

一种简便可较大量提取血清 IgG 的方法

李希强

陈 莉 宋家云

(解放军 302 医院,北京,100039)

(军事医学科学院,北京)

提 要

用辛酸沉淀法结合应用少量阴离子交换剂纯化了四种动物抗血清及正常猪、羊血清的 IgG。本法与硫酸铵法、亲和层析法纯化的 IgG 均呈现相同的电泳纯条带。本法简便、经济、回收率好,可较大量提取血清 IgG。提纯过程保存抗体原有生物活性。

关键词 IgG 的纯化,人铁蛋白抗体

目前最普遍常用的分离纯化血清 IgG 的方法,仍为硫酸铵沉淀结合阴离子交换剂柱层析(一般用 DEAE-纤维素-52)的方法(以下简称硫酸铵法)。该法一般需两次硫酸铵沉淀后,再经 DEAE-纤维素-52 柱层析,手续繁杂,所用 DEAE-纤维素的量较多,还需部分收集器等设备。亲和层析法虽较简单,但试剂(如 Sepharose 4B protein A)价格昂贵,显然不能供大量提取 IgG 之用。为简化方法,节约试剂及省去部分收集的步骤,并能一次较大量分离纯化血清中的 IgG 以供免疫学应用。本文参考 Steinbuch 等报道的辛酸沉淀 IgG 的方法^[1,2],并做了适当的改进,先后纯化了四种动物的抗血清及正常猪、羊血清中的 IgG,进行纯度鉴定及计算回收率,并与硫酸铵及亲和层析法进行比较,并检测了部分 IgG 纯品的免疫活性。

材 料 和 方 法

一、试剂:

1. 辛酸(北京旭东化工厂生产,化学纯)
2. DEAE-纤维素-52 (Whatman)
3. 缓冲液: 0.06mol/L pH4.0, 0.015mol/L pH4.8 及 0.015 mol/L pH5.7 的醋酸盐缓冲液。

4. SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳所需试剂(略)。

5. 正常猪、羊血清及猪、羊、兔三种动物抗人癌源铁蛋白及驴抗兔 IgG 的抗血清。

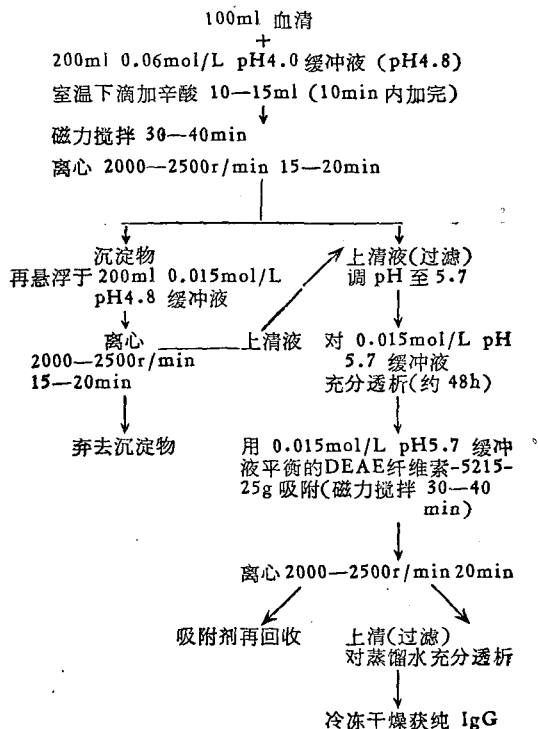


图 1 血清 IgG 的分离流程图
缓冲液均为醋酸盐缓冲液

6. 铁蛋白放射免疫分析所需的其他主要试剂: ^{125}I -人癌源铁蛋白, 驴抗兔 IgG 抗体, 兔抗羊 IgG 抗体及兔抗猪 IgG 抗体等。

二、方法

- 1. 血清 IgG 的纯化步骤: 见图 1。
- 2. SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳方法, 见参考文献 3。
- 3. 测定抗人铁蛋白的抗血清滴度及放射免疫标准曲线的方法, 见参考文献 4。

