

## Nova1 的两种抗体的免疫印迹实验的比较

李华玲, 陈文飞, 焦红梅, 申 丽  
(扬州大学医学院, 江苏 扬州 225001)

**[摘要]** **目的** 探讨两个不同公司的同一种抗体神经-肿瘤腹侧抗原 (Nova1) 在大鼠脑组织中的表达, 比较其异同。 **方法** 采用免疫组织化学法 (IHC) 和 Western-blot (WB) 进行检测。 **结果** IHC 显示 Nova1 在大脑中分布广泛, 在神经细胞的轴突或树突中都有表达; WB 显示在 55 kDa 处都有很清晰的条带。 **结论** 这两种抗体的表达清晰, 既可以用于 IHC, 也可以用于 WB 实验。

**[关键词]** 大鼠脑组织; Nova1; 不同抗体; 免疫印迹实验

**[中图分类号]** R446.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003 - 4706 (2012) 12 - 0033 - 03

## Comparison of Immunoblotting of Nova1 with Two Different Antibodies in Rat Brain

LI Hua - ling, CHEN Wen - fei, JIAO Hong - mei, SHEN Li  
(Medical college of Yangzhou University, Yangzhou Jiangsu 225001, China)

**[Abstract]** **Objective** To compare the expression of Neuro-oncological ventral antigen 1 (Nova1, neuron-specific splicing factor) in rat brain with two antibodies from different company. **Method** Immunohistochemistry (IHC) and Western-blot (WB) were performed to detect the expression of Nova1. **Results** Nova1 was expressed almost in the whole brain, especially in dendrites and axons. WB showed clearly bands at 55kDa. **Conclusion** Our data suggest that two antibodies can be used in IHC and WB experiment with same quality.

**[Key words]** Rat brain; Nova1; Different antibody; Immunoblotting

在做分子生物学的实验室, 都要用到抗体, 但大家常常会有一个困惑, 哪个公司的抗体好用呢<sup>[1-4]</sup>。生产抗体的国内外公司都很多, 选择到好的抗体, 就可以出结果, 但即使是同一个公司的不同抗体质量也是有差异的, 因此, 本实验用了两个不同公司的一种抗体进行检测, Nova-1 (神经-肿瘤腹侧抗原, Neuro-Oncological Ventral Antigen1), 并做了免疫组化和 Western 实验, 以供参考。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验动物

实验用健康清洁级雄性 Sprague-Dawley 大鼠, 由扬州大学医学院实验动物中心提供, 体质量 250 ~ 300 g。

#### 1.2 主要试剂

Nova1 多克隆抗体 (Sigma 公司, HPA004155), Nova1 多克隆抗体 (Lifespan 公司, LS-B3085); 免疫组化亲和素-生物素-过氧化物酶 (ABC) 试剂盒、3, 3'-二氨基联苯胺 (DAB) 显色试剂盒、辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠抗体 (中杉金桥生物技术公司)。Western Blotting ECL Reagent (GE Health 公司)。裂解液 (4%SDS, 0.16MTris, 10% 甘油, 蛋白酶抑制剂 (cocktail) 需新鲜配制。

#### 1.3 方法

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目 (81100862, 31100652)

**[作者简介]** 李华玲 (1971~), 女, 江苏扬州市人, 医学博士, 讲师, 主要从事缺氧的分子机制研究工作。

**1.3.1 大鼠脑组织切片制备** 大鼠麻醉, 预冷的 0.9% 氯化钠注射液 250 mL 快速灌注升主动脉, 4℃ 4% 多聚甲醛溶液 200 mL 固定, 断头取脑, 置 4% 多聚甲醛溶液 2 周左右, 石蜡包埋、切片 (厚 5 μm).

**1.3.2 Nova1 免疫组化检测** LSAB 法免疫组化染色, 具体步骤: 切片滴加 3% 过氧化氢溶液, 室温孵育 10 min; 微波抗原修复 20 min; 滴加正常山羊血清, 室温孵育 20 min; 滴加 Nova1 抗体 (抗体浓度 1:1 000), 4℃ 孵育过夜; 滴加生物素标记的第二抗体, 37℃ 孵育 60 min; 滴加链亲和素-过氧化物酶溶液, 37℃ 孵育 30 min. 上述各步骤后, 用 0.1 mol/L PBS 洗 3 次, 每次 5 min. 用新鲜配制的 DAB 显色 3~5 min, 显微镜下观察, 阳性细胞呈棕黄色颗粒, 常规脱水、透明, 最后封片. 阴性对照组以 PBS 代替一抗, 其余步骤相同.

**1.3.3 Nova1 Western-blot 检测** 大鼠脑组织裂解后, 提取蛋白质并测定浓度, 取 50 μg 样品经

10% SDS-PAGE 分离, 并转移到硝酸纤维膜上, 用 50 g/L PBS 脱脂奶粉封闭, 以所检测蛋白为一抗, 以辣根过氧化物酶标记的为二抗, ECL 显色.

## 2 结果

### 2.1 Nova1 免疫组化染色结果

由图 1 可见, Nova1 在皮层细胞的胞浆和胞核都表达, 甚至在轴突或树突中表达, Lifespan 公司的抗体 (图 1A) 略微比 Sigma 公司的抗体 (图 1B) 的表达要深一些, 但形态学特征都是一致的.

