

一步纯化胰岛素单克隆抗体

任 浏 沈晶晶 陈晓穗 吕 植

(海军总医院中心实验科, 北京)

提 要

本文报道用瑞典 Pharmacia 公司生产的快速蛋白液相层析仪、强阴离子交换预装柱 (MonoQ) 一步纯化胰岛素单克隆抗体的方法, 结果证明此法快速、简便、重复性和分离效果好。纯化后的单克隆抗体的免疫活性仍在 94% 左右。

因单克隆抗体 (McAb) 主要来源于细胞培养的上清液或动物的腹水, 所以, 它们在不同程度上混杂非抗体蛋白及脂类物质等, 为消除实验中的一些非特异结合或干扰, 必须对其进行纯化。我们用瑞典 Pharmacia 公司生产的快速蛋白液相层析仪 (简称 FPLC) 建立了一种快速、简便、重复性和分离效果好的一步纯化胰岛素 McAb 的方法。

一、材料和方法

1. 材料

1) 抗体: 胰岛素 McAb, 属 IgG₁ 亚型, 本实验室建株。

中尽可能地作到低温、快速及减少理化因素的破坏作用。此外, 实验中还观察到, 人 β -干扰素粗制品的活性高低、杂蛋白含量的多少, 直接影响纯化后产品的特异活性和回收率的大小。因此, 最好使用生物活性较高, 而总蛋白浓度又低的制品, 或者将生物活性高低悬殊较大的样品分别纯化。

2) 三羟基氨基甲烷 (Tris): 含量不少于 98.5%, Fluka 进口分装。

3) Ampholine: pH 3.5—10 (瑞典 LKB 公司)。

4) Multiphore-2117 等电聚焦电泳仪: 同上。

5) LCC-500 FPLC: 瑞典 Pharmacia 公司。

6) MonoQ 柱: 强阴离子交换预装柱 (0.5 × 10 厘米) 同上。

2. 方法

1) 胰岛素 McAb 的纯化: 取杂交瘤腹水, 4℃ 离心, 取上清 1:1 稀释, 然后经 Millipore 滤

73, 1983。

[5] 李成文等: 军事医学科学院微生物流行病学研究所, 科研工作年报, 110—116, 1980。

[6] 李成文等: 军事医学科学院微生物流行病学研究所, 科研工作年报, 200—203, 1983。

[7] 李成文等: 《军事医学科学院院刊》, [3], 325—328, 1983。

[8] Knight, Jr. E. et al.: *J. Biological Chemistry*, 256 (8), 3609—11, 1981。

[9] Friesen, H. J. et al.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 206, 403, 1981。

[10] Kenny, C. et al.: *Methods in Enzymology*, 78, PtA, 435—441, 1981。

[11] Inoue, M. et al.: *Infection and Immunity*, 33(3), 763—768, 1981。

参 考 文 献

[1] Gresser, Ion.: *Interferon 2*, p 2, Academic Press, 1980。

[2] Knight, Jr. E. et al.: *Science*, 207(4430), 525, 1980。

[3] 肖成祖等: 《军事医学科学院院刊》, [3], 353, 1983。

[4] 李成文等: 《生物化学与生物物理进展》, [6], 71—

[本文于 1986 年 9 月 29 日收到]

膜 (0.22 μ m) 过滤,用 MonoQ 预装柱^[1,2],一次上样 500 μ l,用盐线性梯度 (A 液: 50m mol/L Tris-HCl 缓冲液, pH 8.0, B 液: A 液 + 0.35 mol/L NaCl, pH 8.0) 方法洗脱,样品流速为 1ml/分,泵压力约 2MPa,总洗脱体积为 20ml,用单通道 280nm 紫外检测器 (10mm 光通道高分辨率流动池),检测选择 AU = 0.5,以 REC-482 双道记录仪记录,纸速为 1cm/分。

2) 电泳鉴定: 采用平板式等电聚丙烯酰胺凝胶 (IEF-PAGE) 电泳法鉴定纯度^[3],柱层析后的样品经透析去盐,凝胶浓度为 5%,厚度 0.5mm,上样量为 30 μ l,设置电流: 30mA,电压: 1500V,功率: 25 瓦,电泳时间为 1.5 小时,考马斯亮蓝 R₂₅₀ 染色,脱色。

