

技术与方法

应用单克隆抗体免疫亲和柱纯化干细胞因子

赖春宁 朱元晓 薛 生 沈倍奋

(军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850)

摘要 应用抗人干细胞生长因子(SCF)单克隆抗体,通过化学偶联方法制备成亲和层析柱,用于纯化大肠杆菌表达的可溶性重组人 rh-SCF。结果表明,经亲和柱纯化的样品经 SDS-PAGE 电泳检测纯度达 95% 以上,计算蛋白回收率为 23.4%,并且纯化后 rh-SCF 生物活性明显高于纯化前样品。

关键词 SCF 单克隆抗体,免疫亲和层析,干细胞因子

造血干细胞因子(SCF)是近年来发现并被克隆的与造血干细胞生长密切相关的几种重要的刺激因子之一。研究表明 SCF 为多谱系造血细胞生长因子,它作用的靶细胞比 IL-3 作用的靶细胞还要早,单独使用对各系祖细胞具有一定的刺激作用,和其它造血刺激因子合用表现较强的协同效应。由于 SCF 的特殊作用,在临床上可以用它治疗重建损伤的骨髓及重症贫血等疾病^[1]。基因工程生产重组人 SCF 具有产量大、获取容易等特点,但因产物含有一定量的菌体蛋白,因而在使用上受到限制,提高 rh-SCF 纯度是基础研究和临床应用的关键。目前纯化 SCF 主要采用凝胶过滤柱和高压色谱,其优点是纯化效果好、产量大,但其缺点是方法复杂、条件要求高,不容易掌握。本文用抗人 SCF 单克隆抗体,通过和溴化氢活化的 Sepharose 4B 偶联制备亲和柱,纯化 SCF 样品,得到令人满意的结果。

1 材料与方法

1.1 抗人 SCF 单克隆抗体的制备及纯化

采用在大肠杆菌表达的重组人 SCF 融合蛋白免疫 Balb/c 小鼠,经杂交瘤技术制备抗人

SCF 单抗,抗体属于 IgG₁ 亚类^[2],将含有 SCF 单克隆抗体的小鼠腹水,用饱和硫酸铵沉淀纯化。

1.2 亲和层析柱制备

取纯化的 SCF 单克隆抗体与 Pharmacia 公司生产的 CNBr-Serpharose 4B,按产品说明书所述方法偶联,收集上清液用紫外分光光度计检测蛋白含量,计算偶联率(%),最后用 10mol/L pH 7.4 PB 平衡柱体备用。

1.3 重组人 SCF 的初步纯化

SCF 在大肠杆菌中的表达量在 10%—20%,经包涵体初步纯化,8mol/L 尿素中变性溶解,然后在谷胱甘肽缓冲液体系中复性^[3]。

1.4 亲和柱纯化 SCF 的步骤

取复性后的 SCF 样品,超滤浓缩后 SCF 蛋白浓度为 1g/L,以 4mL/h 流速上样,用 0.05mol/L pH 8.0 磷酸盐缓冲液冲洗杂蛋白,经 pH 3.0 柠檬酸缓冲液洗脱结合的 SCF 蛋白,收集蛋白峰检测 SCF 纯度。

1.5 纯化制品的纯度分析及免疫印迹分析

用 SDS-PAGE 电泳检测纯化后 SCF 样品

的纯度,用蛋白质印迹方法(Western blot)确定 SCF 的特异性^[4].

1.6 纯化制品的生物活性检测

采用体外半固体 CFU-GM 培养方法^[5]在含有一定量 GM-CSF 因子条件下,加入不同浓度待测 SCF 及其标准品,依据 SCF 可以协同 GM-CSF 作用,促使 CFU-GM 集落生成,间接检测 SCF 样品活性.

表 1 酶联方法选择合适洗脱酸 pH 值

抗体稀释度	对照	pH 值			
		3.0	4.0	6.0	9.6
1:100	0.840±0.01	0.084±0.004	0.770±0.006	0.833±0.06	0.728±0.01
1:1000	0.650±0.01	0.030±0.020	0.530±0.060	0.575±0.04	0.533±0.03

注: $n=3$, 对照为 pH 7.4 PBS 缓冲液.

