

# 琥珀酸弧菌L-天门冬酰胺酶高纯度IgG的制备和应用

关颖谦 彭惠林 何云生 陈剑民 任克勤\* 焦瑞身

(中国科学院上海植物生理研究所, 上海)

本文报道琥珀酸弧菌L-天门冬酰胺酶高纯度IgG的制备, 采用溴化氰活化的琼脂糖球珠亲和层析, 将IgG中能与受体大肠杆菌结合的组分除去, 使该IgG在应用于基因工程筛选中降低本底, 重复性好, 提高筛选效率。将其用作放射免疫探针和酶联免疫探针, 在筛选L-天门冬酰胺酶基因的正克隆中有其独到的优越性。

**关键词** IgG; 放射免疫探针; ELISA; 蛋白质转移电泳

琥珀酸弧菌 L-天门冬酰胺酶对底物专一性高于大肠杆菌的酶<sup>[1]</sup>, 而且动物实验证明对脾脏和肝脏功能副作用轻微<sup>[2]</sup>, 可作为临床上治疗白血病等的药物; 但弧菌为厌氧菌<sup>[3]</sup>, 菌体生产量小, 酶的产量也低<sup>[4,8]</sup>; 因此, 我们用基因工程, 将弧菌的 L-天门冬酰胺酶基因克隆到大肠杆菌中。有关初步结果已作了报道<sup>[7]</sup>。本文报道在该项基因工程中所用的弧菌 L-天门冬酰胺酶抗体的制备及其具体的应用。

## 材料和方法

### (一) 材料

1. 菌种保藏和培养条件: 琥珀酸弧菌 (*Vibrio succinogene* ATCC29513) 系美国北卡罗里那大学肿瘤中心黄英星教授赠送。琥珀酸弧菌系厌氧菌, 可用液体深层静止培养, 培养条件基本按照 Kafkewitz的方法<sup>[5]</sup>, 在37℃培养 20h, 置4℃保存, 每个月传代一次。二年来未发现菌种死亡或退化现象, 这是前人建议的唯一菌种保存方法。我们采用穿刺法, 菌种可保存三个月; 用牛奶管冰冻干燥后可保藏

长达18个月之久。

发酵培养基同文献<sup>[5]</sup>, 扩大培养过程如下:

10ml 种子  $\xrightarrow[20h]{37^{\circ}C}$  200ml 发酵培养基  $\xrightarrow[20h]{37^{\circ}C}$  5L 发酵培养基

发酵瓶中的培养基尽量装满, 灭菌后棉塞外面加塑料布扎紧, 以免空气逸入; 待培养基冷却后立即接种, 37℃培养约 16h。

2. 主要生化试剂: Na<sup>125</sup>I 系北京原子核所产品。CNBr 活化的琼脂糖4B珠由本实验室活化或购自Pharmacia 公司。硝酸纤维素膜(简称 NC 膜)系浙江黄岩人民化工厂产品或购自 Schleicher and Schuell 公司。辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG 抗体(简称 IgGHRPO) 为美国 Cccper Biochemical 产品, 系旧金山大学医学院的 Chris Lou 博士赠送。

### (二) 实验方法

1. L-天门冬酰胺酶的分离纯化: 按参考文献<sup>[6]</sup>的方法, 加以简化见表1。

2. 酶活力测定: 参照 Wade 和 Phillips 的方法<sup>[8]</sup>加以简化。在37℃每分钟催化天门冬酰胺水解成 1 微克分子氨的酶

本文于1987年10月6日收到。

\* 现在合肥安徽教育学院生物系。

表 1 琥珀酸弧菌天门冬酰胺酶的纯化

Table 1 Purification of asparaginase from *Vibrio succinogenes*

处 理 Treatment	蛋 白 质 Protein (g)	天 门 冬 酰 胺 酶 活 力 Asparaginase (IU/10 <sup>4</sup> )	比 活 力 Specific activity (IU/mg)	产 量 Yield (%)
抽 出 液 Extract (24000×g)	4.64	4.15	9	
硫酸铵分级沉淀 Ammonium sulfate fractionation	0.68	2.74	40	65
DEAE纤维素层析 DEAE-cellulose chromatography	0.14	1.49	105	36
羟基磷灰石层析 Hydroxylapatite chromatography	0.069	0.835	121	20

量为一个活力单位。在酶的纯化过程中,为了快速检测柱层析的收集部分的酶活力,我们用微量快速定性分析法,即用毛细管取待测样品、底物和奈氏试剂各一滴,等体积混合均匀,在室温条件(20℃左右)可立即出现铁锈色或棕色沉淀,颜色愈深,沉淀愈多,说明酶活愈高。

