

小鼠单克隆抗体的纯化

朱 美 财

(军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850)

提 要

本文综述了小鼠单克隆抗体 IgG 及 IgM 的各种纯化方法及其优缺点。对于不同类型的抗体, 根据其应用目的可采用相应的纯化方法。

关键词 小鼠, 单克隆抗体, 纯化

自从 1975 年应用细胞融合技术首次获得单克隆抗体以来, 杂交瘤技术得到了迅速发展。单克隆抗体被广泛应用于免疫学、生物化学、药理学、细胞生物学、微生物学及临床。目前已制备了小鼠、大鼠及人的杂交瘤细胞株, 但应用最广泛的仍然是小鼠杂交瘤细胞株。由于小鼠杂交瘤细胞含有小鼠免疫球蛋白的基因, 所分泌的单克隆抗体类型与正常小鼠血清中的免疫球蛋白相同。常见的小鼠单克隆抗体免疫球蛋白类型是 IgG 及 IgM, 其中 IgG 包括 IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b} 及 IgG₃ 四个亚类。细胞培养上清液或腹水中含有大量的污染蛋白, 必须将抗体纯化以满足其结构与功能研究的需要。纯化单克隆抗体常用的方法大部分是基于正常小鼠血清免疫球蛋白的纯化衍化而来, 由于单克隆抗体与正常小鼠免疫球蛋白的理化性质不完全相同, 所以单克隆抗体的纯化方法有其特殊性。本文将有关纯化小鼠单克隆抗体 IgG 及 IgM 的方法介绍如下。

一、腹水的处理

从小鼠腹腔中收集到的腹水离心去除细胞后冰冻保存。纯化前将冻存的腹水融化, 过滤去除大的凝块及脂肪滴, 离心去除细胞残渣及小的颗粒物质。由于贮存或冻融会再产生固体物质所以此步需在进一步纯化之前进行。

二、沉淀技术

免疫球蛋白通常包含在 30—50% 饱和硫酸铵浓度时的沉淀中^[1]。顺序增加饱和硫酸铵浓度如 30, 35, 40, 45, 50% 可使抗体得到相对高的纯度。不同的抗体将在不同浓度饱和硫酸铵条件下发生沉淀。单独应用硫酸铵沉淀不能得到很纯的抗体, 需结合其它方法进一步纯化。分级沉淀比较烦琐, 在其它纯化步骤之前通常直接用 50% 饱和硫酸铵沉淀抗体, 这样可使 90% 以上的 IgG 得到回收^[2], 并使其浓缩在很小的体积之内。硫酸铵沉淀优先去除了大部分大分子量蛋白及酸性蛋白 (包括白蛋白)。经 50% 饱和度硫酸铵沉淀后的抗体去除了腹水中含有的纤维蛋白降解产物, 这些产物可引起亲和凝胶层析柱的不可逆性阻滞^[3], 所以硫酸铵沉淀有助于延长亲和凝胶层析柱的寿命。但要注意对于某些单克隆抗体硫酸铵沉淀能引起抗体活性的降低或丧失。

应用于单克隆抗体的沉淀技术还有聚乙二醇沉淀^[4]及辛酸沉淀^[5]。聚乙二醇沉淀可使 IgM 单克隆抗体达到高的产率及纯度; IgG 的产率高, 但纯度仅有 30—40%。辛酸使污染蛋白沉淀, 在上清中回收的 IgG 占总 IgG 的 60—80%, 纯化的抗体含有少量的白蛋白及其它蛋白污染, 其优点与硫酸铵沉淀相比主要是减少

