

抗 HLJ1 单克隆抗体的制备及抗原检测方法的建立

林翔¹, 马骊², 王菊芳¹, 谭永法³, 温茜², 罗微², 苏瑾², 林影¹, 王小宁¹

1 华南理工大学生物科学与工程学院, 广州番禺大学城 510006

2 南方医科大学生物技术学院分子免疫学研究所, 广州 510515

3 南方医院肝胆外科, 广州 510515

摘要: 为制备抗人肝脏 DnaJ-like 蛋白(Human liver DnaJ-like protein, HLJ1)的单克隆抗体, 并建立免疫组化和双抗体夹心 ELISA 检测 HLJ1 的方法, 采用淋巴细胞杂交瘤技术, 获得两株能稳定分泌抗 HLJ1 单克隆抗体的杂交瘤细胞株 A₄C₇ 和 C₄C₈。经鉴定, 两株单抗的亚类均为 IgG1, 并且效价高、特异性好。以单抗 A₄C₇ 和 C₄C₈ 作为一抗, 对人胎肝组织石蜡切片进行免疫组化染色, 结果表明, 两株单抗均为阳性染色, 且 HLJ1 主要定位于胎肝细胞的胞浆。选取 A₄C₇ 进行 HRP 酶标记, 并以 HRP-A₄C₇ 作为酶标抗体, 以 C₄C₈ 作为包被抗体, 建立双抗体夹心 ELISA 方法, 并进行棋盘滴定确定抗体的最佳工作浓度。该检测方法的线性范围是 15~750 ng/mL, 灵敏度下限达 15 ng/mL, 特异性良好。所建立的免疫组化和双抗体夹心 ELISA 法可用于快速、灵敏地检测组织及血清中的 HLJ1 蛋白, 为 HLJ1 的肿瘤相关性研究提供了有力的工具。

关键词: HLJ1, 单克隆抗体, 双抗体夹心 ELISA, 免疫组化

Preparation of the anti-HLJ1 Monoclonal Antibodies and Establishment of Method for Detection of the Antigen

Xiang Lin¹, Li Ma², Jufang Wang¹, Yongfa Tan³, Qian Wen², Wei Luo², Jin Su², Ying Lin¹, and Xiaoning Wang¹

1 School of Bioscience and Biotechnology, Guangzhou 510006, China

2 Institute of Molecular Immunology, School of Biotechnology, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

3 Department of Hepatobiliary Surgery, Southern Hospital, Guangzhou 510515, China

Abstract: Monoclonal antibodies(McAbs) against human liver DnaJ-like protein(HLJ1) was produced by using lymphocyte-hybridoma technique and then one method for the detection of HLJ1 antigen was established. Two hybridoma cell lines which stably secreted monoclonal antibodies against HLJ1 were generated and named for A₄C₇ and C₄C₈. Subtypes of the two McAbs were both IgG1, and the antibodies showed high titer and good specificity. Using the prepared monoclonal antibody, human embryonic liver tissues were examined by immunohistochemistry. The results indicated that HLJ1 located in the cytoplasm of the human embryonic liver cell. A double antibodies sandwich ELISA was established by using C₄C₈ and HRP labeled A₄C₇. This assay had good specificity, and the lowest detection limit was 7.5 ng/mL and the linear range was 7.5~750 ng/mL. In conclusion, an

Received: November 29, 2007; **Accepted:** March 11, 2008

Supported by: State High Technology Project (863) of China (No. 2004BA711A20) and NSFC & Research Grant Council of Hong Kong Joint Research Fund (No. 30418003).

Corresponding author: Xiaoning Wang. Tel: +86-20-8711-4240; E-mail: xnwang@21cn.net

Li Ma. Tel: +86-20-6164-8322; E-mail: maryhmz@126.com

国家 863 计划(No. 2004BA711A20), 国家自然科学基金委员会与香港研究资助局联合科研资助基金(No. 30418003)共同资助。

immunohistochemistry method and a sensitive sandwich ELISA were established for the detection of HLJ1 protein.

