

免疫吸附亲和层析法提纯抗原、抗体

——甲种胎儿蛋白的纯化

张先扬 胡世真 朱畴蓉 丁昌荣 黄道培 曾庆镛

(中国科学院上海生物化学研究所)

孙大年 徐迪惠

(上海市第六人民医院)

亲和层析法^[1]是利用生物高分子化合物特有的功能专一性,使可逆地与其相对应的固相配基结合,而将生物高分子从其它杂质中分离出来的一种方法。目前已应用于蛋白质、酶、核酸、病毒、抗原和抗体等的提纯。把抗原或抗体用共价键联结到固相载体上,用以分离和纯化相应的抗体或抗原的方法称为免疫吸附法。例如,血清甲种胎儿蛋白(AFP)与白蛋白性质非常相似,采用一般方法很难分离提纯,应用免疫吸附法则可以得到满意的结果。本文简要介绍免疫吸附法怎样用于抗原、抗体的纯化。

I. 材料和方法

(一) 抗血清的制备

1. 绵羊抗正常人全血清的制备 取1毫升正常人血清加等体积佐剂充分乳化,于公羊二侧颌下淋巴结内及腿部二处、皮下四处各注射0.5毫升。二周后,每周免疫一次,多点注射正常人血清共4毫升。四次后放血。

2. 绵羊单相抗 AFP 抗血清的制备 用初步纯化的 AFP 制剂^[2]免疫绵羊(免疫法同1),得到非单相抗 AFP 抗血清。此抗血清和正常人血清、正常人组织提取液在 β 区产生一条较弱的沉淀线。将此抗血清通过偶联正常人血清蛋白的免疫吸附柱和正常人胃组织提取液免疫

吸附柱,吸收去掉非特异部分,可得到比原体积稍大、效价基本不变的单相抗 AFP 特异性抗血清。

(二) 固相载体的制备

1. 琼脂糖的制备 参照 Stellen Hjerter 法^[3],用磷酸缓冲液(以下简称 P. B. S.)抽提去掉琼脂中的琼脂胶而制得琼脂糖。

优质琼脂粉20克,用2,000毫升、pH 6.8 0.03 M P. B. S. 抽提四天,每天换二次 P. B. S.,四天后配成4%浓度,高压锅内融化,冷却后磨碎,过60目筛成细颗粒。再同上用 P. B. S. 抽提四天后,仍配成4%浓度加5克氯化钠于高压锅内融化后,趁热倒入1,000毫升无水乙醇中,迅速搅拌即见白色絮状沉淀形成,待沉淀完全后,用70%乙醇洗涤以除去微量氯化钠,再用乙醚洗后烘干得13克琼脂糖,色微黄,产率65%。

2. 琼脂糖珠 (Sephadex 4B) 的制备 参照 S. Bengtsson 法^[4],喷珠装置如图1。A为可密闭的铜锅,其盖子上有一出口以橡皮管B接氮气钢瓶,另一出口接压力表C, D为不锈钢的开口锅,锅底出口接开关E, E端装上割去斜口的医用针头F(18号针头),烧杯G内为乙醚冰水液和搅拌器,针尖浸入醚层约0.5厘米深,喷珠时在A内装入热水,将已在高压锅内融化的4%琼脂糖倒入D内,迅速盖上盖子,旋紧螺丝以免

漏气, 打开氮气钢瓶阀门, 使压力上升到 $2.8 \sim 3.0$ 公斤/厘米², 边搅拌边打开开关 E, 液体琼脂糖经针尖喷入烧杯内, 即见珠状琼脂糖颗粒形成, 并渐渐沉积到水层底部, 喷珠完毕后关闭 E 及氮气钢瓶阀门, 倾去乙醚层, 在显微镜下观察水层中的琼脂糖颗粒为大小不等的球状物, 筛出 60~120 目的珠状物作为免疫吸附柱的固相载体。

