

马抗乙型肝炎病毒表面抗原抗体的 胃蛋白酶消化片段及其性质

谢彦博 王际彰

(北京生物制品研究所生物化学室)

在医疗实践中使用动物抗血清作被动免疫已有半个多世纪的历史。早期使用未经提纯的“原制血清”，因此反复注射会引起严重过敏反应。其后，免疫化学家研究了提纯抗体的方法，制出“浓制血清”。1936年发表了胃蛋白酶消化法，制出“精制抗毒素”，大大地减少了过敏反应，因而得以推广并沿用至今。但是在人群中多次使用也还会有人出现过敏反应。近年在国外有减少使用动物抗体，改用高价免疫人血清的趋势，但在我国大量生产以人血为原料的抗体制品是不切实际的，因此继续改进动物抗体制品的质量，是值得进行的。近十多年来抗体结构与功能的研究获得了飞跃的发展，生物化学和免疫化学分析手段也日益增多，因此，运用现代知识对被动免疫用的动物抗体制品重新加以考查和改进，是有可能的。

近年来已有许多报告^[1,2]，证明乙型肝炎的被动免疫有肯定的效果。但人的抗乙型肝炎病毒表面抗原(抗-HBs)血清的来源较为困难，迫切需要安全有效的高效价动物抗-HBs抗体供临床试用。我们用纯乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)免疫马匹获得了高效价单特异抗-HBs血清^[3]，经DEAE纤维素层析提纯其中的IgGa^[4]，再用胃蛋白酶将其消化为 $F(ab')_2$ 和 Fc' 碎片，用硫酸锌沉淀法^[5]除去 Fc' 碎片和可能残存的IgGa后制得马抗-HBs的 $F(ab')_2$ 制品，并对消化产物进行了凝胶过滤层析、凝胶过滤法分子量测定，聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)和免疫化学分析。为了对比，也分析了精制破伤风抗毒素的常规制品。结果证明按本法制备的

抗-HBs片段不含有Fc，但仍有抗-HBs活性，PAGE结果纯度较佳，因而为乙型肝炎的被动免疫提供了可供人体试用的制品，并对今后改进常规抗毒素制品的生产，提高纯度，提供了参考。

材料与方 法

材料

1. 马抗-HBs的IgGa 用胃蛋白酶消化→DEAE纤维素层析→亲和层析→凝胶过滤四步法提纯的HBsAg免疫马匹获得高效价(1:256)的单特异性抗-HBs血清，再用半饱和硫酸铵沉淀及DEAE纤维素层析制出抗-HBs的IgGa，效价1:128以上，蛋白质含量20毫克/毫升。

2. 胃蛋白酶 上海生化研究所出品，二次重结晶。

3. 精制马破伤风抗毒素。

4. 转铁蛋白(牛)。

5. 核糖核酸酶(牛胰)，四次结晶。

6. DEAE纤维素: Whatman-DE32微粒型。

7. Sephadex G-200。

8. 蓝色葡聚糖2000。

方法

1. 胃蛋白酶消化 取马抗-HBs的IgGa若干毫升，加入等体积胃酶-0.4M醋酸钠缓冲液(pH4.0)，底物与酶的比例为25:1(蛋白重量比)，在37℃水浴保温不同时间，每隔1小时振荡一次。消化后用5%NaOH调pH8.0以停止

酶反应。将消化物装透析袋,在生理盐水中透析 24 小时,并浓缩至原体积。

2. ZnSO_4 沉淀 按文献[5]方法,向上述消化产物中逐滴加入 250mM ZnSO_4 溶液使最终浓度为 25mM,边加边搅,加完后继续搅拌 2 小时以使沉淀完全,然后 3,000 转/分离心,除去沉淀。向上清液中加入固体 EDTA-4Na 至 1% 浓度,以螯合 Zn^{++} ,然后装透析袋在生理盐水中透析,至检测不到 Zn^{++} 为止(吡啶点滴法)。此过程自始至终应使 pH 保持在 6.8 以下,以防止出现 $\text{Zn}(\text{OH})_2$ 沉淀。

3. 凝胶过滤层析 称 Sephadex G-200, 10 克左右,依法处理后装 $\phi 1.5 \times 90$ 厘米色层柱,胶面高 85 厘米,床体积 150 毫升。平衡流洗液为 0.01M 磷酸钠缓冲液,含 0.1M NaCl 和 0.02% NaN_3 , pH7.6。每次加样 1 毫升。流洗速度维持 10 毫升/小时左右。用自动分部收集器收集流洗液,用 LKB Uvicord II 型紫外光吸收仪自动描记流出液的 280 毫微米光密度曲线,并准确测量各峰流洗体积 V_e 。用已知分子量的马 IgGa、转铁蛋白、核糖核酸酶和蓝色葡聚糖 2,000,在相同条件下,单独进行凝胶过滤,对该 G200 柱进行标定,并根据 $K_{av} = [(V_e - V_0)/(V_t - V_0)]$ 对分子量的对数之线性关系算出胃蛋白酶消化产物的分子量。