Keywords: HLJ1, monoclonal antibody, double antibody sandwich ELISA, immunohistochemistry

人肝脏 DnaJ-like 蛋白(Human liver DnaJ-like protein, HLJ1), 或称为 DnaJ 同系物亚家族 B 成员 4(Homolog subfamily B member 4, DNAJB4), 是由 Kwang-Lae Hoe 于 1998 年从人类肝脏 cDNA 文库中发现的新基因。该基因定位于人 1 号染色体(p31.1), 编码 337 个氨基酸, 相对分子质量为 37 807 D^[1]。新近的研究表明, HLJ1 可能是非小细胞型肺癌(NSCLC)的一种新的肿瘤抑制因子^[2,3]。目前, 国内还未见 HLJ1 的相关研究报道, 该蛋白是否具有抑制其他类型肿瘤的功能还有待研究。

本文采用 HLJ1 重组蛋白免疫小鼠, 制备了两株效价高、特异性好的单抗, 并采用免疫组化方法, 对 HLJ1 在胎肝中的表达情况进行了检测。此外, 本研究将这两株单抗分别作为包被抗体和酶标抗体, 建立了双抗体夹心 ELISA 检测 HLJ1 体系。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 骨髓瘤细胞和实验动物

小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0, 由广州泰默生物技术有限公司保存。6~8 周龄雌性 BALB/c 小鼠, 购自南方医科大学实验动物中心。

1.1.2 HLJ1 抗原

6His·HLJ1 重组蛋白, 由上海联合基因公司提供, 通过 pet28b 质粒在大肠杆菌表达, 分子量 40.3 kD, 经 SDS-PAGE 鉴定纯度达到 96%。

1.1.3 人胎肝组织石蜡切片

人胎肝组织取自胎龄 16 周的引产人胚胎(母亲自愿终止妊娠, 签署知情同意书), 胎儿母亲健康, 肝功能正常。常规方法制备石蜡切片。

1.1.4 血清样本

RF 阳性的类风湿性关节炎患者血清 1 例(RF: 56.9 IU/mL), RF 阴性的正常人血清 1 例, 均由广州南方医院提供。

1.1.5 主要试剂

RPMI-1640 培养基(Invitrogen 公司), PEG2000 (Sigma 公司), 胎牛血清 FBS(Hyclone 公司), 小鼠单克隆抗体亚类鉴定试剂盒(Sigma 公司), 羊抗鼠辣根

过氧化物酶标二抗(Sigma), 人重组 HDJ1 蛋白(美国 Biovision 公司, 分子量 38.1 kD)、人重组 HDJ2 蛋白(美国 Biovision 公司, 分子量 44.9 kD), 内源性生物素封闭试剂盒(美国 Vector Laboratories 公司), 鼠抗人肌动蛋白单克隆抗体(识别平滑肌来源的血管型 α -肌动蛋白, 北京中杉金桥生物技术有限公司), 即用型 SABC 免疫组化染色试剂盒(武汉博士德), DAB 显色试剂盒(武汉博士德)。

1.2 实验方法

1.2.1 免疫方法

取 6~8 周龄雌性 BALB/c 小鼠, 每次免疫 40 μ g 抗原, 每间隔 3 周免疫 1 次, 共 3 次。首次免疫加完全福氏佐剂, 背部皮下多点注射。第 2 次免疫, 加福氏不完全佐剂, 背部皮下多点注射。第三次免疫, 不加佐剂, 于生理盐水中腹腔注射。7~10 d 后鼠尾静脉取血, ELISA 检测血清抗体效价, 间隔 2~3 周, 于融合前 3 d 腹腔注射加强免疫 1 次。

1.2.2 细胞融合及克隆化

取对数生长期的鼠骨髓瘤 SP2/0 细胞和免疫小鼠的脾细胞按常规 PEG 方法融合, 经选择性培养、筛选阳性克隆与连续克隆化 3 次, 建立杂交瘤细胞株。将筛选获得的细胞株连续培养 30 代, 确定稳定分泌抗体后, 将杂交瘤细胞株用液氮保存。

1.2.3 单克隆抗体的亚类鉴定

按小鼠单克隆抗体亚类鉴定试剂盒说明, 对杂交瘤上清进行检测, 鉴定单克隆抗体所属亚类。

1.2.4 单克隆抗体的生产及纯化

采用小鼠腹腔诱生腹水方法生产单克隆抗体, 辛酸-硫酸铵法对小鼠腹水进行纯化, 间接 ELISA 方法鉴定纯化后单克隆抗体的效价。Bradford 法检测纯化后腹水的蛋白总量, SDS-PAGE 鉴定纯化后单克隆抗体的纯度。

1.2.5 单克隆抗体的 Western blotting 鉴定

将靶抗原 HLJ1, 以及 HLJ1 同家族蛋白 HDJ1、HDJ2 进行 SDS-PAGE 电泳, 再转印至硝酸纤维素膜, 用 1% 脱脂奶粉 4°C 封闭过夜, 之后加入适当稀释的单克隆抗体, 37°C 孵育 1 h, TBST 洗涤, 再加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗, 室温孵育 1 h, TBST