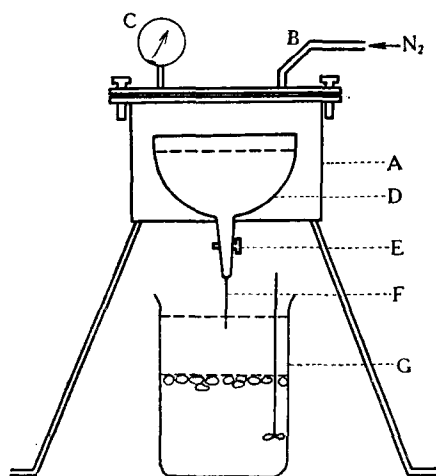


图1 琼脂糖喷珠装置

(三) γ 球蛋白的制备

抗血清经二次 50% 饱和度的硫酸铵沉淀或 13.5% 饱和度的硫酸钠沉淀, 得到 γ 球蛋白粗品, 即可直接用于免疫吸附柱。

(四) 抗 AFP 免疫吸附柱及抗正常人全血清免疫吸附柱的制备

固体溴化氰 (BrCN) (97% 以上) 4 克溶于 70 毫升蒸馏水中, 小心倒入沉积为 100 毫升的琼脂糖中^[5,6], 边搅拌边滴加 2N NaOH 使 pH 维持 11, 反应 8 分钟后即用 5 倍体积预冷的 0.1 M NaHCO₃, 在布氏漏斗或粗砂蕊漏斗上洗涤已活化的琼脂糖, 洗涤时间为 90 秒钟。洗涤完毕后, 即迅速加入预先对 0.1 M NaHCO₃ 透析至平衡的 70 毫升待偶联的 γ 球蛋白 (溶液中总蛋白为 4 克), 在 4℃ 下, 小心搅拌, 反应 6~10 小时后离心除去未偶联上的蛋白, 用生理盐水洗涤免疫吸附剂二次, 再装入柱中 (4 × 10 厘米), 然后用生理盐水及 pH 2.4, 0.1 M 甘氨酸-盐

酸缓冲液, 充分洗涤至流出液 280 毫微米的光吸收均小于 0.02, 再各用 2—3 倍柱体积 7M 尿素及水洗涤, 最后用生理盐水平衡即可使用。

(五) AFP 的纯化

1. 含有 AFP 的肝癌病人腹水、血清或胎儿组织粗纯液^[2] 对生理盐水透析平衡后, 上单相抗 AFP 的免疫吸附柱, 用生理盐水洗去杂蛋白, 用对流免疫电泳法测定^[7] 流出液, AFP 应呈阴性, 对抗正常人抗血清应呈强阳性, 再继续洗至流出液对抗正常人抗血清呈阴性反应, 吸附在柱上的 AFP 用 pH 2.4, 0.1 M 甘氨酸-盐酸缓冲液洗脱 (流速 5 毫升/5 分钟), 洗脱液迅速用 0.5 M K₂HPO₄ 调节 pH 至中性, 收集用对流免疫电泳测定洗脱液对抗 AFP 抗血清呈阳性的部分。样品对生理盐水透析后, 上羊抗正常人全血清免疫吸附柱, AFP 在此柱上不吸附而直接流出, 用生理盐水洗脱 (流速 5 毫升/5 分钟), 每管收集液用兔抗 AFP、兔抗正常人全血清及兔抗白蛋白抗血清进行对流免疫电泳测定, 结果表明流出液仅对抗 AFP 抗血清有沉淀条纹, 收集 AFP 阳性的部分, 合并、浓缩。

2. Sephadex G-200 柱层析: Sephadex G-200 10 克于蒸馏水中溶胀 72 小时后装柱 (2.5 × 80 厘米)。上述浓缩样品上柱用蒸馏水洗脱, 流速 3 毫升/30 分钟, 测定洗脱液在 280 毫微米的光吸收, 得二个吸收峰 (图 2), 峰 1 经兔抗羊 γ

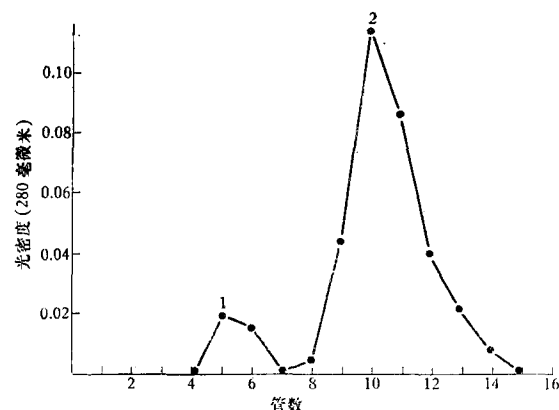


图2 Sephadex G-200 分离 AFP

每管为 3 毫升。第 4—15 管是通过用兔抗羊 γ -G 抗血清扩散法测定和抗 AFP 抗血清对流免疫电泳法测定而测知其组成。

球蛋白抗血清双扩散法鉴定为羊的 γ 球蛋白,峰 2 为 AFP。收集峰 2 浓缩,用 0.3 微米超滤膜 (Millipore PHWP 25 毫米) 过滤去变性蛋白后,即得纯化 AFP。经反复使用免疫吸附柱,峰 1 逐渐消失,样品可以不经过 Sephadex G-200 柱层析即达高度纯化(详见讨论)。

