

# 一种快速纯化单克隆抗体的方法 ——阴阳双层离子交换层析法

施 维 彭彩霞 刘成贵

(解放军总医院生化科单克隆研究室,北京)

## 提 要

本文介绍了一种纯化单克隆抗体的方法——阴阳双层离子交换层析法。利用这种方法从小鼠腹水中分别得到了比较纯的、活力损失较少的二种抗结肠癌单克隆抗体: 3B<sub>3</sub>McAb 和 2C<sub>10</sub>McAb, 取得了比较理想的效果。

**关键词** 单克隆抗体, 离子交换层析

杂交瘤技术的建立为肿瘤的诊断、治疗以及相关抗原的研究提供了一个新的手段。但在众多的研究中首先遇到的问题就是单克隆抗体的纯化问题, 因为不论是小鼠腹水还是血清中, 除含有杂交瘤所分泌的单抗外, 还含有多种蛋白<sup>[1]</sup>。为提高单抗的应用价值, 就需对腹水或是血清进行纯化, 以得到高纯度、高免疫活性的单克隆抗体。目前纯化单克隆抗体的方法有多种, 但因各种单抗的理化性质的差异, 而提取方法的效果也有所不同。较为普遍采用的有免疫亲和层析法, 如蛋白 A 亲和层析法<sup>[2]</sup>, 该方法提取单抗的纯度高, 操作步骤简捷, 但有成本高, 有时影响纯化单抗的免疫活性等缺点。高压液相层析法是近年来发展比较快的纯化方法, 它提取单抗的纯度高, 但不易被推广, 而且对样品的质量要求较高。我们利用单克隆抗体具有带电荷的均一性特点, 设计了一双层离子交换方法, 一次去掉等电点大于和小于单抗 pI 的大部分杂蛋白, 而得到较纯的, 活力损失较少的单克隆抗体。该方法纯化单抗具有简单、快速、廉价等特点, 适于推广。

## 材 料 与 方 法

### 1. 阴阳离子交换层析柱的制备

我们设计了一种能同时载有两种离子交换树脂的层析柱(见图 1), 下层装经处理过的 CM-G50 阳离子交换树脂, 上层装 DEAE-52 阴离子交换树脂, 经缓冲液平衡后待用。

### 2. 单抗的纯化

取含有 3B<sub>3</sub>McAb (或 2C<sub>10</sub>McAb) 的小鼠腹水约 2ml 上阴阳离子交换层析柱, 用 pH 值为 8.0 的 0.005mol/L 缓冲液进行离子梯度洗脱, 收集第一峰。

### 3. 单抗的鉴定

#### (1) PAGE 电泳检测单抗纯度<sup>[3]</sup>

聚丙烯酰胺凝胶厚为 1.5mm, 分离胶  $T = 7.5\%$ , 浓缩胶  $T = 3\%$ , 电泳缓冲液: 0.192 mol/L Gly、0.025 mol/L Tris, pH8.3 系统。纯化的单抗样品经电泳后, 再固定, 考马斯亮蓝染色、脱色, 最后在 570nm 处用光密度计扫描确定蛋白带的纯度。

#### (2) SDS-PAGE 电泳检测单抗分子量<sup>[4]</sup>

基本上按 Laimmli 方法, 标准蛋白选用瑞典 Pharmacia 公司生产的产品, 分子量范围在 2.9—20.5 万道尔顿。

#### (3) 单抗的免疫活性鉴定

取结肠癌组织切片, 加不同稀释倍数的待测单抗纯品, 37℃ 保温 30 分钟, 冲洗, 加 FITC

标记的羊抗鼠 IgG 抗体 (1:500), 37°C 保温 30 分钟, 重复洗涤, 镜检。产生荧光为阳性。

## 结 果

### 1. 阴阳双层离子交换层析柱的设计

如图 1 所示, 阴阳双层离子交换层析柱是由两个直径不同的层析柱叠加起来而组成的, 这样使一个层析柱具有两种离子交换树脂的层析功能, 而且也能使两种树脂分别回收, 重复使用。

