

# 人突触相关蛋白抗原表位分析、 抗体制备及表达研究\*

杨向东\*\* 王仁 刘俊文 屈顺林 郭芳 王蕾 盛树力

(南华大学心血管病研究所, 衡阳 421001)

**摘要** 突触相关蛋白家族成员的功能与神经突触膜上的谷氨酸酯受体和钾离子通道的定位和功能有关, 参与神经递质的释放、神经的生长、发育及修复. 为分析一个新的人突触相关蛋白基因 (FRG4) 的抗原表位和该蛋白质在血管细胞的表达, 从人胎肝文库 PCR 扩增获得 FRG4 基因全长 cDNA 序列. 通过生物信息学分析, 预测 FRG4 编码氨基酸序列的二级结构、抗原决定簇和功能结构域; 选取抗原 13 肽 PKLVKEEVFWRNY, 采用固相多肽合成法合成了 FRG4 抗原多肽, 免疫新西兰白兔获得免抗人 FRG4 多抗; 免疫组化检测该蛋白质在人血管细胞中的表达. 高效液相色谱检测显示制备的免抗人 FRG4 多克隆抗体纯度达 82.79%, 抗体滴度为 1:16 000, 蛋白质印迹证实该抗体具有较好的反应性和特异性, 免疫组化证实, 其主要在平滑肌细胞和内皮细胞的胞浆中表达. 结果表明, 成功制备了免抗人 FRG4 抗体, FRG4 蛋白主要在细胞胞浆中表达, 与生物信息学分析结果一致.

**关键词** 动脉粥样硬化, 巨噬细胞, 突触相关蛋白, 多肽合成, 生物信息学

**学科分类号** R361

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 性心、脑血管疾病在老年人群中发病广、危害重, 目前对其发病机制尚未完全阐明. 巨噬细胞在 As 的整个病变发生和发展过程中均能检测到, 其功能意义不仅是吞噬氧化修饰的低密度脂蛋白 (ox-LDL), 清除毒性物质, 形成泡沫细胞, 同时还有许多其他重要功能, 如与 As 斑块稳定性和机体的免疫功能密切相关. 从分子和基因水平研究巨噬细胞泡沫化机制, 对于 As 发病机制和防治研究具有重要意义<sup>[1]</sup>. 我们应用抑制消减杂交 (SSH) 筛选 ox-LDL 致单核细胞株 U937 细胞泡沫化过程中差异表达基因, 获得 20 多个差异表达的 EST, 其中两个片段经 GenBank 检索是新的 EST 序列, 登录在 GenBank (BI502586, BI502587). 运用热启动 PCR 从人胎肝 cDNA 文库中快速获取了一个 EST 全长 cDNA 序列, 暂命名为泡沫化相关基因 (FRG4)<sup>[2,3]</sup>. FRG4 与人突触相关蛋白 (Homo sapiens synapse-associated protein, SAP1) 有着高度的同源性, 但功能仍不清楚, 目前也没有文献报道突触相关蛋白与心血管疾病的关系. 本研究利用生物信息学分析 FRG4 的抗原表位, 用多肽合成法制备免疫原, 免疫新西兰白兔制备 FRG4 多克隆抗体, 利用该抗体研究 FRG4 在血管平滑肌细胞和内皮细胞的表达.

## 1 材料和方法

### 1.1 主要试剂和细胞

细胞培养基、胎牛血清、完全弗氏佐剂及不完全弗氏佐剂购自 GIBCO 公司; ABC 免疫组化试剂盒为武汉博士德公司产品; BCA 蛋白分析试剂盒和化学发光底物购自 PIERCE 公司, ELISA 试剂盒购自北京利科公司; 多肽合成所用氨基酸及其他相关试剂购自 ACT 公司. 新西兰白兔由首都医科大学北京宣武医院提供, 人肝癌细胞株 HepG<sub>2</sub> 和人巨噬细胞株 THP-1 细胞购自武汉大学典型培养物保藏中心, 人脐动脉平滑肌细胞和脐静脉内皮细胞由本室分离培养.

