

## 单克隆抗体的等电聚焦

罗玉芳 丁锡申

(中国药品生物制品检定所,北京)

### 提 要

本文采用聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦和 Phast-System 仪等电聚焦测定 12 份 HBsAg McAb IgG 的等电点,并对两种方法测定的误差和优缺点进行了讨论。

等电聚焦是按蛋白质等电点的不同,在稳定 pH 梯度中分离的一种电泳方法,常用于测定蛋白质的等电点 (pI) 和鉴定蛋白质的纯度,此法灵敏度高,加样量少,分辨率好,能分开 pI 仅差百分之几 pH 的不同蛋白质。随着单克隆抗体 (McAb) 的广泛应用和深入研究,等电聚焦也成为分析检定 McAb 的方法之一。除测定 McAb 的等电点及分析其纯度和均一性外,可结合免疫印染等鉴别抗体的特异性成分,结合免疫固定检测融合杂交瘤细胞分泌的 IgG 和 IgM 抗体,筛选新的 McAb 细胞株<sup>[1]</sup>等。

本文采用聚丙烯酰胺凝胶 (PAG) 等电聚焦测定 12 份乙型肝炎表面抗原 (HBsAg) McAb IgG 的 pI, 并同瑞典 Pharmacia 公司的 Phast System 仪的测定结果作了比较。

### 材 料 和 方 法

(一) HBsAg McAb: HBsAg McAb IgG 本所疫苗二室研制提纯,其编号为 a<sub>1</sub>、a<sub>2</sub>、a<sub>3</sub>、a<sub>4</sub>、a<sub>5</sub>、a<sub>6</sub>、a<sub>7</sub>、a<sub>8</sub>、a<sub>9</sub>、a<sub>11</sub>、F<sub>4</sub>、S-6 载体两性电解质, Serva 公司的 Servalyt 40% pH3—10, 军事医学科学院生产的两性电解质 40% pH 3—9.5。其他化学试剂皆为分析纯级。

(二) 聚焦电源 LKB2297MACRO-DRIVE 5。冷却仪 LKB2219MULTITEMP II Thermostatic Circulator; 电泳槽,北京东方仪器厂 DF-9 夹心冷却循环垂直槽; pH 测定采用瑞

士 METROHM654-pH Meter。

(三) 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 参照 Leammli (1970) 的方法<sup>[2]</sup>进行,分离胶浓度为 10%。

(四) PAG 等电聚焦。

1. 凝胶板的制备 50% 甘油 3.6ml, 30% 丙烯酰胺-0.8% 甲撑双丙烯酰胺 3ml, 40% Servalyt pH3—10 0.9ml, 无离子水 10.4ml, TEMED 36 $\mu$ l, 混匀抽气,再加 10% 过硫酸铵 64 $\mu$ l, 混匀,缓缓加入已装配好,并有 60% 甘油 2ml 作底层的电泳槽中,插入样品孔梳,制备厚 1.5mm 的凝胶板,室温聚合,取出样品梳,撕去防漏的玻璃纸,排除底层的甘油液。

2. 预电泳 在每一样品孔中各加入 10 $\mu$ l 4 倍稀释的样品液 (8% Servalyt pH3—10-40% 甘油-甲基红少许) 保护胶面,于上槽(负极)注入 0.01mol/L 乙二胺,下槽(正极)注入 0.01mol/L 磷酸, 200V、10—15 $^{\circ}$ C 电泳 30 分钟。

3. 加样 取含 McAbIgG 4—5 $\mu$ g 的样品与样品液以 3:1 混合,加入样品孔,其中有 2—3 孔不加样品,只加 4 倍稀释的样品液,聚焦后,切取作 pH 梯度测定用。

4. 聚焦 以恒功率 4W 在 10 $^{\circ}$ C 聚焦 4 小时。

5. 样品的 pI 聚焦完毕,取出凝胶纵切下准备作 pH 梯度测定的无样胶条,再从负极至正极横切成 1cm 长的胶段,分别置于小管中,顺

序编号,并加无离子水 1ml,冰箱过夜,次日测 pH,以距离作横坐标, pH 值为纵坐标,绘出 pH 梯度曲线,然后根据样品的迁移距离查取相应的 pH 值。

6. 固定、染色、脱色、干燥 将聚焦后有样品的凝胶加固定液 (57.5g 三氯醋酸和 17.3g 磺基水杨酸加水溶解至 500ml) 浸泡 1 小时以上,用 10% 乙醇-10% 醋酸洗两次,每次 10 分钟,按常规用考马斯亮蓝染色、脱色和干燥。