结果表明, pH 3.0 缓冲液洗脱结合蛋白最好, 和对照相比 A 值相差最大. 表明此条件使大部分抗原-抗体解离.

2.2 制备亲和柱单抗选择

取 4 株经饱和硫酸铵沉淀的单克隆抗体, 按上述间接 ELISA 方法, 用 pH 3.0 缓冲液洗脱结合的抗体, A 值检测表明, 33 号结合容量最大 (pH 7.4 缓冲液时), 经 pH 3.0 缓冲液洗脱 A 值较低 (见图 1).

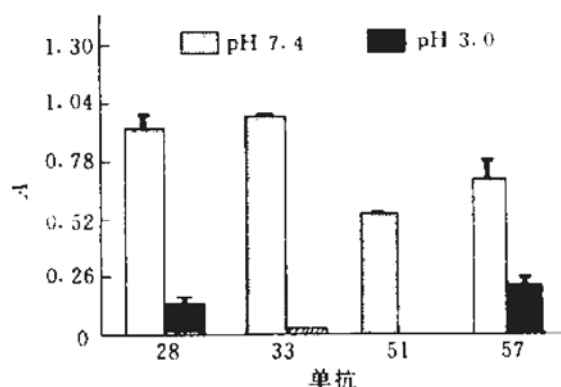


图 1 4 株单克隆抗体结合力比较

2.3 单抗纯度

经饱和硫酸铵沉淀, SDS 电泳检测, SCF 抗体纯度在 70% 左右.

2.4 亲和层析纯化人 SCF

经包涵体纯化、变性、复性、超滤浓缩、

2 结 果

2.1 从亲和柱上洗脱结合 SCF 的条件选择

应用间接 ELISA 方法, 首先包被 5mg/L SCF 抗原, 加入两种浓度抗 SCF 单抗, 用不同 pH 缓冲液洗脱, 然后加酶标羊抗鼠二抗, 最后底物显色, 通过波长 280 检测 A 值, 选择适合的 pH 缓冲液作为洗脱条件, 见表 1.

SDS-PAGE 电泳表明, SCF 纯度在 70% 左右.

2.5 亲和层析纯化人 SCF 蛋白回收率分析

收集抗体亲和柱洗脱下来的蛋白峰, 经计算蛋白回收率为 23.4%.

2.6 纯化产物的纯度分析及免疫印迹鉴定结果

经 pH 3.0 缓冲液洗脱下来的 SCF 蛋白峰, 经 SDS 电泳检测纯度在 95% 以上 (见图 2).

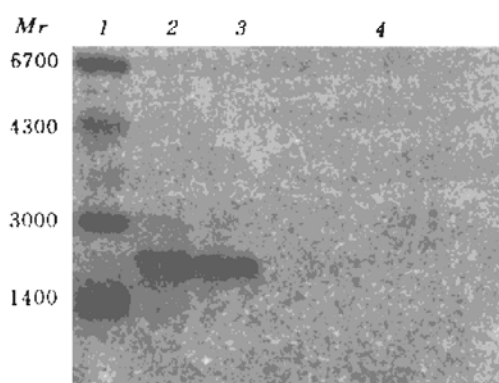


图 2 亲和柱纯化 SCF 蛋白 SDS-PAGE 电泳图

亲和柱经酸洗脱的蛋白峰经蛋白质印迹法染色证明, 与 SCF 抗体反应阳性, 其位置与标准 SCF 蛋白分子量一致 (20kb 左右), 杂蛋白峰表现为阳性反应, 见图 3.