3. 免疫吸附柱的再生: 抗 AFP 免疫吸附柱用 2—3 倍柱体积 7M 尿素洗涤,然后用蒸馏水洗涤去尿素,最后再用生理盐水平衡,即可重复使用。被吸附在抗正常人全血清免疫吸附柱上的其它蛋白可用 2—3 倍柱体积的 pH 2.4、0.1 M 甘氨酸-盐酸缓冲液洗涤,然后依次用 pH 7.0、0.01 M P. B. S, 7M 尿素,蒸馏水洗涤和生理盐水平衡后,即可重复使用。

II. 结 果

(一) 提纯倍数

经过上述方法纯化,用免疫电泳扩散法^[9]测定其提纯倍数,结果见表 1。

表 1¹⁾ 免疫吸附法提纯 AFP 倍数

样 品	纯化前 单位 ²⁾ / 毫克蛋白	纯化后 单位 ²⁾ / 毫克蛋白	提纯倍数
AFP(+)肝癌病人腹水	1.90×10^3	121×10^3	63.7
胎儿组织提取粗纯液	5.00×10^3	90.5×10^3	18.1

1) 表内蛋白量,纯化前用双缩脲法测定,纯化后用 Folin 法测定。
2) AFP 单位系指用电泳免疫扩散法测出峰高毫米数。

(二) 纯度鉴定

- 1. 提纯后的 AFP 在聚丙烯酰胺凝胶电泳中只显示一条对应于 AFP 的蛋白染色带(图 3)。
- 2. 用 ¹²⁵I 标记提纯后的 AFP, 在行醋酸纤维薄膜电泳后, 用 X 光片感光可得放射自显影的图谱(图 4)。
- 3. 用纯化样品免疫绵羊, 可直接得到单相的抗 AFP 抗血清(图 5)。

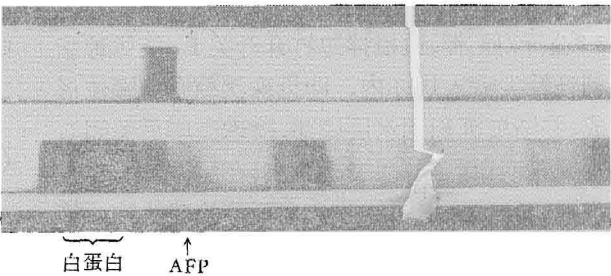


图 3 纯化 AFP 样品的聚丙烯酰胺电泳分析
上: 经免疫吸附柱纯化的 AFP 样品;
下: 上免疫吸附柱前的样品。

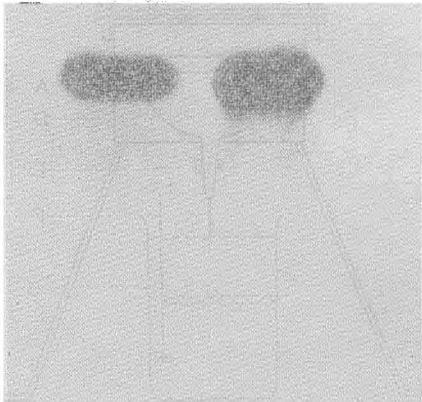


图 4 (不同批号)纯化 AFP 样品的放射自显影图

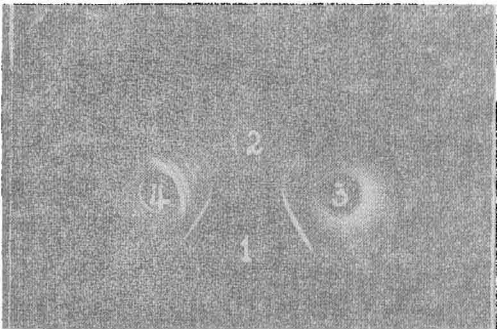


图 5 纯化样品的生物学鉴定

孔 1 为纯化 AFP; 孔 2 为 AFP(+) 病人血清;
孔 3 为纯化 AFP 样品免疫绵羊所得抗血清 (不
经吸收); 孔 4 为未经吸收的免抗胎儿血清抗血清。

III. 讨 论

(一)

