

利用鸡蛋特异性抗体 IgY 的免疫亲和色谱*

陈天豹, 李 珑, 徐小华, 张蓉真, 饶平凡

(福州大学生物工程研究所, 福建 福州 350002)

摘要: 以牛血清白蛋白(BSA)作为抗原, 利用偶联上 BSA 的 Sepharose-4B 的亲合色谱材料从鸡蛋蛋黄中一步分离特异性抗 BSA 抗体。经 SDS-PAGE、双向免疫扩散检验, 所洗脱的样品为电泳纯的特异性抗体。反之, 将所得抗体再偶联到 POROS HY 上可分离抗原。同时考察了母鸡免疫过程中特异性抗体随时间的变化趋势。

关键词: 免疫亲和色谱; 特异性鸡蛋抗体; 灌注色谱

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(1999)06-0563-04

1 前言

亲和色谱作为一种新兴的分离方法因其较简单的纯化过程和迅速、高效率而被重视^[1], 特别是应用在活性物质(如抗体)的分离上更显出优越性^[2]。

通过免疫的方法可以从免疫过的兔子等哺乳类小动物的血液中制备特异性抗体。同血清中的特异性 IgG 一样, 鸡蛋中特异性 IgY 是母鸡为保护下一代在产卵过程中把血清中的 IgG 转移到蛋黄中形成的^[3], 因此 IgY 也是灭病原的专一特效物质。

偶联上特异性鸡蛋抗体的固相载体已经成功的分离特定蛋白质^[4], 但固相材料的性质欠佳, 不适合应用于工业生产。POROS 是当今国际上最快速、先进和上样吸附量较大的分离材料。常规分离使用的大多数是葡聚糖、纤维素等材料, 耐压不高, 而 POROS 承压能力高达 17 MPa, 是以往大多数材料所不能比拟的。本文以牛血清白蛋白免疫产蛋母鸡为模型, 将分离所得的特异性抗体按位置-特异性偶联到聚苯乙烯材料 POROS HY 上, 分离牛血清白蛋白, 为工业化制备蛋白质作前期准备工作。

2 实验部分

2.1 实验材料

产蛋母鸡(购自福州蟠溪鸡场), 牛血清白蛋白(BSA)(北京百泰生化技术公司), 鸡蛋白蛋白(OVA)(中国科学院东方仪器设备公司生化部), 碳酸酐酶(CA)(中科院上海生化所东风生化技术公司), 溶菌酶(Lys)(中科院上海生物化学研究所), CNBr 活化 Sepharose-4B(Pharmacia 公司, 瑞典), POROS HY(PerSeptive Biosystems 公司, 美国), 其

它均为分析纯以上试剂。

2.2 实验方法

2.2.1 母鸡免疫

(1)初次免疫: 以 BSA 为抗原加福氏完全佐剂配制抗原液 1.6 mL(1.0 g/L), 分别于两边翅膀腋下与两腿肌肉进行注射(4点注射)。

(2)加强免疫: 以 BSA 为抗原加福氏不完全佐剂配制抗原液, 注射剂量为 1.6 mL(1.25 g/L)。

2.2.2 蛋黄水溶液制备

将鸡蛋黄稀释7倍, 混合均匀后置于 -20℃ 下, 冻结 10 h 后自然解冻。添加 3% 的硅藻土于 0.3 μm 的醋酸纤维素膜过滤, 所得滤液可直接应用于色谱分析。

2.2.3 配体与固相载体的偶联

(1)BSA 与 Sepharose-4B 的偶联: 按照使用说明偶联 BSA。偶联 BSA 质量浓度约为 10 g/L 胶。

(2)抗体的偶联: 按照 POROS HY 使用说明, 用亚碘酸钠将抗体的糖基氧化成醛基, 将位置-特异性抗体偶联到酰肼活化的 POROS HY 上, 偶联抗体质量浓度约为 5 g/L 胶。

2.2.4 免疫亲和色谱

(1)BSA-Sepharose 4B: 样品为蛋黄水溶部分, 上样缓冲液、平衡缓冲液为 20 mmol/L 磷酸缓冲液, pH 7.0; 洗脱缓冲液为 100 mmol/L 甘氨酸缓冲液, pH 2.8。

(2)AntiBSA IgY-POROS HY: 样品为牛血清白蛋白、鸡蛋白蛋白、碳酸酐酶、溶菌酶的混合溶液, 上样缓冲液、平衡缓冲液为 20 mmol/L 磷酸缓冲液, pH 7.0; 洗脱缓冲液为 100 mmol/L 甘氨酸缓冲液, pH 2.8。

* 收稿日期: 1998-07-28, 修回日期: 1998-11-04
基金项目: 福建省自然科学基金资助项目(96004)

