

研究工作

一种新型免疫亲和层析介质的研究

董建英 杨 端

(北京大学生物系, 北京 100871)

提 要

以国产琼脂糖介质为原料,合成了含胍琼脂糖介质。抗体 Fc 段的糖基经氧化后,可与此种含胍琼脂糖介质偶联,制成高亲和率的免疫亲和层析介质。与溴化氰法相比,这种对抗体上的糖特异的偶联方法制成的免疫亲和层析介质,容量高、稳定性强。用这种含胍琼脂糖介质分别与肿瘤坏死因子和 γ -干扰素等的抗体偶联,制成的免疫亲和层析介质可用于分离纯化相应的基因工程产物抗原。

关键词 免疫亲和层析,含胍琼脂糖介质,肿瘤坏死因子, γ -干扰素,人白细胞介素-2

由于免疫亲和层析的高度选择性,它是分离纯化生物活性大分子的重要手段之一,常被用于基因工程下游的产品的分离纯化^[1,2]。

在免疫亲和层析技术中,免疫亲和层析介质的制备很重要。将抗体偶联到载体上的方法很多,如溴化氰法^[3],环氧法^[4]和高碘酸法^[5]等。这些传统的偶联方法是不特异的,一般通过载体的活化基团与抗体的氨基酸侧链结合,抗体有可能在其抗原结合位点或其附近与载体结合,从而使有的抗体失去活性而不能与抗原结合。所以传统的偶联方法制成的免疫亲和层析介质的效率往往不高。1985年, O'Shannessy 和 Quarles^[6]发表了通过抗体上的糖进行特异结合反应的方法。抗体上的糖经氧化后生成了醛基,可与含胍载体结合,这种对糖特异的偶联方法(胍法)提高了免疫亲和层析柱的容量和稳定性。

目前,国内还没有人做过含胍载体方面的工作,而国外进口的商品不仅价格昂贵,而且储存期有限。为此,我们利用国产琼脂糖介质为原料,对合成含胍载体的方法,偶联抗体的效

率以及免疫亲和层析柱的效能等方面进行了研究。

1 材 料 和 方 法

1.1 材料

人 ABO 血清及兔抗人 ABO 血清抗体由北京大学生物系生物化学大实验室制备,人肿瘤坏死因子及其单克隆抗体由军事医学科学院免疫室沈倍奋先生赠,人 γ -干扰素及其单克隆抗体由清华大学化学工程系丛进阳老师赠,人白细胞介素-2 由中国医学科学院肿瘤所免疫室常立水同志赠,人白细胞介素-2 单克隆抗体购自中国医学科学院肿瘤所免疫室,琼脂糖 QT6 由本实验室自制。其余所用试剂均为分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 含胍琼脂糖介质的制备: 参照文献 [4],并略作改进。

1.2.2 含胍琼脂糖介质中配基含量的测

定: 用凯氏定氮法^[7], 由介质中氮的含量, 推导出胍的含量。

1.2.3 抗体的氧化和偶联: 参照文献[6], 抗体在 pH 5.5, 10 mmol/L NaIO₄ 条件下氧化, 反应在 4℃, 暗处进行 30min. 用 Sephadex G-25 层析法除去过量的 NaIO₄ 后, 氧化的抗体与自制含胍琼脂糖介质偶联, 反应在 4℃ 进行 24h.

1.2.4 胍法与溴化氰法制备的免疫亲和柱的容量比较: 将兔抗人 ABO 血清 IgG 分别用胍法(见方法 3)和溴化氰法^[3]偶联. 装柱后, 用含 0.13 mol/L NaCl, pH 7.4 的 20 mmol/L 磷酸缓冲液平衡, 然后加入人 ABO 血清, 吸附 5h 后, 用平衡缓冲液洗涤, 再用 pH 2.8 的 0.1 mol/L 甘氨酸-盐酸缓冲液洗脱. 在不同上样量的条件下, 分别测定两种免疫亲和柱的吸附容量。