(五) Phast System 等电聚焦。Phast System 是瑞典 Pharmacia 公司 1986 年间世供电泳和染脱色的一种快速、自动电泳装置,它配有各种电泳用的 PAG 薄层胶片(Phast Gel),

用于等电聚焦的 Phast Gel IEF pH3—9, IEF pH 5—8 和 IEF pH4—6.5 三种,本文报告应用 IEF pH3—9 的结果。等电聚焦的全部操作完全按该仪器的说明书进行。已知等电点 (pI) 蛋白标志物也系该公司产品。

## 实验结果

(一) HBsAg McAb IgG 的 PAG 等电聚焦

图 1a 和 b 为 12 份 HBsAg McAb IgG 和人白蛋白的等电聚焦,可看出每份 McAb IgG 聚焦后的主要区带一般都呈清晰、致密、纤细和迁移率很相近的区带丛,各样品有自己的 PI 范围,不完全相同,与文献报道一致<sup>[3,4]</sup>。形成多带谱

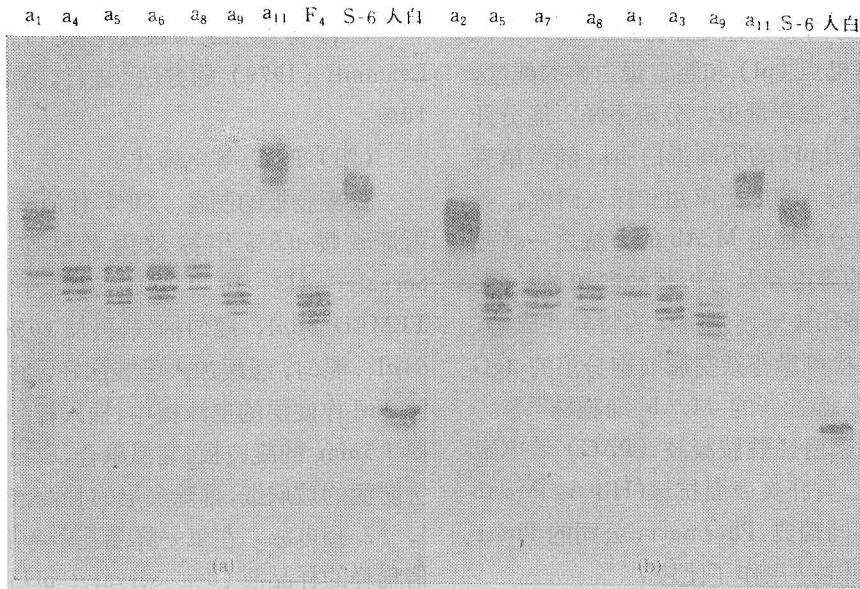


图 1 HBsAg McAb IgG 的 PAG 等电聚焦

a: a<sub>1</sub>, a<sub>4</sub>, a<sub>5</sub>, a<sub>6</sub>, a<sub>8</sub>, a<sub>5</sub>, a<sub>11</sub>, F<sub>4</sub>, S-6 和人白蛋白的等电聚焦。  
b: a<sub>2</sub>, a<sub>5</sub>, a<sub>7</sub>, a<sub>8</sub>, a<sub>1</sub>, a<sub>3</sub>, a<sub>9</sub>, a<sub>11</sub>, S-6 和人白蛋白的等电聚焦。

的原因是 McAb IgG 分子间在结构上仍有细微的差异,能检出这种差异正显示了等电聚焦的高分辨能力,12 份 HBsAg McAb IgG 的 pI 范围列于表 1,可看出虽有高低之别,但都在 pH 5.5--7.8 之间。

McAb IgG 尽管皆来自小鼠,分子量也皆大约为 160000,但当采用普通 PAGE 分析时,常见其迁移距离有远有近,本实验检测的样品也不例外,见图 2。根据以上测定的 pI 范围,我

们发现 pI 低的迁移远, pI 高的迁移近, pI 相近,迁移距离也相似,从而可推知 McAb IgG 在 PAGE 上迁移距离的远近与其 pI 的高低有密切的关系。

(二) HBsAg McAb IgG 的 Phast System 等电聚焦

图 3A 和 B 是应用 Phast System 仪以 Phast Gel IEFpH3—9 的胶片对 12 份 HBsAg McAb IgG 进行的等电聚焦,可看出聚焦的谱带

