

研究报告

重组人 Fab 金属螯合层析法纯化条件的研究*

朱迎春 王 琰 刘群英 化 冰 高荣凯

(海军总医院中心实验科, 北京 100037)

摘要 在重组人 Fab (rh Fab) 表达载体的羧基端插入六个组氨酸, 使其对金属螯合层析介质产生特异性吸附, 可用金属螯合亲和层析法进行分离纯化. 采用自制金属 (铜、锌金属离子) 螯合层析介质, 以 pH 和咪唑两种洗脱方法, 对 rh Fab 段的纯化效果进行了探讨. 结果显示: 铜离子螯合层析介质比锌离子螯合层析介质对 rh Fab 的亲和能力更强; pH 洗脱方法的重复性优于咪唑法; 金属铜离子螯合层析法对 rh Fab 进行一步纯化可得到纯度大于 95% 的 rh Fab 产品.

关键词 组氨酸, 乙肝病毒表面抗原 (HBsAg), 重组人 Fab, 金属螯合亲和层析

单克隆抗体 (McAb) 以其独特的性质在基础和临床医学中得到了广泛应用, 基因工程抗体研究的进展使抗体工程技术发展到了新的阶段^[1]. Fab 段, ScFv 等小分子抗体在大肠杆菌表达的成功提供了新的抗体制备手段, 对抗体制品的纯化成为制备抗体的关键步骤之一. 纯化单克隆抗体常采用免疫亲和层析或离子交换层析法. 前者需要大量纯化的特异性抗原以制备免疫亲和层析柱, 后者的选择性较差, 常需用不同层析介质进行多次层析. 金属螯合层析法可对一些含组氨酸、半胱氨酸等氨基酸的蛋白质进行分离纯化^[2,3]. 以分子生物学或基因工程方法将聚组氨酸片段引入目的蛋白质, 然后以金属螯合层析法将其分离纯化, 再用生物学方法或化学方法将组氨酸片段去除, 则可以很方便地将目的蛋白纯化. 国际上有人尝试在抗体分子片段上加一聚组氨酸片段, 用金属螯合层析法进行纯化取得了较好的效果^[4,5]. 本室也成功地构建了含六个组氨酸的抗乙肝病毒表面抗原 (HBsAg) 的重组人 Fab 段并对其进行了初步纯化^[6]. 本文用快速蛋白液相色谱仪 (FPLC), 采用自制的金属螯合层析介质, 选用铜、锌两种金属离子用 pH 梯度, 咪

唑梯度对 rh Fab 段的纯化进行了比较研究, 建立了 rh Fab 段的纯化方法, 为基因工程抗体的制备开发提供了有效的手段.

1 材料和方法

1.1 仪器

快速蛋白液相色谱仪 (FPLC) (Pharmacia 公司).

1.2 实验材料

含六个组氨酸的抗 HBsAg 人 Fab 段基因及其表达载体为本室构建^[6,7]; 金属螯合层析介质, 本室自制^[2].

1.3 实验方法

1.3.1 可溶性 Fab 段的表达: 可溶性 Fab 段的表达同参考文献 [6, 7]. 在对可溶性 rh Fab 段进行纯化时, 将 100 ml 经 IPTG 诱导后的大肠杆菌培养上清用 50% 饱和硫酸铵进行沉淀, 离心弃上清, 将沉淀 2 ml 溶解, 对层析平衡液进行充分透析后备用.

1.3.2 rh Fab 段的 ELISA 检测、同参考文献 [6, 7].

* 国家“863”计划资助项目.

收稿日期: 1996-03-12, 修回日期: 1996-07-19

1.3.3 金属螯合亲和层析 (IMAC): a. 金属铜螯合亲和层析: 将自制螯合层析介质装柱后 (柱体积 1.5 ml) 以五倍柱体积的 0.1 mol/L CuSO₄ 过柱吸附铜离子, 然后用 20 mmol/L (PBS) 的磷酸盐缓冲液 (含 1 mol/L NaCl, pH 6.5) 充分平衡, 样品经 20 mmol/L PBS (pH 6.5, 1 mol/L NaCl) 透析后上柱. 用 FPLC 分别采用 pH 梯度及咪唑梯度法对其纯化. b. pH 梯度洗脱法: 样品上柱后, 用 pH 6.5 至 3.5 的 20 mmol/L PBS (1 mol/L NaCl) 进行线性洗脱, 按 1 ml/管自动收集洗脱液, 对各洗脱峰进行活性检测, 并将各洗脱峰收集组分, 用 10% 三氯醋酸浓缩后进行 SDS-PAGE 电泳鉴定蛋白质纯度. 洗脱活性峰对水透析, 冷冻干燥, 4℃保存. c. 咪唑梯度洗脱法: 样品上柱后, 用 10 mmol/L、20 mmol/L、30 mmol/L、40 mmol/L、50 mmol/L、60 mmol/L、80 mmol/L、100 mmol/L 咪唑 (溶于 20 mmol/L PBS, pH 6.5, 1 mol/L NaCl) 进行梯度洗脱, 对洗脱峰测定 rh Fab 的活性及纯度. d. 金属锌螯合亲和层析纯化 rh Fab: 将亲和层析介质 (1.5 ml) 装柱后, 以五倍体积的 0.1 mol/L ZnSO₄ 过柱吸附锌离子. 其余操作方法与铜柱相同.

