的 PBS, 37 $^{\circ}$ C 封闭 1 h; 用 TBS 洗涤 A549 细胞 4 次, 用 1.5 ml TBS 稀释 4×10^{10} 的噬菌体 (10 μ l 的原始肽库), 加入 A549 细胞孔中, 吸出未结合的噬菌体, 用 TBST 洗 3 次, 第 1 轮洗涤 Tween-20 浓度为 0, 第 2 轮为 0.1%, 第 3 轮为 0.5%, 第 4 轮为 1%; 再向每孔 A549 细胞中加入 500 μ l Gly-Hcl (pH 2.2), 100 r/min 温和摇动 10 min 以上, 在孔中轻轻敲打后吸出结合于 A549 表面的噬菌体洗脱液, 放入一干净的离心管中, 向离心管中加入 225 μ l 的 1 mol/L Tris-Hcl (pH 9.1) 中和 1.5 ml 的洗脱液。将 helf 细胞 PBS 冲洗后封闭, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 期间不时取出轻轻摇晃, 用 TBS 洗涤 3 次, 将上述中和洗脱液加入已封闭的 helf 细胞中, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 收集上清液。取 10 μ l 测滴度, 其余加入 20 ml 的 ER2738 培养物中, 37 $^{\circ}$ C 剧烈摇动培养 4.5 h (第 4 轮淘选后不再扩增)。

从第 4 轮淘选回收物的滴度检测平板上挑取单个分离良好的噬菌斑, 共 24 个, 进行扩增, 同时, 对在第 1 轮淘选中未与 A549 细胞结合的噬菌体进行 LB/IPTG/X-gal 平板培养, 挑取分离良好的噬菌斑进行扩增 (命名为 S1、S2、S3) 作为后续鉴定实验的阴性对照之一。

测定噬菌体滴度及噬菌体的扩增按噬菌体随机十二肽库说明书进行。

1.2.2 ELISA 鉴定噬菌体多肽 将 A549 和 helf 细胞按 1×10^4 个/孔分别种于 96 孔板, PBS 包被做空白对照, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养至长满单层, PBS 冲洗后用 4% 多聚甲醛固定 20 min, 2% BSA 封闭 1 h。加入滴度 1×10^{12} pfu/10 μ l 的噬菌体, 室温孵育 1 ~ 1.5 h。PBST (0.05%) 洗 3 min \times 3 次, 加 1 : 5 000 稀释的 HRP/Anti-M13 抗体, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, PBST (0.05%) 洗 3 min \times 3 次后加入 TMB 显色, 5 ~

2014-05-13 接收

基金项目: 安徽省重点科研项目 (编号: 07021017)

作者单位: 安徽医科大学¹ 基础医学院、² 生物工程教研室, 合肥 230032

作者简介: 张云, 女, 硕士研究生;

薛绍礼, 男, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: xuesl@sina.com

10 min 后加入等体积的 0.5 mol/L H₂SO₄ 终止反应。酶标仪 450 nm 读数。所挑选噬菌体克隆 A 值/阴性克隆 A 值 > 2.1 为阳性; A549 细胞 A 值/helf 细胞 A 值 > 2.1 为阳性。

1.2.3 肺癌细胞特异性结合肽的测序 选取与肺癌细胞结合亲和力和特异性最好的噬菌体克隆,按照 NEB 公司噬菌体随机十二肽库的说明书,进行扩增和纯化后抽提 DNA,按该公司提供的引物送上海生工生物公司进行全自动测序。

1.2.4 基于肺癌细胞特异性结合肽检测肺癌的免疫酶法的建立 根据肽库筛选和 ELISA 鉴定的结果,选择亲和力和特异性最强的噬菌体克隆替代一抗,HRP/Anti-M13 抗体用作二抗,建立检测肺癌细胞的免疫酶染色法。