### 2.2 Nova1 Western-blot 结果

另外, 用大鼠的全脑组织提取了蛋白质, 并同时用两种抗体做了 Western-blot, 结果如图 2, 在 55 kDa 处都有很清晰的条带.



图 1 Nova1 在皮层的表达

Fig. 1 Expression of Nova1 in striatum cortex

A:Lifespan 公司抗体 (1:500); B:Sigma 公司抗体 (1:500).

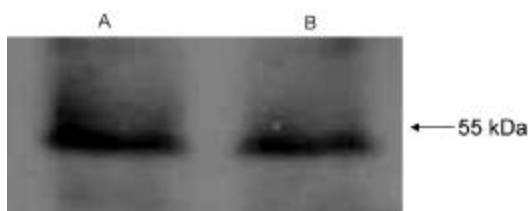


图 2 Western blot 结果显示 Nova1 在正常大鼠脑组织的表达

Fig. 2 Western blot showing the expression of Nova1 in normal rat brain using the anti-Nova1

A:Lifespan 公司抗体 (1:1 000);

B:Sigma 公司抗体 (1:1 000).

## 3 讨论

笔者采用大鼠的脑组织, 分别用免疫组化法和 Western-blot 法比较了两个不同公司的抗体. IHC 的结果显示 Nova-1 在大鼠脑部分布广泛, 尤其是在皮层、海马和丘脑区的神经细胞中的表达最为丰富, 两个抗体没有明显的区别, 也显示出了一致的结果, 在树突或轴突中都有表达. 同时在全脑组织中检测了 Nova-1 的蛋白质表达量, 表达基本一致, 说明 Nova-1 确实是脑部特异性的蛋白质.

有研究报道, Nova-1 是神经特异性的剪接因子. Nova 是神经副肿瘤性眼阵挛共济失调症

(paraneoplastic opsoclonus myoclonus ataxia, POMA) 患者血清中一种抗体的抗原<sup>[5]</sup>, POMA 抗血清与 Nova 蛋白结合而闭掉它的 RNA 结合位点可能是导致这种疾病的直接因素. Nova 是发现最早、同时也是目前在已知的神经系统特异分布的 RNA 结合蛋白中功能研究最为清楚的, 调控了与神经突触功能密切相关的一组基因<sup>[6]</sup>. 霍华德休斯医学院 (HHMI) 研究人员 Robert B.Darnell 等绘制出了图谱<sup>[7]</sup>, 描述了 Nova 蛋白活性的规律. 近日, Darnell 实验室报道, Nova 与它的 RNA 靶标 (GlyR $\alpha$ 2) 共同位于轴突中<sup>[8]</sup>, 这更进一步证实了本实验, Nova-1 的剪接作用在神经突起部位也有.

另外, 常常有疑惑的一个问题是: 一种抗体是否可同时做几种实验. 如果能做 WB 是否可做 IHC、及 ICC 如果能做 IHC 是否可做 ICC, 等等. 虽然, Sigma 公司的网站上只介绍了 Nova-1 的抗体是用于做免疫组化实验, 未显示能否用于 WB, 笔者的实验结果也显示了清晰的条带. 总之, 本研究选用的这两种抗体表达清晰.

#### [参考文献]

[1] 官兵, 周晓军. 淋巴瘤病理诊断常用免疫组化抗体的

选择策略 [J]. 临床与实验病理学杂志, 2011, 27(1): 1-9.

[2] 陈耀祖, 张娟, 王旻. 用于抗体/抗体片段表达的系统及其高表达策略 [J]. 中国生物工程杂志, 2011, 31(9): 76-81.

[3] 王增强, 张桂云, 蒋岩, 等. 三种 HIV 抗体确证试剂盒检测早期感染的比较 [J]. 中华预防医学杂志, 2011, 45(5): 430-434.

[4] 周小鸽. 淋巴瘤病理诊断中的抗体选择 [J]. 诊断病理学杂志, 2010, (1): 4-6.

[5] BUCKANOVICH R J Y Y, DARNELL R B. The onco-neuronal antigen Nov-1 is a neuron-specific RNA-binding protein, the activity of which is inhibited by paraneoplastic antibodies [J]. J Neurosci, 1996, 16: 1114-1122.

[6] ULE J U A, SPENCER J W A, HU J S C M, et al. Nova regulates brain-specific splicing to shape the synapse [J]. Nat Genet, 2005, 37: 844-852.

[7] ULE J S G, MELE A R M, WANG X T B, et al. An RNA map predicting Nova-dependent splicing regulation [J]. Nature, 2006, 444: 580-586.

[8] RACCA C G A, EOM T U J, TRILLER A D R B. The neuronal splicing factor nova co-localizes with target RNAs in the dendrite [J]. Frontiers in neural circuits, 2010, 4: 5.

(2012-09-19 收稿)

## 版权声明

本刊已许可中国学术期刊 (光盘版) 电子杂志社在中国知网及其系列数据库产品中以数字化方式复制、汇编、发行、信息网络传播本刊全文, 作者向本刊提交文章发表的行为即视为同意编辑部上述声明.

《昆明医科大学学报》编辑部