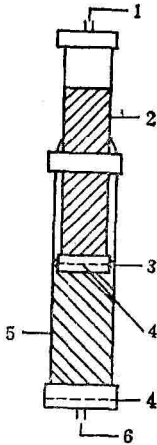


图 1 双层离子交换层析柱设计图

- ① 进口; ② DEAE-52; ③ 胶圈; ④ 尼龙网;  
⑤ CM-G50; ⑥ 出口

### 2. DEAE-CM 双层离子交换层析法提取 3B<sub>3</sub>McAb 的层析图谱

将含 3B<sub>3</sub>McAb 的小鼠腹水上 DEAE-CM 层析柱后, 选用 pH 为 8.0、0.005 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液进行离子梯度洗脱, 见图 2, 其中第一峰为 3B<sub>3</sub>McAb 峰。

### 3. 单抗的纯度及分子量的鉴定

我们将 DEAE-CM 层析法纯化的 3B<sub>3</sub>McAb 与 DEAE 层析法和 Protein A 亲和层析法纯化的样品做 PAGE 电泳, 进行了纯度比较。见图 3。从结果中看出, 我们所建立的 DEAE-CM 层析法提取的 3B<sub>3</sub>McAb 其纯度与 Protein A 法的相似, 单抗纯度都在 90% 以上, 而 DEAE 层析法提取的 3B<sub>3</sub>McAb 纯度则低于 50%。

为进一步证明所提取的蛋白是单抗, 我们

又对单抗样品进行了 SDS-PAGE 电泳分析, 见图 4, 其中 c 为 3B<sub>3</sub>McAb, 从结果上看, 经巯基乙醇作用, 将单抗分子裂解成轻链和重链,

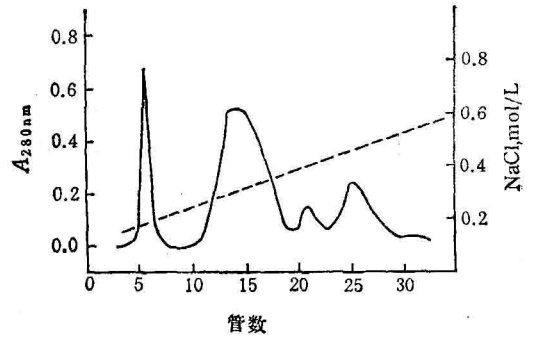


图 2 3B<sub>3</sub>McAb 经 DEAE-CM 柱的离子梯度洗脱图谱  
峰 1 为 3B<sub>3</sub>McAb; --- 为 NaCl 浓度梯度

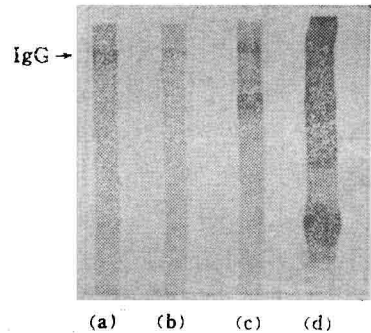


图 3 PAGE 电泳鉴定 3B<sub>3</sub>McAb 纯度结果  
(a) Protein A 法 (b) DEAE-CM 法  
(c) DEAE 法 (d) 原腹水

轻链的分子量为 2.56 万道尔顿, 重链的分子量为 6.26 万道尔顿, 3B<sub>3</sub>McAb 分子量为 17.6 万道尔顿。结果与 IgG 分子相符合。

### 4. 单抗的免疫活性比较

经 DEAE-CM 层析法提纯的 3B<sub>3</sub>McAb 其免疫活性与原腹水中的 3B<sub>3</sub>McAb 相似, 而 Protein A 法提纯的 3B<sub>3</sub>McAb 与原腹水中 3B<sub>3</sub>McAb 相比其免疫活性低一个滴度, 这说明 Protein A 亲和层析法对 3B<sub>3</sub>McAb 的免疫活性有一定的影响。