### 1.2 FRG4 生物信息学分析

本文涉及的数据库检索工具和分析软件主要是互联网上的公共数据库和软件. ORF finder 软件分析该基因的开放阅读框 (ORF); ExPASy 工具包中的程序 Compute pI/MW 软件分析该基因编码蛋白的氨基酸组成、分子质量和等电点; SAPS 软

\* 国家自然科学基金 (30200103) 和湖南省教育厅青年基金 (02B039) 资助项目.

\*\* 通讯联系人.

Tel: 0734-8281277, Fax: 0734-8281288, E-mail: XDY7@263.net

收稿日期: 2004-07-12, 接受日期: 2004-09-30

件分析该蛋白质的电荷分布和跨膜区段; SignalP 软件分析该蛋白质的信号肽剪切位点; BIOEDIT 软件分析该蛋白质的亲疏水性并预测其二级结构; Domain Database 预测该蛋白质的结构域; Psort II 分析该蛋白质的亚细胞定位. 根据亲水性、二级结构、偶联难易及实验难度选取抗原表位 (13 肽 PKLVKEEVFWRNY).

**1.3 FRG4 抗原多肽合成及 FRG4 多克隆抗体制备**

采用美国 ABI 公司的多肽自动合成仪, 以固相合成法合成抗原 (13 肽 PKLVKEEVFWRNY), 合成程序按照 ABI 操作指南. 合成产物经 HPLC 纯化检测, 纯度达到 90.75%. 用纯化后 FRG4 抗原多肽与血蓝蛋白按照 BDB 法交联: 将 FRG4 抗原液与等体积的弗氏完全佐剂混合, 充分乳化; 采用多点皮下注射抗原免疫新西兰白兔, 每只兔子经基础免疫、加强免疫、第 3 次免疫和第 4 次免疫, 于第 4 次免疫后第 10 至 14 天从颈动脉放血, 制备相应的兔抗血清, HPLC 检测抗体纯度达 82.79%, 冷冻抽干, -20℃ 保存.

**1.4 ELISA 法检测抗体效价**

用抗原包被液 (0.05 mol/L 碳酸盐包被液, pH 9.6) 稀释与血蓝蛋白交联的 FRG4 抗原至 10 mg/L, 加到酶标板中 (200 μl/孔), 4℃ 过夜, 5% 脱脂奶粉封闭, 37℃ 2 h; 各孔加 100 μl FRG4 抗血清, 同时设空白和阴性对照, 37℃ 孵育 1.5 ~ 2 h; 每孔加入羊抗兔 IgG 100 μl, 37℃ 孵育 1.5 h, OPD 底物液 150 μl 显色, 酶标仪 490 nm 波长测其吸光度, 大于阴性对照 2 倍以上为阳性.

**1.5 蛋白质印迹杂交**

收集培养的肝癌细胞株 HepG<sub>2</sub> 细胞和人巨噬细胞株 THP-1 细胞, 参照文献 [4] 准备样品. 用 BCA 法进行蛋白质定量, 取 20 μg 样品加入上样缓

冲液, 煮沸 3 min 后进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转 PVDF 膜, 分别与一抗 (兔来源抗 FRG4 多抗血清 1:3 000 稀释) 和二抗 (HRP 标记的羊抗兔 IgG 按照 1:1 000 稀释) 室温孵育 2 h 和 1 h, 利用化学发光法进行显色反应.

