

3 讨 论

上述结果显示本实验室所得到的 3 株 IL-6 单抗均有较强的特异性, 只识别 21 ku 的 rhIL-6, 而与其他细胞因子无交叉. 它对 IL-6 的亲常数达 $1.62 \times 10^9 \text{ (mol/L)}^{-1}$. 用本实验室研制的 3 株抗 IL-6 的单抗并建立的双抗体夹心 ELISA 法检测临床收集的血清标本, 测定结果表明风湿病人血清中 IL-6 的含量大大超过正常人. 其特点是: 快速、实用、灵敏度高、重复性好. 近年来, 许多临床资料表明: 测定血清中 IL-6 水平对许多自身免疫疾病, 如类风湿关节炎、红斑狼疮等的诊断和治疗及愈后判定均有重要的指导意义. 国产化试剂盒的研制成功, 必将推动这些疾病发病机理、诊断及疗效的进一步研究.

参 考 文 献

1 Kohler G, Milstein C. Continuoccs culures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 1975, **256**: 495~ 498

2 Goding J W. Antibody production by hybridomas. *J Immunol Method*, 1980, **39**: 285~ 308

3 孙瑛勋, 赵薇薇, 孙启鸿. 抗人 IgD 单克隆抗体的制备及其特性鉴定. *单克隆抗体通讯*, 1993, **9** (2): 40~ 44

4 Beatty J D, Barbara G B, William G V. Measurement of monoclonal antibody affinity by noncompetitive enzyme immunoassay. *J Immunol Methods*, 1987, **100**: 173~ 179

Preparation and Characterization of A Series of Monoclonal Antibodies Against Recombinant Human Interleukin-6. JINAG Panhong, MO Wei, DOU Liangjun, ZHAO Xiaomeng, YUAN Tingjun, SONG Jinhua (*Beijing Laboratory for Biochemicals, Beijing 100022, China*).

Abstract Using the hybridoma technique, a series of secreting monoclonal antibodies (McAbs) against recombinant human interleukin-6 (rhIL-6) have been established after immunization of Balb/c mice with rhIL-6. Three of these McAbs 2H₂, 1D₂ and 4B₄ were well characterized. Their Ig class and subclass were determined as IgG1 and IgG2a respectively. These McAbs reacted with a high degree of specificity to rhIL-6 and did not have cross reactivity with many other cytokines and irrelevant proteins. Immunoblotting results showed that these McAb only recognized a single band of rhIL-6 with molecular mass of 21 ku. These McAb reacted strongly with IL-6 molecules with an affinity constant (K_{aff}) $1.62 \times 10^9 \text{ (mol/L)}^{-1}$.

Key words monoclonal antibodies, interleukin-6, affinity constant

用 Blue Sepharose CL-6B 快速纯化天花粉蛋白

袁惠东 夏其昌 张祖传

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海 200031)

摘要 差光谱显示染料 cibacron blue F3GA 与天花粉蛋白 (TCS) 有特异性结合, 复合物在可见光部分的最大吸收波长在 690 nm. 摩尔消光系数 $\epsilon = 2.6 \times 10^{-3} \text{ (mol/L)}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, 解离常数 $K_d = 1.8 \mu\text{mol/L}$, 0.5 mol/L NaCl 可使复合物解离. 根据这一特点, 用 Blue-Sepharose CL-6B 凝胶从栝蒌块茎中亲和纯化了 TCS. 此法快速、简便、高效, 易于大量制备.

关键词 天花粉蛋白, Cibacron blue F3GA, 差光谱, 亲和层析

天花粉蛋白 (trichosanthin, TCS) 是一种核糖体失活蛋白 (ribosome inactivating protein, RIP), 大量存在于葫芦科植物栝蒌的块茎中, 已被广泛地应用于科研和临床上. 常用的纯化方法有丙酮沉淀、离子交换层析^[1]、反相 HPLC^[2] 及批量结晶等. 这些方法较为复杂, 费时较长, 纯化过程易造成损失, 影响产率. 蓝色染料 cibacron blue F3GA 是一种结构类似于 NAD^+ 的磺化多芳香环化合物, 可与多种含核苷酸结合部位的蛋白特异地结合^[3], 故常用作配基与 Sepharose 偶联制成亲和凝胶, 它的商品名称为 Blue Sepharose CL-6B. 植物 RIP 均以真核生物 rRNA 为底物, 有核苷酸结合部位, 有人曾研究过 cibacron blue F3GA 与蓖麻毒素 Ricin A 链结合的性质^[4]. TCS 与 Ricin A 链有高度同源性, 所以我们对 TCS 和 cibacron blue F3GA 结合的性质也作了研究, 差光谱的结果证明二者有特异性结合. 在此基础上, 我们建立了一种简便、快速、高效的用 Blue Sepharose CL-6B 纯化 TCS 的方法.

