

免疫毒素的纯化

贺永怀 陈 兴 汲言山 赵薇薇 沈倍奋

(军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850)

提 要

本文采用 Ultrogel AcA 34 凝胶柱纯化单克隆抗体和蓖麻毒素的结合物。结合物与游离毒素的分离较 Sephadex G150 柱好。继而利用蓖麻毒素 B 链能与半乳糖基结合的特性, 用酸化 Sepharose 4B 柱进一步纯化结合物; 达到完全除去游离抗体, 使免疫毒素对靶细胞的特异性毒性提高 20 倍。

关键词 免疫毒素, 蓖麻毒素, 单克隆抗体

抗体与毒素的结合物称为免疫毒素。常用的毒素是蓖麻毒素。它的分子量为 65000 道尔顿, 由 A 链和 B 链通过二硫键连接而成。B 链上含有二个能与半乳糖基结合的部位, 当蓖麻毒素与单克隆抗体以 1:1 连接后形成的免疫毒素分子量为 21—22 万, 往往与游离的抗体(15—16 万)不能完全分开。而游离抗体的存在会影响免疫毒素对靶细胞的杀伤效力。因此, 免疫毒素的纯化是十分重要的。

本文采用 Ultrogel AcA 34 凝胶过滤柱和酸化 Sepharose 4B 柱纯化由蓖麻毒素组成的免疫毒素, 获得较好结果。使免疫毒素对靶

细胞蛋白质合成抑制 50% 的浓度从 1×10^{-9} mol/L 降到 5×10^{-11} mol/L。

材 料 和 方 法

Ultrogel AcA 34, Sephadex G150, Sepharose 4B 均购自 Pharmacia 公司。

Molt-4 细胞系为人 T 淋巴母细胞系, 引自英国皇家肿瘤研究所。按常规方法培养在含 10% 小牛血清, 10mmol/L Hepes, 50 单位/ml 庆大霉素的 1640 培养液中。

H65 单克隆抗体是抗人全 T 细胞的抗体, 属 CD5 系统。由白炎同志提供。

它各组间差异较显著 ($P < 0.01$)。以 1h、1.5h 标记率最高。加入 Eu^{3+} 后不同时间相比, 各组结果差异均显著 ($P < 0.01$)。而以 2h Eu^{3+} 的标记率最高。

文献报告, 在 IgG-DTPA 反应液加入 EuCl_3 后要经特殊处理过 Sephadex G50 柱子分离, 以除去游离的 Eu^{3+} , 通过实验对比, 我们发现不经过柱, 采用透析的方法可以达到同样的目的。

每个 IgG 或其它蛋白分子上标有几个 Eu^{3+} 为好, 国外多数作者认为 1:10—15 灵敏度最高, 但从生物样品中浓度来看, 过分要求更高的灵敏度似无必要。因此本法每个 hAlb 分

子上标记 3~4 个 Eu^{3+} , 其标记率或产物免疫活性均已能达到 TRFIA 技术所要求的质量。

参 考 文 献

- 1 李振甲等. 中华医学检验杂志, 1988; 11: 368
- 2 Sonin, E, Kojila H. *Clin Chem.* 1983; 29: 65
- 3 陈泮藻等. 同位素, 1989; 2: 47
- 4 胡天喜. 生物化学与生物物理进展, 1987; (5): 8
- 5 Pettersson K *et al.* *Clin Chem.* 1983; 29: 60
- 6 Eskola J *et al.* *Clin Chem.* 1983; 29: 1777
- 7 Tolvonon E *et al.* *Clin Chem.* 1986; 32: 637
- 8 Khaw B *et al.* *J Nucl Med.* 1982; 11: 1011
- 9 Layne W *et al.* *J Nucl Med.* 1982; 23: 627
- 10 Dechaud H *et al.* *Clin Chem.* 1986; 32: 1323
- 11 Rene B *et al.* *Clin Chem.* 1987; 33: 48

[本文于 1989 年 9 月 23 日收到]