1.3.4 SDS-PAGE 电泳: 将收集的洗脱液用 10%三氯醋酸沉淀后, 在 12% 的 SDS-PAGE 凝胶中进行电泳, 考马氏亮蓝染色观察结果.

2 结 果

2.1 rh Fab 段的金属铜螯合亲和层析法

2.1.1 pH 梯度洗脱法: 将 rh Fab 段的样品上柱后, 以 pH 6.5 至 3.5 (20 mmol/L PBS 1 mol/L NaCl) 的缓冲液进行洗脱, A₂₈₀监测. 在 pH 5.2 处大部分杂蛋白被洗脱下来. 在 pH 5.0、4.8、4.5、4.0 时产生 4 个洗脱峰, 用 ELISA 法测定各洗脱峰的抗体活性, 发现在 pH 4.0 处的蛋白洗脱液中可检测到很高的抗体活性. 将各洗脱组分进行 SDS-PAGE 分析 (图 1a), 在 pH 4.5、4.0 的洗脱组分可见到分子质量为 25.4 ku 的 Fd 段和分子质量为

23.1 ku 的 K 链. 其 rh Fab 段的纯度可达到 95% 以上, 回收率为 80% (表 1). 从 A₂₈₀ 和 ELISA 定量估算, 洗脱组分约回收 350 μg rh Fab 蛋白 (150 ml 大肠杆菌培养上清).

表 1 Cu ²⁺ -IMAC 和 Zn ²⁺ -IMAC 纯化 rh Fab			
洗脱方式	上样流出物 ELISA 滴度 ¹⁾	洗脱峰 活性 ²⁾	回收率%
锌 pH 梯度	1/100	+	75
铜 pH 梯度	1/2	+	80
铜咪唑梯度	1/2	+	81

¹⁾每 1.5 ml 柱床加 150 ml 大肠杆菌培养上清. ²⁾样品稀释到 10 μg/L 仍有 ELISA 活性.

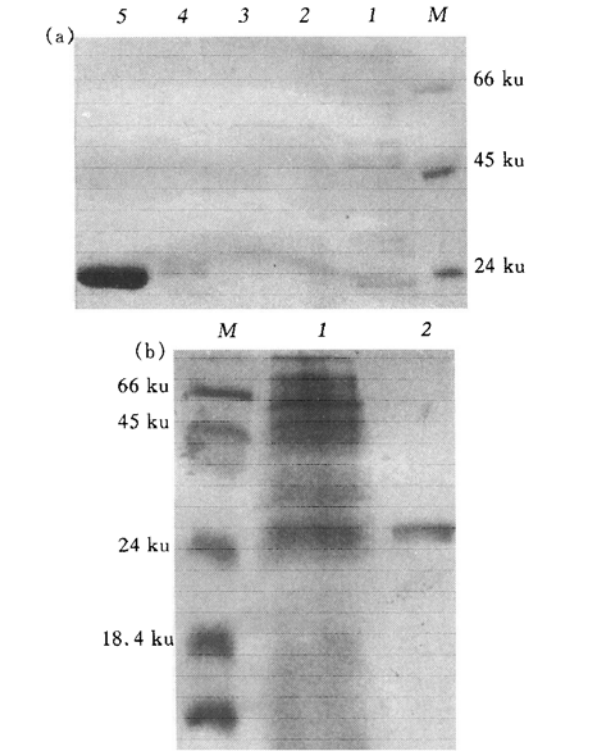


图 1 金属铜螯合层析回收组分的 SDS-PAGE 分析
(a) M: 分子质量标准, 1: pH 5.2 洗脱组分, 2: pH 5.0 洗脱组分, 3: pH 4.8 洗脱组分, 4: pH 4.5 洗脱组分, 5: pH 4.0 洗脱组分; (b) M: 分子质量标准, 1: pH 4.8 洗脱组分, 2: pH 4.0 洗脱组分.

