

单克隆抗体亲和层析柱在纯化羊垂体 催乳素中的应用

杨翰仪 周柏光 孙立群 杨竞平 麦荫乔

(白求恩医科大学生化教研室, 长春)

应用淋巴细胞杂交瘤技术制备出 5 株抗羊垂体催乳素单克隆抗体。以羟磷灰石柱层析纯化一种单克隆抗体 2D2 (属 IgG_{2a})。与环氧氯丙烷活化的 Sepharose 4B 偶联制备免疫吸附层析柱。以此免疫吸附柱从羊垂体粗提液中简单快速地纯化了催乳素。

关键词 羊催乳素; 单克隆抗体; 免疫吸附层析

羊垂体催乳素 (oPRL) 是由 199 个氨基酸残基组成的单链蛋白质激素。分子量为 24kd。具有刺激乳腺发育及泌乳等多种功能。由于垂体中催乳素与生长激素在分子结构及生物学功能上有相当大的相似性, 以及生长素在垂体中含量大大超过催乳素 (多 50—100 倍), 因而使催乳素的纯化困难。我们应用淋巴细胞杂交瘤技术制备出 5 株抗 oPRL 的单克隆抗体。从中选择亲和力和较低的一种单克隆抗体 2D2, 以环氧氯丙烷偶联于 Sepharose 4B 上, 制备免疫吸附剂。用亲和层析方法, 使提取 oPRL 的操作过程简单、流程短、特异性强及纯化程度高。由于 oPRL 与人 PRL 有相当高的同源性和几乎完全的免疫交叉反应^[1,2]。而 oPRL 来源比人 PRL 容易得多。因而 oPRL 的纯化与改造将有利于对人 PRL 的研究与检测。这对于垂体疾病的诊断, 特别是垂体瘤和泌乳综合症有特殊重要价值。并对月经异常和不孕诊断治疗也有重要意义^[3]。

材料和方法

(一) oPRL 的制备

参照 Ellis 法^[4], 将新鲜羊垂体 (来自乌兰浩特肉联厂) 制成匀浆, 在一定 pH 以硫酸铵及乙醇等反复抽提, 然后经 QAE-Sephadex A-25 阴离子交换柱 (Pharmacia 产品) 层析。所得第二蛋白峰, 以鸽嗦囊增重法测定其生物活力为 34 IU/mg。应用于免疫动物及酶联免疫吸附测定 (ELISA) 检测单克隆抗体。

(二) 抗 oPRL 单克隆抗体的制备

基本按 Köhler 和 Milstein 方法^[5]修改进行。以上述纯化 oPRL 免疫过的 BALB/c 小鼠脾细胞与 NS-O 骨髓瘤细胞在聚乙二醇 (MW4000) 作用下进行细胞融合。以含有 HAT (次黄嘌呤、氨基嘌呤、胸苷), 10% 小牛血清的 IMDM (美国产品) 筛选杂交瘤细胞。ELISA 检测抗 oPRL 抗体。对分泌抗体的杂交瘤细胞作多次克隆化后, 获得 5 株杂交瘤细胞株。将杂交瘤细胞注入 BALB/c 小鼠腹腔致瘤, 获得含单克隆抗体的腹水, 纯化备用。同时收集含单克隆抗体的培养上清液备用。

(三) 单克隆抗体的纯化

将收集的 2D2 腹水以 20mmol/L pH

6.8 的磷酸钠缓冲液 10 倍稀释 (或杂交瘤细胞培养上清液) 上样羟磷灰石层析柱。洗除未吸附蛋白质后, 进行 100—300 mmol/L pH 6.8 磷酸钠缓冲液线性梯度洗脱。收集洗脱液检测 A_{280nm} 吸收峰。以 ELISA 检测抗体, 收集抗体阳性蛋白峰部分浓缩备用^[6]。

(四) 免疫吸附剂的制备

取 Sepharose 4B (Pharmacia 产品) 10ml, 加入含 $NaBH_4$ 12mg 的 0.1mol/L NaOH 6ml, 再加入环氧氯丙烷(epichlorohydrin) 1 ml。缓慢搅拌过夜。500ml 蒸馏水洗后, 换用 4% Na_2CO_3 平衡。然后加入纯化并与 4% Na_2CO_3 平衡的单克隆抗体 2D2 混合。37℃ 保温 24h, 间歇摇动。以生理盐水充分洗涤琼脂糖珠后, 再以 4% Na_2CO_3 与 10% 乙醇胺 1:1 混合液浸泡, 37℃ 反应 4h。用生理盐水充分洗涤后装入层析柱。

(五) 亲和层析纯化 oPRL

装有 Sepharose 4B-2D2 的层析柱, 依次用生理盐水、0.2mol/L Gly-HCl pH 2.3, 生理盐水分别洗涤至流出液 $A_{280nm} \leq 0.05$ 后, 将羊垂体前叶生理盐水抽提液上柱, 流速 0.5ml/min。上样完后以生理盐水洗涤, 流速 1ml/min。检测 $A_{280nm} < 0.05$ 后, 换用 0.2mol/L pH 2.3 Gly-HCl 缓冲液洗脱, 监测洗脱液 A_{280nm} 。收集蛋白峰部分, 立即以 1mol/L $NaHCO_3$ 中和。