洗涤, DAB 显色。

1.2.6 单克隆抗体的免疫组织化学鉴定

采用 SABC 法, 对人胎肝组织石蜡切片进行免疫组化染色。

步骤: (1) 石蜡切片常规脱蜡; (2) 微波炉抗原修复; (3) 蒸馏水冲洗, PBS 洗 2 次(5 min/次); 滴加封闭剂阻断内源性生物素; (4) PBS 洗 2 次(5 min/次), 3% H₂O₂ 室温孵育 10 min 以封闭内源性过氧化物酶活性; (5) 蒸馏水冲洗, PBS 洗 1 次(5 min/次), 正常山羊血清室温孵育 10 min 封闭; (6) 倾去血清, 加入稀释的抗 HLJ1 单克隆抗体, 以鼠抗人肌动蛋白单抗作为阳性对照, 以 1% BSA-PBS 作为阴性对照。4℃ 孵育过夜; (7) PBS 洗 3 次(5 min/次), 滴加生物素化羊抗小鼠 IgG 抗体, 37℃ 孵育 20 min; (8) PBS 洗 3 次(5 min/次), 滴加 SABC 试剂, 37℃ 孵育 10 min; (8) PBS 洗 3 次(5 min/次), DAB 显色, 显微镜下观察以控制反应时间; (9) 蒸馏水洗涤; 苏木素复染; 酒精梯度脱水后封片; 镜检。

1.2.7 HRP 标记单抗

改良的过碘酸钠方法标记纯化后的抗体, 并以重组 HLJ1 蛋白包被, 已制备的酶标抗体作为一抗, ELISA 直接法测定该酶标抗体的效价。

1.2.8 双抗体夹心 ELISA

以一株单抗作为包被抗体, 另一株单抗作为酶标抗体, 建立双抗体夹心 ELISA 检测方法。

(1) 步骤: 将稀释成一定浓度的包被抗体包被酶标板, 100 μL/孔, 4℃ 过夜, 弃包被液, 0.05% PBST 洗板 3 次, 3 min/次; 加封闭液(含 1% BSA 的 PBS) 100 μL/孔, 37℃ 孵育 1 h, PBST 洗涤 3 次, 3 min/次。将重组 HLJ1 蛋白稀释一定浓度后加入包被孔内, 100 μL/孔, 并设阴性对照(1% BSA-PBS), 37℃ 孵育 1 h, 洗板 3 次, 3 min/次。将酶标抗体稀释一定浓度加入包被孔内, 100 μL/孔, 37℃ 孵育 40 min, 洗板 3 次, 3 min/次。加入 TMB 显色剂, 100 μL/孔, 37℃ 孵育 15 min, 加 2 mol/L H₂SO₄, 50 μL/孔终止反应。酶标仪 450 nm 处(参考波长 630 nm)测量吸光度值(*OD*₄₅₀ 值)。

(2) 包被抗体和酶标抗体工作浓度的确定: 包被抗体及酶标抗体分别做梯度稀释, 采用棋盘滴定法确定其工作浓度, 检测 600 ng/mL 的重组 HLJ1 蛋白。每个样本或浓度均设 3 个复孔, 以下同。以样

品 *OD*₄₅₀ 值为 0.8 左右且抗体稀释度较高时, 包被抗体和酶标抗体的组合作为抗体的工作浓度, 初步建立双抗体夹心 ELISA 体系。

(3) 标准曲线的绘制及体系灵敏度的确定: 应用建立的双抗体夹心 ELISA 方法, 检测梯度稀释的重组 HLJ1 蛋白。以重组 HLJ1 蛋白浓度为自变量, 以 *OD*₄₅₀ 值为因变量, 绘制标准曲线。以检测孔与阴性对照孔 *OD*₄₅₀ 的比值 P/N ≥ 2.1 的最高抗原稀释度作为该体系的检测灵敏度。

(4) 交叉反应: 应用建立的双抗体夹心 ELISA 方法, 对 HLJ1 同家族的蛋白(HDJ1、HDJ2)以及 4 个不相关蛋白(TM0D4、ANXA1、YWHAB、SOD2, 均为大肠杆菌来源的人重组蛋白)进行检测, 并以 HLJ1 作为阳性对照。检测蛋白的浓度均为 300 ng/mL。

(5) 类风湿因子的影响: 类风湿因子(RF)是一种自身抗体, 用作双抗体夹心法检测的血清标本中如含有 RF, 可能出现假阳性反应。因此, 有必要考核 RF 对 ELISA 检测体系的影响。应用建立的双抗体夹心 ELISA 方法, 对类风湿性关节炎患者的血清样本(RF: 56.9 IU/mL)及正常人的血清样本(RF 阴性)进行检测, 并设置阳性对照(HLJ1 抗原, 50 ng/mL)和阴性对照(1% BSA-PBS)。