2.1.2 咪唑梯度洗脱法: 用 10、20、30、40、

50、60、80、100 mmol/L (含 20 mmol/L PBS, pH 6.5, 1 mol/L NaCl) 的咪唑液进行梯度洗脱. 其中 20、30、40、50 mmol/L 咪唑洗脱液时产生 4 个蛋白洗脱峰. 对洗脱峰进行抗体活性检测, 发现 40、50 mmol/L 咪唑处的洗脱峰含有抗体活性. 经 SDS-PAGE 分析 (图 2), 可见 40 mmol/L 咪唑可将 rh Fab 段洗脱, 40 mmol/L 洗脱峰中 rh Fab 占总蛋白 90%, 50 mmol/L 时 rh Fab 段纯度为 95% 以上. 50 mmol/L 洗脱峰中 rh Fab 段含量为 40 mmol/L 的 1.5 倍.

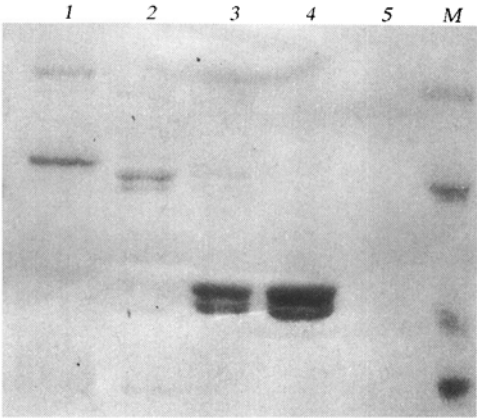


图 2 金属铜螯合层析回收组分的 SDS PAGE 分析

M: 分子质量标准, 1: 10 mmol/L 咪唑洗脱组分, 2: 20 mmol/L 咪唑洗脱组分, 3: 40 mmol/L 咪唑洗脱组分, 4: 50 mmol/L 咪唑洗脱组分, 5: 60 mmol/L 咪唑洗脱组分.

2.2 rh Fab 段的金属锌螯合层析法

以 pH 6.5 至 3.5 (20 mmol/L PBS 1 mol/L NaCl) 的洗脱液对锌螯合层析柱进行洗脱, 发现只在 pH 6.1, 5.8 处出现两个蛋白洗脱峰. 经 ELISA 法测定各组分的抗体活性, 得知 pH 6.1 和 5.8 处的洗脱液中都有 rh Fab 段. 进行 SDS-PAGE 分析 (图 3) 在 pH 5.8 处可得纯度大于 95% 的 rh Fab 产品, 锌柱纯化 rh Fab 段其回收率为 75%. 对上样流出物中的抗体活性检测 (表 1), 可看出流出液抗体活性明显高于铜柱的, 说明 rh Fab 段与锌

螯合层析介质结合效率较低.

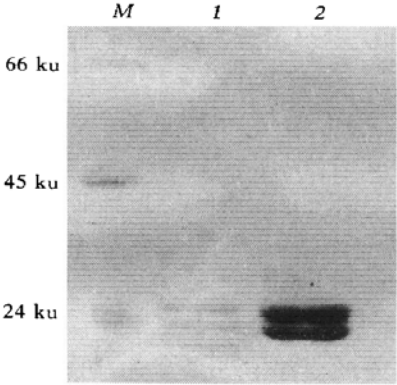


图 3 金属锌螯合层析回收组分的 SDS PAGE 分析

M: 分子质量标准, 1: pH 6.1 洗脱组分, 2: pH 5.8 洗脱组分.

3 讨 论

金属螯合亲和层析法 (IMAC) 始于 70 年代^[3], 近几年已广泛用于生物分子的分离纯化^[8,9]. 过渡金属离子 (如 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ni^{2+}) 可与亚氨二乙酸一类螯合剂形成金属螯合物. 生物分子与金属螯合物之间有三种作用机制^[10]. 一种为静电吸附; 一种为共价键结合; 另一种为配价键结合; 蛋白质表面的组氨酸、半胱氨酸、色氨酸等残基与金属离子就是以配价键方式作用的. 有三种方法可将吸附于金属螯合层析介质上的蛋白质洗脱. 第一种为络合物排除法, 用 EDTA 洗脱, 这种方法对蛋白质的脱附缺乏选择性; 第二种方法为配体交换法, 用一种与吸附蛋白竞争性结合的溶质, 如咪唑洗脱层析柱, 将吸附的蛋白质洗脱; 第三种方法为质子化法; 用较低 pH 的缓冲液洗脱层析柱, 将吸附的蛋白质脱附. 后两种洗脱法具有较好的选择性, 我们用快速蛋白液相色谱系统 (FPLC), 采用自制金属 (铜、锌两种金属离子) 螯合层析介质, 以质子化 (pH 梯度), 配体交换 (咪唑梯度) 两种洗脱方法, 对 rh Fab 段的纯化效果进行了探讨. 实验结果表明, 应用铜柱、锌柱都可得到大于 95% 以上

