

国产羟基磷灰石纯化单克隆抗体的探讨

邹岳奇 阎静辉 刘玉翠

(河北省科学院生物研究所, 石家庄 050051)

关键词 单克隆抗体纯化, 羟基磷灰石, 吸附层析

据文献报道^[1-3], 用羟基磷灰石 (HA) 柱层析纯化单克隆抗体 (MAb) 具有简便快速、低成本、高效以及适用于各类和亚类免疫球蛋白等优点。国内近年来已有一些实验室开展这方面的工作, 但迄今所见文献^[4,7]中所采用的 HA 材料均系美国 Bio-Rad 公司的产品, 尚未见采用国产 HA 纯化 MAb 的报道。我们以市售国产 HA 制成层析柱, 对本室研制的抗促卵泡激素 (FSH) 和抗促黄体激素 (LH) 的两种六株单克隆抗体杂交瘤^[8]所诱生的小鼠腹水进行了纯化试验, 并从国产 HA 的具体情况出发, 对文献提供的层析条件作了若干改动, 取得了比较满意的结果。现以 AF05 单克隆抗体腹水的纯化为例报道如下。

材料与 方法

一 试剂及仪器

羟基磷灰石: HA-II 型, 干粉, 中国科学院生物物理研究所生化试剂厂出品; 抗促卵泡激素单克隆抗体 AF05 腹水: IgG₁ 亚类, 自制; 辣根过氧化物酶标记羊抗小鼠 IgG, 北京生物制品研究所出品; 紫外检测仪: 8802 型, 温州市孚华分析仪器厂产品; 酶联免疫测定仪, DG-1 型, 南京华东电子管厂产品。

二 实验方法

方法 I: 基本按 Bokovsky 法^[5]。将 HA 干粉用磷酸钠缓冲液 (0.01 mol/L, pH 6.8) 浸泡过夜后装柱, 柱床尺寸 1×25 cm。取 2 ml 腹水用蒸馏水稀释至 20 ml, 滤纸过滤后上柱, 流速 25 ml/h。用 0.01 mol/L 磷酸钠缓冲液淋洗至无蛋白流出后, 用 0.05—0.3 mol/L 浓度的同种缓冲液作线性梯度洗脱, 流速 15 ml/h, 总液量 180 ml。以 280 nm 波长对层析全过程作紫外扫描。用酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 检测抗体所在峰以及活性回收比率。采用聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 检测抗体纯度。层析柱用 1.0 mol/L NaCl 再生后可重复使用。

方法 II: 操作步骤与方法 I 相同, 内容有如下改变: (1) 柱床加高至 35 cm; (2) 腹水用量增至 3 ml; (3) 梯度洗脱改用 0.1—0.2 mol/L 浓度范围的磷酸钠缓冲液, 总液量改为 200 ml。

冲液, 总液量改为 200 ml。

结果与 讨论

方法 I 和方法 II 的 HA 柱层析情况分别由图 1 和图 2 给出。

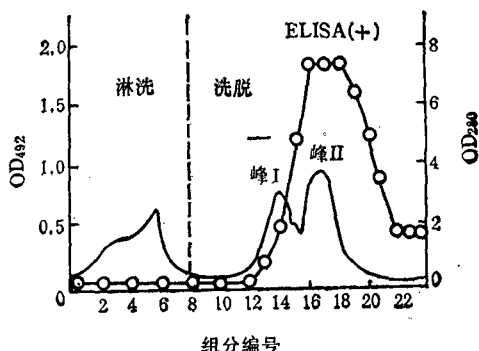


图 1 方法 I 从腹水纯化 MAb AF 05
— 洗脱曲线, ○—○ 抗体活性曲线

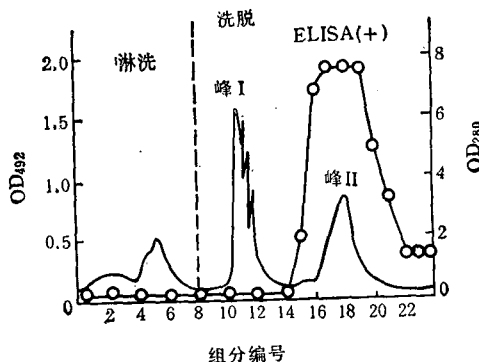


图 2 方法 II 从腹水纯化 MAb AFO5
— 洗脱曲线, ○—○ 抗体活性曲线

两图的图形相似, 淋洗部分均有一个蛋白峰, ELISA 测定 (OD₄₉₂) 无 AF05 抗体活性; 洗脱部分出现两个蛋白峰 (峰 I、峰 II), ELISA 测定峰 II 为