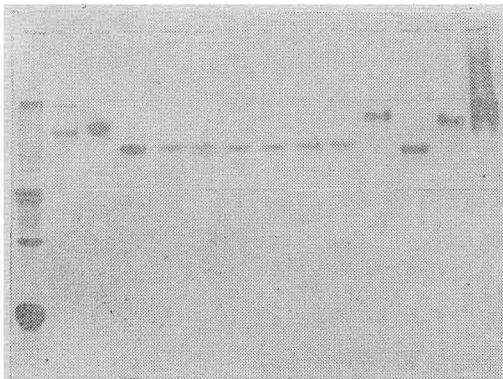
表1 HBsAg McAb IgG 的等电点

样 品	PAG 等电聚焦		Phast System IEF pH3-9
	Servalyt pH3-10	国产两性电解质 pH3-9.5	
McAbIgG a <sub>1</sub>	pH 6.7-7.0	pH 6.9-7.3	pH 6.3-6.7
a <sub>2</sub>	6.8-7.4	—	6.1-6.9
a <sub>3</sub>	5.8-6.4	5.9-6.4	5.95-6.25
a <sub>4</sub>	6.0-6.9	6.1-6.5	5.85-6.25
a <sub>5</sub>	5.8-6.4	6.1-6.5	5.95-6.25
a <sub>6</sub>	5.8-6.4	6.0-6.5	5.95-6.25
a <sub>7</sub>	5.8-6.4	6.0-6.5	6.0-6.25
a <sub>8</sub>	5.8-6.4	6.3-6.5	6.0-6.25
a <sub>9</sub>	5.6-6.4	5.4-6.4	5.8-6.1
a <sub>11</sub>	7.3-7.8	7.6-8.2	7.0-7.45
F <sub>4</sub>	5.5-6.0	5.3-6.4	5.7-6.2
S-6	6.9-7.5	7.4-8.0	6.8-7.1
人白蛋白	4.76±0.06	4.8±0.1	—

## 讨 论

(一) PAG 等电聚焦和 Phast System 等电聚焦测定 McAb IgG 的 pI 值出现误差的原因,是因为与二者所用的试剂和聚焦条件不同有关,如聚焦的温度不同,影响就很大,前者是 10°C,后者是 15°C。Fredriksson (1978)<sup>[3]</sup> 指出 pI 为碱性的蛋白质,在 4°C 比在 25°C 测定可高 0.6pH,而 pI 低的蛋白质的 pI 受温度影响较小。强碱性蛋白质 pI 随温度变化的关系是 -0.03pH/°C, pI 低的仅为 -0.005pH/°C。这可能是 PAG 等电聚焦测定结果偏高的原因之一,另外不同厂家的载体两性电解质对同一蛋白质的聚焦结果也有区别,如图 5 和图 1 皆同是 12 份 McAb IgG 的 PAG 等电聚焦,除图 5 为国产两性电解质,图 1 为 Servalyt 外其余条件完全相同,聚焦结果有明显的差异,前者不仅各样品的 pI 偏高,而且区带数和区带间的疏密程度也不一样。

(二) 两种等电聚焦法的优缺点比较。使用 Phast System 仪,加样量少,自动化程度高,操作简易、快速、加样-聚焦-染脱色可在两小时内完成,重复性好,但价格昂贵;PAG 等电聚焦,虽费时,但凝胶可自制,仪器也可用国货,如也采用已知 pI 标志物测 pH 梯度,同样可得



A a<sub>1</sub> a<sub>2</sub> a<sub>3</sub> a<sub>4</sub> a<sub>5</sub> a<sub>6</sub> a<sub>7</sub> a<sub>8</sub> a<sub>9</sub> a<sub>11</sub> F<sub>4</sub> S-6 M

图2 12份 HBsAg McAb IgG 的 PAGE

A 为 SP2/0 瘤株腹水, M 为鼠 IgG。其余皆为 HBsAg McAb IgG。

形状和 PAG 等电聚焦基本一致。样品 pI 的测定法是先测量各已知 pI 标志物至负极端距离,再与其 pI 在坐标纸上绘出胶片的 pH 梯度曲线(图 4),然后再量取各样品至负极端的距离,在曲线上查取相应的 pH 值,结果见表 1,可以看出 12 份样品 pI 的高低顺序是 a<sub>11</sub> > S-6 > a<sub>1</sub> > a<sub>2</sub> > a<sub>3</sub>、a<sub>4</sub>、a<sub>5</sub>、a<sub>6</sub>、a<sub>7</sub>、a<sub>8</sub> > a<sub>9</sub> > F<sub>4</sub> 与 PAG 等电聚焦法基本一致,但具体数值除个别样品外皆相对偏低,特别是 pI 高的样品差别更大,原因留待下面讨论。