(六) SDS-PAGE

分离胶浓度 10% 在 LKB 普通电泳仪上进行垂直板型电泳。亲和层析所得蛋白峰部分与电泳标准蛋白 (Pharmacia) 比较确定分子量。

结果和讨论

(一) 抗 oPRL 单克隆抗体制备与纯化

用淋巴细胞杂交瘤技术获得 5 株分泌抗 oPRL 单克隆抗体的杂交瘤细胞株。应用 ^{125}I 标记一种单克隆抗体, 与另一种未标记单克隆抗体对 oPRL 进行两位夹心固相免疫放射测定法至少可鉴别出 oPRL 上 3 个不同的抗原决定簇。与兔抗鼠 Ig 类及亚类抗血清 (北京生物制品研究所产品) 进行双向免疫扩散法鉴定。5 种单克隆抗体除一种为 IgG₁ 亚类外, 其余 4 种均属 IgG_{2a}。ELISA 测定 5 种含抗体腹水, 抗体稀释度均在 5×10^{-4} 以上。与羊生长激素反应很弱或无。

选择属 IgG_{2a} 的单克隆抗体 2D2 的腹水和培养上清液经羟磷灰石柱层析, 腹水层析结果示于图 1 (培养上清液层析图相似)。以 ELISA 检测抗体阳性蛋白峰示于图中阴影部分。集中在 0.21mol/L 以上磷酸盐缓冲液浓度洗脱液中。收集抗体阳性蛋白峰, 合并浓缩用于制备免疫吸附柱。

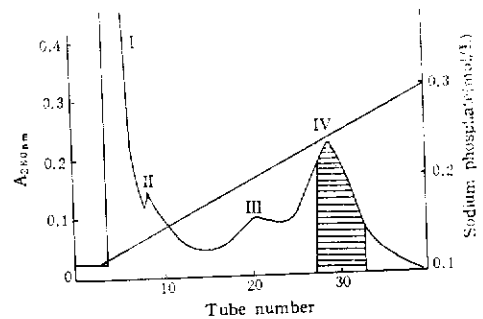


图 1 羟磷灰石柱层析分离腹水中抗 oPRL 单克隆抗体
Fig.1 Purification of oPRL specific McAb from ascites fluid by HAP chromatography

I, II, III, IV: 层析蛋白峰 Protein peak

■: ELISA 检测抗体阳性 Antibody activity detected by ELISA

(二) 亲和层析纯化 oPRL

生理盐水粗提的 oPRL 液经 Sepharose 4B-2D2 层析柱后, 以生理盐水洗脱未被吸附的杂蛋白。然后改用 pH 2.3 的 Gly-HCl 使抗原-抗体复合物分离。所得蛋

白峰即为纯化的oPRL(图2)。经SDS-PAGE鉴定此酸性洗脱蛋白峰为分子量24kd的单一蛋白质区带。

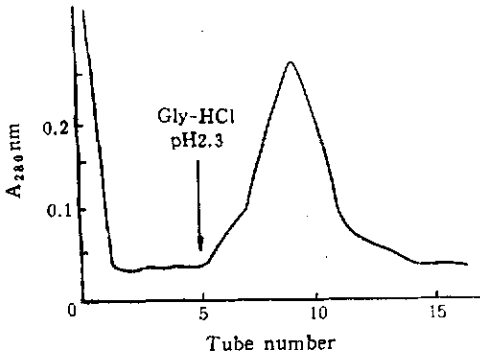


图2 亲和层析法纯化 oPRL
Fig.2 Purification of oPRL by affinity chromatography

由于PRL有较广泛的生理功用。它已

成为国内外学者研究的重要激素之一。自1937年以来,国外学者开始PRL的分离工作。近几年来方法不断改善,使PRL的纯度日益提高。但由于PRL与生长激素结构相近,且含量很低,使纯化工作十分复杂和困难。因而建立简单快速的方法以除去PRL的近似物及保留其活性是研究PRL所迫切要求解决的问题。我们应用抗 oPRL 抗体免疫吸附柱层析,方法操作简单,特异性高,保留PRL活性好,有利于PRL的纯化。此层析柱经反复使用效果良好。由于人PRL与羊PRL有92%同源性和强的交叉免疫反应^[1],我们准备应用此免疫吸附柱于纯化人的PRL。此外可望用纯化的oPRL于人PRL的检测及畜牧业乳制品生产中。

参 考 文 献

- [1] Naill, H. et al.: *Recent Prog. Horm. Res.*, 29:387, 1973.
- [2] Pateels, J.L. et al.: *Excerpt Med. Sect.*, 3:616, 1973.
- [3] Healy, D.L. et al.: *J. Obstet. Gynaecol.*, 24(2):111, 1984.
- [4] Ellis, S.: *Endocrinology*, 69:554, 1961.
- [5] Kohler, G. and Milstein, C.: *Nature (London)*, 256:495, 1975.
- [6] 杨翰仪等: *中国免疫学杂志*, 4(5):270, 1988.

PURIFICATION OF OVINE PROLACTIN BY AFFINITY CHROMATOGRAPHY USING MONOCLONAL ANTIBODIES

Yang Hanyi Zhou Boguang Sun Liqun Yang Jingping
Mai Yingiao

(Bethune University of Medical Sciences, Changchun)

Five monoclonal antibodies against ovine prolactin (oPRL) were obtained by lymphocyte hybridoma technique. One of these monoclonal antibodies, 2D2, with lower affinity was purified by hydroxylapatite chromatography. 2D2 was coupled with Sepharose 4B by epichlorohydrin to form immunosorbent column, which was used for purification of oPRL from curde preparation with a single-step procedure.

Key words

Ovine prolactin; monoclonal antibody, affinity chromatography