MAb AF05 所在。在方法 I, 0.05—0.1 mol/L 梯度洗脱无任何蛋白流出, 抗体蛋白大多在 0.12—0.14 mol/L 内被洗脱, 据此确定可将梯度范围改为 0.1—0.2 mol/L。结果表明, 方法 II 中峰 I 与峰 II 的分离程度明显优于方法 I 者, 并且峰 I 内还可辨认出三个小峰。此外, 我们认为增高柱床是方法 II 层析分辨率提高的另一个原因。

PAGE 分析表明方法 II 中组分第 15—22 管分别均显示一条泳带 (IgG), 抗体纯度达 90% 以上; 将上述组分 15—22 合并, 经浓缩与透析后采用 ELISA 测出 AF05 抗体活性回收率约为 75% (资料未列出)。可见, 使用方法 II, 国产羟基磷灰石纯化单克隆抗体具有高性能, 可达到国外同类产品的纯化效果。但是, 由于国产羟基磷灰石为片状晶体, 刚性易碎, 所以在装柱前应洗去细小晶体以确保柱流速, 同时应避免剧烈搅动, 减少大晶体碎裂。层析后及时正确地再生可增加柱的使用次数。

参 考 文 献

- 1 Kennett R. H, Gilbert F. *Science*, 1979; **203**: 1120
- 2 Kemshead J T *et al. Hybridoma*, 1982; **1**: 109
- 3 Eager K, Kennett R H. *J Immunol Methods*, 1983; **64**: 157
- 4 Larry H *et al. J Immunol Methods*, 1985; **76**: 157
- 5 Bukovsky J, Kennett R H. *Hybridoma*, 1987; **6**: 219
- 6 李振甫等. 生物化学杂志, 1989; **5**: 284
- 7 严自助等. 上海免疫学杂志, 1989; **9**: 368
- 8 邹岳奇等. 河北省科学院学报, 1988; **2**: 68

[本文于 1990 年 2 月 13 日收到, 5 月 4 日修回]

生物化学与生物物理进展

PROGRESS IN BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS

1974年创刊(双月刊) Start Publication in 1974(Bimonthly)

1991年 第18卷 第2期(4月出版)

Vol. 18 No. 2; 1991 Apr.

主 办 中国科学院生物物理研究所
北京 349 信箱

编 辑 《生物化学与生物物理进展》
编 委 会

北京中关村生物物理研究所内
邮政编码: 100080

主 编 林 治 焕
出 版 科 学 出 版 社

北京东黄城根北街 16 号
邮政编码: 100707

印刷装订 中国科学院印刷厂
总发行处 北京报刊发行局
订购处 全国各邮电局
国外总发行 中国国际图书贸易总公司
北京 399 信箱

Sponsored by Institute of Biophysics,
Academia Sinica

P.O. BOX 349, Beijing 100080, China

Edited by Editorial Board of *Progress in
Biochemistry and Biophysics*
Zhong Guan Cun, Beijing 100080, China

Editor-in-Chief Lin Zhihuan

Published by Science Press

16 Donghuangchenggenbeijie, Beijing 100707, China

Printed by The Printing House of
Academia Sinica

Distributed by Beijing Post Office

Subscriptions Domestic Local Post Offices

Foreign Distribution China International
Book Trading Corporation
P. O. BOX 399, Beijing, China

国内统一刊号: CN11-2161

国内邮发代号: 2-816

国外刊号: BM 408

定价: 3.15 元

公 开 发 行