

- 5 Geor RJ, Mccutcheon LJ. Thermo regulatory adaptation associated with training and heat acclimation. *Vet Clin North Am E quine paract*, 1998, 14(1): 97 - 120
- 6 Niess AM, Fehern banch E, Roeckerk, *et al.* Individual dibberenees in self - reported heat tolerance; is there a link to the cardiocirculatory, thermoregulatory and hormonal responsible endurance exercise in heat? *J sorts Med phys Fitness*, 2003, 43(3): 386 - 392
- 7 Sawka MN. Physiological consequence of hypohydrate: exercise performance and thermo regulation. *Med Sci. sport Exerc*, 1992, 24(6): 657 - 670
- 8 William R, Swindell, Juanl, Bougat. Association between environmental stress, selection history and quantitative genetic variation in *Drosophila onelanogaster*. *Genetic*, 2006, 5, 127, (1 - 3): 311 - 320
- 9 Gu DF, Reynolds K, Wu XG, *et al.* Prevenlance, Awareness, Treatment, and control of hypertension in China. *Hypertension*, 2002, 40: 920 - 927
- (收稿: 2009 - 10 - 20)

Protein A/G 亲和层析在 HCV 抗体纯化中的应用效果

杨 蓉 谢忠平 龙润乡 白惠珠 谭振国 王 燕 吴忠香 张 勇

摘 要 目的 分析蛋白 A/G 亲和层析柱在纯化抗 HCV 血清的影响因素, 以便选择最佳使用条件提高 Protein A/G 亲和柱的利用效率。方法 分别将抗 HCV 血清用不同处理方式、不同上样方式、不同使用次数的亲和柱进行纯化, 并收集纯化样品进行检测、分析。结果 用饱和硫酸铵粗纯后, 在蛋白 A/G 亲和层析柱的纯化效果更好; 样品在亲和柱内吸附 30min 可提高亲和柱的对目的蛋白的吸附。结论 使用初纯的抗体并增加吸附时间能提高亲和层析柱的利用率, 并有效延长亲和柱的使用寿命。

关键词 Protein A/G 亲和层析 抗体 纯化 丙型肝炎病毒

Application Effect of Protein A/G Affinity Chromatograph in Hepatitis C Virus Antibody Purification. Yang Rong, Xie Zhongping, Long Runxiang, *et al.* Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Yunnan 650118, China

Abstract Objective To analyze the factors of Protein A/G affinity column, influencing purification effect, and get the best condition to improve application effect of Protein A/G affinity column. **Methods** We Purified anti - HCV - IgG serum with different disposal modality, different sample input modality and different application number of affinity column before detecting and analyzing the purified samples. **Results** The Protein A/G affinity column had the best purified effect after using saturated ammonium sulfate to first purification, which increased the affinity column adsorption effect within 30 minutes adsorption. **Conclusion** Using antibody with first purification and adding the adsorption time could improve utilization rate of affinity column and prolong the service life.

Key words Protein A/G; Affinity chromatograph; Antibody; Purification; Effect evaluation; Hepatitis C virus

亲和层析是一种快速有效的生物活性物质的纯化方法, 它通过偶联蛋白对目的蛋白选择性的吸收和分离, 可取得较高的纯化效果, 且操作简便, 广泛地应用于实验室抗体纯化。由于产品价格昂贵, 使用成本较高, 限制了它的运用, 为了有效提高亲和柱的利用率, 适当降低使用成本, 本室应用 Protein A/G 纯化抗 HCV 血清, 通过对样品不同处理方式、不同上柱方式对亲和柱的影响, 作系统的分析比较, 现将结果报告如下。

材料与方法

1. 材料: (1) 亲和胶: 碧池公司 Thermo/Protein A/G Ultralink Resin。(2) 商品缓冲液: Protein A/G IgG Binding buffer Prod[#] 54200 ot[#] JD121815, IgG Elution buffer Prod[#] 21004 Lot[#] JD122182。(3) 吸附液为 0.1M Tris - HCl 缓冲液 (pH7.97)。(4) 洗脱液为 0.1M Gly - HCl 缓冲液 (pH2.67)。(5) 上海科华 HCV 抗体检测试剂盒 (20080906 批)。(6) 北京鼎国蛋白含量检测试剂盒 (Lorwy 法)。(7) 仪器: 岛津 UV - 1800 紫外可见分光光度计, 梅特勒 - 托利多 DELTA320PH 计, PAC200 电泳仪, Eppendorf5804R 冷冻离心机, Gene5 酶标仪。(8) HCV 抗血清: 本所用 HCV 多表位抗原免疫的兔抗 HCV 血清^[3]。

