

文章编号 :1001-4721(2010)01-0001-03

梅花鹿生茸骨膜干细胞可溶性总蛋白抗体的制备及滴度测定

赵海平, 杨福合, 邢秀梅, 崔学哲, 李春义^{*}

(中国农业科学院特产研究所, 吉林 吉林 132109)

摘要 :为了获取梅花鹿生茸骨膜干细胞可溶性总蛋白抗体。本试验培养了梅花鹿生茸骨膜干细胞, 从该细胞中提取可溶性总蛋白。以其可溶性总蛋白为抗原, 通过淋巴结和皮下注射两种方式免疫试验动物, 注射的抗原量分别为 70 μ g 只和 280 μ g 只。分别于末次免疫后第 10 天和第 20 天采血, 分离血清, 通过 ELISA 试验检测血清中抗体滴度。结果表明, 280 μ g 皮下免疫和 70 μ g 淋巴结免疫均获得了较好的免疫效果, 末次免疫后第 10 天的抗体滴度较高。

关键词 梅花鹿; 生茸骨膜; 鹿茸干细胞; 抗体

中图分类号 S865.4⁺2; S852.5

文献标识码 A

Preparation and Detection of Total Soluble Protein Antibody for Antlerogenic Periosteum Stem Cells in Sika Deer (*Cervus nippon Temminck*)

ZHAO Hai-ping, YANG Fu-he, XING Xiu-mei, CUI Xue-zhe, LI Chun-yi^{*}

(Institute of Special wild Economic Animals and Plants, CAAS, Jilin 132019, China)

Abstract Sika deer (*Cervus nippon Temminck*) antlerogenic periosteal (AP) cells were cultured in order to produce polyclonal antibody. Total soluble protein of AP cells was extracted as antigen. New Zealand white rabbits were inoculated through lymph node injection or subcutaneous injection. The dosage of injection was 70 μ g and 280 μ g respectively. The blood was collected 10 days and 20 days after the last inoculation respectively and the serum thereof was isolated. The antibody titer of each serum was detected by ELISA. The results showed that 70 μ g antigen lymph node injection and 280 μ g antigen subcutaneous injection were resulted good immune-reaction, antibody titer of the serum collected 10 days after the last inoculation was higher than that of 20 days.

Key words sika deer; antlerogenic periosteum; stem cell; antibody

鹿茸是我国名贵的传统中药, 其药用价值一直受到人们的青睐。近年来, 人们逐渐意识到鹿茸拥有更为惊奇的生物学现象: 1) 鹿茸是唯一能够完全再生的哺乳动物器官; 2) 鹿茸具有令人惊奇的生长速度, 最快时

每天可达 2cm, 不会出现癌变的迹象; 3) 鹿茸具有很强的免疫力, 无论是脱掉鹿角后的伤口还是创伤, 自然状态下几乎不会感染。研究人员一直致力于寻找与上述生物学特性有关的生物学活性物质。

收稿日期 2009-11-19

基金项目 国家自然科学基金(309771664)

作者简介 赵海平(1980-), 男, 山东省潍坊市人, 硕士, 研究员, 从事鹿茸生物学研究。

^{*}通讯作者: 李春义(1959-), E-mail: zhyi.li@agresearch.co.nz

多年的研究表明,鹿茸的特殊性在于其最初的细胞来源。在鹿茸发生前将生茸部位的骨膜切除,鹿将终生不能生长鹿茸。而将切除的骨膜移植到鹿体的其他部位,在移植的部位将发生异位的鹿茸^[1-3]。因此该骨膜被称为生茸骨膜。生茸骨膜细胞表达胚胎干细胞的关键标记物(如 OCT4、Nanog 和 SOX2)能在离体条件下被诱导分化成软骨细胞、成骨细胞、脂肪细胞和肌肉细胞^[5]。因此,生茸骨膜细胞被称为鹿茸干细胞。

为了通过免疫学方法筛选梅花鹿生茸骨膜干细胞区别于普通骨膜细胞独特的调控分子和生物活性成分,本研究成功制备了鹿茸生茸骨膜干细胞可溶性总蛋白抗体,为鹿茸相关研究的多克隆抗体的制备提供了参考方案,为鹿茸生茸骨膜干细胞调控分子的鉴别及有效活性成分的筛选奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

梅花鹿生茸骨膜干细胞(本试验室保存)。健康新西兰大耳白兔 2 只,1.5kg 左右(农业部长白山野生生物资源重点野外科学观测试验站提供)。DMEM、FBS、胰蛋白酶(INVITROGEN 公司)、蛋白质提取试剂盒(上海杰美公司)、GENMED 蛋白质萃取试剂盒(上海杰美公司)、羊抗兔辣根过氧化物酶标二抗(Abcam 公司)、脱脂奶粉(Roche 公司)。SPECORD S600 型分光光度计(耶拿公司)

