

一种简单、快速、量大的辛酸纯化单克隆抗体法

叶群瑞 陈伯权 吴美英

(中国预防医学科学院病毒学研究所, 北京 100052)

提 要

用国产辛酸从 BALB/C 鼠腹水中纯化单克隆抗体, 该法有简单、快速和经济等优点。pH 3.6—4.6 不影响单克隆抗体的纯度, 最小辛酸用量为 22 $\mu\text{l}/\text{ml}$ 腹水, 且以加辛酸之后再加硫酸铵二步法为佳。

关键词 辛酸, 纯化单克隆抗体

单克隆抗体 (Monoclonal Antibody MAb) 现已广泛应用于生命科学的许多领域, 特别是在医学上的诊断和治疗。MAb 主要来源于细胞培养的上清液和动物的腹水, 常常在不同程度上混杂非抗体蛋白和脂类物质, 为消除实验研究中的一些非特异性干扰, 特别是在治疗时, 应避免由杂蛋白引起人体的变态反应, 必须对其纯化。目前有许多提纯方法, 如亲和层析、离子交换等。但本文介绍的是一种能从鼠腹水中大量提取, 简单、快速有效和经济的纯化 MAb 方法。

材 料 和 方 法

一、化学试剂 正辛酸 (caprylic acid, (化学纯, 北京医药供应站), 硫酸铵 (化学纯, 北京化学试剂三厂), DEAE 纤维素-32 (Whatman 产品)

二、生物试剂 乙脑病毒 MAb 51-8 (本室建株, IgG2a)^[1], 乙脑病毒 SA14 抗原片 (本室自制), 兔抗 BALB/C 鼠 IgG 荧光抗体 (卫生部生物制品所)。

三、方法

1. 腹水制备 从液氮中快速复苏杂交瘤细胞, 37°C, CO₂ 孵箱培养成片后, 吹打成悬液, 注入预先注射过降植烷 (priston) 的 BALB/C

鼠腹腔内, 10—15 天后, 无菌收取腹水, 离心, 上清加 1% 抗生素, 置 +4°C 备用。

2. 辛酸法 按 Reik 等^[2]方法, 略加变动, 基本步骤如下。

10ml 腹水 + 20ml 0.06 mol/L 醋酸缓冲液 (pH 4.0) 用盐酸调 pH 至 4.8

↓ 加 330 μl 辛酸

室温, 搅拌 30min
离心, 10000r/min 30min, 5°C

↓
上清对 0.01 mol/L Na-K 磷酸缓冲液透析 (pH 7.2) 4°C 过夜

↓
加等量饱和硫酸铵, 搅拌 30min
离心, 10000 r/min, 30min, 5°C 去上清

↓
用 0.01 mol/L 磷酸缓冲液 (PBS, pH 7.2) 重悬, 对 PBS (pH 7.2) 透析, 4°C, 过夜

↓
离心, 8000r/min, 15min, 5°C,
上清分装冻 -20°C 备用

3. DEAE 纤维素-32 柱层析法 按文献 [3] 方法。分别用 0.10 mol/L, 0.15 mol/L, 0.20 mol/L NaCl 洗脱。

4. 硫酸铵法 按文献 [4] 方法

5. 鉴定方法

1) 荧光法 按文献 [5] 方法检查提纯后样品的活性, 用间接荧光法。

2) SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法 (SDS-PAGE) 按 Laemmli^[6] 方法, 浓缩胶和分离胶

分别为 3% 和 10%。

结 果

一、几种提纯方法的比较 结果见表 1, 辛酸法对 MAb 活性几乎无影响, 蛋白回收率比硫酸铵法要低些, 可硫酸铵法使 MAb 的活性损失一半以上。从对 MAb 的活性影响来看, 辛酸法比硫酸铵法好。

表 1 辛酸、硫酸铵、DEAE-32 三种方法比较

	蛋白含量 (mg/ml)	荧光滴度	蛋白回 收率 (%)	活性回 收率 (%)
腹 水	16.0	1:2000	100	100
辛 酸	8.0	1:2000	50	100
硫酸铵	12.0	1:500	75	25
DEAE-32 ^{0.10mol/L}	1.5	1:500	9.48	25
0.15mol/L	ND	<1:10	—	—
0.20mol/L	ND	<1:10	—	—

注: ND: 未做。

从 SDS-PAGE 来看 (见图 1), 51-8 腹水有大约 10 条蛋白带, 硫酸铵提纯的样品有 4 条蛋白带, 而辛酸法提纯的样品只有 2 条带, (1 条是重链, 另 1 条是轻链所在位置。DEAE-32

柱层析法以 0.10 mol/L NaCl 洗脱的样品有 5 条带, 0.15 mol/L NaCl 洗脱的有 4 条带, 0.20 mol/L NaCl 洗脱的有 1 条带。从活性的保留和纯度来看, 辛酸法比硫酸铵和 DEAE-32 方