具体操作为:细胞消化离心后制成涂片,4% 的多聚甲醛固定,室温孵育 15 min, PBS 冲洗 3 次 × 3 min。滴加 1% Triton X-100,室温孵育 10 min, PBS 冲洗 3 次 × 3 min。滴加 3% H₂O₂,室温孵育 30 min,阻断细胞内源性过氧化物酶。PBS 冲洗 3 次 × 3 min, 2% BSA 封闭 1 h。PBS 冲洗 3 次 × 3 min,滴加噬菌体多肽,室温孵育后 0.5% PBST 冲洗 3 次 × 3 min,滴加 HRP/Anti-M13 抗体,孵育后 0.5% PBST 冲洗 3 次 × 3 min。加 DAB 显色液,显色 5 ~ 10 min,双蒸水终止显色。苏木精复染,自来水冲洗返蓝。烤干,中性树脂胶封片。

结果判定:被检测细胞经 IEA 实验及苏木精复染后,细胞边缘特异性染有明显的褐色者为阳性,若未经苏木精复染,则整个细胞呈褐色者为阳性。

1.2.5 免疫酶染色条件的优化 以 helf 细胞作阴性对照,优化噬菌体克隆和酶标抗体的使用浓度和反应时间。分别选用 1 × 10⁶、5 × 10⁶、1 × 10⁷、5 × 10⁷、1 × 10⁸、5 × 10⁸、1 × 10⁹、5 × 10⁹、1 × 10¹⁰、5 × 10¹⁰、1 × 10¹¹、5 × 10¹¹、1 × 10¹² pfu/10 μl 等滴度的噬菌体克隆,以及稀释度分别为 1 : 1 000、1 : 3 000、1 : 5 000 的 HRP/Anti-M13 抗体,与被检测细胞分别进行 0.5、1、1.5 h 的孵育,其他条件不变,观察噬菌体克隆不同滴度、二抗不同稀释度及不同孵育时间对检测结果的影响,确定噬菌体克隆的最佳工作滴度、二抗最佳稀释度以及两者的作用时间。

1.2.6 基于肺癌细胞特异性结合肽检测肺癌的免疫酶法的特异性鉴定

1.2.6.1 以阴性噬菌体克隆为对照的特异性鉴定 S1 号噬菌体克隆是第 1 轮淘选中不与 A549 细胞结合的噬菌体克隆,以此作阴性对照,进行 IEA 实

验,鉴定淘选所得克隆结合肺癌细胞的特异性。

1.2.6.2 以其他癌细胞为对照的特异性鉴定 分别用肺腺癌 A549 细胞、肺腺癌 SPC-A1 细胞、胃癌 BGC 细胞、乳腺癌 231 细胞和结肠癌 RKO 细胞作被检细胞,进行 IEA 实验,鉴定该检测方法的特异性。

1.2.7 基于肺癌细胞特异性结合肽检测肺癌的免疫酶法的重复性鉴定 相同条件下,使用相同扩增批次的噬菌体多肽对同种细胞进行 IEA 实验,观察染色深浅有无变化,鉴定本方法的可重复性。

1.2.8 噬菌体克隆的保存期鉴定 取 4 °C 保存 1、2、3 个月的噬菌体克隆进行 IEA 实验,测定噬菌体多肽的保存期,观察效价的变化情况。

1.2.9 应用 IEA 法对临床肺腺癌组织样本的检测 选取经临床病理确诊为肺腺癌的 10 例组织样本,进行病理切片,常规修复,将 5 号和 S1 号噬菌体克隆的滴度调整为 10¹² pfu/10 μl 用于 IEA 检测肺腺癌组织,使用本研究建立的 IEA 法进行检测。

2 结果

2.1 噬菌体十二肽库的全细胞筛选 每轮差减筛选得到的与 A549 结合且不与 helf 结合的噬菌体,取 10 μl 做滴度监测,其余的加入内含百倍稀释宿主菌 ER2738 过夜培养物的 20 ml LB 培养基内扩增,再经离心、沉淀和重悬的步骤得到扩增液,再次取 10 μl 做滴度监测,剩余的投入下一轮筛选。见表 1。

表 1 四轮差减淘选数据

淘选轮数	投入 (pfu)	回收 (pfu)	回收率
1	1.00 × 10 ¹¹	3.45 × 10 ⁹	3.45 × 10 ⁻²
2	2.28 × 10 ¹⁰	8.87 × 10 ⁶	3.89 × 10 ⁻⁴
3	1.00 × 10 ¹¹	5.17 × 10 ⁷	5.17 × 10 ⁻⁴
4	3.80 × 10 ⁸	8.62 × 10 ⁴	2.19 × 10 ⁻⁴