3) 活性的测定: 用放射免疫平衡饱和分析法^[4]测定纯化后的胰岛素 McAb 的免疫活性。

二、结 果

1. 柱层析图: 胰岛素 McAb 纯化后,分离出 6 个主要峰,见图 1。

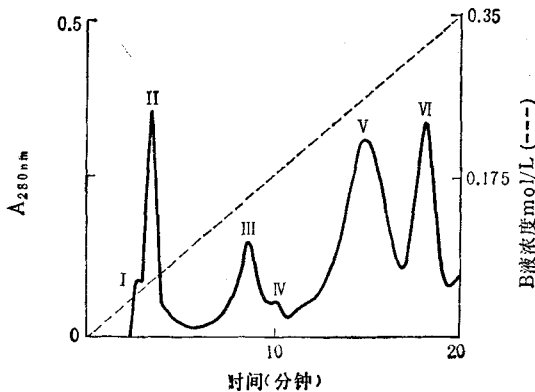


图 1 第一次 MonoQ 柱层析图谱
-----: B 液浓度 (mol/L)

2. 胰岛素 McAb 的免疫活性: 以上收集的各峰,测定其抗体的免疫活性 (见表 1),峰 V 是纯化的胰岛素 McAb,取 V 500 μ l 再上 MonoQ 柱,按图 1 条件洗脱 (图 2),呈现单峰,且柱滞留时间与峰 V 一致。

表 1 纯化后单克隆抗体免疫活性

	纯化前			纯化后		
管 号	0	1	2	3	4	5
cpm (x)	9412	2497	2518	2884	3109	8918
免疫活性 (%)	100					94.2

注: 非特异管计数 cpm 为 2299。

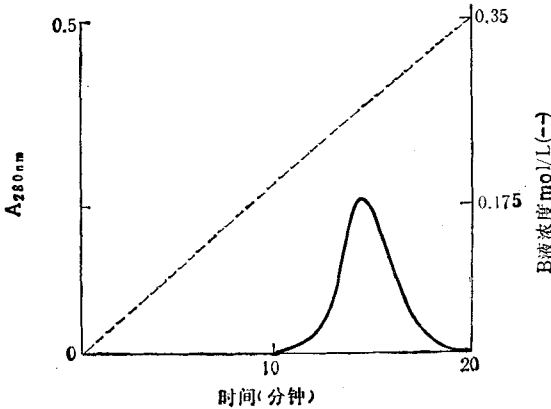


图 2 第二次 MonoQ 柱层析图
-----: B 液浓度 (mol/L)

3. IEF-PAGE 鉴定纯度: 原腹水液呈多条带 (图 3, I),经 MonoQ 柱一步层析后仅呈一条带 (图 3, II)。

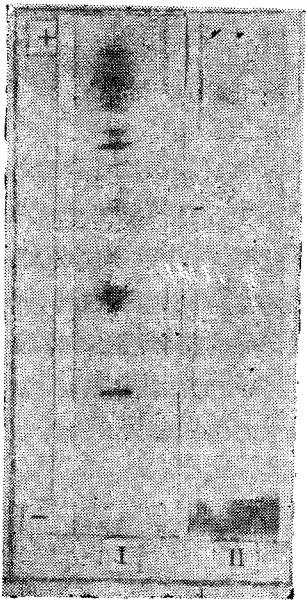


图 3 IEF-PAGE 电泳图谱
I. 杂交瘤腹水液, II. 经 MonoQ 层析后的图谱

(下转第 25 页)

Wey 等人(1981)的实验证明 FPR 测定视紫红质受体的扩散系数与吸收光谱法测定的值是一致的。Koppel 和 Sheetz (1981) 用细胞融合方法和 FPR 方法同时测量红细胞蛋白的扩散系数,结果表明它们的 D 值是相同的, FPR 并不会改变红细胞蛋白的侧向流动。

3. 配体的影响

扩散系数的测定是依赖于细胞表面荧光标记分子浓度的梯度变化,因此,外源标记物显然不如内源膜组分。有实验已证明交联作用与标记物发色团的价数、浓度和作用时间有关。在 FPR 实验中应尽可能使用低价配体,限制标记浓度,标记时间要短,以减少光交联。

综上所述, FPR 技术迅速的发展,使其方法渐趋完善和可信,已发展成为定量测定生物膜流动性的方法之一。目前, FPR 技术已广泛应用于测量各种系统的平移扩散,例如:生物膜和人工膜,溶液中蛋白质分子和化学工业中分子聚合过程的动力学变化等方面。

本文承蒙顾国彦教授指教,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Axelrod, D. et al.: *Biophys. J.*, **16**, 1055, 1976.