3. 聚丙烯酰胺凝胶电泳:按照文献[9]的方法。

4. 蛋白质分析:按 Lowry 等的方法<sup>[10]</sup>。

5. 抗血清的制备:按照常规方法进行<sup>[11]</sup>。

6. 免疫球蛋白 IgG 的分离和纯化:免疫球蛋白常规纯化包括硫酸铵分级沉淀和 DEAE-DE52 纤维素层析,条件参照文献[12, 13]。此外,我们又采用琼脂糖免疫吸附层析,进一步纯化免疫球蛋白。

琼脂糖 4B 珠经 CNBr 活化,与大肠杆菌(受体菌 Y1090)无细胞抽出液一同在 24℃ 振荡 2h,使蛋白与活化的载体结合,形成免疫吸附剂,用以装柱,制成专一性的亲和层析柱。用乙醇胺(1mol/L, pH9.0)洗涤亲和柱(24℃, 2h),以封闭残余活性基团,继以 0.1mol/L 乙酸/0.5mol/L NaCl 缓冲液(pH4.0)洗去未偶联的过剩蛋白,最后用 0.1mol/L 硼酸缓冲液/1mol/L NaCl 缓冲液(pH8.0)洗去封闭剂。通

过以上处理的亲和层析柱即可用以进一步纯化免疫球蛋白 IgG。本实验柱体积 1 × 10cm IgG 的上柱量为 0.8ml,用 1% BSA 约 3.8ml 洗脱,流速为 5ml/h,收集洗脱液约 3.6ml,定量分装小管,每管约 0.9ml,贮于 -20℃ 备用。

7. 免疫双扩散法:按常规方法<sup>[11]</sup>进行。

8. 免疫火箭电泳法:按照 Edwards 的方法<sup>[14]</sup>。

9. 抗原抗体交叉电泳:按文献[14]进行。

10. 酶联免疫吸附检测法:按文献[15]进行。

11. 蛋白质转移电泳(Western Blot)技术:基本按文献[16]方法但有所改进。把含有经电泳分离后的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶与硝酸纤维素膜紧密贴在一起,驱除气泡后,两者的外面各覆盖二层湿润的 3 号滤纸,再覆盖海绵垫(图1),最后用多孔有机玻璃板夹紧后,竖立于装有电泳缓冲液 0.5mol/L Tris/192mmol/L 甘氨酸/20% 甲醇(pH8.6)的电泳槽中。硝酸纤维素膜的一面应向正极,若凝胶中含有尿素,则该膜应面向负极。槽中注入缓冲液为 0.7% 乙酸。电源用上海昆虫所制造的高压电泳仪(型号 SCR 300),电泳条件是:电压 60V/cm,电流 350mA,

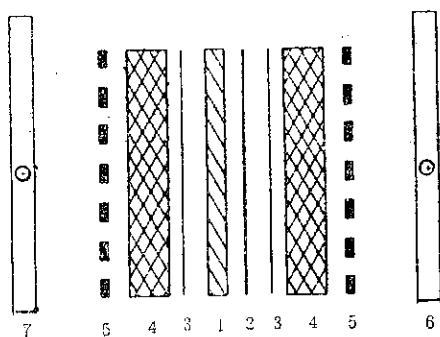


图 1 蛋白质转移装置示意图

Fig.1 Scheme of the assembly for protein transfer

- 1.凝胶 Gel 2.转移膜 Transfer membrane  
3.滤纸 Filter paper 4.海绵垫 Sponge washer  
5.凝胶夹板 Gel splint 6.正极 Positive pole  
7.负极 Negative pole

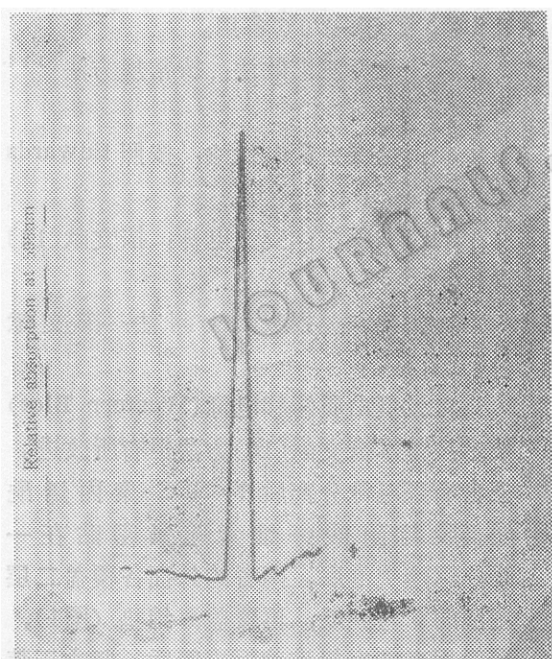


图 2 纯化的天门冬酰胺酶 SDS 聚丙烯酰胺凝胶和它的扫描图

Fig.2 The purified L-asparaginase in SDS polyacrylamide gel and its scanning

在 5—10℃电泳 4h。若电源为 LKB-2197 型号高压电泳仪，电压 90V，电流 200mA，电泳 4—5 h。在这两种电泳条件下转移后的凝胶中蛋白质几无残留。此外，国产