1 材料和方法

1.1 材料

栝蒌块茎购自浙江平湖地区; 结晶 TCS 标准品购自上海金山制药厂; Cibacron blue F3GA 为 Fluka 公司产品; Blue Sepharose CL-6B 购自 Pharmacia 公司; ^{14}C -Leu 购自 Gibco 公司; 磷酸肌酸激酶 (PCK)、高铁血红素 (Hemin)、ATP、GTP 均为 Sigma 公司产品; 其余均为分析纯试剂. 兔网织红细胞裂解液 Lysate 按应文斌等^[5]的方法制备, 液氮中保存备用.

1.2 方法

1.2.1 Cibacron blue F3GA 与 TCS 结合性质的研究: Cibacron blue F3GA 经乙醚沉淀进一步纯化后^[6], 用 20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5 缓冲液稀释成不同浓度, 并各加 TCS 至 20 $\mu\text{mol/L}$, 室温过夜使二者充分结合, 在 Beckmann DU-7500 分光光度计上做 500~800 nm 的波长扫描, 比色杯光径 1 cm. 以一

定浓度的染料溶液为参比, 以含相同浓度染料但加有 TCS 的溶液为样品, 作出差光谱, 找出最大吸收波长 λ_{max} . 在 TCS 浓度比染料浓度大大过量的条件下, 测定反应复合物在 λ_{max} 处的光吸收值, 求出摩尔消光系数 ϵ . 测定在不同染料浓度下复合物的光吸收值, 并以染料浓度为横坐标、 λ_{max} 处的光吸收差值为纵坐标绘制结合曲线及双倒数曲线.

1.2.2 天花粉蛋白的纯化: 栝蒌块茎捣碎, 用水抽提后, 离心, 上清用硫酸铵分级沉淀, 取 30%~100% 饱和度沉淀部分用水溶解, 对 20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5 缓冲液透析, 上经相同缓冲液平衡的 Blue Sepharose CL-6B 柱, 先用平衡缓冲液充分洗去未吸附的蛋白, 然后用含 0.5 mol/L NaCl 的 20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5 缓冲液洗脱吸附在柱上的 TCS. 蛋白浓度用 Lowry 法^[7] 测定, 纯度用 Laemmli^[8] 的 SDS-PAGE 法进行测定.

1.2.3 TCS 对无细胞系统蛋白质生物合成抑制活性的测定: 基本按应文斌等^[5]的方法. 每一反应体系中含 30 μl 兔网织红细胞裂解液、20 μl 不同浓度的 TCS、20 μl 含 0.05 μCi ^{14}C -Leu 的氨基酸混合液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 保温 1 h, 加终止脱色液 (0.2 mol/L NaOH, 0.6% H_2O_2) 脱色 1 h, 再加 50% 三氯乙酸 (TCA) 至终浓度为 20% 使蛋白沉淀, 把沉淀转移至玻璃纤维膜上, 先用 8% 的 TCA 洗三遍, 再用丙酮洗一遍, 烘干, 在液闪计数器上测定其每分钟的放射性计数 (cpm), 并以测得的 cpm 值表示蛋白质生物合成能力. 样品的活力则以蛋白质合成被抑制 50% 时所需的样品浓度 IC_{50} 表示.

2 结 果

2.1 Cibacron blue F3GA 与 TCS 的结合反应

一定浓度 cibacron blue F3GA 与过量 TCS 反应后, 500~800 nm 波长范围的差光谱扫描结果如图 1 所示, 不同浓度的染料与 TCS 作用后呈现特征性差吸收光谱. Cibacron blue F3GA 与 TCS 反应后, 最大吸收波长 λ_{max} 由

