

亲和层析法在免疫学中的应用

谢彦博 王际彰

(北京生物制品研究所生化室)

在免疫学研究中,很早就开始将抗原-抗体反应的特异性用于提纯抗原或抗体。其方法是先使抗原与抗体在液相中可逆结合成为免疫沉淀物,洗涤除去不反应的杂质,然后改变条件使它们解离以获得纯净的抗体或抗原。解离的方法有稀酸法、稀碱法、浓盐法、增温法等四类。

但因其液相反应,实用尚有局限性,仅适用于天然的颗粒性抗原,如细菌、红细胞等。对于非颗粒性抗原,则必须在解离时设法将它变为不溶性的,以便与可溶性的抗体分子分开。

在50—60年代间,针对液相反应的局限性,出现许多制备固相酶、抗原或抗体的报道,即用种种化学方法将它们偶联到不溶性的载体上(载体偶联法),或依靠双功能团试剂(如戊二醛)在酶、抗原或抗体分子间发生交联反应,成为不溶性的网状结构,然后装柱以层析法进行免疫吸附反应,或在普通容器中分批进行免疫吸附反应。

但是这些免疫吸附剂,缺点是非特异吸附较高,产品纯度尚难令人满意。

亲和层析法是最近5、6年间在固相酶及免疫吸附剂的基础上发展起来的一种新方法。即利用生物高分子化合物的反应特异性,使其可逆地与其相应的固相配体结合,从而将生物高分子从其它杂质中分离出来,以达到很高的纯度。

瑞典的 Porath、Ax'en、Ernback^[1] 最早介绍用溴化氰活化珠状琼脂糖凝胶后偶联蛋白质(如酶或抗原)的方法。此法反应温和,结合牢固,蛋白质一般不会失活。其后, Ax'en 及 Ernback^[2] 详细报道了各种酶与卤化氰活化的多糖载体,如交联葡萄糖、纤维素、琼脂糖凝胶结合的条件和方法。后来,又有不少文献介绍了亲和层析实验方法及其在酶、蛋白质、抗原、抗体提纯中的应用^[3,4-7]。迄今,亲和层析法已发展成为广泛应用的一种生化新技术。现将我们应用溴化氰活化法进行亲和层析的方法报告如下。

亲和层析实验方法

亲和层析实验可分载体活化、蛋白偶联、免疫吸附和解吸再生四个步骤。

一、载体活化

首先考虑载体的选择,理想的载体应该具备以下性能:①亲水性,②不溶性,③在使用条件下稳定,④非特异吸附力低,⑤有大网络结构,⑥易于进一步作成衍生物。常用的载体有珠状琼脂糖,依其琼脂糖量分为2B(2%),4B(4%)和6B(6%)三种。我们所用的是4B珠状琼脂糖凝胶,一些来自瑞典,一些系自己制作^[8]。

我们主要参照 Cuatrecasas 法^[9]进行活化反应。将4B在G3玻璃滤器中用水充分洗涤,抽至表面无水后,称取10克。取CNBr 1—2克,在乳钵中加水10毫升研碎,使CNBr大部分溶解后倒入4B中,在电磁搅拌下滴加2N NaOH,同时用装有碱性电极的pH计测定pH值,使pH维持在11.0,反应温度维持在15—20℃(用冰浴或往反应液中直接加入碎冰块),反应时间10—12分钟。到用时用500毫升冰冷的水在G3玻璃滤器上快速洗涤至中性,再用250毫升冰冷的0.1M NaHCO₃ (pH 9.0)洗涤,全部洗涤时间2—3分钟。此载体即可与蛋白质进行偶联。

CNBr为挥发性剧毒药品,操作时注意防止中毒,必须在良好的通风柜中进行。CNBr分装于水瓶中,加盖经石蜡浸泡过的软木塞,并用石蜡封口,在冰箱保存。发黄变质者不能用。此法需要在通风柜内滴加NaOH溶液维持pH恒定,较为麻烦且不安全。因此 Porath 等于1973年发表了用pH 11.9的磷酸三钾缓冲液维持pH恒定的方法^[9]。我们应用此方法偶联抗体,得到较好的效果。操作过程如下:

1. 取10克洗涤过的4B加10毫升磷酸钾缓冲液(配法:每升中含3.33克分子的磷酸三钾及1.67克分子磷酸氢二钾,10倍稀释后测定pH为11.9),放冰浴保温5—10℃。

2. 取CNBr 0.4克,加水4毫升,电磁搅拌下约20分钟溶解。

3. 在上述已加缓冲液的4B中,在电磁搅拌下缓慢滴加上述CNBr溶液4毫升,需时2分钟,再搅拌8分钟。

4. 用水及0.25M NaHCO₃ (pH 9.0)洗涤如前法。

二、蛋白偶联

- 1. 将需要偶联的蛋白质 200—400 毫克,用 0.1M 或 0.25M NaHCO₃ (pH 9.0) 透析,平衡过夜,维持 5—10℃。
- 2. 活化及洗涤好的 4B 立即与平衡好的蛋白质混合(活化产物不稳定,为节省时间,活化 4B 在 G3 滤器中快速洗涤后不必取出,堵塞滤器下部出口,直接将蛋白质溶液倒入混匀),倒入 18 × 180 毫米试管中,补加 NaHCO₃ 至 20 毫升总体积,加塞。
- 3. 置旋转圆盘上(每分钟转动约 10 次),在 10—20℃ 上下转动 24 小时(一般搅拌器长时间搅拌会使

4B 破碎及使蛋白质变性)。

4. 装色层柱,然后用 0.1M NaHCO₃ pH 9.0、0.1M 硼酸钠-硼酸-1M NaCl pH 8.5、0.1M 醋酸钠-醋酸-1M NaCl pH 4.1 缓冲液依次流洗,每种 150—200 毫升。收集全部流洗液,测定未偶联的蛋白质量,即可间接算出已偶联的蛋白质量及结合百分数。亦可将结合了蛋白质的 4B 用 6N HCl 在封口安瓿中 110℃ 水解 24 小时,滤去棕黑色沉淀物后测定其氨基酸量,即可直接算出偶联量。如此制备的亲凝胶可加缓冲液(含 0.02% NaN₃) 平衡备用,在冰箱可保存数日。

现将我们实验室制备的亲凝胶的部分结果列入表 1。

表 1 各种亲和层析用凝胶的制备结果

亲和凝胶种类及实验批号	活化方法 文 献	珠状琼脂糖凝胶 4B		CNBr (克/10 克 4B)	偶联蛋白质 种类及加量 (280μg O.D.)	偶联 (%)	偶联上的 蛋白质量 (O.D./克 4B)
		来源	用量(克湿重)				
兔抗人全血清蛋白的抗体 74-1	9	瑞典	10.0	0.4	333.0	82.0	27.3
同上 74-2-1	9	瑞典	10.0	0.4	234.0	83.8	19.6
同上 74-2-2	9	瑞典	10.0	0.4	234.0	65.3	15.3
马抗乙型肝炎抗原的抗体 74-1	9	瑞典	9.5	0.4	416.0	64.1	28.1
人血清蛋白 74-1	9	瑞典	10.0	0.4	199.0	55.7	11.1
同上 74-2	9	瑞典	49.0	0.4	721.0	55.1	8.1
同上 74-6	5	瑞典	10.0	3.0	268.0	67.6	18.1
同上 74-7-1	5	自制	10.0	3.0	235.0	76.4	17.9
同上 74-7-2	5	自制	10.0	2.0	235.0	78.5	18.5
同上 74-8	5	自制	50.0	2.0	1320.0	79.8	21.1