1. 蓖麻毒素的纯化 按本实验室以前报道的方法^[1]提取蓖麻毒素,在实验前,用酸化 Sepharose 4B 柱,进一步纯化得电泳纯的毒素进行实验。

2. 免疫毒素的制备 亲和纯抗体通过 SPDP 试剂与蓖麻毒素连接。方法见文献^[2]。

3. 完整细胞蛋白质合成的测定 用 ³H-亮氨酸参入法测定细胞蛋白质合成^[2]。

4. SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 按文献^[3]方法。

结 果

一、凝胶过滤法纯化免疫毒素

抗体和毒素经 SPDP 连接后,在反应混合物中有抗体与毒素的结合物(免疫毒素),游离抗体和游离毒素。一般选用凝胶过滤法纯化免疫毒素^[4]。反应混合物经 Sephadex G150 柱(ϕ 1.6 × 100cm)分离,平衡和洗脱缓冲液为 0.1mol/L 磷酸盐,含 0.1mol/L NaCl, pH7.5。分离后得二个峰(图 1)。

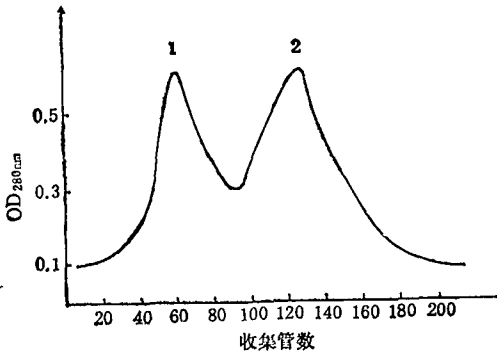


图 1 免疫毒素在 Sephadex G150 柱上的层析图谱

经 SDS-PAGE 分析,峰 1 前半部分(40—50 管)主要是结合物,其中混有少量游离抗体;峰 1 后半部分(50—70 管)主要是游离抗体。峰 2 主要是游离毒素。

用 Ultrogel AcA 34 柱(ϕ 1.6 × 100cm)纯化免疫毒素。平衡和洗脱缓冲液同上。结合物与游离抗体间的分离有一定程度改进(图 2)。洗脱图谱中出现 4 个峰,经 SDS-PAGE 分析,峰 1 主要为免疫毒素。峰 2 的前半部分(60—65 管)既有少量免疫毒素,又有游离抗

体。峰 2 的后半部分(65—80 管)是游离抗体。峰 3 为分子量 11 万左右的蛋白质,可能是不完整的抗体。峰 4 为游离毒素。

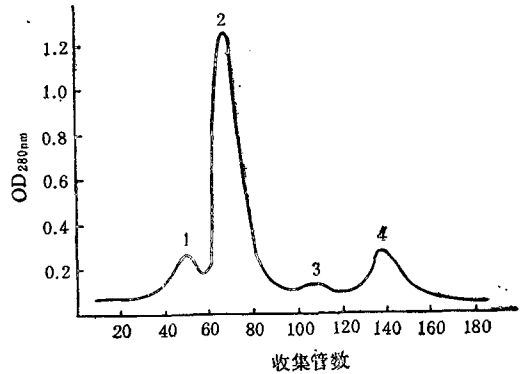


图 2 免疫毒素在 Ultrogel-AcA34 柱上的层析图谱

用不同的凝胶过滤材料,虽然可以改进结合物与游离抗体的分离,但不能使它们完全分开。为了得到纯的免疫毒素必须进一步纯化。

二、亲和层析法纯化免疫毒素

蓖麻毒素 B 链上有能与半乳糖基结合的部位。利用这一特性可以采用酸化 Sepharose 4B 柱或半乳糖-Sepharose 4B 柱纯化结合物。柱体先用 10mmol/L PB, pH7.7(0.1 mol/L NaCl)平衡。加样后,用同样缓冲液洗到杂蛋白(游离抗体) OD < 0.002,然后,换含 50mmol/L 半乳糖的上述缓冲液洗脱(图 3)。