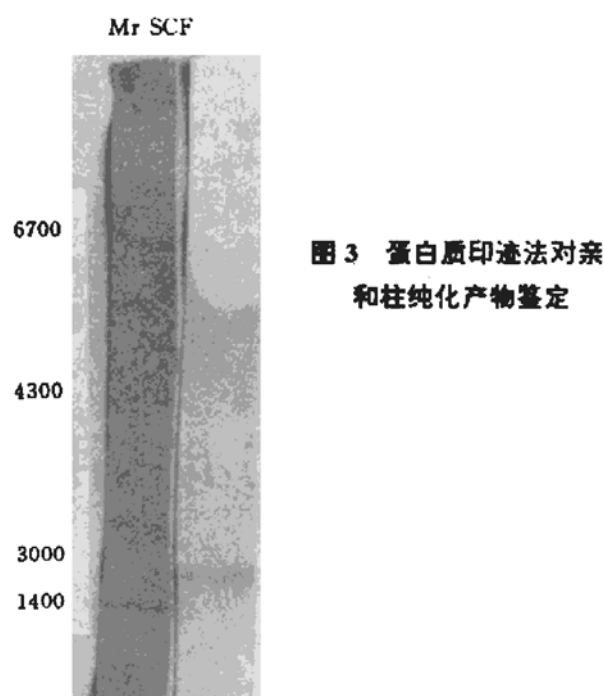


图3 蛋白质印迹法对亲和柱纯化产物鉴定

2.7 亲和柱纯化产物活性检测

亲和柱纯化 SCF 蛋白峰, 经无菌处理, 稀释一定浓度, 对体外半固体 CFU-GM 造血祖细胞形成影响, 见图 4。

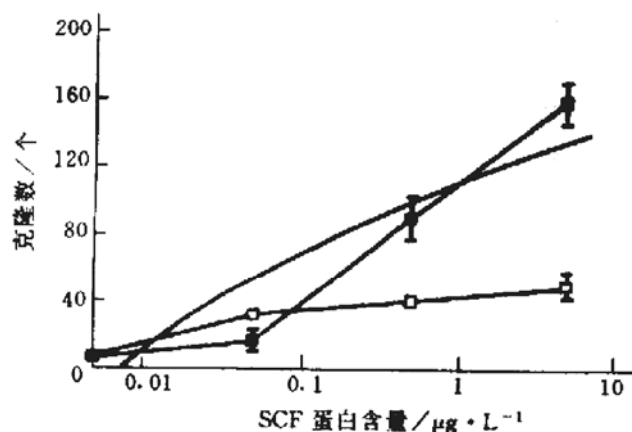


图4 亲和柱纯化 SCF 上样前后生物活性比较

—■—, SCF 上样后; —□—, SCF 上样前。

结果表明, 亲和柱纯化后的样品生物活性明显高于纯化前, 刺激 CFU-GM 集落形成是前者 2—3 倍 (在相同的蛋白浓度下)。

3 讨 论

本文根据单克隆抗体的特性, 通过化学交

联方法制备的亲亲和层析柱纯化大肠杆菌表达的可溶性 SCF 蛋白, 此方法具有简单、快速、容易掌握、不需要特殊设备等特点。一次上样 SCF 粗品, 经适合的缓冲液洗涤, 可以得到较高纯度 SCF 纯品, 以往的经验表明制备亲和柱关键在于单抗的亲合力, 而抗体的纯度并不非常重要。本研究使用 4 株抗同一位点的单克隆抗体, 经饱和硫酸铵纯化, 选择一株亲合力较强和一株亲合力适中的抗体制备亲和柱, 实验结果表明, 抗体亲合力适中者制备亲和柱较理想, 蛋白样品容易结合、结合量大, 经适合的酸洗脱蛋白易解吸, 而高亲合力和单抗制备的亲亲和柱, 虽然蛋白样品结合量大, 但不易洗脱, 得量较少。

人 SCF 蛋白在酸环境下比较稳定, 不容易分解, 可以保持一定的活性, 经 pH 3.0 缓冲液洗脱, 在短时间内对柱体影响不大, 经亲和柱纯化的 SCF 蛋白样品, 经 SDS-PAGE 电泳检测纯度在 95% 以上, 生物活性检测表明, 在相同的浓度纯化后 SCF 样品刺激 CFU-GM 集落生成明显高于纯化前, 为前者 2—3 倍, 这说明经亲和柱纯化后可以提高样品的比活性, 并且纯化后 SCF 样品细胞毒性明显减少, 表现为协同 GM-SCF 对 CFU-GM 促增殖作用, 集落数增多、集落增大。

综合上述结果, 在一定的条件下, 应用亲和层析柱, 纯化人 SCF 样品, 可以得到满意结果。

参 考 文 献

- 1 Avraham B H, Vannier E. Blood, 1992; 79 (2): 365
- 2 薛 生, 孙瑛勋. 单克隆抗体通讯, 1993; (4): 35
- 3 朱元晓, 赖春宁. 高科技通讯, 1993; (8): 27
- 4 赖春宁, 朱元晓. 中国实验血液杂志, 1993; (2): 177

Purification of Recombinant Human SCF by McAb Affinity Chromatography. Lai Chun-ning, Zhu Yuanxiao, Xue Sheng, Shen Beifen (Institute of Basic Medical Sciences, Beijing 100850, China).