1.2 方法

1.2.1 生茸骨膜干细胞培养 将梅花鹿生茸骨膜干细胞冻存管自液氮中取出,迅速放入 37℃ 水浴中,不断摇动至冻存液融化。无菌条件下将细胞液移入 10mL DMEM(含 10%FBS,以下同)培养液中,800r/min 5min。弃上清,10mL DMEM 培养液重悬细胞,移入细胞培养皿中,CO₂ 培养箱培养。隔天换液,当细胞生长至 80~90%时传代。

1.2.2 生茸骨膜干细胞可溶性总蛋白提取 无菌条件下,将生长至 80%~90%的细胞用 0.25%的胰蛋白酶消化,10mL DMEM 培养液悬浮,转移至 15mL 离心管,

800r/min 5min。弃上清,150μL PBS 悬浮,转移至 1.5mL 离心管。重复上述操作,共收集 8 个细胞培养皿中的细胞。细胞计数。800r/min 5min,弃上清,细胞称重。

按 GENMED 组织可溶性总蛋白质萃取试剂盒操作说明提取蛋白质,利用分光光度计测定浓度后 -70℃ 保存。

1.2.3 采血和致敏 将兔子编号,于免疫前耳静脉采血,取血清作阴性对照。淋巴结免疫的兔子于免疫前 7d 用弗氏完全佐剂 1mL/只注射于爪垫以致敏肩前淋巴结和股淋巴结;皮下免疫的兔子不用致敏。

1.2.4 免疫 取生茸骨膜干细胞可溶性总蛋白提取液,用 PBS 稀释至适当的浓度。1 号兔子采取淋巴结免疫方式免疫,免疫抗原量为 70μg/只,即将含有 70μg 生茸骨膜干细胞可溶性总蛋白提取液用 PBS 稀释至 500μL,与弗氏佐剂按 1:1 的比例混合乳化。免疫部位为肩前淋巴结和股淋巴结 4 点,共免疫 4 次。初免用弗氏完全佐剂,2 免、3 免用弗氏不完全佐剂乳化。初免、2 免、3 免间隔时间为 14d,3 免后 7d 进行加强免疫。2 号兔子采取皮下免疫方式免疫,免疫抗原量为 280μg/只,与淋巴结免疫相同的方法乳化,免疫部位及方式为皮下多点注射,免疫程序相同。

1.2.5 采血并检测血清中抗原滴度 于末次免疫后第 10 天和 20 天采血,制备血清,ELISA 检测阳性血清中抗体的滴度。

2 结果

2.1 细胞计数和重量

细胞计数为 8.0×10^6 个/mL,细胞重 70mg。

2.2 生茸骨膜干细胞可溶性总蛋白提取液浓度测定

$OD_{280}/OD_{260}=0.965$, $F=0.743$,生茸骨膜干细胞可溶性总蛋白提取液浓度为 26.9mg/mL,结果见表 3。

表 3 OD 值测定结果

波长	1	2	3	平均值
OD ₂₆₀	0.373 7	0.375 3	0.375 2	0.374 7
OD ₂₈₀	0.361 4	0.361 7	0.361 0	0.361 4

2.3 抗体滴度测定结果

Plate#1										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	2.007	1.975	1.812	1.759	1.819	1.400	1.002	0.953	0.672	-0.000
B	2.067	2.034	2.083	2.097	2.071	1.989	1.449	0.970	0.678	0.000
C	1.388	1.385	1.292	1.241	1.139	1.063	0.923	1.038	0.650	
D	1.353	1.392	1.375	1.328	1.311	1.120	1.082	0.940	0.604	

Wavelength Combination :JLm1

Mean Temperature :27.3

Plate Blank Used Lm1=0.051

Reader: VersaMaxPLUS ROM v1.21 Aug 16 2005

注 :A.淋巴结免疫 10d 采血 B.皮下免疫 10d 采血 C.淋巴结免疫 20d 采血 D.皮下免疫 20d 采血 ;1~7.阳性血清倍比稀释 2⁴~2¹⁰ 8.阴性血清对照 9.PBS 空白对照。

Endpoint

Lm1 450

Automix :Off

Calbrate :On

Column Priority

C.Speed:Normal

Plate Last Read :

15 S3 2009-7-21

图 1 ELISA 试验结果

将显色后的 ELISA 反应板放入 soft Max Pro5 酶标仪,测定其在 450nm 波长下的 OD 值,见图 1。

由图 1 可知,阴性对照平均值为 $N=0.324$ 。根据 $P/N>2.1$ 判定,淋巴结免疫 10d 血清滴度为 2^9 ;皮下免疫 10d 血清滴度为 2^{10} ,淋巴结免疫和皮下免疫 20d 血清滴度均有所下降。由此可以看出,280 μ g 皮下免疫和 70 μ g 淋巴结免疫均可获得较好的免疫效果,末次免疫后第 10 天采血血清中抗体的滴度高于末次免疫后第 20 天采血血清中抗体的滴度。