**1.6 RT-PCR 反应检测 FRG4 mRNA 的表达**

提取血管平滑肌和内皮细胞总 RNA, 逆转录成 cDNA. 以 GAPDH 为内对照, 进行半定量 RT-PCR 反应, 所用引物序列如下, GAPDH 上游为 5' TGAAGGTCGGAGTCAACGGATTTT 3', 下游为 5' CATGTGGGCCATGAGGTCAACCAC 3', 预计产物大小为 983 bp; FRG4 上游为 5' AAGCTTATGTTCCGGGGCTTGAGCAGTTGGTT 3', 下游为 5' GGATCCAAAGTAGAAGAGGCAAGTTTCAACTT 3', 预计产物大小为 202 bp. 首次循环先在 94℃ 变性 5 min, 变性、退火、延伸分别为 95℃ 1 min, 58℃ 1 min, 72℃ 1 min, 共 30 个循环, 最后一次循环在 72℃ 延伸 7 min. PCR 产物用含 0.5 mg/L 溴化乙锭的 1.2% 琼脂糖凝胶电泳分析.

**1.7 免疫组化检测蛋白质表达**

人脐动脉平滑肌细胞和脐静脉内皮细胞用胰酶消化, 传代培养, 细胞贴壁长满玻片后, 取出固定, 按免疫组化试剂盒说明进行操作.

**2 结 果**

**2.1 FRG4 氨基酸序列**

以人胎肝、胎心和胎盘 cDNA 文库为模板进行 PCR 扩增, 发现 FRG4 在人胎肝 cDNA 文库中表达最高, 以人胎肝 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 扩增克隆后测序, 得到一 1 213 bp 全长 cDNA 序列, 经 BioEdit 软件翻译得到 FRG4 的氨基酸序列<sup>[3]</sup> (图 1).

```

MFRGLSSWLGLQQPVAGGGQPNGDALPEQPSETVAESAEEELQQAGDQELHLQAKDFGNLYLNFNFAAATKKITE
SVAETAQTIKKSVEEGKIDGIIDKTIIGDFQKEQKKFVEEQHTKKSEA AVPPWVDTND EETIQQQILALSADKRNFL
RDPPAGVQFNFDQMYPVVALVMLQED ELLSKMRFALVPKLVKEEVFWRNYFYRYSLIKQSAQLTALAAQQQLA
BSD domain
AGKEEKSNGREQDLPLAEAVRPKTPPVVIKSQLKTQEDEBEIISTSPGVSEFVSDAFDACNLNQEDLRKEMEQLVL
DKKQEETAVLEEDSADWEKELQQLQEYEVVTESEKRDENWDKBIEKMLQEEN

```

Fig. 1 Sequence of FRG4 and BSD domain

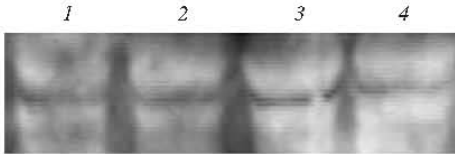
**2.2 FRG4 生物信息学分析及抗原表位选择**

新基因 (FRG4) 的开放阅读框 (ORF) 是从第 62 个碱基到第 1 120 个碱基, 编码 352 个氨基酸. 分析结果显示, 该蛋白质分子质量为 40 ku,

等电点 (pI) 为 4.45, 为一弱酸性的蛋白质; 该蛋白质于 160 ~ 206 位氨基酸之间有一功能域 BSD, 包含一特异性基序 FW-modify, 说明它是真核转录因子家族成员之一 (图 2). 亲疏水性分析发现,



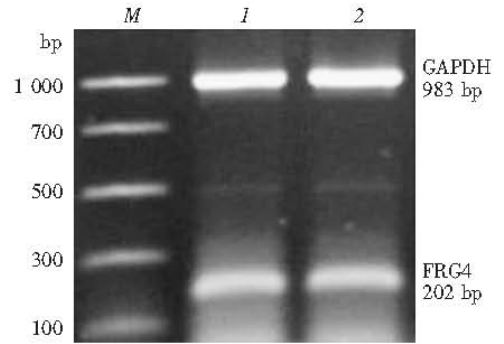
一抗, 以 HRP 标记的羊抗兔 IgG 为二抗, 与转移到硝酸纤维素膜上的 HepG<sub>2</sub> 细胞和 THP-1 细胞抽提的总蛋白进行印迹反应, 均检测到 FRG4 蛋白的表达 (图 5)。蛋白质印迹杂交结果有一些背景, 分析其原因可能是因为我们使用的是抗血清, 而不是纯化的抗体。