从表 1 可见参考 Porath 新法^[9]制备兔或马抗体的亲和凝胶可以得到满意的偶联量,约为 15—30 O.D./克 4B(湿重)。偶联时加入蛋白质较多则偶联量可以增加,但不成比例。制备人全血清蛋白的亲凝胶则偶联量偏低。这主要是因为人血清蛋白中的白蛋白及甲种球蛋白难以偶联之故。我们曾将不偶联的血清蛋白部分浓缩后以琼脂电泳分离,结果主要为白蛋白,少量甲种球蛋白及极微量乙种球蛋白,无丙种球蛋白。为了增加血清蛋白的偶联量,我们增加了 CNBr 的用量,从原来的每 10 克湿重 4B 用 0.4 克增至 2—3 克,并改加 2N NaOH 维持 pH,偶联量可以增加至 18—21 O.D./克 4B(湿重),如此制备的人全血清蛋白亲和凝胶,已用于制备免疫纯的马抗乙型肝炎抗原和抗体,效果很好^[10]。表 1 材料还表明,用我们自制的珠状琼脂糖凝胶制备人全血清亲和凝胶,其偶联量与瑞典 Pharmacia 4B 基本相同。

三、免疫吸附

免疫吸附可以在色层柱中(层析法)或普通容器中进行(分批法)。进行层析法时选用直径高度比为 1:10 的柱。将亲和凝胶装柱,以缓冲液平衡后即可上样。样品不宜过浓,我们采用 1—2% 的浓度,样品体积约为床体积的 1/2。例如 10 毫升的亲凝胶,我们用 1 毫升血清稀释 5 倍后加入,加样及流洗速度约为 1/2 床体积/小时。其他操作同一般层析方法。如用分批法则将亲和凝胶与样品混合搅拌数小时使其充分吸附后装柱,在同一缓冲液流洗。待流洗液中不再出现蛋白质(280μg O.D. < 0.95) 时,即可加解吸剂解吸。

四、解吸再生

亲和凝胶吸附抗原(或抗体)并充分流洗至无杂质蛋白质后即可进行解吸。常用的解吸剂有 pH 2—3 的甘氨酸缓冲液,7M 胍溶液等。解吸时流速可以提高,

如 10 毫升的凝胶,流速可取 50 毫升/小时。解吸下来的物质集中在很小的体积中,立即调整 pH 及离子强度使其稳定。亲和层析柱用水充分洗去解吸剂及用相应的缓冲液流洗平衡后即可再用。典型的亲和层析实验过程可见图 1。

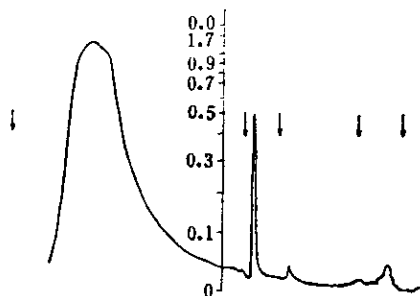


图 1 亲和层析过程

图中左起箭头依次代表加样、甘氨酸-HCl 缓冲液解吸、水洗、7M 脲溶液解吸、水洗。左起蛋白质峰依次代表:样品流穿峰、甘氨酸-HCl 缓冲液解吸峰、水解吸峰、7M 脲溶液解吸峰。

实验设计:

亲和层析法在免疫学中的应用可分提纯抗体及提纯抗原两大类。每类还可以根据实验设计分为吸附解吸法和过滤法两种。吸附解吸法用于需要得到极纯的特异抗体(或抗原)的场合,因吸附解吸后只有特异吸附的抗体(或抗原)解吸下来。吸附解吸除对亲和凝胶的质量要求较高外,还需有极纯的抗原(或抗体),因所得到的抗体(或抗原)的纯度直接依赖于所用的抗原(或抗体)的纯度,此外,解吸条件的选择也很重要,如何选择一种解吸能力高,回收率高而不破坏载体结构和抗体(或抗原)的生物活性的解吸剂仍是需要研究的。

过滤法是将需要除去的成分的配体偶联于珠状琼脂糖凝胶上,装柱后将样品过柱,需除去之成分即被吸附于柱上,流出液中即不含该成分,犹如过滤一样。例如,我们曾将正常人血清偶联于 4B 上,用以吸收马抗乙型肝炎抗原抗血清中的抗正常人血清的抗体,得到免疫纯的抗乙型肝炎抗原的抗体^[3]。过滤法产品虽达不到十分纯粹的要求(因尚含有其他无关蛋白质),但对于目前尚未能制出纯粹的抗原(或抗体)供偶联之用的体系时,仍是一条比较可行的途径。