2. 方法: (1) 样品的预处理 (两种处理方式): ①饱和硫酸铵粗纯化: HCV 抗血清, 加入等体积的 50% 饱和硫酸铵^[4], 置 4℃, 2h, 5000r/min, 离心 20min, 弃上清, 沉淀用适量 0.01mol/L PBS 悬浮, 加入等量的 33% 饱和硫酸铵, 置 4℃, 2h, 5000r/min, 离心 20min, 弃上清, 沉淀用适量 0.01mol/L PBS 悬浮, 装

基金项目: 国家 863 资助项目 (2007AA02Z480)、云南省联合支持国家计划项目 (2008GA008)

作者单位: 650118 昆明, 中国医学科学院/北京协和医学院医学生物学研究所

通讯作者: 谢忠平, 电子信箱: xzp@imbcams.com.cn

入处理好的透析袋中,放入 0.01mol/L PBS 中,4℃,磁力搅拌过夜。上样前加入等量吸附液平衡待用;②HCV 抗血清直接加入等体积吸附液平衡 30min 待用。(2)亲和柱预处理:将 2ml protein A/G 凝胶装入柱内,使胶面平整,无沟流及气泡;用吸附液平衡 5~10 个柱体积。连接紫外可见分光光度计在 280nm 波长处调零^[1]。(3)上样(两种上样方式):①用吸管取适量已处理上样样品,上样量与柱体积相等,沿柱内壁缓慢加入。上样后用止血钳夹住出样端 30min,使目的蛋白与偶联蛋白充分结合,并且用流传峰循环再环上样;②预处理样品直接上样。(4)吸附:用吸附液再次平衡柱体,在 A₂₈₀ 处测定蛋白浓度,直到基线稳定(即杂蛋白完全洗脱)。(5)洗脱及再生:加入洗脱液,待吸光度上升至 0.1 以上时收集,吸光度下降至 0.1 以下停止收集。待基线稳定后,再加入 5~10 个柱体积对柱子再生;加入 0.05% 叠氮钠 5~10 个柱体积后,两端封口,4℃ 备用。

3. 纯化样品处理及检测:(1)分别收集各样品收集峰并及时加入适量 1mol/L Tris 调 pH 值至中性,装入透析袋,放入 0.01mol/L PBS 中,4℃,磁力搅拌,换液。(2)Lowry 法检测纯化抗体的蛋白含量。用北京鼎国 82Q001100 批 Folin 酚蛋白定量试剂盒检测,纯化抗体分别作 1:20,1:40 两个稀释度,标准蛋白稀释为 0.2mg/ml、0.4mg/ml、0.6mg/ml、0.8mg/ml、1.0mg/ml,取 1ml 蒸馏水作为空白同步操作;每管加入 5ml 甲液,混匀,室温,10min,加入乙液 0.5ml,混匀,室温,30min,在

650nm 波长处,用紫外可见分光光度计读数;绘制蛋白标准曲线,从曲线上可得到待测样品浓度。(3)3ELISA 法检测纯化抗体活性。用上海科华 20080906 批试剂盒检测,纯化抗体 100 微升/孔,37℃,30min,洗板机洗板 5 次,酶标抗体 100 微升/孔,37℃,30min,洗板机洗板 5 次,TMB 显色,37℃,10min,终止液 50 微升/孔终止,在 450nm 和 630nm 波长处,放入酶标仪上读板。(4)SDS-PAGE 电泳检测其纯度。配胶:分离胶浓度为 12%,浓缩胶浓度为 5%;电泳条件参照文献要求^[5]。