2.2.5 SDS-PAGE

Laemmli 体系, 4% 浓缩胶, 10% 分离胶, 恒压电泳, 200V。

2.2.6 特异性抗体的检测——双向免疫扩散实验

免疫检测板底层、上层分别为0.75%, 0.1% 琼脂糖溶液。加入抗原和待测的样品, 于37℃扩散18h, 0.5 mol/L 溶液浸泡5h 洗去可溶蛋白, 用0.2% 考马斯亮兰染色1h, 用0.5 mol/L 的 NaCl 溶液褪色, 直至背景色清晰。

3 结果与讨论

3.1 特异性抗体的分离

根据免疫反应, 针对特定的抗原刺激, 机体可产生免疫应答, 这种应答的结果在动物体液和淋巴细胞表面上产生可与抗原特异结合而具有特定结构的球蛋白, 即为抗体。

图1为免疫 BSA 蛋黄液在免疫亲和色谱柱上的分离情况。从图中可以看出, 蛋黄液上样后, 未被柱材料吸附的表现为色谱图的第一个色谱峰 A。平衡缓冲液平衡至基线时, 改用洗脱缓冲液, 使抗体与抗原(BSA)的结合能力改变, 从而将吸附在柱上的蛋白质置换下来, 表现为图1中的 B 峰。

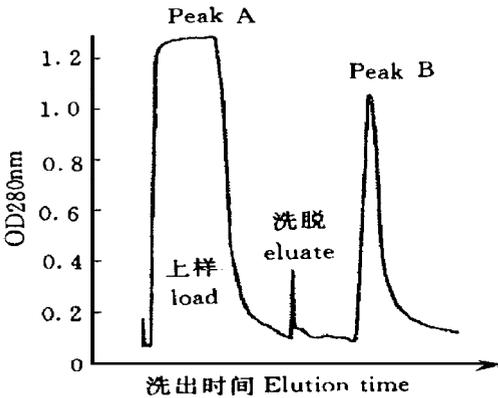


图1 免疫亲和色谱图(BSA-Sepharose 4B)

Fig. 1 Pattern of immunoaffinity chromatogram (BSA-Sepharose 4B)

柱: 0.46 cm × 4 cm, 上样量25 mL, 上样缓冲液、平衡缓冲液为20 mmol/L 磷酸缓冲液, pH 7.0, 洗脱缓冲液为100 mmol/L 甘氨酸缓冲液, pH 2.8。

Column: 0.46 cm × 4 cm; loading volume: 25 mL, loading buffer, equilibrating buffer: 20 mmol/L phosphate buffer, pH 7.0, eluating buffer: 100 mmol/L, glycine buffer, pH 2.8.

采用不同 pH 值(5.0, 3.5, 2.8)的甘氨酸缓冲

液洗脱的色谱图见图2。在不同的 pH 值情况下, 都有蛋白质洗脱下来。经电泳、双向免疫扩散检测均为电泳纯的特异性抗体(数据未列出)。根据多克隆抗体产生的原理, 它们对抗原的亲合能力有所不同^[5], 因此在不同的强度下会分别洗脱出来。基于分离单纯的特异性抗体的目的, 采用本实验的洗脱条件(100 mmol/L 甘氨酸缓冲液, pH 2.8)即可一步分离得到电泳纯的特异性抗体(图3, 4)。

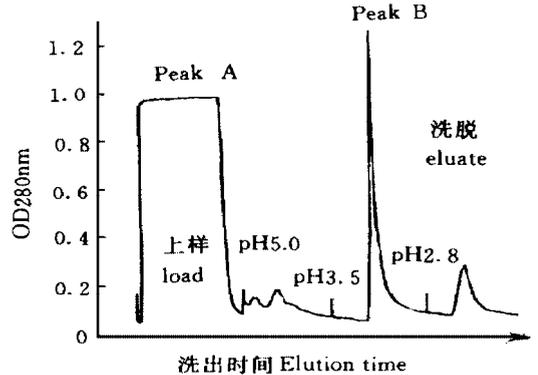


图2 免疫亲和色谱图(BSA-Sepharose 4B)

Fig. 2 Pattern of immunoaffinity chromatogram (BSA-Sepharose 4B)

柱: 0.46 cm × 4 cm, 上样量25 mL, 上样缓冲液、平衡缓冲液为20 mmol/L 磷酸缓冲液, pH 7.0, 洗脱缓冲液为100 mmol/L 甘氨酸缓冲液, pH 5.0, 3.5, 2.8。

Column: 0.46 cm × 4 cm, loading volume: 25 mL, loading buffer, equilibrating buffer: 20 mmol/L phosphate buffer, pH 7.0, eluating buffer: 100 mmol/L, glycine buffer, pH 2.8.

图3 电泳图

Fig. 3 Electrophoretic pattern

1. 实验样品; 2. C 峰; 3, 4. D 峰; 5. BSA; 6. 标准蛋白; 7. 蛋黄液; 8. B 峰。

1. sample; 2. peak C; 3, 4. peak D; 5. BSA; 6. protein markers; 7. WSF; 8. peak B.