了抗体聚合。另外,利用 IgM 在低离子强度缓冲液中发生沉淀的特性可使其部分纯化^[6]。

三、离子交换层析

1. 阴离子交换层析 由于小鼠 IgG 有广泛的等电点,应用 DEAE 离子交换层析纯化正常小鼠 IgG 时既要得到很高的产率又要得到很高的纯度是不可能的。但是应用 DEAE 离子交换层析纯化小鼠单克隆抗体是简单而有效的方法。Parham 等^[6]报道了小鼠单克隆抗体 IgG₁ 的纯化方法。DEAE 纤维素柱(DE-52, Whatman)以 5mmol/L Tris-HCl(pH7.5)平衡,以 0—100mmol/L NaCl 线性梯度洗脱抗体,大部分单克隆抗体结合到柱上并在前半部分梯度洗脱下来,许多污染蛋白包括白蛋白结合到柱上直到以 0.5mol/L NaCl 净化柱时才洗脱下来。DE-52 在没有竞争性蛋白存在时对 IgG 的最大结合容量是 50mg/ml,为了获得高浓度的 IgG 可用含 100mmol/L NaCl 的缓冲液洗脱 DEAE 柱。Manil 等^[2]报道了 IgG₁ 及 IgG₂ 的 DEAE 离子交换层析, IgG₁ 于 80mmol/L Cl⁻ 浓度时洗下 84%, IgG₂ 于 60mmol/L Cl⁻ 时洗脱下 81%。IgG_{2a} 可用更低离子强度的缓冲液洗脱,以低离子强度洗脱纯化的 IgG_{2a} 单克隆抗体无转铁蛋白污染,其纯度与抗原免疫亲和层析水平相当^[7]。许多单克隆抗体尤其是 IgG_{2b}、IgG₃ 及某些 IgG₁ 在低离子强度下易发生沉淀,为了获得高产率的抗体,可以将沉淀上柱,将 DEAE 纤维素柱预先以 5mmol/L Tris-HCl(pH8.0)平衡,以 0—0.5mol/L NaCl 梯度洗脱。随着离子强度的增高抗体又回到溶液中,并产生一尖峰,产率很高,但抗体纯度较差^[3]。近年来生产了许多新的 DEAE 离子交换层析支持介质如丙烯酰胺(DEAE-Bio gel)、琼脂糖(DEAE-Sepharose)及串珠状的纤维素(DEAE-Sephacel),由于它们容量大、重复性好、使用方便可优先选用。

阴离子交换层析对 IgM 单克隆抗体回收率差^[3],它非常牢固地结合到离子交换柱上。

2. 阳离子交换层析 Carlsson 等^[8]报道了

在 SP-Sephadex G-50 柱上进行阳离子交换层析的方法。IgG₁、IgG_{2a}、IgG_{2b} 及 IgA 在 pH4.0—5.0 缓冲液中几乎完全结合于柱上。洗下的免疫球蛋白部分可进一步经凝胶过滤去除少量的污染蛋白,抗体产率为 45—97%。Menozzi 等^[9]报道了用 SP Zetaprep 阳离子交换层析从细胞培养上清中纯化 IgG₁ 的方法,以 0.1mol/L Tris-HCl(pH8.0)缓冲液 NaCl 浓度梯度洗脱, IgG₁ 于 250mmol/L NaCl 浓度时洗脱下来,无污染蛋白。

四、凝胶过滤

硫酸铵沉淀的抗体以 PBS 溶解后上 Sephadex G-200 柱可观察到三个蛋白峰^[6]。最高峰中含脂质及 IgM, 另外两个峰含 IgG 及血清蛋白。对于含高浓度特异性 IgG 的腹水沉淀来说, IgG 纯度可达 90% 以上。用正常离子强度 PBS 洗脱 Sephadex G-200 柱分离到的 IgM 部分含有污染蛋白。若以低离子强度缓冲液平衡凝胶过滤柱,以含高离子强度缓冲液洗脱, IgM 部分呈一高峰最后洗脱下来。纯化的 IgM 不含巨球蛋白及 IgG 等污染蛋白,产率为 50—80%^[10]。改变凝胶的性质,使用 Sephacryl S300 及 S200 可得到更好的效果。

五、羟基磷灰石层析

羟基磷灰石层析法简单快速,能够提供相对纯的小鼠 IgG 及 IgM 单克隆抗体^[2,11,12]。Bio-Gel HT 或 HTP (Bio-Rad) 羟基磷灰石柱以 10mmol/L PB(pH6.8)平衡,以 10—300mmol/L PB(pH6.8)洗脱, IgG 及 IgM 在 150—210mmol/L PB 之间洗下,抗体回收 80—90%。以 0—0.3mol/L NaCl 梯度洗脱, IgG 在低于 300mmol/L Cl⁻ 的不同浓度洗下,抗体活性回收 47—70%。羟基磷灰石层析纯化的单克隆抗体含有不同程度的白蛋白及转铁蛋白污染,层析图形重复性差。