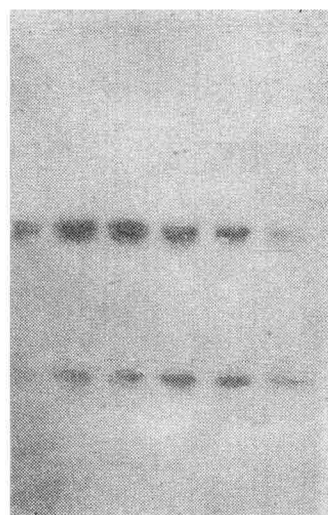


图 2 不同 pH, 辛酸提纯 MAb 的 SDS-PAGE

1. pH 3.6 2. pH 3.8 3. pH 4.0 4. pH 4.2
5. pH 4.4 6. pH 4.6

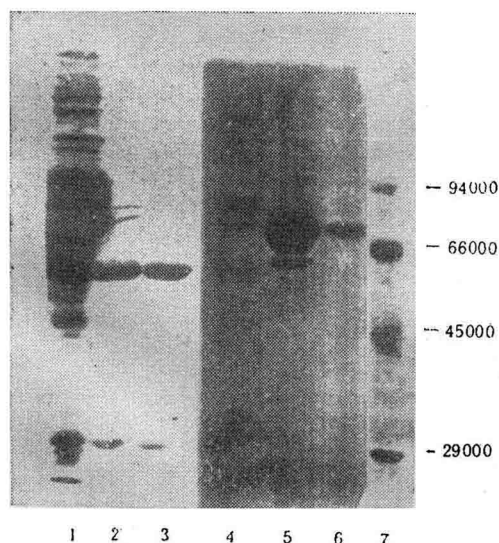


图 1 辛酸、硫酸铵、DEAE-32 三种方法的 SDS-PAGE 比较

1. 腹水 2. 硫酸铵 3. 辛酸 4. DEAE-32 0.10 mol/L NaCl 5. DEAE-32 0.15 mol/L NaCl 6. DEAE-32 0.20 mol/L NaCl 7. 标准蛋白标记

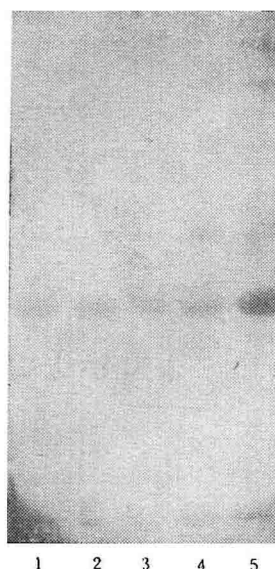


图 3 不同辛酸量提纯 MAb 的 SDS-PAGE

1. 33 μl 辛酸/ml 腹水 2. 22 μl 辛酸/ml 腹水
3. 11 μl 辛酸/ml 腹水 4. 5.5 μl 辛酸/ml 腹水
5. 腹水

法好。

二、辛酸法最佳条件的研究 按辛酸法的基本条件,我们重点比较了不同 pH (见图 2),不同辛酸量 (见图 3),单用辛酸不用硫酸铵的一步法 (见图 4),以及辛酸加硫酸铵的二步法 (见图 3) 可以看出,不同 pH (3.6—4.6) 对 MAb 的纯度都无多大影响。而辛酸量对 MAb 的纯度有影响,每 ml 腹水所用辛酸量低于 22 μ l 时,有些杂蛋白无法去除。无论是不同 pH

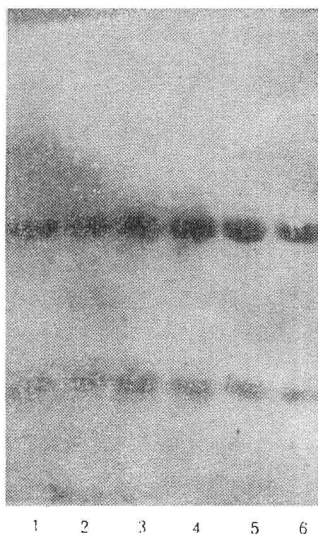


图 4 单用辛酸不用硫酸铵提纯 MAb 的 SDS-PAGE

1. pH 3.6 2. pH 3.8 3. pH 4.0
4. pH 4.2 5. pH 4.4 6. pH 4.6

或不同辛酸量提纯的 MAb,其活性都没有很大的改变。单用辛酸不用硫酸铵的提纯法不如用辛酸之后再用硫酸铵的纯度好,而在用辛酸之前或之后用硫酸铵的影响不大。

讨 论

到目前为止,还未见国内有人报道用辛酸

从腹水中纯化 MAb,国外学者 Rosso^[7] 于 1983 年首创辛酸提纯 MAb,1987 年,Reik 等人^[2]报道辛酸加硫酸铵对纯化免疫球蛋白 IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, 都非常有效,认为用辛酸之后再加硫酸铵能有效的去除残余的白蛋白,我们的实验也证明了这一点,他们报道 IgG 的回收率可达 50—80%,我们用国产辛酸提纯的 MAb,回收率也在 50% 左右。

辛酸提纯 MAb 的最大优点是能够大量从腹水中纯化 MAb,并且药品用量很小,Reik 报道提纯 100 ml 腹水,需 3.3ml 辛酸,而我们的研究表明只需 2.2ml 就足够,且 pH 变化对提纯 MAb 没什么影响。与柱层析法相比,该法省去了柱子部分的操作,减少了制备柱子时污染 MAb 的机会。对大量样品来说,该法与亲和层析离子交换柱,羟基磷灰石或 HPLC 柱层析相比比较经济,因柱材料较贵以及需要柱子监测设备。与硫酸铵法相比,该法对 MAb 的活性损失小的多,且纯度更高。因此,我们建议用国产辛酸作为提纯 MAb 的基本方法之一。

参 考 文 献

- 1 陈伯权等. 中国医学科学院学报, 1983; 5(4): 201
- 2 Reik L M *et al.* *J Immunol Methods*, 1987; 100: 123
- 3 中国医学科学院流行病学防治研究所编. 常见病毒病实验技术. 北京: 科学出版社, 1978: 120—122
- 4 杜平主编. 医用实验病毒学. 北京: 人民军医出版社, 1985: 119—120
- 5 中国医学科学院流行病学防治研究所编. 常见病毒病实验技术. 北京: 科学出版社, 1978: 55
- 6 Laemmli U K *et al.* *Nature*, 1970; 227: 680
- 7 Rosso C *et al.* *J Immunol Methods*, 1983; 65: 269

[本文于 1990 年 1 月 31 日收到, 3 月 30 日修回]