2.2 ELISA 鉴定噬菌体克隆

2.2.1 以阴性噬菌体克隆为对照的 ELISA 鉴定 用 ELISA 法对随机挑取的 1 - 24 号噬菌体克隆进行鉴定,得到 10 个阳性克隆,阳性率为 41.67%,其中 2、5、8、9、10、11、12、16、24 等 9 个克隆对 A549 细胞具有较高的亲和性,S1、S2 和 S3 号克隆为阴性对照,见图 1。

2.2.2 以 helf 细胞为对照的 ELISA 鉴定 以 helf 细胞为阴性对照,进一步鉴定 2、5、8、9、10、11、12、16、24 等 9 个克隆对 A549 细胞的亲和性。得到 4 个为阳性克隆(2、5、8、10 号)。见图 2。

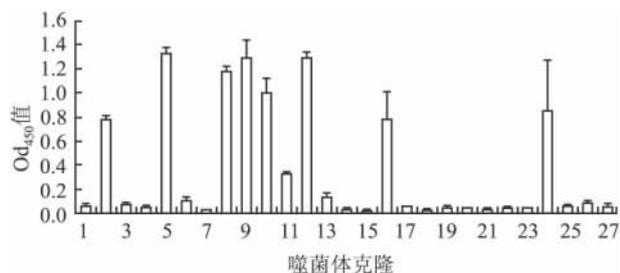


图1 ELISA 鉴定 1-24 号噬菌体克隆对 A549 细胞的亲和力的 OD₄₅₀ 结果

1~24:1-24 号克隆;25~27:阴性对照 S1、S2、S3 号克隆

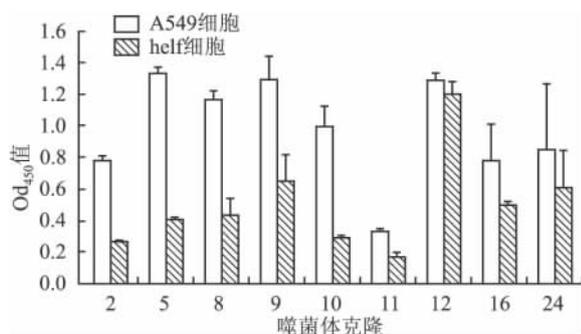


图2 噬菌体克隆 2、5、8、9、10、11、12、16、24 号分别对 A549 细胞和 h12f 细胞的亲和力 OD₄₅₀ 值

2.3 肺癌细胞特异性结合肽的测序 对 5 号噬菌体克隆进行 DNA 测序,结果为 CTT CAG CCT CAT GAT CGG AAT ATG CAT CTT CCT ACG,推出 5 号噬菌体克隆的氨基酸序列为 LQPHDRNMHLPT。此十二肽序列经 BLAST 数据库搜索,未发现相似的已知序列,提示此十二肽可能为一种新的肺癌表面抗原的配体。

2.4 免疫酶法的建立及其反应条件优化 选取 ELISA 鉴定结果中与 A549 亲和力较好的 5 号克隆建立免疫酶染色法,对不同滴度的 5 号噬菌体克隆与不同稀释度的 HRP/Anti-M13 抗体稀释度进行棋盘滴定,结果表明 5×10^9 pfu/10 μ l 滴度的噬菌体与 1:5 000 稀释度的抗 HRP/Anti-M13 抗体,或 1×10^9 pfu/10 μ l 滴度的噬菌体与 1:1 000 稀释的抗 HRP/Anti-M13 抗体时,A549 细胞呈阳性,h12f 细胞呈阴性,两者差异较大,为最佳工作浓度。噬菌体克隆和 HRP/Anti-M13 抗体的作用时间可选 1 h 或 1.5 h。

2.5 基于肺癌细胞特异性结合肽检测肺癌的免疫酶法的特异性鉴定

2.5.1 以阴性噬菌体克隆为对照的特异性鉴定

以 S1 号噬菌体克隆作阴性对照,鉴定 5 号噬菌体克隆结合肺癌细胞的特异性。结果显示噬菌体克隆 5 号与 A549 细胞亲和力较强,细胞膜被染上褐色,而阴性对照 S1 号克隆则没有使细胞染上明显的褐色。见图 3A~3D。