结 果

一、用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳对上述方法提纯的驴抗兔 IgG 抗血清, 以及猪、羊、兔抗人癌源铁蛋白抗血清中的 IgG 和正常猪、羊血清中的 IgG 进行纯度鉴定, 除有一批猪抗人癌源铁蛋白抗血清的 IgG, 后经证实因辛酸用量不足而不够纯含有少量白蛋白外, 其余各批均得到单一条带的电泳纯 IgG。见图 2, 3 (见图版 IV)。

二、三种提取血清 IgG 方法比较 本文对比了硫酸铵法, 亲和层析法 (Sephrose 4B Protein A) 及本法提取 IgG 的纯度, 表明三种方法所得 IgG 经 SDS 聚丙烯酰胺电泳鉴定纯度一致, 均得到单一条带电泳纯的 IgG 见图 2, 3 (图版 IV)。

三、免疫活性的鉴定 本文用放射免疫分析(RIA)观察了三种动物, 兔、羊及猪抗人癌源铁蛋白抗血清提取前原血清及提纯冻干后 IgG 的免疫活性 (见表 1)。

表 1 表明滴度为 1:80000 的抗血清和大致相当量的纯化冻干的血清 IgG (25ng/管), 在相同的条件与 ^{125}I 标记的人癌源铁蛋白的结合率 (B/T%) 相当接近。另外, 由图 4 可见, 用 1:80000 滴度的兔抗血清与 10ng/管兔 IgG 所得出的铁蛋白放射免疫标准曲线也相当重合 (S_d 分别为 57.4% 及 49.8%)。结果说明经辛酸方法提取的几种 IgG 基本上保存了原有的免疫活性。

4. 回收率: 仅对比过辛酸法及硫酸铵法提取羊血清 IgG 回收率, 分别为 658mg/100ml

表 1 几种动物抗人铁蛋白血清及纯化 IgG 的免疫活性

血清滴度或 IgG 用量	与 ^{125}I -铁蛋白的结合率 (B/T%)
兔抗血清 1:80000 ¹⁾	35.9
提纯兔 IgG (25ng/管)	37.4
羊抗血清 1:80000 ¹⁾	50.6
提纯羊 IgG (25ng/管)	50.0
猪抗血清 1:80000 ¹⁾	50.2
提纯猪 IgG (25ng/管)	37.1

1) 按各种动物血清 IgG 含量计算, 1:80000 兔、羊及猪血清 IgG 含量分别约为 14ng/管、24ng/管及 19ng/管。

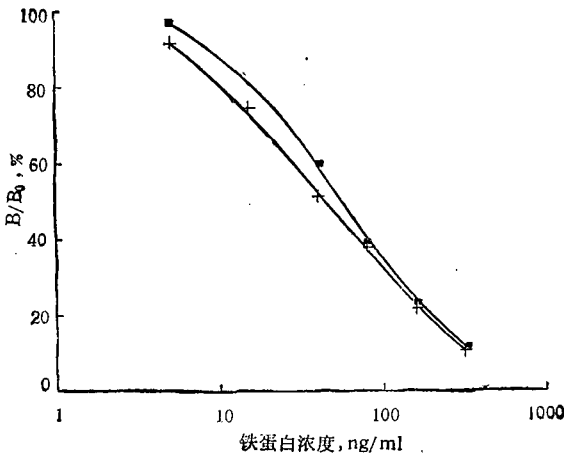


图 4 人铁蛋白放射免疫标准曲线
■—■血清(兔血清使用滴度 1:80000)
x—x: 纯化 IgG, 兔 IgG 用量 10ng/管

血清及 700mg/100ml 血清, 表明两种方法的回收率是接近的。

讨 论

IgG 的提纯是很常用的生物化学技术, 随着各种免疫分析技术的普及和发展要求, 从抗血清中提纯 IgG 日益普遍。

本文的结果表明, 辛酸沉淀结合应用少量阴离子交换剂 (DEAE-纤维素-52) 的方法可以从血清中分离纯化出 IgG, 其纯度与硫酸铵沉淀结合阴离子交换柱层析或亲和层析法相同, 而所用的阴离子交换剂可节约近 5 倍, 又可免去柱层析应用部分收集器的步骤。方法简便, (下转第 218 页)

