

## 技术与方法

# 单克隆抗体亲和层析技术

李 勇 郑武飞

(天津医学院免疫学教研室)

亲和层析技术中用常规抗血清作配体时,由于抗血清成份复杂、亲和力多样化,特异性强的制剂又不易得,因而此层析技术的应用受到限制。单克隆抗体(McAb)技术的建立,为亲和层析技术的应用带来了突破。因为 McAb 作为亲和层析技术中的配体有以下几个优点:(1)可以利用粗制抗原制备分泌单一抗体的杂交瘤细胞株,在体外或体内大量生产 McAb;(2)由于 McAb 是针对单一抗原决定簇的,该决定簇是某一抗原物质所特有或是多种抗原物质所共有时,可没有任何交叉反应或有完全的交叉反应。由于抗原抗体的结合是单一决定簇的结合,在空间结构上非常微小的改变都会影响这种结合,因而易选择合适的条件,使抗原以单一的峰洗脱<sup>[1]</sup>;(3)本身结构和组成单一,便于研究其特性;(4)在制备过程中,可根据需要筛选并选择合适的抗体产生细胞株。所以,用 McAb 作配体的亲和层析,除具有一般亲和层析技术简单、快速、条件温和及可纯化小量物质等优点外,还具有特异性强、应用更广泛等长处。

本文就近年 McAb 亲和层析法的研究和应用综述介绍如下:

### 一、McAb 的固定

#### 1. CNBr-Sephrose 交联法:

McAb 亲和层析法,应用最多的是以溴化氰活化的 Sepharose (CNBr-Sephrose) 为载体进行交联。此法操作简单,而且有 CNBr-Sephrose 商品。用此法纯化了有的有: H-2<sup>d</sup> 抗原<sup>[2]</sup>、

IgG 亚类<sup>[3]</sup>、人神经胶质母细胞瘤所产生的纤维蛋白溶酶激活剂前体<sup>[4]</sup>、 $\gamma$ -干扰素<sup>[5]</sup>、C3b 灭活剂<sup>[6]</sup>等。但是此法所固定的 McAb 往往只能得到抗体理论活性的 5—10%<sup>[7]</sup>,其余的都在交联过程中被破坏。这是由于抗体分子与载体的交联是无方向性的多位点结合,很容易造成结合部位的破坏;这一方法的另一个大的缺点是非特异性吸附较严重。

#### 2. SPA-Sephrose 交联法:

为避免 CNBr-Sephrose 作载体的缺陷,有人采用 SPA (金黄色葡萄球菌蛋白 A) 化的 Sepharose (SPA-Sephrose)。SPA 可以与大部分 IgG 类或其它类 Ig 的 Fc 段发生特异性结合。由于 Fc 段和 SPA 是定向的结合,从而避免了由于抗原结合部位参加交联而产生的破坏作用;而且 SPA 本身的非特异吸附非常低,从而可以得到较高效的亲和柱。Lundblad 等<sup>[7]</sup>采用此法分离人尿中含葡萄糖的寡糖,而采用 CNBr-Sephrose 交联的载体只得到抗体计算能力的 6%。但此法也有局限性。首先,SPA 仅与 IgG 某些亚类有较高的亲和力,而且 SPA 与 IgG 亚类的亲和力差异很大,如大鼠、豚鼠、狗、猴等种动物的亚类在酸性和 NaSCN 存在的条件下,亲和力顺序为: IgG2c > IgG1 > IgG2b > IgG2a, 其中 IgG2b 只有极微弱的亲和力,而 IgG2a 根本不能结合<sup>[8]</sup>。再者,SPA 与 IgG 的结合对 pH 敏感,在抗原的洗脱过程中若用 pH 改变来进行洗脱,则可能连带 McAb 也被洗下。这样,亲和柱只能使用一次,

而且还要设法把这些抗体从样品中除去。关于 SPA 的性质,生物学活性以及固定化的 SPA 在免疫化学中的应用,文献中有详细的描述<sup>[9]</sup>。Schneider 等在分离膜蛋白时<sup>[10]</sup>,将 McAb 先与 SPA-Sepharose 颗粒进行吸附,然后用二甲基庚二亚胺酸盐交联,作成的亲和柱可在 pH11.5, 0.5% 脱氧胆酸钠的条件下洗脱抗原。不过交联过程也会使抗体有部分失活。