2.5.2 以其他癌细胞为对照的特异性鉴定 以多种癌细胞为被检细胞,鉴定该 IEA 法检测肺癌细胞的特异性。结果显示,肺腺癌 A549 和 SPC-A1 细胞呈阳性,而其他 3 种癌细胞为阴性,显示该检测方法用来检测肺癌具有较好的特异性。见图 3E~3I。

2.6 基于肺癌细胞特异性结合肽检测肺癌的免疫酶法的重复性鉴定 使用相同扩增批次的 5 号噬菌体克隆在相同条件下进行不同时间多次 IEA 实验后,染色结果一致,表明该方法重复性良好。

2.7 噬菌体克隆的保存期鉴定 实验表明,保存 2 个月的 5 号噬菌体克隆仍具有较好的活性,仍可用于 IEA 实验,保存 3 个月不适合再用于检测,需要再次扩增。

2.8 应用 IEA 法对临床肺腺癌组织样本的检测

10 例肺腺癌样本经本 IEA 法检测有 7 例为阳性,镜下观察到 5 号克隆与肺腺癌细胞膜结合(图 4A),S1 号克隆为阴性对照(图 4B)。

3 讨论

传统免疫酶法采用单克隆抗体,制备周期长且成功率低,而从噬菌体展示肽库中筛选肿瘤细胞特异性结合肽来建立检测肺癌的免疫酶染色法,在抗体的制备方面具有高通量、技术难度小和成功率高等优点。本研究利用从噬菌体展示肽库中筛选得到的肺癌细胞特异性结合肽来建立免疫酶法,对细胞和组织的重复检测结果一致,且染色清晰易判断,显示了较高的稳定性和灵敏度。此外,本研究采用的全细胞筛选法不需要对受体分子进行纯化和分析,保持其天然构象和活性,因此可能发现肺癌细胞表面未知抗原^[3]。

现有的肺癌检测方法以低剂量 CT 和血清肺癌标志物为主,CT 虽然检测结果精确但对人体有辐射,多次使用不利于健康,且价格昂贵难以应用于肺癌筛查;血清肿瘤标志物由于种类混杂而不得不采用联合检测。此外,痰液细胞学检查也被广泛应用于肺癌的早期检查,而且该方法简便易行,成本低廉,患者无痛苦,更适合用于肺癌高危人群的普查^[4]。将本研究建立的检测肺癌的免疫酶法与液基细胞学痰检相结合,检测痰液中脱落的肺癌细胞,