**Fig. 5 Expression of FRG4 in HepG<sub>2</sub> and THP-1 cells**  
1, 2: HepG<sub>2</sub> cells; 3, 4: THP-1 cells.

### 2.5 RT-PCR 检测 FRG4 mRNA 的表达

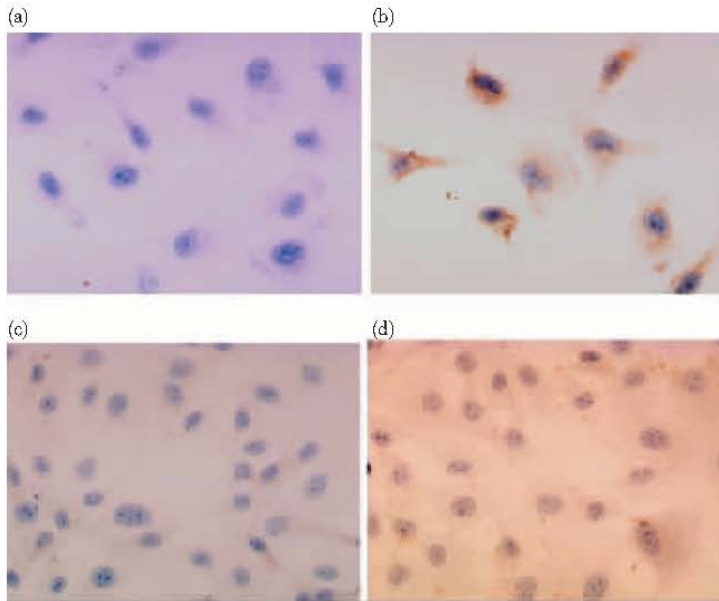
为进一步研究 FRG4 mRNA 在血管细胞中的表达情况, RT-PCR 检测看家基因 GAPDH 和目的基因 FRG4, 扩增产物的片段长度分别为 983 bp 和 202 bp, FRG4 基因在人平滑肌细胞和内皮细胞均有表达 (图 6)。



**Fig. 6 Expression of FRG4 mRNA in smooth muscle cells and endothelial cells**  
M: DNA marker; 1: Smooth muscle cells; 2: Endothelial cells.

### 2.6 免疫组化检测 FRG4 表达及初步定位

利用细胞免疫组化检测 FRG4 蛋白在脐动脉平滑肌细胞和脐静脉内皮细胞的表达, 图 7a, c 为不加一抗兔抗人 FRG4 抗体作为阴性对照, 图 7b, d 加一抗兔抗人 FRG4 抗体作为阳性结果。从免疫组化结果可见, FRG4 蛋白在人内皮细胞和平滑肌细胞均有表达, 尤以内皮细胞显著, 且主要是在细胞胞浆, 胞核处很少, 与生物信息学分析结果一致。



**Fig. 7 Expression of FRG4 protein in endothelial cells and smooth muscle cells**  
(a, b) Endothelial cells. (c, d) Smooth muscle cells. (×400).