2 结果

2.1 杂交瘤细胞株的建立

经细胞融合和筛选得到 2 株稳定分泌抗体的杂交瘤细胞株, 经连续培养 30 代仍可稳定地分泌单抗。两株单抗分别命名为 A₄C₇ 和 C₄C₈。经亚类鉴定, 两株单抗 A₄C₇ 和 C₄C₈ 均为 IgG1。

2.2 单克隆抗体的生产与纯化

通过小鼠腹水瘤接种法生产单克隆抗体, 并采用辛酸-硫酸铵法纯化单克隆抗体。间接 ELISA 测定纯化后单克隆抗体的效价, A₄C₇、C₄C₈ 两株单抗的效价分别达到 10⁷ 和 10⁶。Bradford 法测定纯化后抗体蛋白总量, A₄C₇ 和 C₄C₈ 分别为 4.2 mg/mL 和 2.4 mg/mL。

2.3 单克隆抗体的 SDS-PAGE 电泳

采用 SDS-PAGE 鉴定纯化后单抗的纯度。根据图 1 可知, 纯化后的腹水主要有两条蛋白区带, 即分子量 50 kD 位置的 IgG 重链, 以及分子量 26 kD 位置的 IgG 的轻链。经扫描图谱得知, 纯化后两株

单抗的纯度均达 80%以上, 而未经纯化的腹水杂蛋白较多, 说明该纯化方法去除了大部分杂蛋白, 达到了纯化的目的。

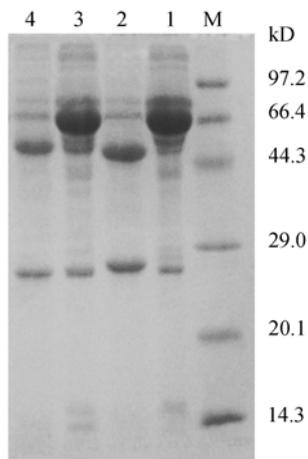


图 1 纯化后单克隆抗体的 SDS-PAGE 分析

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of purified mouse anti-HLJ1 antibodies

M: protein marker; 1: unpurified McAb A₄C₇; 2: purified McAb A₄C₇; 3: unpurified McAb C₄C₈; 4: purified McAb C₄C₈

2.4 单克隆抗体的 western blotting 鉴定

免疫印迹结果显示, 单抗 A₄C₇ 能识别 40 kD 左右的靶抗原 HLJ1 蛋白区带, 而与 HLJ1 同家族的蛋白 HDJ1、HDJ2 均没有交叉反应(图 2); 单抗 C₄C₈ 则与 HLJ1、HDJ1、HDJ2 均不反应(图 3)。

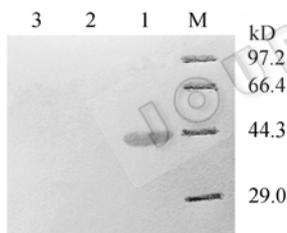


图 2 单抗 A₄C₇ 的 Western blotting 鉴定

Fig. 2 Specificity analysis of McAb A₄C₇ by Western blotting

M: protein marker; 1: HLJ1; 2: HDJ1; 3: HDJ2

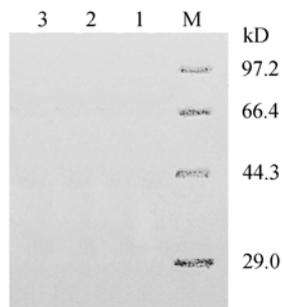


图 3 单抗 C₄C₈ 的 Western blotting 鉴定

Fig. 3 Specificity analysis of McAb C₄C₈ by Western blotting

M: protein marker; 1: HLJ1; 2: HDJ1; 3: HDJ2

2.5 免疫组织化学鉴定

对两株单抗进行免疫组化鉴定, 结果 A₄C₇(图 4)和 C₄C₈(图 5)均为阳性染色。其中, 胎肝细胞的胞浆被染成黄棕色, 细胞核因苏木素复染呈蓝色。胎肝组织中的肝血窦内含有大量的血窦细胞, 包括内皮细胞、造血组织细胞等, 因此肝血窦中可见含有大量染为蓝色的细胞核, 但无黄棕色染色。阴性对照(图 6)以 1%的 BSA-PBS 代替一抗, 细胞核呈蓝色, 其它部分未染色。阳性对照(图 7)的一抗为鼠抗人肌动蛋白(Actin)单抗, 胎肝组织的血管壁处被染为黄棕色, 细胞核呈蓝色, 而胆管和其它部分均未着色。