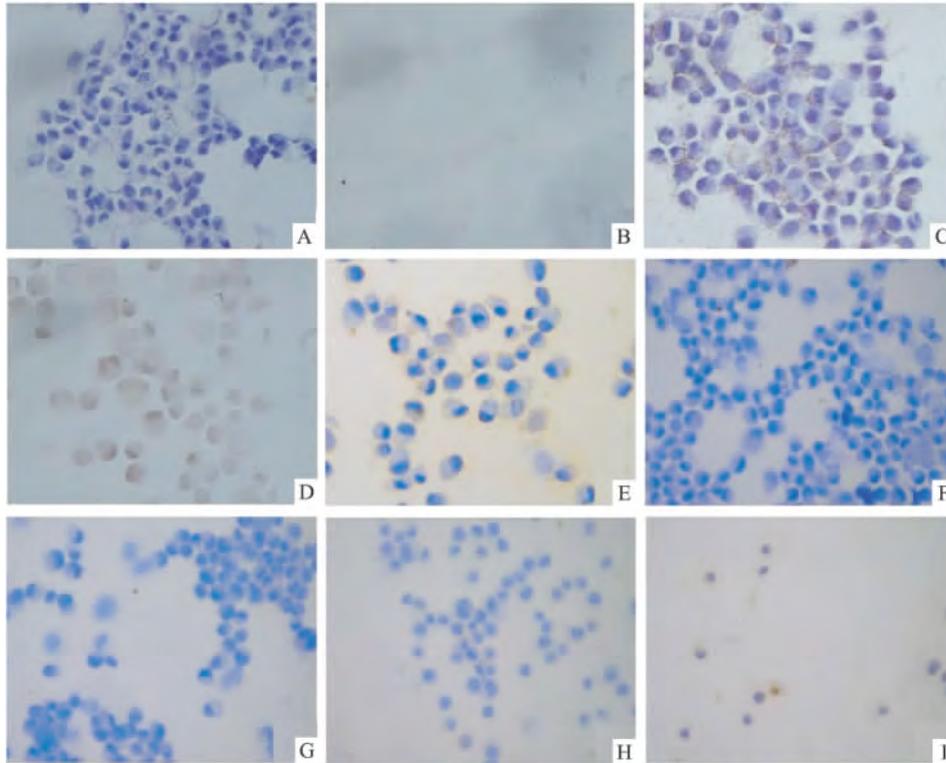


图3 IEA 法中 5 号噬菌体克隆与 A549 细胞及其他癌细胞的亲和力 ×400

A: 阴性对照, S1 号噬菌体克隆, 苏木精复染; B: 阴性对照, S1 号噬菌体克隆, 未复染; C: 5 号噬菌体克隆, 苏木精复染; D: 5 号噬菌体克隆, 未复染; E - I: 5 号噬菌体克隆, 细胞种类依次为 A549、BGC-231、RKO、SPC-A1

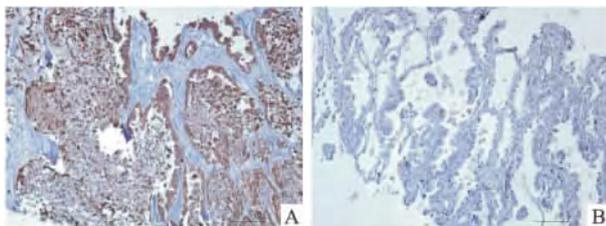


图4 IEA 法检测肺腺癌组织样本 ×100

A: 阳性克隆; B: 阴性对照

有望提高肺癌痰检的检出率和准确性, 成为最具潜力的肺癌筛查方法。本研究建立的检测方法还可以在肺癌确诊中作为现有检测方法的补充。

目前, 本研究尚处于初级阶段。特异性鉴定的实验结果表明, 阳性克隆除了与筛选靶细胞 A549 结合, 也与另一种肺癌细胞 SPC-A1 细胞结合, 但由于细胞来源有限, 阳性克隆是否与这两种细胞以外的肺癌细胞结合尚未得到鉴定, 这将在搜集到其他肺癌细胞后的后续研究工作中进行鉴定。而 10 例肺腺癌组织样本的鉴定中有 3 例检测结果为阴性, 原因可能是肺腺癌亚型间细胞表面抗原存在差异、不同临床分期的差异或是受病理切片制作技术的影

响, 具体原因需扩大样本量进行统计学分析来确定。另外, 临床痰检中, 痰液中脱落细胞或支气管肺泡灌洗液中除了可能存在肺癌细胞和正常细胞外, 还可能

存在气道中脱落成分渗出的其它细胞^[5], 由于时间所限, 痰液和肺灌洗液中中性粒细胞、淋巴细胞和吞噬细胞等炎症细胞对检测方法可能造成的影响尚待后续实验验证。

在建立 IEA 法的基础上, 将进一步研究合成已经测序的 5 号短肽, 观察其对肺癌细胞生物学行为的影响, 探讨其构建肿瘤靶向药物的可能性。

参考文献

- [1] 强荣兵, 张楠楠, 魏丽丽, 等. 噬菌体展示技术及其在肿瘤研究中的应用[J]. 中国生物工程杂志, 2009, 29(9): 81-6.
- [2] 孙美艳, 张磊, 李艳, 等. 噬菌体展示技术的研究进展[J]. 吉林医药学院学报, 2009, 30(2): 97-9.
- [3] 吴红珍, 张林波. 全细胞差减筛选法在噬菌体展示文库中的应用[J]. 中国生物制品学杂志, 2012, 25(2): 243-5.
- [4] 王洪. 肺癌诊断方法的研究进展[J]. 泸州医学院学报, 2010, 33(6): 713-7.
- [5] 王咏梅, 王永其. 痰脱落细胞检查的临床指南[J]. 临床肺科杂志, 2000, 5(2): 100.