与进口 NC 膜都可做为转移蛋白的载体。在电泳结束后，可用放射免疫法<sup>[13]</sup>或酶联吸附免疫法<sup>[14]</sup>检测膜上的蛋白。

12. 金色葡萄球菌 A 蛋白 (*Staphylococcus aureus* protein A) 的同位素标记：参照文献[14, 17]的方法用 Na<sup>125</sup>I 标记金色葡萄球菌 A 蛋白，定量分装小管，使每管同位素计数达  $5 \times 10^5$  cpm，置 -20℃ 备用。

## 结果和讨论

### (一) 天门冬酰胺酶的分离和纯化

为了获得高效价特异性抗血清，首先必须制备具有一定浓度、成份专一高纯度的抗原，如表 1 和图 2 所示，我们通过硫酸铵分级沉淀，DEAE-DE52 纤维素柱层析和羟基磷灰石三个步骤获得的 L-天门冬酰胺酶经聚丙烯酰胺凝胶电泳分析达到电泳纯的要求(图 2) 酶液浓度为 2mg/ml。

### (二) 免疫球蛋白 IgG 的分离纯化和纯度鉴定

有关弧菌 L-天门冬酰胺酶抗体的制备，尚未见报道。我们制取纯度高价高的 IgG，主要是为了放射免疫检测和酶联免疫吸附检测法筛选基因文库中的正克隆。为此抗血清在硫酸铵分级沉淀和 DEAE-DE52 纤维素层析后，须进一步经亲和层析纯化，即用受体菌无细胞抽出液偶联到 CNBr 活化的琼脂糖 4B 珠上，制成亲和层析柱，吸附 IgG 中对受体菌抗原蛋白有交叉反应的抗体组份，提高 IgG 的纯度，以期减弱放射免疫检测法和酶联免疫吸附法中的背景，降低假阳性反应。如此获得的纯化的 IgG 经免疫双扩散法测定其效价至少为 1:64 (图版 I-1)；图版 I-3 是抗原-抗体交叉电泳的结果，说明我们所用的抗原达到免疫纯的要求，因此，由它

所免疫产生的抗体之特异性是极高的。又用火箭免疫电泳进一步分析,来自大肠杆菌和琥珀酸弧菌的 L-天门冬酰胺酶对抗体的免疫反应。结果如图版 I-2 所示,只有后者和 IgG 的免疫反应出现一清晰的单一峰。这也说明我们制备的亲层析纯的免疫球蛋白 IgG 是高纯度的。高效价的特异性抗体;而大肠杆菌的 L-天门冬酰胺酶则无明显的峰出现。图版 I-2 的结果明显指出这两个细菌来源的 L-天门冬酰胺酶的绝大部分抗原决定簇是不相同的。

### (三) 亲和层析纯特异性 IgG 的应用

1. 用于蛋白转移电泳检测 L-天门冬酰胺酶: Western Blot 是一种精确微量而有效的检测蛋白的方法。我们取 0.1 $\mu$ g L-天门冬酰胺酶,用大肠杆菌 C-600 的无细胞抽出液 50 $\mu$ l (265 $\mu$ g 蛋白)作对照,经过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,再将凝胶中的蛋白定量地转移到硝酸纤维素膜上。用上述制备的高纯度 IgG 进行放射免

疫检测(图版 I-4),结果酶的放射性带清晰,而 C-600 的无细胞抽出液除少量背景外,无明显的放射性带。这说明我们的 IgG 有很高的特异性,在经过亲和层析后,大肠杆菌的背景所剩无几,完全可用 Western Blot 方法检测正克隆中 L-天门冬酰胺酶的表达量及其分子量。

2. 用于酶联免疫吸附法,筛选 $\lambda$ gt11-AS8 重组噬菌体:先原位固定抗原于硝酸纤维素膜上,用酶联免疫吸附法,以亲和层析纯免疫纯高特异性的 L-天门冬酰胺酶的 IgG 为探针进行筛选。抗原-抗体探针-辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 的偶联体与底物分子(二甲基联苯胺)反应,经氧化显黄色者,为正克隆(图版 I-5)。