3 讨论

作为独特的生物医学研究模型,鹿茸的生长发育近年来颇受研究人员的青睐,但是大多有关研究都只停留在组织形态学水平上^[6]。由于鹿茸材料珍稀,研究成本较高,成分复杂,有效成分及生物活性物质难以分离,鹿茸发生、生长过程中内部调控方式比较独特,常规研究方法不能达到预期目的。分子生物学的快速发展,为鹿茸的研究提供了一个新的手段(或技术)。不少研究者们把研究重点转向了从分子水平入手来研究其内部调控机理及生物学内环境。李春义等研究者发现,鹿茸的发生起源于生茸骨膜。鹿茸不同阶段的间充质、软骨及骨细胞都来源于该骨膜细胞层的细胞^[2~4]。由此可推测,鹿生茸骨膜可能与鹿茸特殊的生物学现象有着密不可分的联系。对于鹿茸生茸骨膜干细胞的研究,成为了鹿茸研究新的突破口。本试验室成功构建了梅花鹿生茸骨膜干细胞 cDNA 表达文库,为研究生茸骨膜干细胞特殊的调控分子和生物活性成分奠定了基础。为此,本试验制备了梅花鹿生茸骨膜干细胞可溶性总蛋白抗体,试图通过免疫学手段来筛选建立的生茸骨膜干细胞 cDNA 表达文库,以期获得其相对于其它普通骨膜细胞的差异基因,为揭示鹿茸生长发育机制及寻找特殊活性物质奠定基础。

试验中采用 GENMED 组织可溶性总蛋白质萃取

试剂盒提取梅花鹿生茸骨膜干细胞可溶性总蛋白。以细胞来替代组织块,省去了液氮研磨的过程。细胞收集完成后,用 GENMED 裂解工作液裂解细胞,以细胞的数量来选择试剂的用量,共用细胞 70mg,获得蛋白质 13.5mg,提取的可溶性总蛋白占细胞总重的 19.3%,与试剂盒中说明的 1g 组织可获得 150~200mg 可溶性总蛋白的比例相符。

本试验成功制备了鹿茸生茸骨膜细胞多克隆抗体,抗体最高滴度为 2^{10} ,鹿茸生茸骨膜细胞可溶性总蛋白 280 μ g 皮下免疫和 70 μ g 淋巴结免疫均获得较好的免疫效果,末次免疫后第 10 天血清中抗体滴度高于末次免疫后第 20 天血清中抗体滴度。

本试验为鹿茸生茸骨膜干细胞有效活性成分的筛选奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] Goss R J, Powel R S. Induction of deer antlers by transplanted periosteum. I. Graft size and shape [J]. J Exp Zool, 1985, 235(3): 359-73.
- [2] Hartwig H, Schrüdde J. Experimentelle Untersuchungen zur Bildung der primären Stirnauswüchse beim Reh (Capreolus capreolus L.) [J]. Z Jagdwiss, 1974, 20: 1-13.
- [3] Li C, Suttie J M. Deer antlerogenic periosteum: a piece of postnatally retained embryonic tissue? [J]. Anat Embryol (Berl), 2001, 204(5): 375-88.
- [4] Li C, Yang F, Sheppard A. Adult stem cells and mammalian epimorphic regeneration—Insights from studying annual renewal of deer antlers [J]. Current Stem Cell Research & Therapy, 2009, 4(3): 237-51.
- [5] Kierdorf U, Li C, Price J S. Improbable appendages: Deer antler renewal as a unique case of mammalian regeneration [J]. Semin Cell Dev Biol, 2009, 20(5): 535-42.

一刊在手 致富不愁 想致富请订 2010 年《特种经济动植物》

《特种经济动植物》(原名《国外特种经济动植物》)是由中华人民共和国农业部主管、中国农业科学院特产研究所主办的全国唯一的特种经济动植物专业性国家级科技类期刊,主编为中国农业科学院特产研究所所长、研究员、博士生导师杨福合。1982 年创刊,月刊,大 16 开,56 页。本刊面向生产和用户,为科技兴农、振兴农村经济、农民科技致富服务,奉行科学、适用、及时的办刊方针,介绍特产农业、特色农业新技术、新成果、新品种、新经验、新信息,努力办成广大读者买得起、读得懂、用得上的好刊物,是您致富的好帮手。主要栏目:① 特种经济动物 毛皮动物、野生动物、珍(野)禽、畜禽优良品种、特有水(海)产动物。② 特种经济植物 经济植物、野生(名)特果树、药源、观赏、油料、饲料、蜜源、园林草坪、海(水)生、防风固沙

(氮)等植物,高产作物、野生名特蔬菜、各地名产、牧草、食用菌等的栽培、加工、植物保护等。③ 信息荟萃 国内毛皮市场及世界毛皮拍卖会行情,全国十大中药材市场特种经济动物、植物类中药材市场行情、发展前景及其权威预测等。刊号:CN 22-1155/S,邮发代号 12-183,每期定价 4.00 元,全年 48.00 元(含邮费)。全国各地邮局(所)均可订阅,也可随时从邮局汇款至编辑部订阅。地址:吉林省吉林市左家镇鹿鸣大街 15 号 邮编:132109 单位:中国农业科学院特产研究所《特种经济动植物》编辑部 联系人:包秀芳 电话:(0432)66513067 66513069(兼传真) E-mail:tzjdz@126.com