1.2.5 胍法和溴化氰法制备的免疫亲和柱的稳定性比较: 将鼠抗人肿瘤坏死因子 TNF 的单克隆抗体分别用胍法和溴化氰法偶联. 装柱后, 用 pH 7.4 的 20 mmol/L 磷酸缓冲液平衡, 然后加 TNF 的基因工程产物粗品吸附, 再用 pH 3.5 的 0.1 mol/L 柠檬酸缓冲液洗脱. 收集柠檬酸洗脱液, 浓缩后用不加抗体的 ELISA 反应测定免疫亲和柱上抗体脱落情况. ELISA 反应中不加抗体, 就不会结合二抗, 不会有颜色反应; 若是免疫亲和柱上抗体脱落, 就会使 ELISA 反应产生颜色。

1.2.6 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定蛋白质纯度: 参照文献[8]. 分离胶浓度用 12%.

1.2.7 紫外光吸收法测定蛋白质含量, 根据经验公式:

$$\text{每毫升所含蛋白毫克数} = (1.45 \times A_{280} - 0.74 \times A_{260})$$

$$\text{每毫升所含抗体 (IgG) 毫克数} = A_{280} / 1.4$$

2 结 果

2.1 自制含胍琼脂糖介质 (HZ-QT6) 的

配基含量及偶联抗体容量 经凯氏定氮法测定, 每毫升 HZ-QT6 中配基含量可达 12.7 μ mol. 将不同浓度的兔抗人 ABO 血清 IgG 分别与 1g HZ-QT6 偶联, 结果发现, 随着加入抗体量的增加, 结合的抗体量也增加; 抗体高浓度时, 偶联率略有下降. 每克(湿重, 相当于 1.4 ml) HZ-QT6 的最大偶联抗体容量在 20mg 以上。

2.2 胍法与溴化氰法制备的免疫亲和柱的容量比较 (见图 1) 在上样量为 500 μ l 人 ABO 血清时, 胍法制备的免疫亲和柱的容量是溴化氰法制备的免疫亲和柱容量的 5 倍左右。

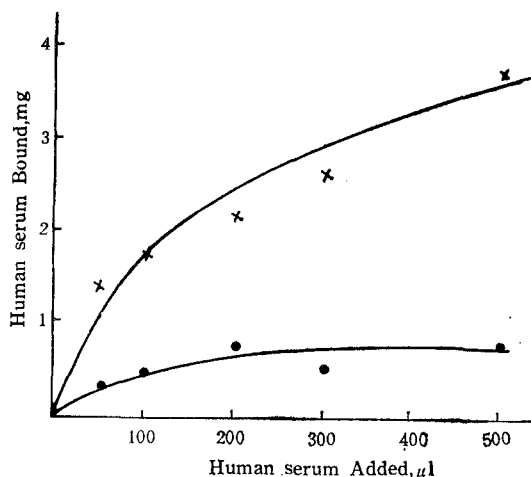


图 1 人 ABO 血清在胍法(+++)和溴化氰法(---)制备的免疫亲和柱上的吸附容量比较

Fig. 1 Adsorption capacity of human serum on immunoaffinity column prepared by HZ-method (+++) and CNBr-method (---)

2.3 胍法与溴化氰法制备的免疫亲和柱的稳定性比较 溴化氰法制备的免疫亲和柱的柠檬酸洗脱液, 浓缩 40 倍后, 在不加抗体的情况下, ELISA 测定有明显的颜色反应, 在 450 nm 处光吸收为 0.525; 而胍法制备的免疫亲和柱的洗脱液, 在同样条件下, ELISA 测定光吸收为 0.035, 这个数值在 ELISA 测定的误差范围之内. 这说明, 溴化氰法制备的免疫亲和柱在酸性条件下不稳定, 在洗脱时易脱落抗体; 而胍法制备的免疫亲和柱基本上是稳定的。