4. 对流电泳 按常规法进行,采用 1.2% 的琼脂凝胶,板液为 pH8.6、离子强度 0.025 的巴比妥缓冲液,电泳槽液为 pH8.6、离子强度 0.05 的巴比妥缓冲液。电泳时每板 (2.5×7.5 厘米) 电流 3 毫安,电泳时间 1.5—2 小时。

5. 聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE) 采用 7% 浓度的分离胶, pH8.8 的 Tris-HCl 缓冲液。浓缩胶用 pH6.7 的 Tris-HCl 缓冲液,聚合方法为光聚合。电极液为 pH9.0 的 0.25M 硼酸缓冲液。电泳时间 2 小时,每管 ($\phi 0.7$ 厘米内径) 3 毫安。电泳完毕后用氨基黑染色。

实验结果

1. 马抗-HBs 的 IgGa 的胃蛋白酶消化产物 我们曾用胃蛋白酶消化马抗-HBs 的 IgGa 24 小

时,用凝胶过滤法、PAGE 法检查消化产物的情况。消化产物在 Sephadex G-200 层析后出现 A、B、C 三个峰(图 1),它们的 K_{av} 值分别为 0.27, 0.44, 0.94,而未消化的马 IgGa 只出现一个 K_{av} 值为 0.18 的对称的峰(图 2)。因凝胶过滤时被分离物质的 K_{av} 值是特征性,它与该物质的分子量呈反比关系,因此 A、B、C 三个峰均为 IgGa 的消化片段。为了确证此点,曾在 IgGa 的消化产物中加入少量未经消化的 IgGa,结果除了 A、B、C 三峰之外在 A 峰之前, $K_{av} = 0.18$ 处也出现 IgGa 峰(图 3)。C 峰的 K_{av} 值为 0.94,可见它是小分子的消化产物。为了测出 A、B 峰的分子量,曾将马抗-HBs 的 IgGa (分子量 15 万)、转铁蛋白(分子量 7.66 万)、核糖核酸酶(分子量 1.37 万)用相同的方法测出其 K_{av} 值依次为 0.175、0.332、0.74,将这些 K_{av} 值对分子量的对数作图得出标准直线,从这直线上查出 A、B 峰的分子量分别为 10.2 万和 5.3 万(图 4)。H. Fey 报告[6],用胃蛋白酶消化牛的

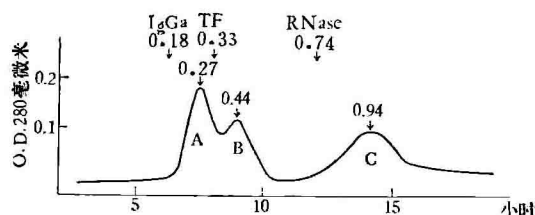


图 1 马抗-HBs 的 IgGa 的胃蛋白酶消化产物的凝胶过滤层析图

$\phi 1.5 \times 85$ 厘米 Sephadex G-200 柱。平衡流洗液为 0.01M P.B.-0.1M NaCl-0.02% NaN_3 。流速 10 毫升/小时。加样 1 毫升。图中数字为 K_{av} 值,TF = 转铁蛋白,RNase = 核糖核酸酶

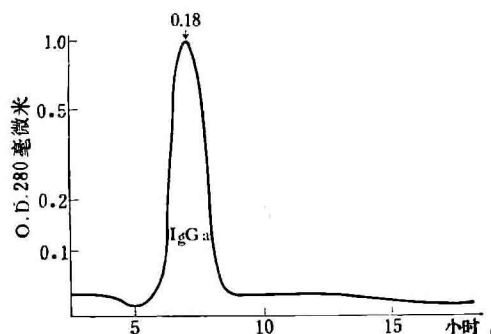


图 2 马抗-HBs 的 IgGa 的凝胶过滤层析图 (条件同图 1)

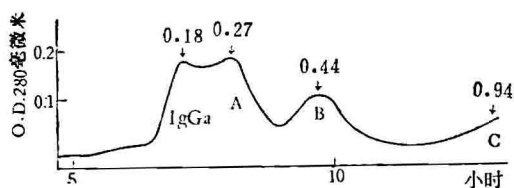


图3 消化产物加入 IgGa 后的凝胶过滤层析图
(条件同图 1)

0.16—0.31 (以清蛋白为 1.0) 处出现很宽的连续色区 (图 5)。C 峰无可见的色带。

2. 不同消化时间的影响 曾在消化后 1, 2, 4, 8 小时取样作凝胶过滤层析。结果见图 6。图 6a 为消化 1 小时样品, 在 $K_{av} = 0.286$ 处出现分散度稍宽和稍不对称的峰, 并且在接近床体积处有小分子峰, 说明在所采用的条件下大