610 nm^[3]红移至 690 nm, 而在 586 nm 处产生一个负吸收峰. 随着染料浓度的增大, 对应的

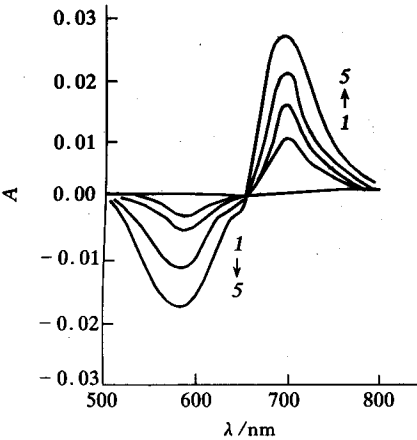


图 1 TCS 和 cibacron blue F3GA 作用后的差示光谱

TCS 浓度为 20 μmol/L; 曲线 1~5 所用的染料浓度分别为 0 (基线), 3.28 μmol/L, 4.69 μmol/L, 6.10 μmol/L, 7.46 μmol/L.

690 nm 处的光吸收差值 (ΔA_{690}) 以双曲线形式增大 (图 2a), 说明染料分子与 TCS 分子相互作用并形成了特异性复合物, 它在 $\lambda_{\max}$ (690 nm) 处的摩尔消光系数 $\epsilon = 2.6 \times 10^{-3} \text{ (mol/L)}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (图未给). 以游离染料浓度的倒数为横坐标、复合物浓度的倒数为纵坐标作图得一直线 (图 2b), 其横截距的倒数即为复合物解离常数 K_d , 经计算为

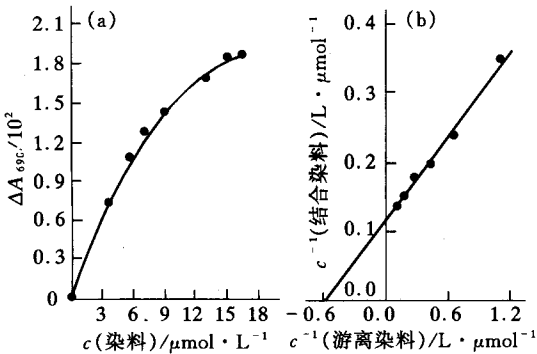


图 2 Cibacron blue F3GA 与 TCS 的结合反应

(a) 690 nm 处的光吸收差曲线; (b) 对应的游离染料浓度与结合染料浓度的双倒数曲线; TCS 的浓度为 20 μmol/L.

1.8 μmol/L, 此值与酶和抑制剂复合物的解离常数相当. 此外, 我们在上述反应体系中加入 0.5 mol/L NaCl 后, 差光谱曲线消失, 说明 TCS-cibacron blue F3GA 复合物解离, 这为以染料为配基的 TCS 的亲纯化提供了依据.

2.2 天花粉蛋白的分离纯化

取 3 ml 对 20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5 缓冲液充分透析的硫酸铵沉淀透析物 (约 18 mg 蛋白), 上 Blue Sepharose CL-6B 柱 (0.6 cm×4 cm), 流速 10 ml/h. 用平衡缓冲液充分洗出未被吸附的蛋白 (峰 1) 后, 加入含 0.5 mol/L NaCl 的 20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5 溶液进行洗脱, 分部收集, 每管 2 ml, 洗脱曲线如图 3 所示. 合并峰 1 和峰 2 各管,

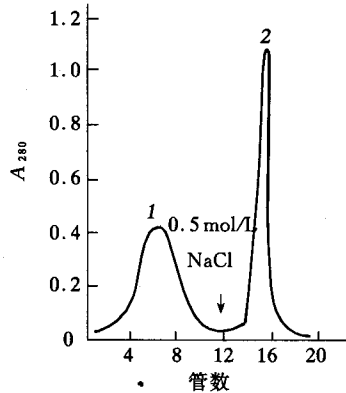


图 3 TCS 的 Blue Sepharose CL-4B 亲和层析图谱

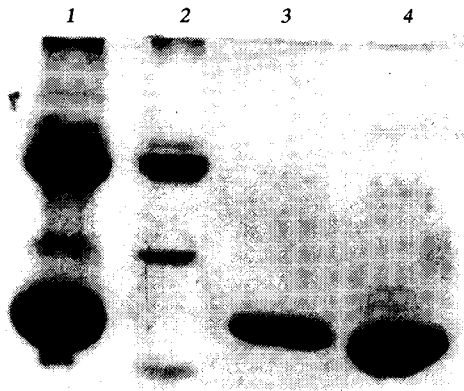


图 4 纯化后 TCS 的 SDS-PAGE 电泳图谱

1: (NH₄)₂SO₄ 沉淀, 2: 流出液 (峰 1), 3: 亲和纯化后的 TCS (峰 2), 4: TCS 标准品.