2.4 人肿瘤坏死因子的纯化 将人 TNF

的单克隆抗体与 HZ-QT6 偶联, 偶联率为 69%。人 TNF 基因工程产物粗品的免疫亲和层析图谱见图 2。测定生物活性^[9]发现, TNF

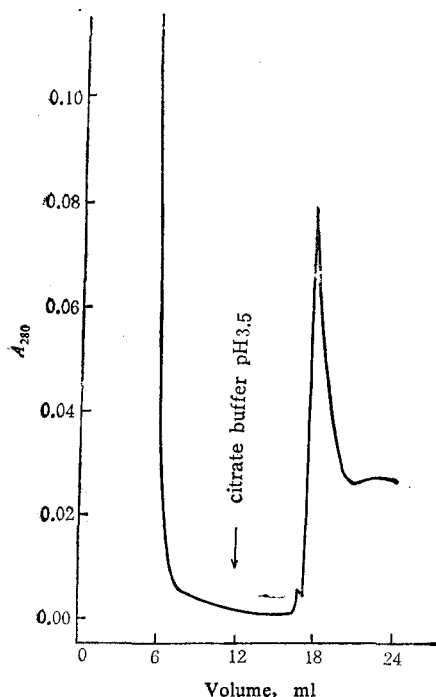


图2 肿瘤坏死因子的免疫亲和层析图谱

Fig. 2 Immunoaffinity chromatography of TNF

主要集中在柠檬酸缓冲液的洗脱液中, 纯化后 TNF 的比活性为 $1.25 \times 10^6 \text{U/mg}$, 是最初粗品的 5 倍。用 SDS 电泳鉴定蛋白质纯度, 电泳胶板 550nm 扫描图谱见图 3。提纯后的样品在电泳图上可见两条明显的条带, 分子量分别为 17.3kD 和 14.5 kD, 17.3 kD 蛋白是完整的 TNF 分子。因为 TNF 上有一位点极易被水解, 所以样品中有部分水解后的产物 14.5kD 片

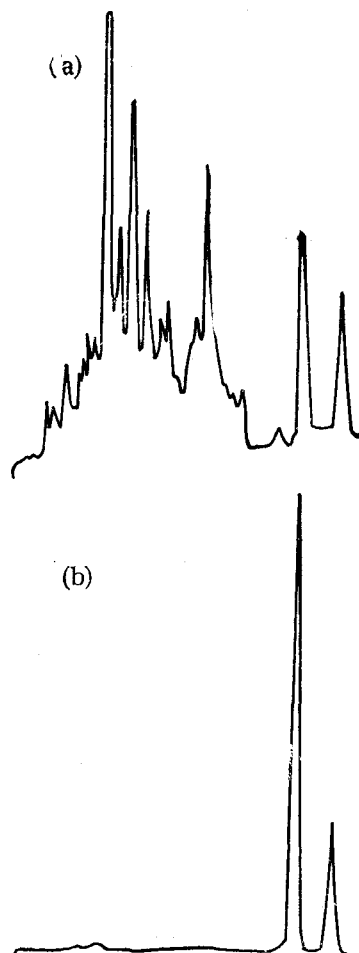


图3 肿瘤坏死因子的 SDS 电泳扫描图谱

Fig. 3 Scanning analysis of TNF on SDS-PAGE at 550nm

a: TNF 粗品. b: 提纯后 TNF 样品

(a) Crude TNF preparation (b) purified TNF

段存在, 它基本上保留了 TNF 的活性。原液中 17.3 kD 蛋白和 14.5 kD 片段分别占总蛋白的 5.25% 和 5.22%; 经免疫亲和层析纯化后,

表1 γ -干扰素的免疫亲和层析结果

Table 1 The result of immunoaffinity chromatography of γ -IFN

	蛋白质 protein (mg)	总活性 total activity ($\times 10^6 \text{U}$)	比活 specific activity ($\times 10^6 \text{U/mg}$)	纯化倍数 purification fold	回收率 recovery
γ -干扰素粗品 crude γ -IFN	10.2	2.52	0.25	1	100%
被洗涤掉的 γ -干扰素 γ -IFN washed	9.4	0.80	0.08	0.3	32%
洗脱的 γ -干扰素 γ -IFN eluted	0.3	0.88	2.75	11.2	35%