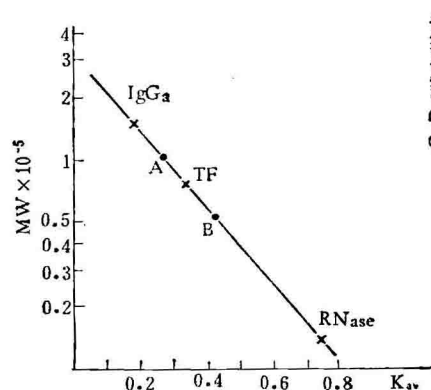


图 4 K_{av} 值与分子量的对数之关系图

IgG 后通过 Sephadex G-75 柱可得到分子量为 101,900 的 $F(ab')_2$ 峰、分子量为 49,000 的 Fab' 峰和小分子峰。我们的 A、B、C 峰形与 Fey 报告的相近, 因此认为 A 峰即 $F(ab')_2$, B 峰即 Fab' 。曾用对流电泳法检查 A、B、C 三峰的抗-HBs 活性, 结果 A 峰仍能与 HBsAg 生成沉淀线而 B、C 则不能。这亦证明 A 峰即 $F(ab')_2$ 。我们还用 PAGE 法对 IgGa 及 A、B、C 等峰进行分析, 结果 IgGa 在胶面下出现一条稍宽的色带, A 峰除了在胶面下出现稍宽的色带之外, 在其下又出现一条稍浅的色带, B 峰则在比迁移率

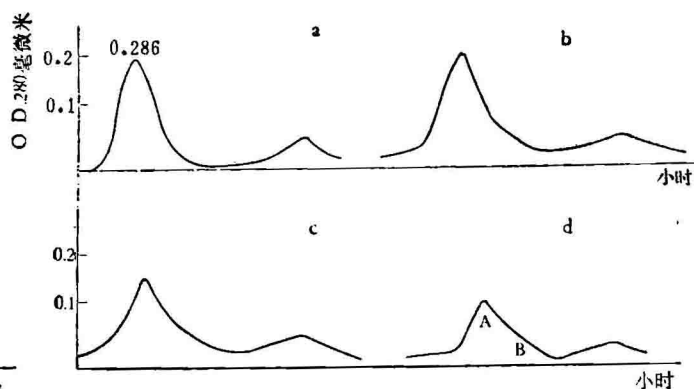


图 6 用胃蛋白酶消化马抗-HBs 的 IgGa 时不同消化时间的影响

a = 1 小时, b = 2 小时, c = 4 小时, d = 8 小时
(层析条件同图 1)

部分的 IgGa 已被消化为 $F(ab')_2$ 。随着时间的延长, 出现 Fab' 的 B 峰 (图 6d, 消化 8 小时)。

3. 用 $ZnSO_4$ 沉淀法除去 Fc' 消化片段 马抗-HBs 的 IgGa 的消化产物中含有 A、B、C 三峰已如上述, 其中 C 峰为 Fc' 碎片, 此外还可能存在未被消化的完整的 IgGa。这些均应除去。我们是用 $ZnCO_3$ 沉淀法除去的。 $ZnSO_4$ 沉淀后样品再用凝胶过滤法检查, 结果 C 峰消失, 只余 A、B 两峰 (图 7), 它们的 K_{av} 值与沉淀前的 A、B 相近。由于 $ZnSO_4$ 是 Fc 及完整 IgG 的有效沉淀剂, 加 $ZnSO_4$ 后 A、B 两峰形未变的事实可使人确认它们是 $F(ab')_2$ 及 Fab' 而非 IgGa。 $ZnSO_4$ 沉淀后的 A、B 峰的 PAGE 图谱与沉淀前

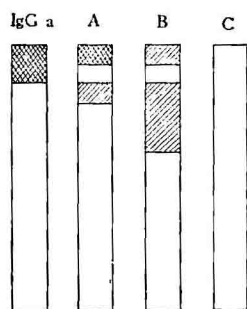


图 5 马抗-HBs 的 IgGa 及消化产物的聚丙烯酰胺凝胶电泳分析

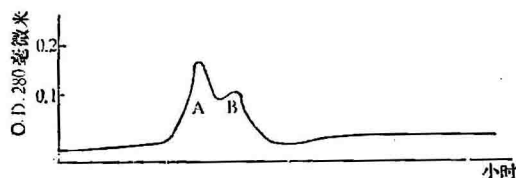


图 7 用 $ZnSO_4$ 沉淀法除去 Fc' 消化片段后的凝胶过滤层析图 (条件同图 1)