2.6 HRP 标记单抗

选择效价较高的单抗 A₄C₇ 采用过碘酸钠法进行 HRP 标记。抗体标记后, 经 ELISA 检测, HRP-A₄C₇ 效价达到 2.7×10^5 。在双抗体夹心 ELISA 体系中, 选择以 C₄C₈ 为包被抗体, 以 HRP-A₄C₇ 为酶标抗体。

2.7 双抗体夹心 ELISA 体系的建立

2.7.1 包被抗体和酶标抗体工作浓度的选择

采用棋盘滴定法, 以样品 OD₄₅₀ 值为 0.8 左右, 阴性对照的 OD₄₅₀ 值较低时包被抗体和酶标抗体的组合作为抗体的工作浓度。当包被抗体 1:400 稀释, 酶标抗体 1:4000 稀释, 所对应 OD_{450 nm} 值为 0.8253, 接近 0.8, 且酶标抗体和包被抗体稀释度较高, 因此, 以该稀释浓度作为包被抗体和酶标抗体的工作浓度(图 8)。

2.7.2 标准曲线的绘制及体系灵敏度的确定

应用建立的双抗体夹心 ELISA 方法, 检测梯度稀释的重组 HLJ1 蛋白。以重组 HLJ1 蛋白浓度为横坐标, 以对应的 OD₄₅₀ 值为纵坐标绘制标准曲线(图 9)。抗原浓度在 15~750 ng/mL 范围内时与吸光度值的线性关系良好(标准曲线方程为 $y=0.0017x+0.0221$, $R^2=0.9983$)。当抗原浓度为 15 ng/mL 时, 对应 OD₄₅₀ 值为 0.033, 阴性对照 OD₄₅₀ 值为 0.013, $P/N=2.54 \geq 2.1$, 结果仍为阳性, 即该体系灵敏度下限可达到 15 ng/mL。

2.7.3 ELISA 体系的特异性鉴定

应用建立的双抗体夹心 ELISA 方法, 对 HLJ1 同家族的蛋白(HDJ1、HDJ2)以及 4 个不相关蛋白(TM0D4、ANXA1、YWHAB、SOD2)进行检测, 检测蛋白的浓度均为 300 ng/mL。ELISA 体系的特异性鉴定结果如图 10 所示。HLJ1 同家族的蛋白(HDJ1、HDJ2)以及 4 个不相关蛋白(TM0D4、ANXA1、

YWHAB、SOD2)的 P/N 值均小于 2.1, 为阴性, 而靶抗原 HLJ1 的检测结果为阳性(P/N 值=28.6), 说明该体系能特异性地检测 HLJ1 抗原。

2.7.4 类风湿因子干扰试验

应用建立的双抗体夹心 ELISA 方法, 对血清样本进行检测, RF 阳性及 RF 阴性的血清样本 P/N 结果均小于 2.1, 为阴性, 说明该体系不受 RF 干扰。实验结果见表 1。

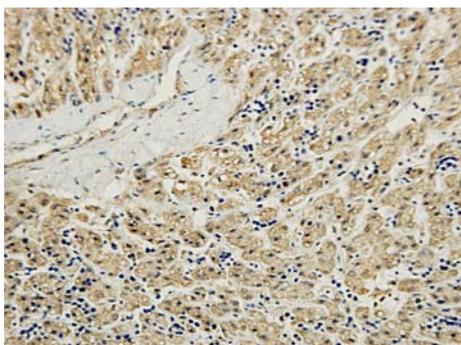


图 4 单抗 A₄C₇ 对胎肝组织的免疫组化染色(×400)
Fig. 4 Immunohistochemical staining of human embryonic liver tissues with McAb A₄C₇ (×400)

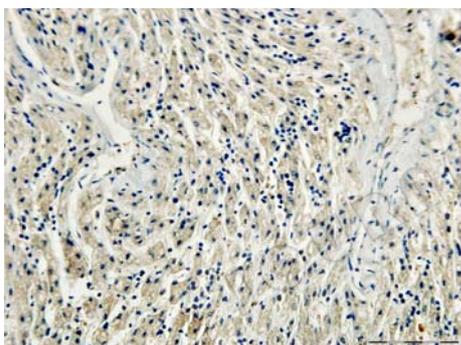


图 5 单抗 C₄C₈ 对胎肝组织的免疫组化染色(×400)
Fig. 5 Immunohistochemical staining of human embryonic liver tissues with McAb C₄C₈ (×400)