结 果

1. 不同处理方式上样纯化效果比较:样品 1 与样品 2 除样品处理方式不同外,其他上样情况都相同。在杂蛋白洗脱过程中,粗纯样品的杂蛋白峰值明显小于血清样品的杂蛋白峰值。由表 1 数据可看出,由于样品 1 经过饱和硫酸铵粗纯,样品中目的抗体浓度高,杂蛋白较少,所以其目的蛋白高峰值持续时间较长,为 9min,且 OD 值达到 4.0;而样品 2 为血清上样,含有较多杂蛋白,其目的蛋白峰值只达到 1.92,维持时间由 35min 缩短到 19min。以上结果显示,用初纯过的抗体上亲和层析柱可有效去除样品中的杂蛋白,提高亲和柱的工作效率。

表 1 样品不同处理方式纯化效果比较

处理方式	流传峰最高 OD 值	收集峰最高 OD 值	峰值维持时间 (min)	收集时间 (min)	总抗体量 (ml)
样品 1	2.18	4.0	9	35	34.0
样品 2	4.0	1.54	4	19	15.1

样品 1 为用饱和硫酸铵粗纯化样品,样品 2 为未经饱和硫酸铵粗纯化样品

2. 不同上样方式纯化效果比较:样品 A 和样品 B 均为饱和硫酸铵粗纯化样品,由于上样方式的不同造成纯化效率的差异。从表 2 可看出,由于样品 A 经过 30min 充分吸附,目的蛋白与蛋白 A/G 结合充分,亲和层析柱吸附利用度高,所以其目的蛋白高峰值持续时间较长,而样品 B 为直接上样,虽然最高 OD 值也达到了 4.0,但峰持续时间十分短暂,由 5min 缩短到 0.5min。以上结果显示,上样后用止血钳夹住出样端 30min,使 IgG 与亲和柱充分结合,并且每

次均用流传峰再次上样,使未结合到亲和柱上的目的蛋白再次结合,这样可有效利用层析柱的吸附能力,并提高纯化效率。

3. 不同使用次数的纯化效果比较:见表 3。用至第 10 次时,由于蛋白凝块阻塞,其纯化效率大大下降,将亲和胶取出置于小方瓶中用吸管反复吹打,直至无片状蛋白凝块。将之前已使用过 10 次的亲和胶合并后共 4ml,重新装柱、再生、平衡。将使用次数超过推荐使用次数的合并柱与另一支使用在推荐使用次数内的 Protein A/G 亲和柱做平行比较,新柱及合并柱上样样品均用饱和硫酸铵粗纯化过,加样方式均为加样后吸附 30min,加入洗脱液后由于合并柱的柱体积较长,加样量为新柱的 2 倍,所以出现峰值的时间较晚,其峰值维持时间和收集时间也较长,合并柱第 17 次收集峰所测到的最高吸光度比新柱略高。从

表 2 不同上样方式纯化效果比较

上样方式	收集峰最高 OD 值	峰值维持时间 (min)	收集时间 (min)	总抗体量 (ml)
样品 A	4.0	5	35	34.2
样品 B	4.0	0.5	25	24.6

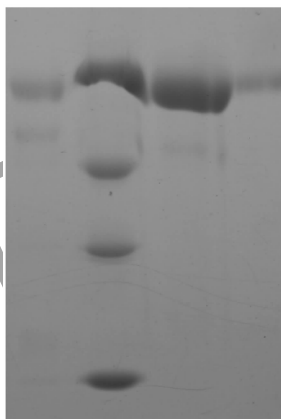
样品 A 上样方式见上样方式①,样品 B 上样方式见上样方式②

紫外分光光度计检测到收集峰的吸光值看,使用过 17 次后的柱子,亲和胶仍能有效地结合 IgG,其纯化后抗体浓度与新柱相比未见明显下降。(1) Lowry 法测得 HCV 新柱纯化抗体浓度为 2.15mg/ml,合并柱纯化抗体浓度为 1.88mg/ml。新柱纯化抗体的浓度略高于合并柱。(2) 用上海科华 HCV 抗体试剂盒 (ELISA 法) 检测纯化抗体的特异性及活性,结果显示:两种亲和柱纯化抗体活性检测均能达到 0.7mg/ml,特异性及活性无明显差异。(3) 用 SDS - PAGE 法测定其纯度结果见图 1。结果显示使用过 17 次亲和柱纯化抗体的纯度与使用过 8 次亲和柱纯化抗体的纯度相同,并无其他杂蛋白,见表 3。