分别测得蛋白质含量约为 10 mg 和 8 mg, 说明上柱样品都已回收. 12.5% SDS-PAGE 结果表明: 峰 1 不含 TCS, 峰 2 为均一的蛋白质染色条带, 分子质量与 TCS 标准品相同 (图 4). 此外, 我们还测定了该条件下亲和凝胶的交换容量, 每毫升 Blue Sepharose CL-6B 可吸附 15 mg TCS.

2.3 纯化产物的活性测定

为了进一步鉴定纯化产物的性质, 我们测定了它对兔网织红细胞裂解液蛋白质生物合成的抑制活性 (图 5). 纯化的 TCS 在无细胞系统中抑制 50% 蛋白合成的浓度 IC_{50} 为 3.2×10^{-10} mol/L, 较标准品活性 ($IC_{50} = 3.9 \times 10^{-10}$ mol/L) 略低, 并与文献 [5] 报道相符, 可见纯化效果较好.

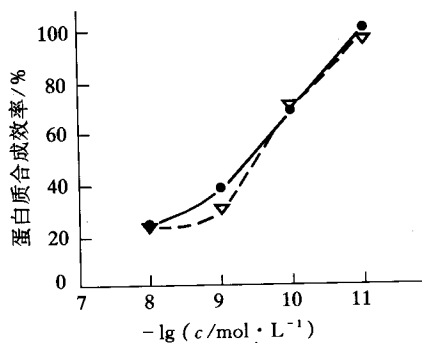


图 5 纯化的 TCS 与标准品 TCS 抑制无细胞系统蛋白合成活性比较

以抑制 50% 蛋白合成时的 TCS 浓度 (IC_{50}) 为毒性标准. ●—●: 纯化的 TCS; ▽—▽: 标准品 TCS.

3 讨论

能特异地和 cibacron blue F3GA 结合的蛋白质均有一个双核苷酸结合域, 二者主要靠疏水作用和静电吸引相互结合^[9]. 我们的结果表明: 在 TCS 与 cibacron blue F3GA 结合中, 静电力起了重要的作用, 只要加入一定浓度 NaCl 就可解吸附. 尽管这一作用力较弱, 但这种结合是特异性的, 因为蛋白与 cibacron blue F3GA 之间的非特异性相互作用并不能产

生特征性的差光谱红移^[11].

虽然 TCS 和 Ricin 同属 RIP 家族, 作用机制相同, 一级结构和高级结构均有高度同源性^[10], 但它们与 cibacron blue F3GA 的结合能力有显著差别, TCS ($K_d = 1.8 \mu\text{mol/L}$) 比 Ricin A 链 ($K_d = 0.72 \mu\text{mol/L}$)^[4] 约低 2.5 倍; 此外, Keiichi 等^[5] 发现 cibacron blue F3GA 对 Ricin A 链的活性有明显的抑制作用, 并认为染料可作为底物类似物结合 Ricin A 链的活性部位, 但我们的结果表明染料对 TCS 活性无明显影响 (数据未给), 这说明二者的结合部位的结构存在一定差异, Ricin A 链的结构更利于与染料的结合.

TCS 与 cibacron blue F3GA 弱的特异性相互作用有利于 TCS 的纯化, 低盐洗脱条件有利于保持 TCS 的活性、延长 Blue Sepharose 亲和柱的使用寿命. 本文建立的纯化方法不需要复杂的设备, 操作简便, 周期短, 效率高, 适于大量制备.

参考文献

- 1 Yeung H W, Poon S P, Ng T B *et al.* Isolation and characterization of an immunosuppressive protein from *Trichosanthes Kirilowii* root tubers. *Immunopharmac Immunotoxicol*, 1987, **9**: 25~46
- 2 Maraganore J M, Joseph M, Bailey M C. Purification and characterization of Trichosanthin. *J Biol Chem*, 1987, **262**: 11628~11633
- 3 Thompson S H, Stellwagen E. Binding of cibacron blue F3GA to proteins containing the dinucleotide fold. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1976, **73**: 361~365
- 4 Keiichi W, Gunki F. Interaction of cibacron blue F3GA and polynucleotides with ricin A-chain, 60S ribosomal subunit-inactivating protein. *Biochim Biophys Acta*, 1987, **914**: 177~184
- 5 应文斌, 张振范, 王庆诚. 网织红细胞破碎液中蛋白质生物合成的抑制的测定. *生物化学与生物物理进展*, 1989, **16**: 467~470
- 6 Apps D K, Glead C D. Interaction of pigeon liver nicotinamide adenine dinucleotide kinase with cibacron blue F3GA. *Biochem J*, 1976, **159**: 441~443
- 7 Lowry O H, Rosenbrough N J. Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951, **193**: 265~275
- 8 Laemmli U K. Leavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, **227**: 680~685
- 9 Beissner R S, Quirocho F A, Rudolph F B. Dinucleotide fold