六、蛋白 A-Sepharose 亲和层析

免疫球蛋白与蛋白 A 的结合是高度 pH 依

赖性的^[13]。小鼠单克隆抗体在 pH8.0 缓冲液中 IgG_{2a} IgG_{2b} IgG₃ 几乎全部结合于蛋白 A 柱上, 而 IgG₁ 则表现为不同的结合力^[2,14]。纯化 IgG_{2a} IgG_{2b} IgG₃ 单克隆抗体时可分别以 pH4.5 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液洗下 IgG_{2a}, 以 pH3.5 缓冲液洗下 IgG_{2b}。IgG₃ 于 pH4.0 缓冲液中同 IgG_{2a} 一起洗下。纯化 IgG₁ 单克隆抗体时, 若在 pH8.0 缓冲液中大部分抗体结合于蛋白 A 柱上, 可用 pH6.0 柠檬酸缓冲液洗脱; 若在 pH8.0 缓冲液中大部分抗体不结合于蛋白 A 柱上, 可先将腹水进行 DEAE 层析纯化后再进行蛋白 A 亲和层析^[2]。若不明确抗体的类型, 可用 pH3.5 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液或含 0.15mol/L NaCl 的 0.1mol/L 乙酸溶液将全部 IgG 从蛋白 A 柱上洗脱下来。用酸性溶液洗下的抗体必须立即中和以保护抗体活性。用蛋白 A 亲和层析纯化的抗体纯度很高, 有时含有极微量的蛋白污染。当以低 pH 缓冲液洗脱 IgG 时可使其发生部分降解。因此应当尽可能应用高 pH 的缓冲液洗脱抗体。另外, 有人认为 IgG₁ 对蛋白 A 结合的差异性是由 IgG₁ 存在着 2—3 个亚类所致^[14]。Stephenson 等^[15]还报道了小鼠单克隆抗体在蛋白 A 柱上的不均一性洗脱, 建议不管是否已知单克隆抗体亚类均以 pH3.5 缓冲液洗脱回收抗体。

七、免疫亲和层析

根据抗原抗体反应的原理可以将抗原固相化以纯化其特异性的单克隆抗体。大分子抗原如蛋白质、核酸可直接偶联到溴化氰活化的 Sepharose 4B 上, 小分子抗原可以通过中间臂或载体偶联到 Sepharose 4B 上^[16-18]。若偶联的配基是半抗原或已知其抗原决定簇时, 可用游离的半抗原或抗原类似物将抗体特异地洗脱下来。非特异性洗脱方法包括(1)改变 pH, 即使 pH 升高或降低; (2)降低极性剂; (3)离液序列高的离子; (4)尿素或盐酸胍。某些洗脱剂可引起抗体的变性, Lim^[16]发现 3mol/L KSCN 洗脱时使 IgM 单克隆抗体活性全部丧失而不使 IgG 单克隆抗体失活, 甘氨酸-HCl(pH2.5)

缓冲液不能洗下任何抗体, 碱性洗脱剂 0.1mol/L 甘氨酸-NaOH ± 50% (V/V) 乙二醇(pH11.0) 可使 38% 的 IgM 得到回收。Kitagawa 等^[17]报道 5% 二甲亚砜(pH10.7) 含 0.5mol/L NaCl 可使 90% 的 IgM 单克隆抗体得到回收。以酸性洗脱剂洗下的抗体需立即中和至中性, 以高浓度 KSCN 洗下的抗体应立即除盐以减少抗体的变性。用抗原免疫亲和层析纯化的单克隆抗体, 其产率与抗原抗体亲和力有关, 其纯度一般均很高, 可用于抗体分子结构的研究。有时抗体中含有部分非特异性吸附产物可通过增加平衡液中 NaCl 浓度使其减少或消失。

八、高效液相层析 (HPLC)

应用离子交换剂、羟基磷灰石、凝胶等介质作柱填充剂结合 HPLC 技术可用于单克隆抗体的纯化。Burchiel 等^[19]与 Clezardin 等^[20]报道了应用 Mono Q 离子交换层析柱纯化小鼠单克隆抗体的方法。应用离子交换层析柱从腹水中一次纯化的单克隆抗体 IgG 含有不同程度的污染蛋白, 需更换梯度或用凝胶过滤及疏水基相互作用柱进一步纯化。抗体经硫酸铵沉淀后再进行 HPLC 可得到更高的纯度。对于 IgM 单克隆抗体也可进行两步纯化^[21], 其纯度可达 90% 以上, 避免了巨球蛋白污染。用 HPLC 方法纯化的抗体有时含有正常小鼠腹水免疫球蛋白的污染, 可联用几种柱层析方法将具有活性的抗体特异地纯化。

九、其他方法

等电聚焦技术可用来从小鼠腹水中纯化单克隆抗体^[22], 其优点是(1)操作快速(3—5h)、(2)不损害抗体、(3)可分离相对大量的单克隆抗体(1—30mg)、(4)纯化的抗体无正常鼠 IgG 的污染、(5)产率高, 但需要特殊的制备性等电聚焦装置。亲和凝胶蓝是一种交联的琼脂糖凝胶含有具反应性的 F3GA 染料, 对各种蛋白具有不同的亲和性, 可用于纯化 IgG 单克隆抗体^[23], 结合凝胶过滤也可用于纯化 IgM 单克隆抗体^[24]。Mather 等^[25]报道从 SDS 凝胶中应