表 3 不同使用次数的纯化效果比较

使用次数	收集峰最高 OD 值	高 OD 值范围 (2.0 ~ 4.0) 维持时间 (min)	收集时间 (min)	总抗体量 (ml)
新柱第 7 次	3.2	5	20	18.1
新柱第 8 次	3.3	5	18	16.7
合并柱第 16 次	3.5	11	29	28.3
合并柱第 17 次	3.5	10	26	24.6

合并柱为之前使用过 10 次以上的 2 支 2ml 的 Protein A/G 亲和柱,合并后使用至 17 次



Marker 抗体 1 抗体 2

图 1 亲和层析样品纯度电泳检测照片

抗体 1 为使用至 17 次亲和柱纯化抗体,抗体 2 为使用至 8 次亲和柱纯化抗体

讨 论

在免疫亲和层析技术中,有多种因素可影响到免疫亲和层析纯化效果,虽然亲和胶偶联蛋白 A/G 能与 IgG 的 Fc 段有效结合,但对缓冲液、离子强度、pH 值的变化敏感,选择合适的缓冲液、pH 值和离子强度是有必要的^[3];另外样品中的一些杂质会堵塞柱子使纯化效果降低,对样品进行预处理可降低影响;控制样品流速和样品的预处理也是非常重要的^[6]。所用缓冲液不论是商品试剂还是自配的,从平衡、吸附、

洗脱、再生都应该配套使用,否则可能因为组分不一致而影响使用效果;使用前所有材料应放室温平衡 30min;样品上样后应与亲和柱有一定的反应时间以提高抗体结合率。收集到的纯化样品应及时加入 Tris 缓冲液,防止抗体免疫活性的丧失。若样品蛋白含量较高,上样后易形成沉淀造成堵塞,加样前可做适当稀释,加样时应将样品充分混匀,边加边混匀,应少量多次加。若出样速度明显减慢表明柱内可能有蛋白凝块形成,应用吸管把蛋白凝块吹散,让胶体重重新沉淀,若蛋白凝块没有吹散,以后每次纯化均会受到该种蛋白的影响。

与亲和胶配套的缓冲液价格昂贵,为降低使用成本,我们在配套试剂用完后,改用自配的缓冲液,使用过程中发现,用商品缓冲液平衡、上样后,加入自配吸附缓冲液后待纯化样品却被迅速洗脱,可能是由于两种缓冲液的离子强度、pH 值存在一定差异造成。但在随后的纯化过程中,改用自配的缓冲体系,也能得到很好的纯化效果。

Protein A/G Ultralink Resin 亲和柱用不同处理方式的样品上样,对亲和柱的使用寿命有影响,用经饱和硫酸铵粗纯的样品作为上样样品可获得较好的纯化效果,还可适当延长亲和层析柱的使用次数,降低使用成本;不同的上样方式对纯化效率有影响,加样后,让样品在亲和柱内吸附 30min 可提高亲和柱的纯化效率;Protein A/G Ultralink Resin 厂商建议使用次数为 10 次,在使用初纯抗体作上样样品后,亲和柱使用至 17 次时,其纯化效果仍能满足需要。

综上所述,在采取适当的样品处理方式和一定的上样方法后可有效提高蛋白 A/G 亲和层析柱的使用寿命和纯化效率。

参考文献

- 黎燕,冯健男,张纪岩. 分钟免疫学实验指南. 化学工业出版社, 2008:29-33
- 冯慧,伊德林,曾艳,等. 亲和层析法纯化抗大肠肿瘤相关抗原的单克隆抗体. 新乡医学院学报, 2006, 20(6): 564-568
- 谢忠平,崔萍芳,宋霞,等. 利用 HCV 多表位复合抗原制备高效价抗体. 中国生物制品学杂志, 2005, 18(04): 313-315
- 黄祯祥,洪涛,刘崇柏. 医学病毒学基础及实验技术. 北京:科学出版社, 1990:220-223
- 曹成喜. 分析生物化学技术. 北京:化学工业出版社, 2008, 1: 62-66
- 应国清,王玉姣,易喻,等. 免疫亲和层析技术及其医药应用进展. 药物生物技术, 2005, 12(5): 342-346

(收稿:2009-09-14)

(修回:2009-12-03)