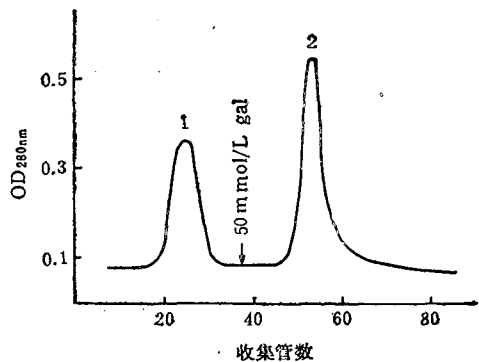


图 3 酸化 Sepharose 4B 柱纯化免疫毒素

得到的洗脱峰 2 是纯的免疫毒素。经 SDS-PAGE 分析,证明是分子量为 21 万的抗体毒素结合物(图 4)。

三、游离抗体对免疫毒素毒性的影响

结合物中如含有游离抗体,则往往与结合

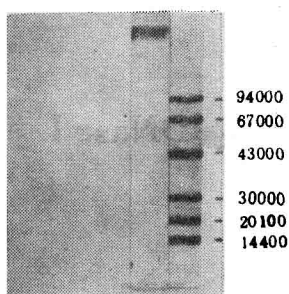


图4 纯化的免疫毒素 SDS-PAGE 图

物中的抗体竞争相应抗原。其结果是减弱了免疫毒素与靶细胞的结合，从而降低毒性。用³H-亮氨酸参入法测定 H65-Ricin 免疫毒素，经酸化-Sephrose 4B 柱纯化前与纯化后对靶细胞 Molt-4 的毒性说明了这一点(图 5)。

未经进一步纯化的 H65-Ricin 使 Molt-4 蛋白质合成抑制 50% 的浓度 $IC_{50} = 1 \times 10^{-7}$ mol/L，而经纯化的 H65-Ricin IC_{50} 为 5×10^{-11} mol/L。两者相差 20 倍。

讨 论

免疫毒素是一种有发展前途的导向药物。但制备过程比较复杂，大部分实验室的得率在 20—40% 之间。因此必须用凝胶过滤的方法纯化免疫毒素。免疫毒素的纯度，对它杀伤靶细胞的效率有很大影响。因为游离抗体的存在会封闭靶细胞上的相应抗原，使之减少与免疫毒素的结合。但由于免疫毒素的分子量与游离抗体的分子量相差不大，一般凝胶过滤方法很

难将游离抗体从结合物中完全分开；所以需要采用其它方法作进一步纯化。除去游离抗体也可采用抗蓖麻毒素的抗体亲和柱。但洗脱时往往用 pH 较低的缓冲液，会影响结合物中的抗体活性。而酸化 Sepharose 4B 或半乳糖 Sepharose 4B 柱洗脱时用 50mmol/L 半乳糖，对结合物中的抗体和毒素均无影响。

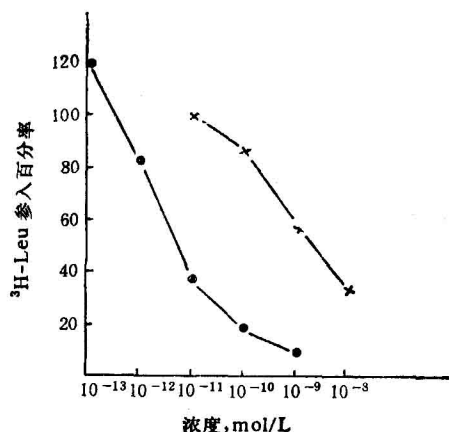


图5 未纯化的免疫毒素与经酸化的 Sepharose 4B 柱纯化的免疫毒素对靶细胞的毒性
×—×未纯化，●—●纯化

参 考 文 献

- 1 贺永怀等. 生物化学与生物物理进展, 1987; (6): 64
- 2 沈倍奋等. 中华微生物学和免疫学杂志, 1985; 5(4): 209
- 3 Leaml U K et al. Nature, 1970; 227: 680
- 4 Thorpe P E et al. Immunol Rev, 1980; 62: 119

[本文于 1989 年 9 月 25 日收到]

(Continued from page 456)

simultaneously assayed by the reverse-phase high-performance liquid chromatography(HPLC). The results show that the increased amplitudes of N_{200} , P_{300} could be related to the increased metabolism rate of brain energy and the decreased biosynthesis of bioactive substances.

Key words the averaged cortical potentials evoked by laser; optical fiber; brain co-enzymes, HPLC