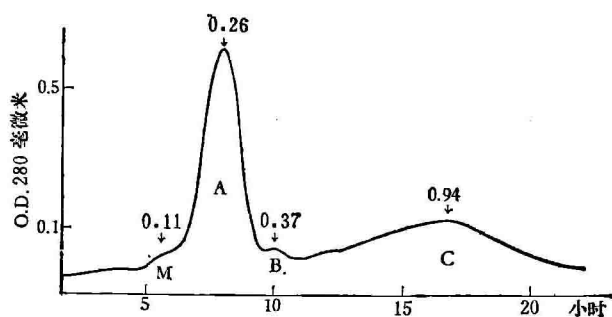


图8 精制马破伤风抗毒素的凝胶过滤层析图
(条件同图1)

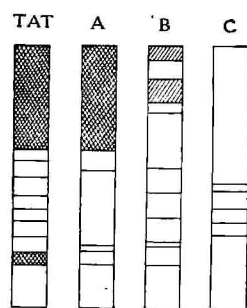


图9 精制马破伤风抗毒素及其凝胶过滤层析后各峰的聚丙烯酰胺凝胶电泳分析

相同。

4. 精制马破伤风抗毒素常规制品的凝胶过滤及 PAGE 分析 为了比较, 曾将本所生产的精制破伤风抗毒素进行凝胶过滤及 PAGE 分析。凝胶过滤后出现 M、A、B、C 四个峰(图8), 其 K_{av} 值分别为 0.11、0.26、0.37、0.94, 其中 A 峰的 $K_{av} = 0.26$, 与上述马抗-HB₂ 的 IgGa 的 $F(ab')_2$ 相近 ($K_{av} = 0.27$), 所以是马破伤风抗毒素的 $F(ab')_2$, M 峰分子量较高, 可能是马血清中未被消化的大分子蛋白质或是 IgG 的聚合物, 代表 Fc 片段的 C 峰较高较宽。PAGE 显示出精制破伤风抗毒素成分的复杂性, 在胶面以下有一片连续色区, 其下直至清蛋白处有多条色带(图9TAT), 经凝胶过滤后 A、B、C 峰仍比较复杂(图9A、B、C)。

讨 论

1. 近代抗体结构与功能的研究表明, 抗体 IgG 是由 2 种(轻链与重链), 4 条(2 轻 + 2 重)多肽链组成的。由链间二硫键联结成 Y 形结构。Y 形的中部是所谓的绞链部, 两个较密实的 Fab 区通过绞链部与较密实的 Fc 区相连接。Fab 区的主要活性是和特异的抗原决定簇结合, Fc 区则具有其他一些生物学功能, 如补体结合、种属特异抗原性、固定于皮肤等等。用木瓜蛋白酶消化 IgG 可以得到两个 Fab 和 Fc 部分。用胃蛋白酶消化则可得相连在一起的 Fab' 即 $F(ab')_2$ 和 Fc' 碎片。 $F(ab')_2$ 有两个与抗原结合的部位, 即具有双价抗体的活性, 因

而仍能与抗原起沉淀反应或凝集反应。1936 年, 已知用胃蛋白酶消化抗血清可以降低异种抗原性。但因是采用原血清消化, 且消化产物只经过一般的粗提纯, 故纯度较差。我们采用经过纯化的 IgGa 来消化, 继之以 $ZnSO_4$ 沉淀除去 Fc' 碎片和可能残存的 IgG, 可以制得 PAGE 上较纯的 $F(ab')_2$ 。这样就为改进“精制抗毒素”的生产工艺, 进一步降低不良反应提供参考。

2. 乙型肝炎的被动免疫已被证明有一定效果, 因此需要较多量的抗-HB 制品来试用。按本法制备的马抗-HBs 的 $F(ab')_2$ 制品, 仍具有与 HBsAg 特异结合的能力, 并且由于使用纯化的马 IgGa 作为原材料, 因此不含有除了 IgGa 以外的异种血清蛋白成分, 而 IgGa 上的主要的抗原性部位 Fc 片段业已被除去, 因而能减少发生过敏反应的可能性。在使用抗体作被动免疫时还需要考虑到抗原抗体复合物在体内组织器官中的固定作用, 它会对组织器官造成一定的免疫损伤。一般认为, IgG 的补体结合位是在 Fc 片段上的功能区 C_{H2}, 除去 Fc 片段后的产品是较为安全的。

参 考 文 献

- [1] Krugman, S. et al.: *New Eng. J. Med.*, **288**, 755, 1973.
- [2] Sumnness, W. et al.: *New Eng. J. Med.*, **290**, 701, 1974.
- [3] 谢彦博等:《微生物学报》, 1978 年, 第 18 卷, 第 2 期。
- [4] 谢彦博等:《微生物学报》, 1977 年, 第 17 卷, 第 4 期。
- [5] Fey, H.: *Immunochem.*, **14**, 99, 1977.

[本文于 1978 年 2 月 21 日收到]