用电转移技术回收了有活性的单克隆抗体。

随着杂交瘤技术的发展及其广泛应用,许多新技术、新方法已应用于单克隆抗体的纯化。由于小鼠单克隆抗体类型多及各种纯化方法的局限性,迄今为止还没有一种方法能够满足不同目的的需要。因此,在纯化之前明确单克隆抗体的类型有助于抗体的纯化。若纯化的抗体用于功能研究,那么对 IgG 单克隆抗体采用硫酸铵沉淀结合 DEAE 离子交换层析或蛋白 A 亲和层析法纯化,对于 IgM 单克隆抗体采用硫酸铵沉淀结合凝胶过滤或羟基磷灰石层析法纯化,均可满足要求。如果用于研究单克隆抗体分子结构,那么必需使抗体达到高度均一性,并且排除非特异性抗体的污染。对于免疫抑制的小鼠其腹水不含自身抗体或应用去除免疫球蛋白的牛血清培养液均可结合上述方法得到高纯度的特异性抗体。若腹水中含有自身抗体,应采用免疫亲和层析法纯化。高效液相层析及制备性等电聚焦也可用于获得抗原特异性的单克隆抗体。但二者均需特殊的装置,且费用昂贵。

本文承蒙孙曼昇教授、阎国珍副教授审校,特此致谢。

参 考 文 献

- 1 Parham P. *Immunogenetics*, 1981; 13: 509
- 2 Manil L, Motte P, Pernas P *et al. J Immunol Methods*, 1986; 90: 25
- 3 Goding J W. *J Immunol Methods*, 1980; 39: 300
- 4 Neoh S H, Gordon C, Potter A *et al. J Immunol Methods*, 1986; 91: 231

- 5 Russo C, Callegaro L, Lanza E *et al. J Immunol Methods*, 1983; 65: 269
- 6 Parham P, Androlewicz M J, Brodsky F M *et al. J Immunol Methods*, 1982; 53: 133
- 7 Smith J A, Margolies M N. *Biochemistry*, 1984; 23: 4726
- 8 Carlsson M, Hedin A, Inganas M *et al. J Immunol Methods*, 1985; 79: 89
- 9 Menozzi F D, Vanderpoorten P, Dejaiffe C *et al. J Immunol Methods*, 1987; 99: 229
- 10 Bouvet J P, Pires R, Pillot J. *J Immunol Methods*, 1984; 66: 299
- 11 Stanker L H, Vanderlaan M, Juarez-Salinas H. *J Immunol Methods*, 1985; 76: 157
- 12 Bukovsky J, Kennett R H. *Hybridoma*, 1987; 6: 219
- 13 Ey P L, Prowse S J, Jenkin C R. *Immunochem*, 1978; 15: 429
- 14 Villemez C L, Russell M A, Carlo P L. *Molecular Immunology*, 1984; 21: 993
- 15 Stephenson J R, Lee J M, Wilton-Smith P D. *Anal Biochem*, 1984; 142: 189
- 16 Lim P L. *Mol Immunol*, 1987; 24: 11
- 17 Kitagawa Y, Sasaki T. *J Immunol Methods*, 1987; 96: 7
- 18 Margolies M N, Rothstein A M, Geftter M L. *Mol Immunol*, 1981; 18: 1065
- 19 Burchiel S W, Billman J R and Alber T R. *J Immunol Methods*, 1984; 69: 33
- 20 Clezardin P, Macgregor J L, Manach M, *et al. J Chromatogr*, 1985; 319: 67
- 21 Clezardin P, Hunter N R, Macgregor I R, *et al. J Chromatogr*, 1986; 358: 209
- 22 Rosebrough S F, Grossman Z D and McAfee J G. *Immunology Letters*, 1986; 12: 147
- 23 Bruck C, Portetelle D, Glineur C, *et al. J Immunol Methods*, 1982; 53: 313
- 24 Johnson E, Miribel L, Arnaud P, *et al. Immunology Letters*, 1986/1987; 14: 159
- 25 Mather S and Joyce T P. *Biochem Biophys Res Commun*, 1985; 133: 1020

[本文于 1989 年 7 月 6 日收到]

B92 号稻壳制饲料技术

近年来,由于粮食大量减产,使得饲料原料紧缺,产品脱销。稻壳制成饲料,将大大缓解饲料紧缺现象。生产所需厂房 100m²,主要设备为粉碎机、蒸煮釜、糖化罐、配料缸,需水电,投资 0.5—1 万元便可投产。原料成本 0.15 元/斤,售价 0.30 元/斤,利润 0.1 元/斤以上。若日产 1 吨,半年内即可收回全部投资,适合乡

镇、家庭企业上马。培训费:单位 500 元,个人 390 元;函授:单位 200 元,个人 99 元。

本培训班常年招生,面授、函授均可。如函授不会可来京面授,面授时减去已付函授费。汇款及通信处:北京 867 信箱 20816 组李群,邮码:100024,乘车路线:北京站乘 9 路车在呼家楼换乘 350 路到平房东口站下车 400 米发明城内,电话:5009194。