17.3 kD 蛋白和 14.5 kD 片段分别占总蛋白的 56.73% 和 32.78%，共计 89.5%。由电泳鉴定免疫亲和层析的纯化倍数为 8 倍左右。

2.5 人 γ -干扰素的纯化 将人 γ -IFN 的单克隆抗体与 HZ-QT6 偶联，偶联率达 96%。将含 γ -IFN 的 7 mol/L 盐酸胍菌裂解液，70 倍稀释后，进行免疫亲和层析。层析图谱见图 4。层析结果见表 1。提纯后的样品用 SDS 电泳鉴定，电泳胶板扫描分析图谱见图 5，

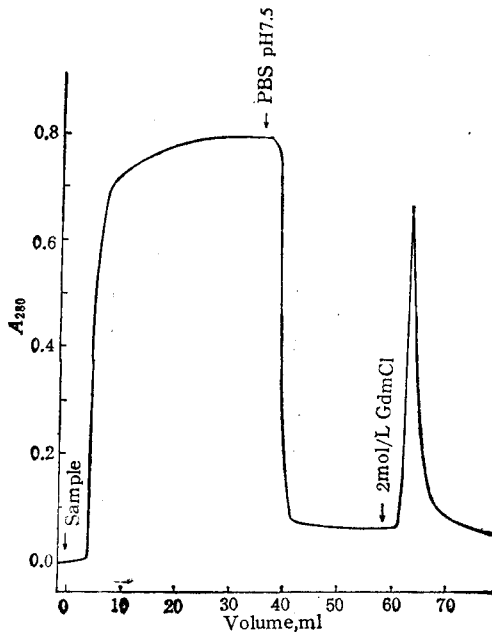


图 4 γ -干扰素的免疫亲和层析图谱

Fig. 4 Immunoaffinity chromatography of γ -IFN

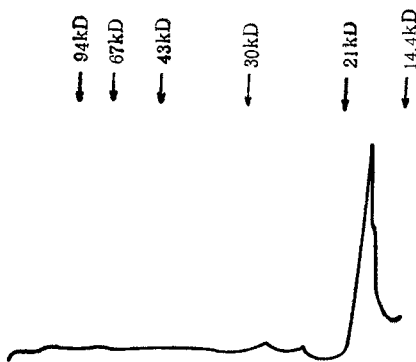


图 5 γ -干扰素的 SDS 电泳扫描图谱

Fig. 5 Scanning analysis of γ -IFN on SDS-PAGE at 550 nm

最明显条带分子量为 17kD 左右，与 γ -IFN 分子量一致，占总蛋白的 67% 左右。

2.6 人白细胞介素-2 的单克隆抗体柱层析 将人 IL-2 的单抗与 HZ-QT6 偶联，偶联率为 78%。人 IL-2 的基因工程产物粗品的免疫亲和层析图谱及生物活性测定结果见图 6。由图 6 可知，IL-2 的生物活性主要集中在洗脱液中，说明此柱对 IL-2 的吸附是有效的。

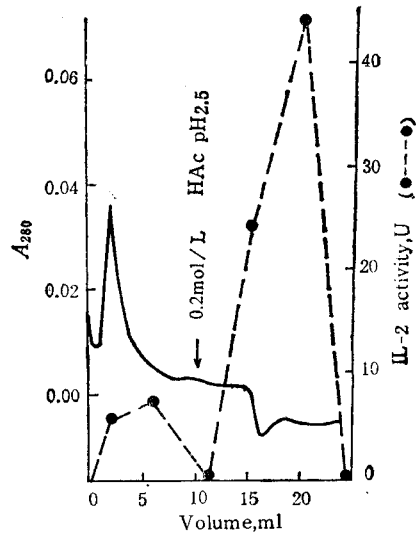


图 6 白细胞介素-2 的免疫亲和层析

Fig. 6 Immunoaffinity chromatography of IL-2

3 讨 论

抗体中的糖位于远离抗原结合位点的 Fc 段，不参与抗原的结合，因此，专一性地修饰糖基很少影响抗体的抗原结合活性^[10]。本文所用肼法是一种对糖特异的偶联方法，这样偶联上的抗体是定向的，大部分都保留了与抗原结合的活性。与溴化氰法相比，肼法制备的免疫亲和柱的容量较高，在酸性条件下也较稳定，这种新型免疫亲和柱的重复使用性较好。