### 3. 生物素-亲合素交联法:

为克服 SPA-Sepharose 法的缺陷,有报道以生物素-亲合素 (biotin-avidin) 系统进行交联。Updyke 和 Nicolson<sup>[2]</sup> 采用链霉菌亲合素 (Streptavidin), 它是由 *Streptomyces avidinii* 分泌的一种分子量大约 60,000 的蛋白质,具有 4 个高亲和力的 ( $K_a \sim 10^4 M^{-1}$ ) 生物素结合部位。一旦与生物素形成复合物,只有在非常剧烈的条件下如高 pH 加上高浓度的去垢剂才可以解离。交联方法是: McAb 用修改的 Lerner 等人的方法先进行生物素化,将链霉菌亲合素交联于 Affi-Gel 15 上(也可以是其它载体),然后,先用链霉菌亲合素吸附去除待分离样品中生物素结合酶及游离生物素,再将样品和生物素化的 McAb (b-McAb) 保温,与 Streptavidin 交联洗去其它杂质以后,进行洗脱。纯化结果与 SPA-Sepharose 法的结果进行比较发现,对 I-A 抗原的分离效果对所用的这株与 SPA 有低亲和力的抗体来说,Streptavidin 较 SPA-Sepharose 优越得多;而对另一株与 SPA 有高亲和力的抗体比则区别不大。作者认为,Streptavidin 免疫亲和层析法的优点为:(1)小量的纯化 McAb 便可以在温和条件下被生物素化,而且抗体几乎不失活;(2)Streptavidin 基质可以用于吸附由不同 b-McAb 所形成的复合物,或者是生物素化的多克隆抗体、凝集素、激素、核酸及其它配体;(3)由于 Streptavidin 对 b-McAb 的亲合力高,只需少量即可以达到对抗原抗体复合物的吸附,从而避免了非特异性吸附作用的增加;(4)Streptavidin 在 4℃ 下保持 95% 以上生物素结合活性可达一年,它对许多试剂及理化条件如去垢剂、离子强度、pH 等稳定;(5)

b-McAb 也可以与不同商品出售的亲合素及链霉菌亲合素的酶、荧光染料或高电子密度分子等的复合物联合使用。

## 二、样品的吸附和洗脱

这也是得到理想分离效果的关键<sup>[11]</sup>。影响的条件包括 pH、离子强度、温度、去垢剂及促溶剂的种类和浓度等。Fornstedt 对此有专门的研究<sup>[11]</sup>。

目前文献多使用分段洗脱法,即杂蛋白洗脱后,改变缓冲液的 pH、离子强度或温度对样品进行洗脱。酸洗脱一般使用高 pH (pH11 或 pH 11.5) 或低 pH (pH2.5) 加上一定量的去垢剂如脱氧胆酸钠、Triton X-100 或促溶剂如 NaSCN 等。在洗脱后,一定要将 pH 立即调到中性,以防变性。改变离子强度如改变 NaCl 浓度,或与酸洗脱结合进行;对 SPA-Sepharose 所制备的亲和层析柱不仅要求对抗体抗原及其结合性质的了解,还应知道抗体 Fc 段与 SPA 结合的性质。如前所述,在许多情况下不能使用酸洗脱,因为大部分抗体种类在 pH4—6 时便从 SPA 上解离下来<sup>[8]</sup>。Lundblad 等研究针对 (Glc)<sub>4</sub> 的 McAb 时发现,此株抗体与抗原的结合对温度非常敏感,每下降 8℃,亲和常数增加 2 倍,37℃ 是  $8 \times 10^3 M^{-1}$ ,而 4℃ 是  $1.7 \times 10^5 M^{-1}$ 。他们用该株抗体吸附于 SPA-Sepharose 上对 [<sup>3</sup>H]-(Glc)<sub>4</sub> 进行亲和层析。在 4℃ 时进行吸附,大约 99% 的放射性被吸附于柱上,洗去杂质后,将温度升至 37℃,几乎 100% 的吸附上的放射性被洗下来<sup>[7]</sup>。此外,还有使用梯度洗脱的<sup>[5]</sup>。Le 等人用只针对活性  $\gamma$ -干扰素的一株 McAb P<sub>1</sub> 作亲和层析柱, $\gamma$ -干扰素先用 <sup>125</sup>I 标记的形式进行研究。虽然  $\gamma$ -干扰素在低 pH 条件下不稳定,但在不同 pH 洗脱的活性加起来也达到 81%,较单一 pH 条件下的回收率高。梯度的建立可参考 Peterson 1956 年所建立的方法。