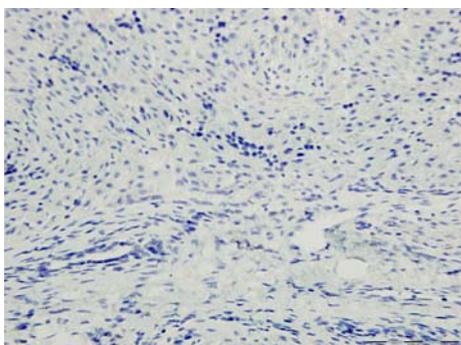


图 6 胎肝组织免疫组化染色的阴性对照(BSA-PBS 代替一抗)(×400)
Fig. 6 Negative control of immunohistochemical staining of human embryonic liver tissues (×400)

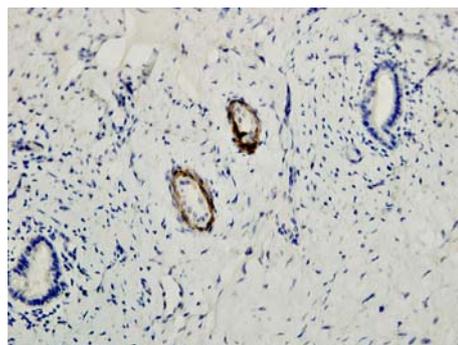


图 7 胎肝组织免疫组化染色的阳性对照(鼠抗人肌动蛋白单抗代替一抗, ×400)
Fig. 7 Positive control of immunohistochemical staining of human embryonic liver tissues with McAb mouse anti-actin(×400)

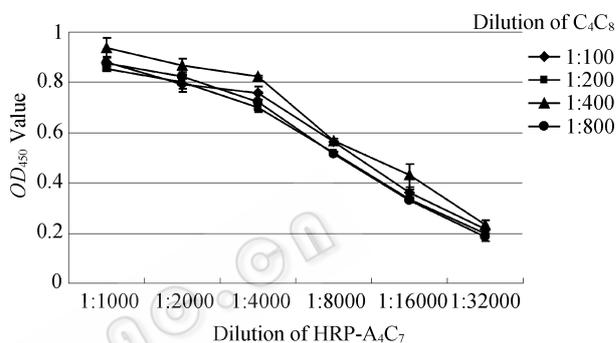


图 8 包被抗体和酶标抗体最佳工作浓度测定结果
Fig. 8 Results of optimal concentration of sandwich ELISA

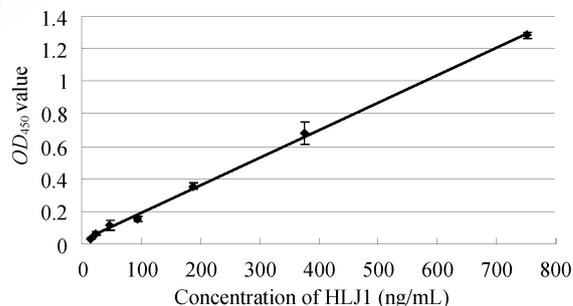


图 9 双抗体夹心 ELISA 检测重组 HLJ1 的标准曲线
Fig. 9 Sandwich ELISA standard curve for HLJ1

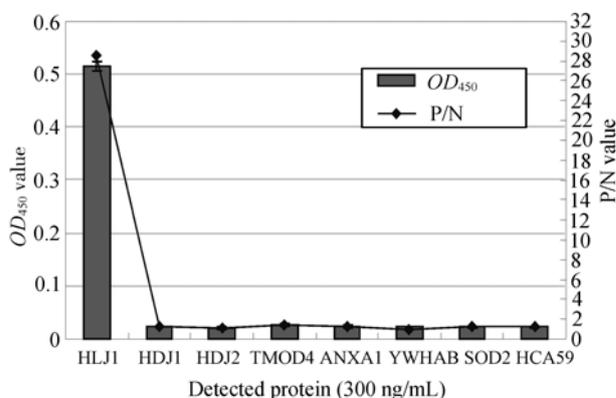


图 10 交叉反应结果
Fig. 10 The cross test results of sandwich ELISA

表 1 HLJ1 体系 RF 干扰实验结果
Table 1 Results of RF interference test

Item	OD _{450nm} value	P/N	Results
RF: 56.9 IU/mL	0.030 ± 0.003	1.67	-
RF: negative	0.025 ± 0.001	1.39	-
Positive control (HLJ1, 50 ng/mL)	0.110 ± 0.001	6.11	+
Negative control	0.018 ± 0.001	1.00	-