以上结果表明: 阴阳双层离子交换层析法是一种具有廉价、快速、纯化效率较高、易于大

量制备及推广的纯化单抗的方法。

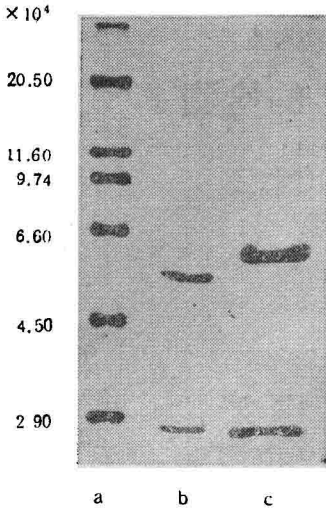


图4 单抗 SDS-PAGE 电泳图谱

(a) 标准蛋白 (b) 2C<sub>1</sub>McAb (c) 3B<sub>3</sub>McAb

## 讨 论

目前较为被普遍采用的纯化单克隆抗体的方法是 Protein A 亲和层析法,该方法具有简单、快速、纯化效率高等特点,但据 Larry H. Stanker 等人介绍,该方法有时影响单抗的活性<sup>[1]</sup>,而且成本也较高。1987年 Paolo Gallo 用 HR-5/5 Mono Q 做支持物的快速蛋白液相层析系统(FPLC)纯化单克隆抗体,得到了

比较理想的结果<sup>[5]</sup>。同年, A. Jungbauer 等人用 SP-TSK-5PW 柱子的 High-Performance cation-exchange chromatography 纯化单抗,其纯度为 99%<sup>[6]</sup>,但以上两种方法的操作步骤较繁琐,仪器设备昂贵,不易于推广。国外有人先用 DEAE 阴离子交换层析纯化单抗样品,之后再经 CM 阳离子交换层析,这种两步层析法与我们设计的一次法相比,有操作较繁琐、周期长等缺点。

等电聚焦结果显示,除 McAb 带外还有少量其它蛋白带。而 A. Jungbauer 等人的 HPLC 纯化的单抗其等电聚焦电泳也有其它杂蛋白带存在。

本文得到了陈湘教授、周贵民教授的亲切指导和帮助,同时沈文梅主任给予了大力支持,在此表示衷心的感谢。

## 参 考 文 献

- 1 Stanker L H *et al.* *J Immunol Methods*, 1985; **76**: 157
- 2 Ey P L *et al.* *Immunochemistry*, 1978; **15**: 429
- 3 莽克强等。聚丙烯酰胺凝胶电泳。北京: 科学出版社, 1975
- 4 Laemmli U. *Nature (London)*, 1970; **227**: 680
- 5 Paolo Gallo *J Chromatogr*, 1987; **416** (1): 53
- 6 Jungbauer A *et al.* *J Chromatogr*, 1987; **397**: 313

[本文于 1989 年 1 月 3 日收到]

## 食用蛋白粉生产可行性分析报告

——北京市星火技术研究所提供(5551 与)

目前国内生产粉丝和玉米淀粉的厂家,在提取淀粉后,原料中的绝大部分蛋白质混悬在粉水中,因没有合适的提取技术,大部分厂家的粉水只能廉价出售或白白扔掉,给厂家带来不少的经济损失。本技术采用粉水制取粉水蛋白,其适用性相当广泛,可作酱油、味精、复合氨基酸、食用酵母的原料,也可作为饼干、馒头、面包、挂面、蛋卷的蛋白添加剂。设备投资 1—2.5

万元,生产蛋白粉成本 300—350 元/吨,产品出厂价为 1500 元/吨,年收益 21—63 万元。资料费 10 元。

本生产可行性报告内容包括:产品市场情况、所需原料、设备、投资及效益分析、工艺流程、技术转让方式、技术转让方地址、电话、联系人、转让费等。

汇款处:北京 867 信箱 20816 组李群,邮政编码:100024。