## 三、McAb 的纯化

为了增强亲和层析的特异性,减少或消除

非特异性吸附, McAb 必须进行纯化。作为 McAb 来源的细胞培养上清或动物腹水都不同程度地掺杂了其它蛋白, 须根据抗体的种类和性质用不同的方法纯化。

**1. SPA-Sepharose 法** 此法也被用来对 McAb 进行亲和层析<sup>[12]</sup>。要注意的是不同抗体种类(特别是大鼠和小鼠的)对其亲和力差异很大。

**2. 高效液相层析<sup>[12]</sup>** 如可以在中性环境中通过离子交换和分子筛过滤的高效液相层析对小鼠抗体进行快速高效的分离纯化, 这较传统的离子交换或凝胶层析速度快, 而且 Ig 回收率也高(每 100ml 腹水约可收 100—300 $\mu$ g 纯化 Ig)。

**3. McAb 亲和层析法** Bazin 等<sup>[13]</sup>依据以下两个事实对大鼠 McAb 进行纯化: (1)大约 95% 的 Ig 轻链是 kappa 型; (2)大鼠的同种型抗原决定簇位于 kappa 型轻链的恒定区上。他们利用一株抗 Ig $\kappa$ -1a 同种型的 McAb 建立亲和层析。

**4. 羟基磷灰石柱层析** Stanker 等<sup>[14]</sup>以此法纯化提取 McAb, 可得高纯度的 IgG 和 IgM McAb。用 SDS-PAGE 检测, 无腹水白蛋白、转铁蛋白及其它杂蛋白的污染, 同时, 还可以使 McAb IgG 与腹水中的杂 IgG 分离。

**5. 用其它方法** 由于 McAb 属于蛋白质, 因此, 依具体情况可利用某些常规方法纯化 McAb。如有人采用 50% 硫酸铵沉淀结合凝胶层析<sup>[10]</sup>。

#### 四、McAb 对相应抗原的亲合力及 McAb 株的选择原则

亲和力是 McAb 应用时应考虑的重要因素<sup>[15,16]</sup>。它是选择抗体株和合适洗脱条件的重要依据<sup>[11]</sup>。亲和力太低, 则分离效果差(如解离常数大于 0.05M 的抗体则不能使用), 亲和力太高, 又要采用比较剧烈的条件(如高 pH、高浓度去垢剂等)才能将所要的物质从柱上洗下, 这常导致分离物质的变性及免疫学和生物学活性的丧失, 同时也会使 McAb 自身变性。

目前文献报道的许多 McAb, 对亲和力多已进行了测定<sup>[17,18]</sup>。方法如下: 先将定量的抗体抗原进行反应, 然后测定抗原抗体复合物或游离抗原抗体的量。用多相平衡观点对结果进行分析以得出亲和常数  $K$ 。基本方程为:

$$b = n \cdot (Ab) \cdot K \cdot [Ag]^a / (1 + K \cdot [Ag]^1)$$

式中  $b$  为结合抗体的浓度,  $n$  为抗体价数,  $(Ab)$  为抗体总浓度,  $K$  为结合常数,  $[Ag]$  为抗原平衡时的浓度。在最简单的情况下, 即不存在抗体的异质性 (McAb 是同质的) 以及结合位点之间无相互作用而不形成真实复合物 (genuine complex) 的情况下, 指数  $a$  为 1。结合参数则通过 Steward 和 Petty 所建立的方程进行直线转换:

$$1/b = 1/n \cdot K \cdot (Ab) \cdot [Ag] + 1/n \cdot (Ab)$$

或 Scatchard 法:

$$r/[Ag] = -r \cdot K + n \cdot K$$

其中  $r = b/(Ab)$

指数  $a$  则可以从 Sips 对数转换来得到:

$$\log [r/(n-r)] = \log K + a \cdot \log [Ag]$$

通过直线转换便可以得到  $K$ 。如有多复合物存在, 则直线可以有一定的弯曲, Jacobsen 等<sup>[16]</sup>采用计算机模型, 以描述此时可能发生的线性关系的热力学变化。

测定平衡时游离抗原抗体或免疫复合物的方法, 过去一般采用分离的方法<sup>[16]</sup>, 即抗原或抗体用同位素标记或荧光标记, 将免疫复合物与游离抗原抗体分离(中性盐沉淀或平衡透析等), 然后对标记的抗原或抗体进行定量。此法需大量纯化的不变性的抗原, 对不易得到纯化的抗原则不适用; 而且, 该法较繁。有人采用 ELISA 法以测定平衡体系中游离抗体的量<sup>[19]</sup>。作者指出, 从实际工作来说, 这种方法有以下几个优点: (1) 简便, 易于建立, 因此可快速重复进行优选不同的实验条件如温度、缓冲液组成及抗原类似物等。(2) 抗原和抗体的用量少。(3) 所得数据分散性非常小以及高度的可重复