的 rh Fab 段纯品. 应用锌柱时, pH6.1 的洗脱液即可洗脱 rh Fab 段. 由表 1 可见其上样流出液的活性明显高于铜柱的, 说明 rh Fab 与锌柱的结合能力较弱 (与铜柱相比). 铜柱本身咪唑、pH 梯度法纯化的抗体纯度, 回收率基本一致. 国际上大都采用咪唑洗脱法^[5]进行纯化, 在我们的实验中发现由于咪唑在 A₂₈₀有强吸收较难由仪器 (FPLC) 检测蛋白吸收峰. 且 pH 梯度法的重复性优于咪唑法. 因此, 我们建立了金属铜螯合层析法 (pH 梯度法). 此法具有如下优点: a. 样品的预处理方法简单. 抗体 rh Fab 段只需硫酸铵沉淀透析后, 即可直接上样进行纯化, 操作简便. b. 纯化速度快. 一次色谱纯化周期几小时. c. 纯度高, 经本方法一步纯化的抗 rh Fab 段纯度大于 95%. d. 活性高, 由于本方法大大减少了操作步骤, 缩短了纯化时间, 减少了样品丢失. e. 制备量大, 因为此介质的柱容量大^[2]. 1.5 ml 的柱体积可上样 150 ml 大肠杆菌培养上清的样品. 如果使用直径更大的色谱柱, 则其制备量增加数倍.

综上所述, 本文所建立的抗 rh Fab 段的纯化方法, 具有高纯度, 高活性的优点. 该方法简单, 快速, 容易掌握. 一次上样, 经 rh Fab 段合适的缓冲液洗涤, 可以得到高纯度的 rh Fab 段. 为 rh Fab 段的大规模制备及基因工程抗体的开发打下了基础.

参 考 文 献

1 Willamson R A, Burioni R, Sanna P P *et al.* Human monoclonal antibodies against aplethora of viral pathogens from single combinatorial libraries. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90**: 4141~ 4145

2 朱迎春, 王晶翼, 谢邦铁等. 金属螯合层析介质的研制及其在纯化 rh Cu/Zn SOD 中的应用. 见: 周同惠主编. 生物医药色谱新进展 (第二卷). 西安: 西北大学出版社. 1994, 404~ 405

3 Porath J, Carlsson J, Olsson I *et al.* Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature*, 1975, **258**: 598~ 599

4 Hemdan E S, Zhao Y J, Sulkowski E *et al.* Surface topography of histidine residues: A facile probe by immobilized metal ion affinity chromatography. *Proc Natl Acad Sci USA*,

1989, **86**: 1811~ 1815

5 Casey J K, Keep P A, Chester K A *et al.* Purification of bacterially expressed single chain Fv antibodies for clinical application using metal chelate chromatography. *J Immunol Methods*, 1995, **179**: 105~ 116

6 陈竞华, 王 琰, 刘群英等. 人源性噬菌体抗体库的构建及抗 HBs 单抗的筛选. *中华微生物学和免疫学杂志*, 1995, **15** (3): 158~ 162

7 王 琰, 刘群英, 徐建军等. 人抗 HBs Fab 段基因的序列分析及表达. *中华微生物学和免疫学杂志*, 1995, **15** (5): 304~ 307

8 Dobrowolska G, Muszynska G, Porath J. Model studies on iron (III) ion affinity chromatography interaction of immobilized metal ions with nucleotides. *J Chromotogr*, 1991, **541**: 333~ 339

9 Boden V, Winzerling J J, Vijayalakshmi M *et al.* Rapid one-step purification of goat immunoglobulins by immobilized metal ion affinity chromatography. *J Immunol Methods*, 1995, **181**: 225~ 232

10 Porath J, Olin B. Immobilized metal ion affinity adsorption and immobilized metal ion affinity chromatography of biomaterials serum protein affinities for gel-immobilized iron and nickel. *Biochemistry*, 1983, **22**: 1621~ 1630

Investigation of Metal Chelate Chromatography in Purification of Recombinant Human Fab.
ZHU Yingchun, WANG Yan, LIU Qunying, HUA Bing, GAO Rongkai (*Navy General Hospital, Beijing 100037, China*).

Abstract Recombinant human Fab (rh Fab) with a hexahistidine tail attacked to the carboxyl end of Fd could be easily purified by immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC). IMAC with different immobilized metal ions (Zn²⁺ and Cu²⁺) and different elution strategies (pH and imidazole gradient) were compared. The results showed that Cu²⁺ were more effective than Zn²⁺ in retaining the His tagged Fab protein. pH gradient showed better consistency in Fab recovery than imidazole gradient. Using Cu²⁺ IMAC more than 95% pure rh Fab could be obtained by one step purification.

Key words histidine, anti-HBsAg, recombinant human Fab, immobilized metal ion affinity chromatography