红花加速正畸牙齿移动相关机制的初步研究

徐建光 沈 军 杨 梓 谢 晋 祝小鹏

摘要 选取 48 只 8 周龄雌性 SPF 级 Wister 大鼠,建立大鼠正畸牙移动实验动物模型。随机分为红花组和对照组。红花组每日灌服 6 g/kg 红花水煎剂,对照组每日灌服 3 ml 生理盐水,每周加力一次。4 周后处死所有实验大鼠,分离大鼠上、下颌骨,测量上颌第一磨牙近中移动距离,并制作第一磨牙及相关牙周组织切片,采用免疫组织化学方法检测牙周组织中血管内皮生长因子(VEGF)的表达,并采用计算机图像分析方法对各组 VEGF 的表达强度进行半定量分析,同时测量下颌第一磨牙根尖区的骨密度,对所得实验数据进行统计学分析。红花组第一磨牙近中移动距离以及破骨细胞数大于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);VEGF 在红花组大鼠牙周组织中的表达明显高于对照组($P < 0.05$);两组下颌第一磨牙区的骨密度差异无统计学意义($P > 0.05$)。

关键词 红花;牙移动;Wister 大鼠

中图分类号 R 783.5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)09-1333-03

如何在生理允许范围内加速正畸牙齿移动,缩短疗程,是口腔正畸医师最为关心的问题之一。国内许多学者通过现代化研究手段发现,中药在骨折愈合过程中通过影响成骨细胞以及破骨细胞的形

成,加速骨组织的改建,从而促进骨折愈合^[1]。在正畸治疗过程中,正畸牙齿移动的本质就是成骨细胞与破骨细胞的作用,因此,该研究拟通过动物实验建立大鼠正畸牙齿移动模型,观察传统中药红花对正畸牙齿移动的影响并分析其相关机制。

1 材料与方法

1.1 红花水煎剂制备 选取红花 100 g,冷水浸泡 1 h 后煎煮两次,首次加水约为药量 10 倍,大火至煮沸后文火 30 min,滤出液体保留,第 2 次加水约为药量 8 倍,大火至煮沸后文火 20 min,滤出液体,并将两次滤液混合,文火开盖蒸馏至与原药量相等的毫升数,即 1 ml = 1 g 生药^[2],保存备用。

1.2 建立实验动物模型 选取 48 只 8 周龄雌性 SPF 级 Wistar 大鼠,体重 180 ~ 200 g,2% 氯氨酮注射液腹腔麻醉,将上颌两个中切牙视为一个整体,高速手机在整体牙冠的远中面、唇面和舌面的颈缘处各磨出平行龈缘且深约 0.2 mm 的浅沟,0.2 mm 的不锈钢结扎丝嵌入沟内,结扎后局部清洁,GC Fuji 正畸粘接材料(日本 GC 公司)环绕结扎丝粘接,以防止结扎丝脱落。同时采用结扎丝环绕第一磨牙颈部并固定,并通过镍钛弹簧连接于中切牙,弹簧的拉伸力量为 0.5 N。矫治装置安装完成以后,大鼠饮食为非常规粉状饲料(钙 0.1%、磷 0.4%、维生素 D 2 000 IU/kg),饮消毒水,室温控制在 18 ~ 25 °C,湿

2014-06-04 接收

基金项目:安徽医科大学校基金(编号:2012XKJ021)

作者单位:安徽医科大学口腔医学院,安徽医科大学附属口腔医院,安徽省口腔疾病研究中心实验室,合肥 230032

作者简介:徐建光,男,讲师,主治医师,责任作者,E-mail: xujian-guang1982@yeah.net

The immunoenzymatic assay to detect lung cancer with peptides specifically binding to lung cancer cells

Zhang Yun^{1,2}, Wang Huasu^{1,2}, Xia Mizhen², et al

(¹School of Basic Medical Sciences, ²Dept of Biological Engineering, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract With A549 cells serving as target cells and helf cells as absorber cells, polypeptides specifically binding to lung cancer cells were screened out from Ph. D. - 12TM Phage Display Peptide Library. Establish the immunoenzymatic assay (IEA) with the screened polypeptides replacing primary antibody, and the enzyme-marked anti phage antibody working as secondary antibody. After four rounds of panning and ELISA identification, the phage clone with best affinity and specificity to A549 cells was applied in the new method.

Key words phage display peptide library; A549 cells; lung cancer; immunoenzymatic assay