Abstract The purification of recombinant hu-

man SCF (rh SCF) expressed in *E. coli*. By McAb affinity chromatography which prepared by combining an anti-SCF McAb with NCR-Sepharose 4B was performed. At optimum conditions, the purity of rhSCF obtained

was higher than 95%. The biological activity also increased apparently.

Key words McAb affinity chromatography, purification, rhSCF

人肌型特异烯醇化酶放免分析法及初步应用

陈泮藻 金道山* 王录焕 王士雯* 郝秀华 高宇红* 李振甲 韩志涛*

(解放军总医院临床医学基础研究所, 北京 100853)

摘要 建立了人肌型特异烯醇化酶(hMSE)的放免分析法, 抗血清的亲合常数为 $5.1 \times 10^9 \text{ L/mol}$, 采用改良的 BHR 法制备了 ^{125}I -hMSE, 后者非特异结合率为 3%, 与抗血清 ($1:10^3$) 结合率达 50.16%。批内和批间 CV 分别为 8.6% 和 13%。回收率为 95%—105%。标准曲线范围为 5—320 $\mu\text{g/L}$ 。最小检出率为 5 $\mu\text{g/L}$ 。最佳反应条件: 0.1 mol/L pH7.4 PBS (含 5 mmol/L MgSO_4 , 0.1% 吐温-20, 0.1% NaN_3); 反应温度和时间: 37°C 反应 0.5 h 和 4°C, 0.5 h, 作为快速测定; 或选用 4°C 反应 24 h。65 例健康人血清 hMSE 浓度为 $23.9 \pm 10.9 \mu\text{g/L}$ ($\bar{x} \pm s$)。hMSE 超过 57 $\mu\text{g/L}$ ($\bar{x} + 3s$), 为阳性值。测定了 AMI 和肌病患者, 血清 hMSE 明显升高。

关键词 肌型特异烯醇化酶, 急性心肌梗塞, 肌病, 放射免疫分析法

人肌型特异烯醇化酶(hMSE)对急性心肌梗塞(AMI)诊断具有高特异性, 并对病情监视和预报复发有重要临床意义, 深受从事心血管研究的工作者的关注。检测血清 hMSE 的放射免疫分析法(RIA)具有特异性强、灵敏度高及超微量测定等优点。本文介绍了 hMSE 的 RIA 和其初步应用。

1 材料和方法

1.1 试剂

Bolton-Hunter 试剂: 购于 Sigma 公司。 Na^{125}I : 中国原子能研究院产品, 放射性强度 5.55 GBq/ml, 完全(或不完全)福氏佐剂: 购于 Life Technologies 公司。0.1 mol/L, pH7.4 磷酸盐缓冲液 PBS (含 5 mmol/L MgSO_4 , 0.5% NaCl, 0.1% NaN_3 , 0.1% BSA, 0.1% 吐温-20)。hMSE 标准浓度配制: 5、10、20、40、

80、160、320 $\mu\text{g/L}$ 。PR 分离剂: 将二抗: 正兔血清: 聚乙二醇: 水, 按 3.0: 0.6: 20: 60 体积配制。

1.2 仪器

UV250 型紫外分光光度计(日本)。HH6003型Gamma计数器, 电泳仪(北京六一仪器厂)。SCR20AB型高速冷冻离心机(日本)。

1.3 方法

1.3.1 人肌型烯醇化酶提取、纯化鉴定 取死亡 5 h 后人肌肉匀浆, 上清液于 55°C 加热处理, 经滤膜超滤得的粗酶制品。再经 CM-Sephadex、DEAE-Sephadex 和 Sephadex G100 柱层析, 获得比活性为 162.1 U/mg, 纯度高达 15.6 倍的纯化烯醇化酶。再经 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 显示单一蛋白区带, 亚基分子

*解放军总医院老年病研究所。

收稿日期: 1994-04-06, 修回日期: 1994-07-10