性,使结果易解释。另外,从理论上讲,作者认为还有以下几个优点:(1)不需标记的抗原或抗体,从而避免了由于标记而产生的破坏作用。(2)由于 ELISA 高度的灵敏性,测定很低浓度的游离抗体是可能的。如可以容易地测定到  $10^{-9}M$  的解离常数。如果应用  $\beta$ -半乳糖苷酶系统以测定荧光代替光吸收的话,可能达到  $10^{-11}M$ 。(3)可以使用不纯化的 McAb。另外,间接 ELISA<sup>[20]</sup> 可以避免其它方法在测定游离抗原或抗体时造成的体系平衡的破坏,使结果更真实。

另外, Van Heyningen 等 1983 年曾提出一种简单的对针对同一抗原的多株 McAb 进行亲和力排序的方法,亲和力较高的用于 RIA、ELISA 等,较低的用于亲和层析。此方法依据的原理是:达到抗原抗体结合最大量的 50% 的抗体浓度越低则抗体的亲和力越高。这样便可以将同一抗原的 McAb 按亲和力高低加以排列,以便选择。这一方法可以在克隆的选择时便进行。

除亲和力外,McAb 的交叉反应性也是在选择时应该考虑的。

## 五、关于 McAb 的交叉反应性

由于 McAb 是针对抗原分子上单一抗原决定簇(一定构象的结构区域)的,若它只在某一种分子中存在,则对其它分子没有交叉反应;若这一决定簇为多种分子所共有(如不同物种体内物质的同源结构),则 McAb 对所有这些分子都可完全起反应。目前许多关于 McAb 新株的报道都有其特异性的描述<sup>[17,18]</sup>。有人也利用某株 McAb 对所分离的物质的交叉反应来纯化它,这样便扩大了 McAb 的应用范围<sup>[4,21]</sup>。如 Nielsen 等利用抗脲酶的 McAb 纯化了一种纤维蛋白溶酶激活剂前体,从而证明这种前体的存在;又如 Tigyí 等利用一株抗牛髓鞘碱性蛋白(MBP)的 McAb 对人的 MBP 进行了纯化,较使用传统的分离效果为好。

## 六、McAb 亲和层析的实际应用

此技术已在多方面应用,并取得较好效果,如(1)纯化细胞膜蛋白质:膜蛋白含量一般较少,且多具亲水和疏水两种特性,纯化较难,而 McAb 却可以较好地纯化它们。如 H-2 抗原和 HLA 抗原的纯化, C3b/C4b 受体的纯化等;(2)分离病毒衣壳蛋白:用抗 EB 病毒 gp340 衣壳抗原的 McAb 进行亲和层析,可得到毫克水平的抗原量<sup>[22]</sup>。(3)分离 IgG 亚类:免疫球蛋白各亚类之间的理化性质非常相似,用传统方法难以分离,而用 McAb 作亲和层析得到各 IgG 亚群的纯度都在 99% 以上<sup>[3]</sup>。(4)易失活物质的纯化:生物活性物质纯化步骤多、时间长、条件剧烈时,常导致其活性大部分丧失。比如传统方法分离补体 C3 抑制因子,需两周,活性回收最高只达 20%,而用 McAb 亲和层析仅需三天,收率达 70%<sup>[6]</sup>。 $\gamma$ -干扰素即使其对低 pH 不稳定用此法也得 81% 以上的活性回收率<sup>[9]</sup>;(5)未知物质的提纯和证实:McAb 亲和层析技术对不易检测的含量较少的未知物质的研究,更显示其优越性<sup>[4,23]</sup>。如从神经胶质母细胞瘤上清中分离出一种纤维蛋白溶酶激活剂前体而证实其存在。在此物质纯化以前知道病毒转化的鼠细胞可以释放一种分子量大约 48,000 的纤维蛋白溶酶激活因子,具有脲酶活性,但不能得到足够的纯化物以证实其前体的存在。Nielsen 等利用抗脲酶的 McAb 作亲和层析,得到纯化 831 倍、活性回收率 41%、分子量 52,000 的前体,从而证实其存在,并对其进行了研究<sup>[4]</sup>;(6)McAb 的纯化:在 McAb 应用的其它领域中同样要求纯化的 McAb 制剂,可用抗 Ig 的 McAb 作亲和层析以提取之;(7)其它难以用传统方法进行纯化的物质的纯化:如人 MBP 及尿抑胃素的纯化等。