## 3 讨 论

目前研究发现, 突触相关蛋白家族 (family of

synapse-associated proteins, SAPs) 包括 Dlg, SAP97/hDlg, SAP90/PSD-95, SAP102 和 PSD-93/chapsyn, 也被称为 MAGUK (membrane-associated

guanylate kinase), 主要分布在兴奋性或抑制性突触的突触前膜或后膜. SAPs 的功能与突触膜上的谷氨酸酯受体 (glutamate receptor) 和钾离子通道 (voltage-gated  $K^+$  channels) 的定位和功能有关<sup>[5]</sup>. SAPs 在神经系统中重要的作用, 它能介导神经递质的释放、促进神经的生长、发育及修复, 也与大脑的记忆功能有密切的联系. SAPs 基因的突变或表达改变, 可能引起一系列的神经精神疾病如 Parkinsonism 病、癫痫病甚至精神分裂症等<sup>[6-8]</sup>. FRG4 是应用抑制消减杂交 (SSH) 筛选 ox-LDL 处理的 U937 细胞, 获得的新差异表达基因, 该基因经 Blast 分析, 与人类的突触相关蛋白 (SAP1) 有高度同源性, FRG4 编码蛋白可能是 SAPs 家族新成员. 当前关于 SAPs 功能研究主要集中于神经系统, 对其与动脉粥样硬化等心血管疾病的关系尚无文献报道.

利用核酸和蛋白质数据库以及生物信息学分析技术, 对新功能不明确的基因进行分析和功能预测, 能够引导科学实验的研究方向. 在本研究中, 参照国内外多个实验室的工作, 我们在确定抗原表位时从亲水性、抗原性、可及性、可塑性和二级结构等方面综合考虑, 通过生物信息学技术对巨噬细胞泡沫化过程中差异表达基因 FRG4 进行分析和预测<sup>[9-12]</sup>. 在首都医科大学北京宣武医院盛树力教授指导下, 根据蛋白质的亲水性、二级结构、偶联难度及实验难度等选取了位于 189 ~ 202 位 PKLVKEEVFWRNY 这 13 个氨基酸作为抗原多肽, 采用固相合成法合成. 制备的兔抗人 FRG4 抗血清经 ELISA、蛋白质印迹检测, 其效价达到 1:16 000 以上, 特异性较高, 说明多肽的选取和抗体制备是成功的. 本实验印迹杂交或免疫组化结果显示, FRG4 蛋白在人肝癌细胞株 HepG<sub>2</sub>、巨噬细胞株 THP-1 细胞、平滑肌细胞和内皮细胞中均有表达, FRG4 蛋白主要在细胞胞浆中表达, 与生物信息学预测显示一致. FRG4 是从巨噬细胞泡沫化和分化过程中获得的差异表达基因, FRG4 多克隆抗体的制备, 有利于进一步研究 FRG4 基因及其编码蛋白

在巨噬细胞分化和动脉粥样硬化性心、脑血管疾病中的作用.