- [2] Jacobson, K. et al.: *Fed. Proc.*, **42**, 72, 1983.
 [3] Koppel, D. E.: *Techniques in the Life Sciences*, (J. Metcalfe and T. R. Hasketh, Eds.), Vol. **B4**, Lipid and Membrane Biochemistry, Elsevier/North-Holland, Amsterdam, 1982.
 [4] Koppel, D. E.: *Fast Methods in Physical Biochemistry and Cell Biology* (R. I. Sha'afi and S. M. Fernandez, Eds.), Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, The Netherlands, pp. 339—367, 1983.
 [5] Koppel, D. E. and Sheetz, M. P.: *Biophys. J.*, **43**, 175, 1983.
 [6] Kapitza, H. G. et al.: *Biophys. J.*, **45**(2, Pt), 89, 1984.
 [7] Salmon, E. D. et al.: *J. Cell. Biol.*, **99**, 2157, 1984.
 [8] 张孔华等:《第三次生物膜学术讨论会论文摘要》, **P**, 20, 1985.
 [9] Schneider, M. B. and Webb, W. W.: *Appl. Optics*, **20**, 1382, 1981.
 [10] Barisas, B. G.: *Biophys. J.*, **29**, 545, 1980.
 [11] Yaguerabide, J. et al.: *Biophys. J.*, **40**, 69, 1982.
 [12] Van Zoelen, E. J. J. et al.: *Biophys. J.*, **42**, 103, 1983.
 [13] 徐成汤等:《细胞生物学杂志》, **7**, 166, 1985.
 [14] Jacobson, K. et al.: *J. Supramol. Struct.*, **5**, 565, 1976.
 [15] VanderKool, J. M. et al.: *J. Cell. Biol.*, **100**, 435, 1985.
 [16] Schlessinger, J. and Elson, E. L. (G. Ehrenstein and H. Lecar, Eds.), *Methods of Experimental Physics*, Academic Press, New York, pp. 197—227. 1981.

[本文于 1986 年 8 月 12 日收到]

(上接第 80 页)

三、讨 论

McAb 的分离和纯化常用经典的多克隆抗体的方法,如盐析和 DEAE 离子交换柱层析二步法或亲和层析法^[5,6]。我们认为,前者纯化步骤繁琐,所需时间长,因 McAb 是针对单一抗原决定簇,分子空间结构极微小的改变就可能影响其活性,随着提取时间的延长,活性也有丧失。样品易被稀释,提取后的产品往往需要浓缩;亲和层析法,虽有特异性强的优点,但某些抗原用此法不易得到纯化的 McAb。我们改用 FPLC 系统一步纯化 McAb,结果较满意(图 1)。

FPLC 系统,其运转由微机操作,完全按操作者设计的指令进行,实验结果重复性好。免

疫活性实验证实 McAb 经 MonoQ 柱,抗体活性丧失较少,与文献报道基本一致^[7],即分离后的蛋白活性仍保持在 90—100%。

参 考 文 献

- [1] Cooper, E. H. et al.: *Clinical Chemistry*, **29**(9), 1635, 1983.
 [2] Pharmacia FPLC Application File: *Analysis of Protein in Body Fluids* AF Printed in Sweden by Offsetcenter, 1984-1.
 [3] 何忠效等:《等电聚焦》,科学出版社,1985。
 [4] 吕植等:《解放军医学杂志》, **6**, 17, 1981。
 [5] Goding, J. W.: *Monoclonal Antibodies Principles and Practice*, p. 98, Academic Press, 1983.
 [6] Schneider, C. et al.: *J. Biochem.*, **257**(18), 1096, 1982.
 [7] Clezardin, P.: *J. Chromatography*, **319**, 67, 1985.

[本文于 1986 年 10 月 28 日收到]