亲和层析在免疫学中的应用

一、提纯抗体

Cuatrecasas 等报告了羊抗胰岛素抗体的初步工作^[4]。他们制备胰岛素-Sepharose 柱,用以吸收羊抗胰岛素的抗体,然后用 pH 2.8 的醋酸或 6M 脲-盐酸来解吸,可解吸出 80% 的抗体。Anfinsen 等^[10]用高度纯化的葡萄球菌核酸酶作为偶联抗原提纯了兔抗葡萄球菌核酸酶的抗体,用 pH 11 的氢氧化铵或 pH 3 的醋酸

溶液为解吸剂。Tripatzis 等^[11]在研究脑组织特异性抗原的时候,由于尚未能制出免疫纯的脑抗原,用初步提纯的糖蛋白给兔免疫,可产生特异抗体以及微量的两种杂抗体。他们用马脑匀浆制出亲和层析柱,抗体先经肝匀浆层析柱,用过滤法先除去部分杂抗体后再过脑匀浆层析柱,特异性脑抗体被吸附到柱上,再经解吸即可得到免疫电泳单一的抗脑抗体。Naoki 等^[12]为了增加兔抗促卵泡成熟激素抗体的特异性,制作了人绒毛膜促性腺激素的亲和层析柱,因后者与促黄体生成激素在免疫学特异性上是相同的,故可以吸收掉兔抗促卵泡成熟激素中的抗促黄体生成激素抗体成分。北京生物制品研究所报告^[3]将正常人血清偶联于珠状琼脂糖凝胶后,通过亲和层析法可以将马抗乙型肝炎抗原抗血清(用抗原抗体复合物法免疫)中的抗正常人血清蛋白抗体全部吸收,因而获得高效价的免疫纯的抗乙型肝炎抗原的抗体。

二、提纯抗原

Frommel 等^[13]报告将山羊抗豚鼠血清中的 IgG 与 Sepharose 偶联,用以吸收掉豚鼠血清中的 IgG₁、IgG₂、IgM (过滤法)。此种无丙种球蛋白的血清可用于组织培养实验;如用单相特异性抗血清制造的亲和层析柱吸收掉血清中的某一种 Ig,便可供某些复杂免疫反应分析之用。最近两、三年间,由于对乙型肝炎抗原及甲胎蛋白的广泛兴趣,陆续出现了用亲和层析法提纯这两种蛋白质的报告。Tripatzis 等^[14]报告用乙型肝炎抗血清制成的亲和层析柱可以将稀释成 500 毫升的 0.1 毫升阳性血清中的乙型肝炎抗原回收,因此适于检测极微量的乙型肝炎抗原。该作者用此法测出肝炎病人血及尿中均有乙型肝炎抗原,且血及尿中的该抗原是相同的。Grabow 等^[15]用兔抗乙型肝炎抗血清制成亲和层析柱,5 毫升的亲和凝胶可以将 20 毫升的阳性血清中的乙型肝炎抗原全部吸收。他们用 5M 碘化钠为解吸剂,抗原收率为 83%,无杂蛋白。与此同时,又有报告^[16]报道了用亲和层析法提纯乙型肝炎抗原的工作。他们采用两种方法提纯先经超离心及 G-200 型 Sephadex 凝胶过滤初步纯化的乙型肝炎抗原。其一为通过人抗乙型肝炎抗原血清的亲和层析柱,用 6M 脲-盐酸 pH 3.0 解吸;其二为通过马抗人全血清抗体的亲和层析柱(过滤法),杂蛋白即被吸收在柱上。两法均可制得不含杂蛋白的乙型肝炎抗原。在甲胎蛋白方面,Caron 等^[17]报告按照 Porath 等的方法^[18]在 Sepharose 4B 上引入环氧氯丙烷及间苯三酚后再与抗甲胎蛋白抗体偶合制成亲和凝胶,采用分批法与肝癌病人腹水搅拌 16 小时,装柱流洗,再用 pH 3 的甘氨酸缓冲液解吸。使用 30 毫升的亲和凝胶可以从 1200 毫升的人腹水中(含 162 毫克甲胎蛋白)制备出 36 毫克