3 讨论

人类肝脏蛋白质组研究计划(HLPP)是由我国科学家于 2002 年率先提出并领衔的国际重大科研合作项目, 该计划的目标之一是建立人类肝脏蛋白质的抗体库, 寻找并验证人类肝脏疾病的生物标志物^[4]。本实验室承担了抗体库建设的部分工作, 其中包括本文的 HLJ1 单克隆抗体的制备。筛选具有应用价值的抗体, 用于人类肝脏疾病标志物的鉴定和研究是我们进一步工作的重点。

HLJ1 是由 Kwang-Lae Hoe 等人于 1998 年发现的热休克蛋白, 属 Hsp40 家族。该家族在原核及真核生物中广泛表达, 在细菌中被称为 DnaJ。Hsp40 能够通过其高度保守的 J 结构域, 与热休克蛋白 Hsp70 家族相互作用, 并作为分子伴侣在新生多肽的正确折叠、转位和装配方面发挥重要作用^[5]。目前发现的人 Hsp40 蛋白, 还包括 HDJ1、HDJ2、HSJ1、HSDJ、HSPF1 等^[1]。我们利用 NCBI 提供的 bl2seq 工具, 对 HLJ1 与 HDJ1、HDJ2 的氨基酸序列进行同源性分析, 结果表明: HLJ1 与 HDJ1、HDJ2 均有很高的序列相似性, 分别达到了 79%(275/344)和 50%(183/361)。

新近的研究表明, HLJ1 可能是非小细胞肺癌(NSCLC)的一种新的肿瘤抑制因子。Tsai 等人通过改变肺癌细胞系中 HLJ1 的表达量发现, 增加 HLJ1 的表达量可以减缓癌细胞的分裂周期, 抑制癌细胞的增殖、运动和浸润。在 71 例 NSCLC 患者中, 有 55 例患者, 其癌组织中 HLJ1 的表达量低于癌旁正常组织。并且, 癌组织中 HLJ1 表达量较高的 NSCLC 患者, 其癌症复发率明显降低, 存活期也较长。以上证据均提示 HLJ1 可能具有抑制 NSCLC 的功能^[2,3]。目前, 对 HLJ1 的肿瘤抑制机制仍不明确, 该蛋白是否能够抑制其它类型的肿瘤, 或成为新的肿瘤标志物还有待研究。

采用淋巴细胞杂交瘤技术, 我们获得了 2 株稳定分泌抗 HLJ1 抗体的杂交瘤细胞株, 分别命名为 A₄C₇、C₄C₈。经鉴定, 两株单抗的亚类均为 IgG1, 效价分别达到 10⁷ 和 10⁶。采用辛酸-硫酸铵法对小鼠腹水进行纯化, 抗体的纯度达到了 80% 以上。Western blotting 鉴定中, 单抗 A₄C₇ 能够特异性识别靶抗原 HLJ1, 而与 HDJ1、HDJ2 均没有交叉反应, 表明单抗 A₄C₇ 具有良好的特异性。单抗 C₄C₈ 与靶抗原 HLJ1 以及蛋白 HDJ1、HDJ2 均不能反应, 我们推测, 原因可能是该单抗识别靶抗原 HLJ1 的构象型表位, 而不能识别其线性表位。经过 SDS-PAGE 电泳和 Western blotting 鉴定, 抗原蛋白已经变性, 其构象型表位遭到破坏, 因此单抗 C₄C₈ 不能与已变性的靶抗原 HLJ1 结合。之后的免疫组化鉴定中, 单抗 C₄C₈ 在胎肝组织中为阳性染色, 表明 C₄C₈ 能够与组织中的 HLJ1 蛋白结合, 该结果也支持了我们的推测。

在免疫组化试验中, 两株单抗 A₄C₇ 和 C₄C₈ 均为阳性染色, 并具有良好的染色效果。胎肝细胞的胞浆被染成黄棕色, 肝血窦中虽含大量染为蓝色的细胞核, 但无黄棕色染色。该结果表明, 两株单抗均能够应用于免疫组化染色。并且, HLJ1 主要定位于胎肝细胞的胞浆, 肝血窦造血组织细胞不表达 HLJ1 蛋白。以单抗 A₄C₇ 和 C₄C₈ 为基础, 本研究建立了双抗体夹心 ELISA 检测抗原的方法。该体系检测 HLJ1 的线性范围是 7.5~750 ng/mL, 检测下限为 7.5 ng/mL, 并且具有良好的特异性。RF 干扰实验中, 对类风湿性关节炎患者的血清样本(RF: 56.9 IU/mL)及正常人的血清样本(RF 阴性)进行检测, 结果均为阴性, 表明该检测体系不受 RF 干扰, 同时提示, 这两例血清样本中均不含有 HLJ1 蛋白。