用免疫吸附法纯化 AFP 具有许多优点,如
操作简便、特异性强、分离量较大、操作周期短、
可从大体积中富集微量样品等等。如一根 200

毫升羊抗 AFP 抗血清制备的免疫吸附柱,一次可吸附 15 毫克 AFP 病人血清或腹水,可不经其他处理直接过柱,纯化周期约为 7 天。国内有试用此法提纯肝炎相关抗原,已得到初步结果。如要纯化抗体,也可试将抗原直接偶联在载体上如法泡制。我们将正常人血清偶联在载体上,用以吸附掉羊抗人胎血清抗血清中的非特异抗体,获得特异的抗 AFP 抗血清,广泛用于临床实践,得到满意结果。

(二) 关于免疫吸附柱的某些特性

1. 稳定性 由于被偶联的蛋白分子经共价键固定在琼脂糖上,大大增强了蛋白质空间结构的稳固性,柱的免疫吸附活力能长期保持不变。在我们实验室,有的柱在室温下使用三个多月,重复使用三十余次,尚未发现活力下降。

2. 特异性 我们制备的琼脂糖含硫量虽小于 0.3% 但对结晶素有少量吸附作用,表明可能具有少许非特异性吸附蛋白的能力。实验发现,除共价键偶联的抗体蛋白外,还有非共价联接的抗体蛋白(图 2 峰 1),经多次 7M 尿素再生的柱,非共价联接的抗体蛋白逐渐洗净,非特异性吸附的干扰逐渐消失,则 Sephadex G-200 柱层析可以不用。

氯甲酸乙酯^[9]、戊二醛^[10]交联抗体免疫吸附柱法虽操作更为简便,但我们发现吸附能力较差,重复使用效果不好,在中性和酸性条件洗脱时都不断有蛋白流出,对样品的干扰较大。

3. 样品回收率 根据电泳免疫扩散法定量测定^[8],过抗 AFP 免疫吸附柱的回收率为 70%,流过抗正常人全血清免疫吸附柱的 AFP 回收率为 85%。

(三) 操作中的某些注意事项

1. 用不同厂家琼脂制备的琼脂糖,共价结合蛋白的能力稍有不同。

2. 琼脂糖珠和免疫吸附柱应保存在含防腐剂的水溶液中,防霉、防冰冻、防干裂。

3. 溴化氰活化琼脂糖必须在低温和 pH 11 的碱性条件下进行。由于活化中间体不稳定,

故必须严格控制反应时间和洗涤时间。蛋白偶联取决于琼脂糖质量,溴化氰用量,偶联蛋白的种类、用量及反应条件的控制。在我们实验室活化 1 毫升沉积琼脂糖珠的溴化氰用量为 40—70 毫克,偶联上的蛋白量为 20—30 毫克。

4. 溴化氰为剧毒易挥发物质,操作须在通风柜内进行。

参 考 资 料

- [1] Feinstein, G.: Die Naturwissenschaften, **58**, 399, 1971.
- [2] 上海市第六人民医院、上海第一医学院、中国科学院上海生物化学研究所: 医学情况交流(上海), 第 38 页, 1972 年 10 月 5 日。
- [3] Hjertter, S.: J. Chrom., **61**, 73, 1971.
- [4] Bengtsson, S. & Philipson, L.: Biochim. Biophys. Acta, **79**, 399, 1964.
- [5] Porath, J., Axen, R. & Ernback, S.: Nature, **215**, 1419, 1967.
- [6] Nishi, S. & Hirai, H.: Biochim. Biophys. Acta, **278**, 293, 1972.
- [7] 浙江医科大学附属第一医学院、上海第一医学院中山医院、上海市第六人民医院、中国科学院上海生物化学研究所: 活页资料, 1971 年 12 月。
- [8] 上海第一医学院、上海市第六人民医院、中国科学院上海生物化学研究所: 医学情况交流(上海), 第 28 页, 1972 年 10 月 5 日。
- [9] Avrameas, S. & Ternynck, J.: J. Biol. Chem., **242**, 1651, 1967.
- [10] Avrameas, S. & Ternynck, T.: Immunochem., **6**, 53, 1969.

本工作承蒙周光宇、潘家秀同志的支持,中山医院周康同志的协助,特此致谢。

名 词 解 释

抗原

一种能刺激人体或动物产生抗体的物质,它往往是一种蛋白质,而且通常不是口服而是经胃肠道以外的途径注入的。

抗体

抗原刺激机体所产生的一种球蛋白,它只能与引起其产生的那种物质(抗原)相结合。

如预防注射用的霍乱菌苗就是一种抗原,把它注射入人体后一段时间(约 7—10 天),在血液中就会出现一种与霍乱菌相应的球蛋白——抗体,它仅能与霍乱菌相结合,并能抑制或消灭这种菌。