到准确的结果，至少在目前对大多数实验室更 适用。

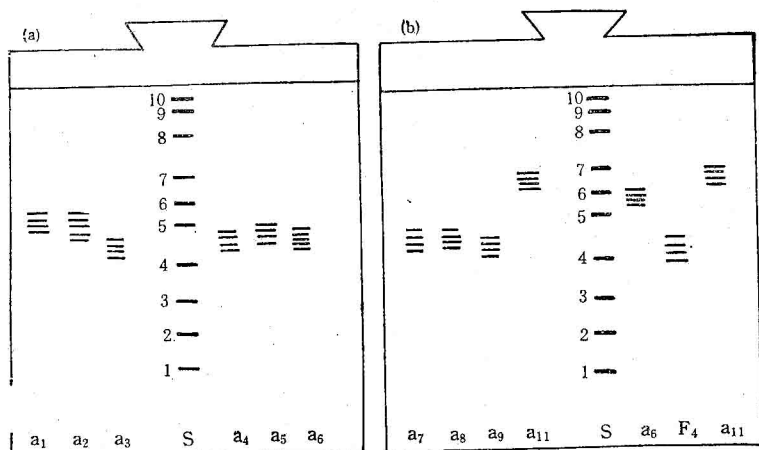


图3 HBsAg McAb IgG 的 Phast System 等电聚焦

a: a<sub>1</sub>、a<sub>2</sub>、a<sub>3</sub>、a<sub>4</sub>、a<sub>5</sub>、a<sub>6</sub>、为 HBsAg McAb IgG, S 为已知 pI 标志物, 见图 4  
b: a<sub>7</sub>、a<sub>8</sub>、a<sub>9</sub>、a<sub>11</sub>、F<sub>4</sub>、S-6 为 HBsAg McAb IgG, S 同 A。

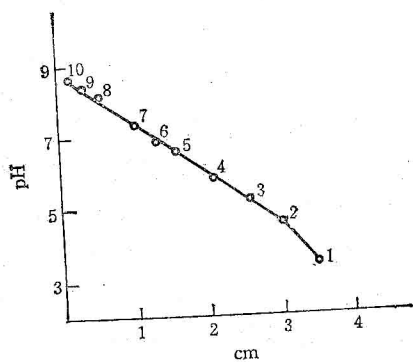


图4 Phast Gel IEFpH3-9 胶片的 pH 梯度曲线

1. 淀粉糖苷酶 pI 3.50
2. 豆腐酶抑制剂 pI 4.55。
3. β-乳球蛋白 A pI 5.20
4. 牛碳酸酐酶 B pI 5.85
5. 人碳酸酐酶 B pI 6.55
6. 马肌红蛋白酸性带 pI 6.85
7. 马肌红蛋白碱性带 pI 7.35
8. 扁豆血凝素酸性带 pI 8.15
9. 扁豆血凝素中间带 pI 8.45
10. 扁豆血凝素碱性带 pI 8.65

### 参 考 文 献

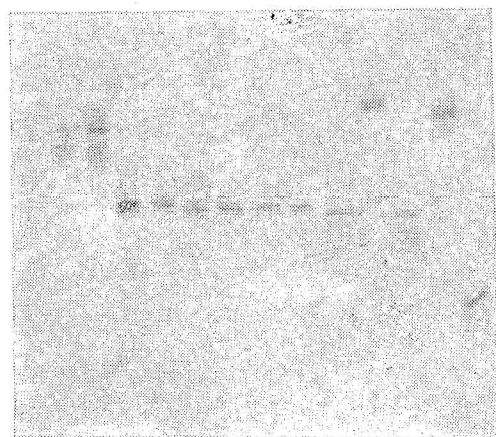


图5 国产两性电解质对 HBsAg McAb IgG 的等电聚焦

图中标号即 HBsAg McAb IgG 的编号

- [2] Leammli, U. K.: *Nature* (London) 1970, 227, 680.
- [3] Awdeh, Z. L. et al.: *Nature* 1968, 219, 66.
- [4] Leaback, D. H. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1979, 32, 467.
- [5] Fredriksson, S.: *J. Chromatography*, 1978 151, 347.

[1] Sweden LKB: *Application Note*, 317.

[本文于 1987 年 12 月 31 日收到]

(上接第 68 页)

- [3] Giudicelli, J. et al.: *J. Immunol. Methods*, 1982, 54, 43.
- [4] Rychly, J. et al.: *Neoplasma*, 1984, 31, 57.
- [5] 孙玲等: «生理学报», 1985, 5(2), 120.
- [6] Smith, B.A. et al.: *J. Immunol.*, 1978, 120, 921.
- [7] Rychly, J. et al.: *Cell Electrophoresis*, Walter de Gruyter, Inc., Berlin, New York, 1985, 479-481.

[本文于 1987 年 10 月 24 日收到]