以上结果说明,我们制备的亲层析纯、效价高且特异性强的 L-天门冬酰胺酶 IgG 可用于构建灵敏度高、假阳性少、重复性强的免疫探针,为 L-天门冬酰胺酶基因工程打下基础。

### 参 考 文 献

- [1] Durden, D.L. and Distasio, J.A.: *Int. J. Cancer*, 27:58—65, 1981.
- [2] Durden, D.L. and Distasio, J.A.: *Cancer Research*, 40:1125—1129, 1980.
- [3] Wolin, N.J. et al.: *J. Bacteriol.*, 81:911—917, 1961.
- [4] Kafkewitz, D. and Goodman, D.: *Appl. Microbiol.*, 27:206—209, 1974.
- [5] Distasio, J.A. and Niederman, R.A.: *J. Biol. Chem.*, 251:6921—6932, 1976.
- [6] Abuchowski, A. et al.: *Preparative Biochemistry*, 9:205—211, 1979.
- [7] 关颖谦等:生物工程学报, 4(1): 11—19, 1988.
- [8] Wade, H.E. et al.: *J. General Microbiol.*, 69:299—312, 1971.
- [9] Laemmli, U.K.: *Nature*, 227:680—685, 1970.
- [10] Lowry, O.H. et al.: *J. Biol. Chem.*, 193:256—275, 1951.
- [11] 朱培坤:免疫酶技术,山东科学技术出版社, pp.19—21, 41—42, 1983.
- [12] Livingston, D.M.: *Methods in Enzymology*, ed. Jakoby, W.B., Wüchek, M. (Academic, New York), Vol. 34, pp.723—731, 1974.
- [13] Broome, S. and Gilbert, W.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 75:2746—2749, 1978.
- [14] Edwards, Ray: *Immunoassay: An Introduction* (William Henemann Medical Books, London): pp.28—29, 116—118, 1985.
- [15] Young, R.A. and Davis, R.W.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 80:1149—1193, 1983.
- [16] Towbin, H.T. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci.(USA)*, 76:4350—4354, 1979.
- [17] Hunter, W.M. and Greenwood, F.C.: *Nature*, 194:495, 1962.

# PREPARATION OF HIGH PURITY IgG FROM *VIBRIO SUCCINOGENES* AND ITS APPLICATION IN SCREENING OF POSITIVE CLONES

Guan Yingqien (Y.C.Gwan) Pong Huilin He Yunsheng Chen Jianmin  
Ren Keqin Jiao Ruishen(J.S.Chiao)

(Shanghai Institute of Plant Physiology, Academia Sinica, Shanghai)

In the previous paper, application of L-asparaginase IgG from *V. succinogenes* to the screening of positive clones was reported. The present paper gives the detailed procedures for the preparation of IgG of high purity. The feature of this procedure was the adsorption of non-specific antibody components from IgG purified by ammonium sulfate fractionation and DEAE-DE52 chromatography on an affinity chromatography. In this affinity chromatography, the lysate of the host *E.coli*-Y1090 was linked with Sepharose-4B beads activated by CNBr. Then the L-asparaginase IgG was passed through the immunosorbent column. In this way, our polyvalent IgG was bound to natural antigens produced by *E.coli*-Y1090, consequently the polyvalent IgG was separated into more homogenous groups with improved specificity and affinity. The high purity IgG was then utilised as the radioimmunological and horseradish peroxidase linked immunological probes in the screening of positive clones. The results demonstrated that both IgG probes had the advantages of low background, high sensitivity and good reliability.

## Key words

IgG; radioimmuno probe; ELISA

## Explanation of plate

1. Double immunodiffusion analysis of purified asparaginase IgG  
Central well, IgG, Peripheral wells, The dilution of *V. succinogenes* asparaginase (1:8, 1:16, 1:32, 1:64)
2. Rocket immunoelectrophoretic comparison of *Vibrio* asparaginase(V) and *E. coli* asparaginase(E).  
Right, *Vibrio* asparaginase(V), Left, *E. coli* asparaginase(E)
3. Crossed immunoelectrophoresis of asparaginase and asparaginase IgG
4. Western blot analysis of asparaginase and lysate from *E.coli* C600 detected by  $^{125}\text{I}$  autoradiophotography  
a. Asparaginase b. Lysate from *E.coli* C600
5. In situ screening of positive  $\lambda$ gt11 recombinant plaques detected by Horseradish peroxidase conjugated second antibody

Cuan Yingqien et al.: preparation of high purity IgG from Plate I  
*vibrio succinogenes* and its application in screening of positive clones