样品池架可放置四个荧光样品池,为了方便,四个样品池可以一次放入,当更换样品池时,不要打开样品室盖,只要旋转伞齿轮即可换样测量。定位销及弹簧的作用是使样品池准确地定位,以保证测量重复性好。

使用恒温水浴维持样品的恒温。水浴中的水通过进水管和出水管不断循环,以维持温度恒定,恒温范围为0—60℃。

光学附件包括聚光装置和偏振装置。样品室光路设计是为了把来自激发单色器出射狭缝的单色光会聚于样品池的中心,同时又把样品发射的荧光会聚于发射单色器的入射狭缝上。为此,在样品室内装有透镜 L_2 和 L_3 ,其焦距为45mm,通光孔径为 $\phi 10\text{mm}$,已充分利用了单色器的相对孔径。另外,由于安装布局的需要,装有平面反射镜以改变光路。为了测量样品的荧光偏振,我们又设计了荧光偏振附件,它由起偏振器和检偏振器组成。它们被分别固定在可调节的金属支架上,拨动拉杆位置,在0—90°范围内连续可调。偏振片的透过率为30—35%,偏振度>99.5%。

安装与调试

通过调节底脚螺丝,将灯室、两个单色器、样品室、光电倍增管室的光路窗口调到同一水平高度,并用水平仪校准,然后用自己设计的光路接头将它们连接起来。

调试时首先用汞灯光源垂直入射并聚焦到激发单色器的入射狭缝上,左右微调各单元,将单色器的入射与出射狭缝、样品室的中心。聚

(上接第215页)

可较大量从血清中提纯IgG。与亲和层析方法相比既简便、又经济等。结果表明用本法自抗血清中提纯的IgG,其免疫活性与原血清非常接近,无失活现象,适用于免疫学中抗血清IgG的纯化。另外,与硫酸铵沉淀结合阴离子交换剂柱层析法相比,从羊血清提纯IgG的回收率也很接近。

以上结果都说明本法是一种简便可较大量提取血清中IgG的方法,有推广普及的价值。关于辛酸及DEAE-纤维素-52的用量,本文提

焦透镜均落在同一光轴上,把单色器、样品室和光电倍增管固定好。然后安上灯室,使灯大体安装在灯室的中心,即仪器的光轴上,光密封灯室后,点燃闸控灯,在样品室中放入散射样品或一小纸片,通过调节透镜和上下、左右调节灯在灯室内的位置,使得信号光电倍增管得到最高计数,也就是光路已经调好。

结果和讨论

我们研制的毫微秒荧光谱仪已经正常工作三年多,在该谱仪上测量了大量样品的荧光寿命,并发表了数篇科研论文。使用结果表明光学机械系统设计合理、使用方便,重复性好。由于在灯室处和样品室内安装了透镜,并设计了灯室调节机构,使得灯在灯室内的位置竖直、水平可调,并能紧固在底座上。这些措施使光路的收集效率提高了2个数量级以上,因此,使得整个谱仪具有灵敏度高、稳定性好的特点。

由于设计了恒温和偏振附件,该仪器可以测量样品的荧光寿命随温度的变化以及与偏振的关系,这就增加了仪器的功能,更有利于医学和生物学的研究。

参考文献

- 1 Badaea M G *et al.* *Methods in Enzymology*, 1979; 61:378—425
- 2 Laws W R *et al.* *Photochemistry and Photobiology*, 1986; 44(3):343—348
- 3 彭程航等:生物化学与生物物理进展,1987;(2): 49

[本文于1990年4月3日收到,

5月15日修回]

出大致的用量范围,在提纯不同动物血清IgG时,可根据实际情况适当地改变,选定最佳用量。

参考文献

- 1 Steinbuch M. *et al.* *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1969; 134:279
- 2 王寒正等. 上海免疫学杂志, 1984;5(4): 248
- 3 BD 哈密斯等. 蛋白质的凝胶电泳实践方法, 北京: 科学出版社, 1986: 18
- 4 宋家云等. 中华医学检验杂志, 1988;11(3): 166