本文建立了免疫组化和双抗体夹心 ELISA 检测 HLJ1 的方法, 为血清和组织中 HLJ1 的定性和定量检测打下了良好的基础。由于条件所限, 目前已检测的组织及血清样本量较小, HLJ1 在肝脏疾病组织, 特别是肝癌组织中的表达情况, 以及血清中的 HLJ1 的含量仍有待进一步研究。在今后的工作中, 我们将进一步收集血清及病理组织样本, 并对样本中 HLJ1 的表达情况进行检测, 并对 HLJ1 与肿瘤的相关性进行深入研究。

致谢 感谢广州泰默生物技术有限公司及郑泓等人协助本研究制备单克隆抗体。

REFERENCES

- [1] Hoe KL, Won M, Chung KS, *et al.* Isolation of a new member of DnaJ-like heat shock protein 40(Hsp40)from human liver. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1998, **1383**: 4-8.
- [2] Tsai MF, Wang CC, Chang GC, *et al.* A new tumor suppressor DnaJ-like heat shock protein, HLJ1, and survival of patients with non-small-cell lung carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*, 2006, **98**(12): 825-838.
- [3] Wang CC, Tsai MF, Dai TH, *et al.* Synergistic activation of the tumor suppressor, HLJ1, by the transcription factors YY1 and activator protein 1. *Cancer Res*, 2007, **67**(10): 4816-4826.
- [4] He FC. Human liver proteome project: plan, progress, and perspectives. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2005, **4**: 1841-1848.
- [5] Fan CY, Lee S, Ren HY, *et al.* Exchangeable chaperone modules contribute to specification of type I and type II Hsp40 cellular function. *Molecular Biology of the Cell*, 2004, **15**: 761-773.



2008 年中国微生物学会及各专业委员会学术活动计划表

序号	会议名称	筹办单位	时间	人数	地点	联系人
1	“病毒性肝炎：成就与挑战”国际研讨会	中国微生物学会病毒学专业委员会	4月	200人	福建 厦门	杜海莲 0592-2183111
2	医学真菌学学术研讨会	中国微生物学会真菌学专业委员会	6月	200人	湖北 武汉	郑岳臣 02761151310
3	疫苗质量控制与安全性评价会议	中国微生物学会生物制品专业委员会	6月	200人	北京	白东亭 01067095727
4	中日病毒学会议	中国微生物学会病毒学专业委员会	6月	100人	日本 东京	李昌 lichang78@163.com
5	第二届全国农业微生物研究及其产业化研讨会暨第十一届全国杀虫微生物学术讨论会	中国微生物学会农业微生物学专业委员会	6月	150人	内蒙古	孙明 027-87283455
6	第三届微生物资源与环境修复学术会议	中国微生物学会农业微生物学专业委员会	7-8月	150人	山东 烟台	朱昌雄 010-68919561
7	全国第二届海洋微生物研讨会	中国微生物学会海洋微生物学专业委员会	8月	150人	山东 济南	张玉忠 13969185852
8	中国病原生物学(医学微生物学和寄生虫学)教育教学研讨会	中国微生物学会	8月	100人	上海	董珂 021-63846590-776712
9	全国第六届感染与免疫和生物制品学术研讨会	中国微生物学会医学微生物学与免疫学专业委员会	8月	100人	吉林 延吉	孟繁平
10	第二届全国微生物基因组学学术研讨会	中国微生物学会基础、农业微生物学专业委员会	8月	100人	上海	李林 027-87286952
11	全国第16次干扰素与细胞因子学术研讨会	中国微生物学会干扰素专业委员会	10月	100人	内蒙古	范中善 13671683629
12	第十届中-日-韩国际酶工程会议	中国微生物学会酶工程专业委员会	10月	150- 200人	韩国 济州岛	欧阳浩森 010-64807420
13	第十一次全国环境微生物学学术研讨会	中国微生物学会环境微生物学专业委员会	10月	150- 200人	江苏 无锡	蒋建东 025-84396348
14	感染与健康研讨会	中国微生物学会微生物毒素专业委员会	10月	200人	广东 广州	姚永明 010-66867394
15	第七届全国青年微生物学者学术研讨会暨全国青年微生物遗传学学术研讨会	中国微生物学会基础微生物学专业委员会	10月	100人	山东 济南	李越中 0531-88564288
16	2008年中国微生物学会学术年会	中国微生物学会	11月	400人	海南 海口	王旭 010-64807200
17	链霉菌分子生物学学术研讨会	中国微生物学会分子微生物学与生物工程专业委员会	11月	80- 100人	海南 海口	朱春宝 021-62470561