## 参 考 文 献

- 1 Lippy P, Geng Y J, Aikawa M, *et al.* Macrophages and atherosclerotic plaque stability. *Curr Opin Lipidol*, 1996, **7** (4): 330 ~ 335
- 2 杨向东, 王 抒, 唐蔚青, 等. 人单核细胞泡沫化敏感候选基因的筛选. *中国动脉硬化杂志*, 2002, **10** (3): 195 ~ 198  
Yang X D, Wang S, Tang W Q, *et al.* *Chin J Arterioscler*, 2002, **10** (3): 195 ~ 198
- 3 阎宏伟, 杨向东, 何淑雅, 等. cDNA 文库基础上运用热启动聚合酶链反应末端延伸快速分离全长 cDNA 序列. *中国动脉硬化杂志*, 2002, **10** (5): 396 ~ 399  
Lv H W, Yang X D, He Sh Y, *et al.* *Chin J Arterioscler*, 2002, **10** (5): 396 ~ 399
- 4 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 F, 曼尼阿蒂斯 T. 金冬雁, 黎孟枫等译. *分子克隆实验指南*. 第二版. 北京: 科学出版社, 1996. 852 ~ 898  
J Sambrook, E. F. Fritsch, T Maniatis. Translated by Jin D Y, Li M F, *et al.* *Molecular Cloning*. 2nd. Beijing: Science Press, 1996. 852 ~ 898
- 5 Fujita A, Kurachi Y. Breakthroughs and views of SAP family proteins. *Biochem Biophys Res Com*, 2000, **269** (1): 1 ~ 6
- 6 Ferreira A, Rapoport M. The synapsins: beyond the regulation of neurotransmitter release. *Cell Mol Life Sci*, 2002, **59** (4): 589 ~ 595
- 7 Steward O, Worley P. Local synthesis of proteins at synaptic sites on dendrites role in synaptic plasticity and memory consolidation? *Neurobiol Learn Mem*, 2002, **78** (3): 508 ~ 527
- 8 Antar L N, Bassell G J. Sunrise at the synapse: the FMRP mRNP shaping the synaptic interface. *Neuron*, 2003, **37** (4): 555 ~ 5558
- 9 盛树力. 多肽激素的当代理论和应用. 北京: 科学技术文献出版社, 1998. 1 ~ 15  
Sheng S L. *Theory and Application of Polypeptide Hormone*. Beijing: Science and Technology Press, 1998. 1 ~ 15
- 10 宋建勋, 朱锡华, 陈克敏. 人 Fas 抗原表死亡位点分析. *第三军医大学学报*, 1999, **21** (5): 325 ~ 328  
Song J X, Zhu X H, Chen K M. *J Third Mil Med Univ*, 1999, **21** (5): 325 ~ 328
- 11 Mezo G, Drakopoulou E, Paal V, *et al.* Synthesis and immunological studies of alpha-conotoxin chimera containing an immunodominant epitope from the 268 ~ 284 region of HSV gD protein. *J Pept Res*, 2000, **55** (1): 7 ~ 17
- 12 Schirmeister T H, Alvarado GG, Pfeleiderer W, *et al.* The 9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) group and its use in oligonucleotide synthesis. *Nucleosides Nucleotides*, 1999, **18** (6 ~ 7): 1219 ~ 1220

## Epitope Analysis of a Novel Homo Sapiens Synapse Associated Protein and Preparation of Antibody and Expression Research \*

YANG Xiang-Dong \*\*, WANG Ren, LIU Jun-Wen, QU Shun-Lin, GUO Fang, WANG Lei, SHENG Shu-Li

(*Institute of Cardiovascular Disease, Nanhua University, Hengyang 421001, China*)

**Abstract** A family of synapse-associated protein (SAPs) has recently emerged as a central player in the molecular organization of synapses. This work is to analyze the epitope of a novel Homo sapiens synapse associated-protein (FRG4) and synthesize polyclonal antibody, then research FRG4 protein expression in smooth muscle cells and endothelial cells. FRG4 full-length sequence was obtained by PCR from human fetal liver library. Its epitope, motifs and the second structure of amino acids encoded were detected by bioinformatics technique. By solid-phase peptide synthesis method to synthesize FRG4 peptides, then peptides were immunized to rabbits; by immunohistochemistry to detect the expression of FRG4 in vascular smooth muscle cells and endothelial cells. The 13-peptides PKLVKEEVFWRNY was selected by bioinformatic analysis to synthesize rabbit anti-human FRG4 polyclonal antibody. Antibody purity was 82.79% and antibody dilution was 1:16 000 detected by ELISA. The antibody has a good reaction and speciality in Western blot, it was mainly expressed in the cytoplasm of smooth muscle cells and endothelial cells by immunohistochemistry. The results suggested a novel Homo sapiens synapse associated protein (FRG4) antibody was synthesized successfully. FRG4 expressed mainly in the cytoplasm of vascular smooth muscle cells and endothelial cells.

**Key words** atherosclerosis, macrophages, synapse-associated protein, peptide synthesis, bioinformatic analysis

---

\* This work was supported by grants from The National Natural Sciences Foundation of China (30200103) and Hunan Province Educational Office Young Foundation (02B039).

\*\* Corresponding author. Tel: 86-734-8281277, Fax: 86-734-8281288, E-mail: XDY7@263.net

Received: July 12, 2004 Accepted: September 30, 2004