## 结 语

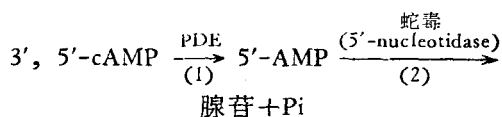
综上所述,McAb 应用于亲和层析技术,使之得到进一步发展。由于可以用粗制抗原制备,似乎所有生物分子都可以该法得到其 McAb,

## 一种快速可靠的 3', 5'-cAMP 磷酸二酯酶活力测定法

张林华 吴兆锋 刘秉文 蓝天鹤

(华西医科大学生物化学教研室, 成都)

磷酸二酯酶 (PDE; E. C. 3. 1. 4. 17.) 催化 cAMP 分解为 5'-AMP, 它与质膜上催化 cAMP 生成的腺苷酸环化酶配合, 共同控制细胞内 cAMP 含量. 因此, 观察 PDE 活力变化对于研究环腺苷酸在细胞代谢调控中的作用具有重要意义. PDE 活力测定多采用放射性同位素标记的 cAMP 为底物. 由于一般粗酶样品中同时存在多种 5'-核苷酸酶, 使 5'-AMP 分解而引起误差, 因此常将经 PDE 作用后生成的 5'-AMP 转化为腺苷测定. 基本反应如下.



将阴离子交换树脂直接加入反应液中, 吸附除去 cAMP 后, 离心取上清液测定腺苷的放射性, 即可代表 PDE 活性. 此法称作 "Batch" 技术<sup>[1]</sup>. 该法简便, 应用较广, 但水溶性体积较大, cAMP 与腺苷分离不全, 空白较高. 作者采用酸化树脂的方法, 调整实验条件, 避免了水溶性体积较大带来的不便, 建立了一种快速可靠的 PDE 测活方法.

### 一、材料与方 法

#### 1. 材料

<sup>3</sup>H-cAMP, 比放射性为 23 Ci/mmole, 放化纯度 95% (上海原子核所). 腺苷, Merck 公司

从而使可纯化的领域大为扩展. 加之较传统亲和层析更优越, 而具有广阔应用前景. 笔者认为, 不久这一技术将在对生物大分子结构和功能的研究中直接发挥作用. 同时, 和在其它方面的应用一样, 迫切需要对 McAb 理化及特定生物学性质的深入了解, 以建立更高效、快速、适应性强及应用更广泛的亲和层析方法.

#### 参 考 文 献

- [1] Hissey, P. H. et al.: *J. Immunol. Methods*, **78**, 211, 1985.  
 [2] Updyke, T. V. and G. L. Nicolson: *ibid.*, **73**, 83, 1984.  
 [3] Bird, P. et al.: *ibid.*, **71**, 97, 1984.  
 [4] Nielsen, L. S. et al.: *Biochemistry*, **21**, 6410, 1982.  
 [5] Le, J. et al.: *J. Immunol. Methods*, **69**, 61, 1984.  
 [6] Hsiung, L. M. et al.: *Biochem. J.*, **203**, 293, 1982.  
 [7] Lundblad, A. et al.: *J. Immunol. Methods*, **68**, 227, 1984.  
 [8] Lindmark, R. et al.: *ibid.*, **62**, 1, 1983.

- [9] Langone, J. J.: *ibid.*, **55**, 277, 1982.  
 [10] Schneider, C. et al.: *J. Biol. Chem.*, **257** (18), 10766, 1982.  
 [11] Fornstedt, N.: *FEBS*, **177**(2), 195, 1984.  
 [12] Perry, G. A. et al.: *Prep. Biochem.*, **14**(5), 431, 1984—85.  
 [13] Bazin, H. et al.: *J. Immunol. Methods*, **71**, 9, 1984.  
 [14] Stanker, L. H. et al.: *ibid.*, **76**, 157, 1985.  
 [15] Steward, M. W. and A. M. Lew: *ibid.*, **78**, 173, 1985.  
 [16] Jacobsen, C. et al.: *ibid.*, **50**, 77, 1982.  
 [17] Cook, J. et al.: *Mol. Immunol.*, **22**(5), 531, 1985.  
 [18] David, F. et al.: *ibid.*, **22**(3), 339, 1985.  
 [19] Li, C. K. N.: *ibid.*, **22**(3), 321, 1985.  
 [20] Friguet, B. et al.: *J. Immunol. Methods*, **77**, 305, 1985.  
 [21] Tigyi, G. J. et al.: *Mol. Immunol.*, **21**(10), 889, 1984.  
 [22] Randle, B. J. et al.: *J. Immunol. Methods*, **77**, 25, 1985.  
 [23] Chao, J. et al.: *Biochim. Biophys. Acta.*, **801**, 244, 1984.

[本文于 1985 年 4 月 17 日收到]