本文实验中用自制含肼琼脂糖介质分别偶联了 TNF、 γ -IFN 和 IL-2 的单抗，制备了免疫亲和柱，并分离纯化相应基因工程产物抗原。肼法制备的 TNF 免疫亲和柱一步纯化基因工程产物 TNF 粗品，经电泳鉴定效果较好，

但酸洗脱对 TNF 的生物活性有影响,影响活性回收。影响免疫亲和层析效率的因素很多,具体对于某一生物活性分子来说,影响其活性的因素也很多,其层析条件需要摸索。溴化氰法制成的免疫亲和柱不稳定,单抗在洗脱时易脱落,造成产品被瘤细胞产生的单抗污染;而肼法制成的免疫亲和柱,不仅亲和效率高,而且稳定性强,这就克服了上述溴化氰法的缺点。

抗体与含肼载体的偶联取决于抗体中糖氧化产生的醛,而抗体中糖侧链的数目、长度或单糖的组成不同,所以不同的抗体偶联率不同,平均在 70% 左右。

含肼载体除与抗体偶联制备免疫亲和层析介质之外,还适用于其他糖蛋白、核苷、核苷酸和 RNA 的固定,因此,自制含肼琼脂糖介质的应用是可推广的。自制含肼琼脂糖介质可在 4℃ 保存数月,这为实验提供了方便。

自制含肼琼脂糖介质的配基含量同 Sigma

公司同类产品相当,而自制产品的成本只是进口产品价格的三十分之一左右,这可以为国家节约外汇,所以本研究还具有实际应用意义。

参 考 文 献

- 1 Stachelin T, Hobbs D S, Kung Hsiang-fu *et al.* *J Biol Chem*, 1981; 256(18): 9750
- 2 Shoji Oda, Shiroh Akinaga, Akiko Kumagai *et al.* *Hybridoma*, 1986; 5(4): 329
- 3 Axén R, Porath J, Ernback S. *Nature*, 1967; 214: 1302
- 4 Sanderson L, Porath J. *J Chromatogr*, 1974; 90: 87
- 5 Sanderson C J, Wilson D V. *Immunology*, 1971; 20: 1061
- 6 O'Shannessy D J, Quarles R H. *J Appl Biochem*, 1985; 7: 347
- 7 张龙翔,张庭芳,李令媛等.生化实验方法和技术.北京:高等教育出版社,1981: 55—60
- 8 张龙翔,张庭芳,李令媛等.生化实验方法和技术.北京:高等教育出版社,1981: 112—119
- 9 Rubin B Y, Anderson S L, Sullivan S A *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985; 82: 6637
- 10 Rodwell J D, Alvarez V L, Lee C *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986; 83: 2633

STUDY OF A NEW KIND OF IMMUNOAFFINITY CHROMATOGRAPHY MEDIA

Dong Jianying Yang Duan

(Department of Biology, Peking University, Beijing 100871)

ABSTRACT

Hydrazido-agarose was prepared and used for the site-specific immobilization of antibody. Antibody was oxidized with sodium periodate, resulting in the production of aldehyde on the carbohydrate moiety. The oxidized antibody was then reacted with the hydrazido-agarose to form stable hydrazone linkages. The method of immobilization resulted in an increased activity and stability of the bound antibody. TNF, γ -IFN and IL-2 were purified by chromatography on immunosorbents prepared with monoclonal antibodies using this method respectively. Their activities were tested.

Key words immunoaffinity chromatography media, hydrazido-agarose, TNF, γ -IFN, IL-2