(下转第 9 页)

(上接第 28 页)

的纯甲胎蛋白,如重复吸收和解吸总共可以制备出120毫克的甲胎蛋白。Pihko 等^[19]用绵羊抗人甲胎蛋白抗体制成亲和层析凝胶,以分批法与兔胚胎提取物搅拌后用 8M 脲及 0.05M 氨基乙醇解吸,甲胎蛋白的收率为 35%,经琼脂扩散法证实为单一成分。中国科学院生物化学研究所与上海市第六人民医院合作用亲和层析法制备出甲胎蛋白^[20]。他们将含有甲胎蛋白的材料先上单相抗甲胎蛋白柱,用 pH 2.4 的甘氨酸缓冲液解吸后再上混合的羊和兔抗正常人血清柱以吸去少量的杂蛋白,即可得到纯甲胎蛋白。此外, Ryder Jr 等^[21]报告用兔抗猪脾 DNA 酶 II 的亲和层析柱可以提纯猪脾 DNA 酶 II。

亲和层析法是一种选择性吸附层析法。实验方法简便快速,不需要特殊的昂贵的仪器设备。因此为生物学工作者所重视。在免疫学方面,亲和层析法的应用仅是在开端,在抗原和抗体提纯工作中取得了一些成绩,在其他免疫学分支中的应用仍在探索,今后,除应努力探讨这种技术在免疫学领域中各方面的应用以使其发挥更大的作用外,还应该对这种技术继续改进和发展。

参 考 资 料

[1] Porath, J., Axén, R. & Ernback, S.: *Nature*,

- 215: 1491, 1967.
- [2] Axén, R. & Ernback, S.: *Eur. J. Biochem.*, 18: 351, 1971.
- [3] Cuatrecasas, P. & Anfinsen, C. B.: *Ann. Rev. Biochem.*, 40: 259, 1971.
- [4] Cuatrecasas, P., Wilchek, M. & Anfinsen, C. B.: *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 61: 636, 1968.
- [5] Cuatrecasas, P.: *J. Biol. Chem.*, 245: 3059, 1970.
- [6] Cuatrecasas, P. & Anfinsen, C. B.: *Methods in Enzym.*, 22: 345, 1971.
- [7] Williams, K. W.: *Lab. Practice*, 22: 591, 1973.
- [8] 北京生物制品研究所: 微生物学通报, 第2卷, 第2期, 第17页, 1973。
- [9] Porath, J., Axén, R. et al.: *J. Chrom.*, 86: 53, 1973.
- [10] Anfinsen, C. B. et al.: *Nature*, 225: 189, 1970.
- [11] Tripathis, I. et al.: *Nature, New Biol.*, 230: 250, 1971.
- [12] Naoki, S. et al.: *Endocrin.*, 90: 302, 1972.
- [13] Frommel, D. et al.: *J. Imm.*, 105: 1292, 1970.
- [14] Tripathis, I. et al.: *Nature*, 231: 266, 1971.
- [15] Grabow, W. O. K. et al.: *J. Inf. Dis.*, 127: 183, 1973.
- [16] Józwiak, W. et al.: *J. Imm.*, 110: 1151, 1973.
- [17] Caron, M. et al.: *J. Chrom.* 87: 239, 1973.
- [18] Porath, J. et al.: *Nature, New Biol.*, 238: 261, 1972.
- [19] Pihko, H. et al.: *Immunochem.*, 10: 381, 1973.
- [20] 张先扬等, 生物化学与生物物理进展, 1974年 第2期 第40页。
- [21] Ryder, Jr. K. W. et al.: *J. Chrom.*, 80: 128, 1973.