proteins interaction of arabinose binding protein with cibacron blue 3G-A. J Mol Biol, 1979, **134**: 847~ 850

10 Edward J C, Jon D R, Mary L P *et al.* Primary amino acid sequence of α -trichosanthin and molecular models for abrin α chain and α -trichosanthin. J Biol Chem, 1990, **265**: 8665 ~ 8669

11 Easterday R L, Easterday I M. Affinity chromatography of kinases and dehydrogenases on sephadex and sepharose dye derivatives. Adv exptl Med Biol, 1974, **42**: 123~ 133

Rapid Purification of Trichosanthin by Blue Sepharose CL-6B. YUAN Huidong, XIA Qichang, ZHANG Zuchuan (*Shanghai Institute of Biochemistry, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China*).

Abstract It is revealed by difference spectra

that cibacron blue F3GA could bind specifically to Trichosanthin (TCS) . The spectral absorption maximum is on 690 nm with molar absorption coefficient of $2.6 \times 10^{-3} \text{ (mol/L)}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. The dissociation constant is 1.8 $\mu\text{mol/L}$, and 0.5 mol/L NaCl could dissociate the complex. Based on these results, TCS is purified from the root tuber of *Trichosanthes Kirilowii* by Blue Sepharose CL-6B. This method is rapid, simple, efficient and could be applied in mass preparation of TCS.

Key words trichosanthin, cibacron blue F3GA, difference spectra, affinity chromatography

膜渗滤亲和层析法纯化腹水单克隆抗体

徐 兵 朱忠勇 唐玉钗 兰小鹏
(南京军区福州总医院实验科, 福州 350025)

摘要 用膜渗滤亲和层析法纯化腹水单克隆抗体 (McAb). 采用硝酸纤维素膜 (NCM) 作固相支持物吸附抗原, 用负压使小鼠腹水渗滤 NCM, 在滤过的同时腹水中的 McAb 不断结合于 NCM 上吸附的抗原, 再将 McAb 从 NCM 上解离, 从而得到高纯度的 McAb. 用此法纯化抗白蛋白 (Alb) McAb. 结果提纯的 Alb McAb 纯度达 PAGE 电泳单条带, 将此 McAb 点样 NCM 用于斑点免疫渗滤法 (DIFA) 检测 Alb, 其灵敏度比用腹水点样时高 20 倍. 该法快速简便, 可代替亲和层析柱用于纯化 McAb.

关键词 硝酸纤维素膜, 渗滤, 亲和层析, 纯化, 单克隆抗体

利用硝酸纤维素膜 (NCM) 免疫吸附一步法 (简称吸附法) 纯化 Ig^[1], 可直接将配体包被于 NCM, 省去了 BrCN 活化琼脂糖珠和制备亲和层析柱, 简化了亲和层析流程. 但该法仅将硝酸纤维素膜 (NCM) 浸入待提液中并不时摇动来使液体中 Ig 与 NCM 上的配体结合, 二者结合的几率较低, 提取率较低, 不适用于量大浓度低的待提液, 且反应时间长, 提纯的是总 IgG. 我们采用硝酸纤维素膜 (NCM) 作固相支持物吸附人血白蛋白, 用负压使 Alb McAb 腹水渗滤 NCM, 使腹水中 McAb 与 NCM 上包被的 Alb 充分结合, 再解

离下 McAb, 提高了抗原与抗体结合率 (免疫浓缩) 和提取效率, 现介绍如下.

1 材料和方法

1.1 材料

NCM: 孔径 0.65 μm (浙江台州生化材料厂). Alb McAb 杂交瘤及腹水 (本室自制). 人血白蛋白 (Alb) 纯品 (上海生物制品研究所). 抽滤器: 用塑料滤器改制, 将旋接的上盖换成由一圈环壁和一圈环底组成的“压环”,

收稿日期: 1996-11-15, 修回日期: 1996-12-12