[本文于1990年2月8日收到,

3月26日修回]

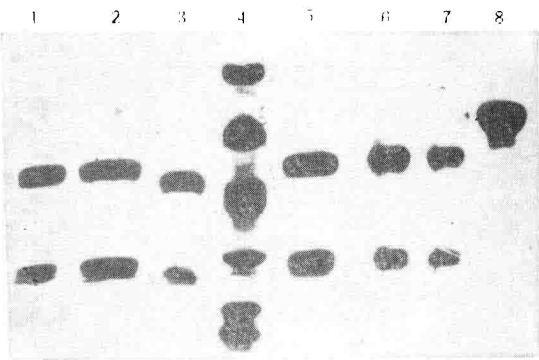


图 2 纯化 IgG 的 SDS-PAGE 图

1 羊抗人癌源铁蛋白抗血清 IgG，辛酸法提取；2 羊抗人癌源铁蛋白抗血清 IgG，亲和层析法提取；3 兔抗人癌源铁蛋白抗血清 IgG，辛酸法提取；4 标准蛋白，分子量由上至下依次按分子量大小的排列分别为 94000,67000,43000,30000,20000,14400；5 正常羊血清 IgG，辛酸法提取；6,7 驴抗兔抗血清 IgG，辛酸法提取；8 白蛋白

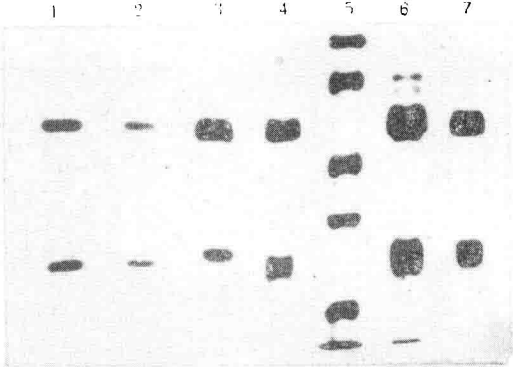


图 3 纯化 IgG 的 SDS-PAGE 图

1 正常小鼠血清 IgG，硫酸铵法提取；2 正常羊血清 IgG，硫酸铵法提取；3 正常羊血清 IgG，辛酸法提取；4 正常猪血清 IgG，辛酸法提取；5 标准蛋白(同图 2)；6 猪抗人癌源铁蛋白抗血清 IgG，辛酸法提取(不纯)；7 猪抗人癌源铁蛋白抗血清 IgG，辛酸法提取(增加辛酸用量)

王 会等：“一种测定多个目的基因扩增的简易方法——差异 PCR 扩增法”一文的图 1

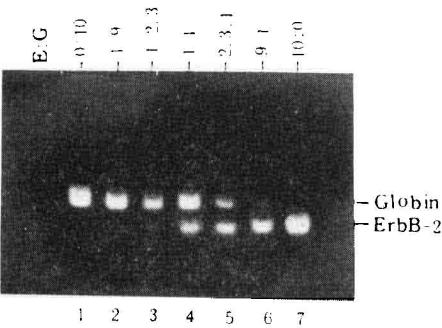


图 1 C-erbB-2/HER-2 和人类珠蛋白基因 γ -IVS-II 经 PCR 扩增后的聚丙烯酰胺凝胶电泳图上方所示为 PCR 扩增前两种带有目的基因质粒 pCER204 与 pUC-2 γ - β 的重量比(单位: ng)

李永兴等：“介绍一种新的半干式免疫转渍法”一文的图 1

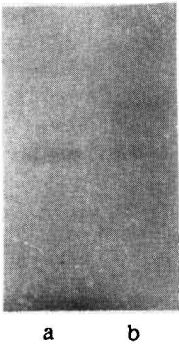


图 1 固氮螺菌 (*Azospirillum brasilense*) 粗提物的免疫转渍图

用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离粗提物,抗固氮酶铁蛋白为第一抗体

- a. 加 NH_4^+ 前细胞粗提物
- b. 加 NH_4^+ 后细胞粗提物