

一种新的免疫吸附亲和层析柱的制备及其应用

曾章新 朱忠勇 戚少然

(解放军医学检验专科中心,福州 350001)

提 要

本文介绍用加工成颗粒性的硝酸纤维素作为固相配体支持物,制备一种新的免疫吸附亲和层析柱,用于纯化 AFP。该法制备简单,固相支持物连接抗体之前不需活化处理和使用化学交联剂。实验结果表明,纯化的 AFP 纯度较高,收获量也大,是一种实用的柱层析技术。

关键词 颗粒性硝酸纤维素,免疫吸附亲和层析柱,AFP 纯化

免疫吸附亲和层析是用于分离和纯化抗原、抗体的一种特异性吸附层析技术,它具有简单、快速、产物纯度高、不失活等优点。层析中最常用的是以溴化氰(BrCN)活化的琼脂糖珠(Sepharose)作为固相配体支持物,但致活剂 BrCN 易挥发,有剧毒,生产、保存均不安全,而已用 BrCN 活化的 Sepharose 商品价格昂贵,使用期也短,使该技术在实验室的应用受到一定限制^[1,2]。硝酸纤维素(NC)具有非共价性牢固吸附蛋白质的特性,已广泛应用于分子杂交、免疫印迹和免疫斑点等实验技术中,是一种很好的固相支持物^[3-5]。1989 年我们首次用国产 NC 薄膜免疫吸附一步法少量地纯化 IgG 获得成功。此后,我们鉴于 NC 薄膜法产物收获量小,为适应提纯较大量的抗原或抗体,又将 NC 膜产品的边角料加工成颗粒性 NC 制成抗甲胎蛋白免疫吸附柱,用来纯化甲胎蛋白(AFP),效果满意,现报道如下。

材 料 和 方 法

1. 材料

(1) 硝酸纤维素膜产品的边角料(浙江黄岩四青生化材料厂)。

(2) 直径 10mm,长 400mm 层析柱(上海锦华实验器械厂)。

(3) ZCX-2 型柱层析仪(天津市分析仪器厂)。

(4) 抗 AFP 血清(上海生物制品研究所)。

(5) 0.01 mol/L pH 7.2 PBS (1.48 g/L Na_2HPO_4 , 0.43 g/L KH_2PO_4 , 7.20 g/L NaCl)。

(6) 含 2.5 g/L 明胶,5 ml/L NP40,0.2 g/L NaN_3 的 PBS。

(7) 0.05 mol/L pH 9.6 碳酸盐缓冲液。

(8) 3 mol/L KCNS。

(9) 7 mol/L 尿素。

2. 方法

(1) 颗粒性 NC 的制备:将 NC 膜产品的边角料加入碳酸盐缓冲液制成匀浆,并悬浮处理,在 60℃ 以下烘干获得较为均匀的颗粒性 NC。

(2) 抗 AFP 免疫吸附柱的制备:取 4 支(每支 2 ml)冻干抗 AFP 血清加 H_2O 复溶,用碳酸盐缓冲液稀释至 16 ml;加入 8 g 颗粒性 NC,搅拌片刻使成稠糊状,然后移至表面积较大的玻璃皿内使散开,置 37℃ 温箱烘干。将干燥后的 NC 收集于烧杯内,用 PBS 悬浮洗涤三次,然后装层析柱。装柱后依次用 PBS(约 5 倍柱床体积),KCNS 液(2 倍柱床体积),尿素液(2 倍柱床体积)洗涤。将上柱前后各洗涤液收集,分别用紫外光吸收法测蛋白量,求出蛋

白的结合量。最后用含明胶、NP40 和 NaN_3 的 PBS 充分洗涤,洗柱完毕,即可使用。

(3) AFP 的纯化: 胎儿组织液的制备, AFP 的吸附、洗脱和免疫吸附柱的再生均按文献介绍的方法操作^[1]。另采用 ZCX-2 型柱层析仪控制层析,按峰收集蛋白样品。

结 果

1. 蛋白洗脱峰 胎儿组织液经过柱后,洗脱液分离出二个蛋白峰。前一峰为洗涤液洗脱下来的杂蛋白主峰,后一峰为解吸液洗脱下来的 AFP 峰(见图 1)。

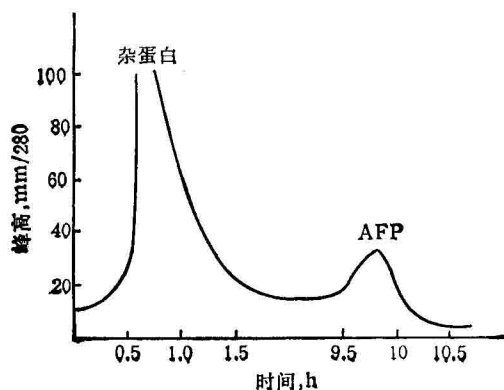
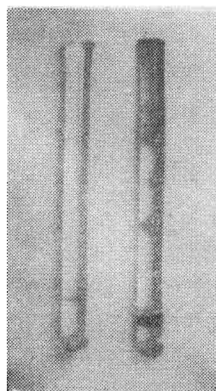


图 1 胎儿组织液过 NC 柱洗脱蛋白峰图谱
用 ZCX-2 型柱层析仪描绘

2. AFP 的鉴定 纯化所得的 AFP 样品进行 PAGE 电泳,只分离出一条蛋白带。经免疫电泳扩散,该样品与抗 AFP 血清出现一条沉



(a) (b)

图 2 PAGE 电泳鉴定 AFP 纯度图谱

(a) 纯化 AFP (b) 正常人血清

淀线,与抗正常人全血清不出现沉淀线。将纯化的 AFP 免疫家兔获得的抗 AFP 血清与胎儿组织液和肝癌病人血清进行免疫双扩散均显一条沉淀线,与正常人血清不显沉淀线。PAGE 电泳鉴定结果见图 2。

3. 抗体结合量及 AFP 获得量 用紫外光吸收测蛋白质法测得 8g 颗粒性 NC 可结合蛋白质 121.6mg, 每 g NC 结合 15.2mg。首次过柱获得 AFP 纯品 9.3 mg, 再生后再次过柱获得 7.5mg, 平均每次可得 8.4mg AFP。

讨 论

硝酸纤维素免疫吸附亲和层析柱制备手段简单。由于 NC 非共价结合蛋白质,吸附抗体前不需要预先活化处理,结合过程中也不需要化学交联剂,大大简化了亲和柱层析中的复杂操作手续和过长的流程,又能有效地保护抗体的活性。

NC 与抗体蛋白结合十分牢固,一般不被洗涤液和解吸液洗脱下来。我们采用含非离子型表面活性剂和明胶的 PBS 洗柱,有利于将抗血清中某些与 NC 结合不牢固的小分子蛋白去掉,又能有效地封闭 NC 未结合蛋白质的空位点,从而保证了所获蛋白样品的纯度。

实验表明,由 NC 替代其它固相配体支持物制备成亲和层析柱纯化的 AFP 纯度较高,获得量也大,足以满足一般实验室的需用。该法简单,既省时,又经济,是实验室实用的柱层析技术。

参 考 文 献

- 1 Johnstone A 等著,童明庆等译,实用免疫化学,南京:南京出版社,1990: 274
- 2 汪美先等·免疫学基础,西安:陕西科学技术出版社,1981: 408
- 3 Towbin H *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979; 76: 4350
- 4 Palfreyman J W *et al.* *J Immunol Methods*, 1988; 109: 199
- 5 Towbin H *et al.* *J Immunol Methods*, 1984; 72: 313

[本文于1990年9月3日收到,11月9日修回]