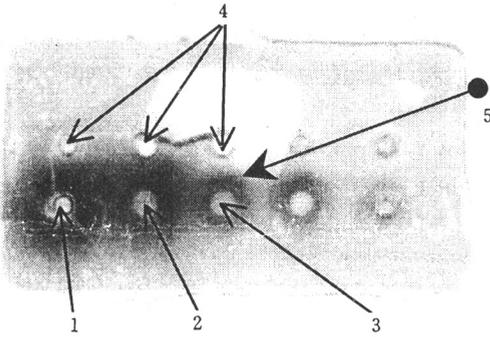


图4 双向免疫扩散图

Fig. 4 Double-immunodiffusion analysis

- 1. 蛋白液(WSF), 2. A 峰 (peak A), 3. B 峰 (peak B),
- 4. 抗原 Antigen(BSA), 5. 沉淀线(precipitated line).

通过双向免疫扩散检测可知, 未吸附的 A 色谱峰不能与抗原(BSA)形成沉淀线, 而经洗脱缓冲液洗脱下的 B 峰能与抗原(BSA)形成沉淀线。这表明在蛋黄液中与抗原(BSA)特异性结合的抗体在上样时能被色谱柱吸附。将未吸附的 A 色谱峰再返回上样, 比较前后两次洗脱峰的高度可以得出对抗体的回收率大于90% (表1)。

因此采用同样的蛋黄处理条件、上样量和洗脱条件, 通过洗脱峰的吸光度就能反映特异性抗体随时间的变化情况。比以往采用测定抗体滴度的方法简单、快速、准确, 而且能避免人为的视觉误差。免疫过程中特异性抗体随时间的变化趋势如图5所示。产蛋鸡经过加强免疫后产生特异性抗体的量大大增加, 这也符合抗体产生规律^[8]。

表1 亲和色谱分离鸡蛋蛋黄中特异性抗体

Table 1 Immunoaffinity purification of specific immunoglobulin from egg yolk

	鸡蛋抗体(IgY) Egg yolk antibody (IgY)
抗体含量 (Antibody content)	50~ 100 mg IgY/ 蛋 (5~ 7个蛋/周) (50~ 100 mg IgY per egg (5~ 7 egg per week))
特异性抗体含量 (Specific Antibody content) ^[6]	2~ 10%
亲和色谱分离特异性抗体含量 (Content of specific antibody isolated by immunoaffinity)	7. 22 mg IgY/蛋(最高) ^a (7. 22 mg IgY per egg)
第1次上样洗脱峰 OD _{280nm} (Desorbed eluate after first loading)	0. 85
第2次上样洗脱峰 OD _{280nm} (Desorbed eluate after second loading)	0. 075
回收率(Yield)(%)	> 90%
纯度(Purity)	电泳纯 (electrophoretic purity)

^a IgY 280nm 吸光系数(absorbance)^[7]: 13. 6.

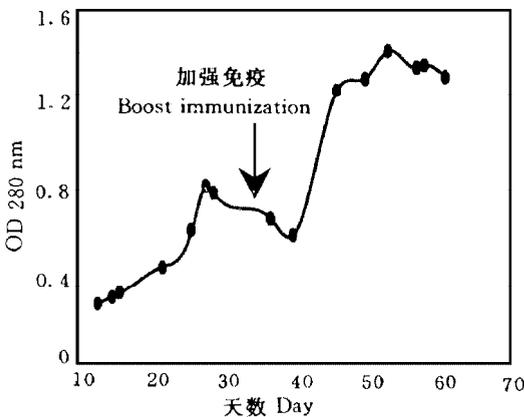


图5 免疫过程中特异性抗体随时间的变化趋势

Fig. 5 Production of specific antibody from chicken egg

3. 2 目的蛋白的分离

将收集的特异性抗体浓缩、氧化抗体上的糖基后偶联到目前最新的灌注色谱材料——POROS HY上。POROS 材料具有良好的性能, 能使用在高压液相色谱上。图6是应用偶联上抗体的亲和色谱分离牛血清白蛋白的实例。以牛血清白蛋白、鸡蛋白蛋白、碳酸酐酶、溶菌酶的混合溶液为上样试验品, 未吸附部分为图6中的 C 峰, 洗脱部分为图6中的 D 峰, 经过电泳检测, 洗脱部分为电泳纯的牛血清白蛋白。可以看出, 其优良的色谱性能和特异的分离效能, 使得免疫亲和灌注色谱大大提高了工作效率, 为工业化、规模化使用免疫亲和色谱分离目的蛋白质奠定了坚实的基础。

4 结论

通过偶联上牛血清白蛋白的 Sepharose 4B 可以进一步分离出鸡蛋黄水溶部分中特异性抗体, 再将抗

体偶联到灌注色谱材料 POROS 上分离相对应的抗原,为工业化分离目的蛋白奠定了基础。

参 考 文 献

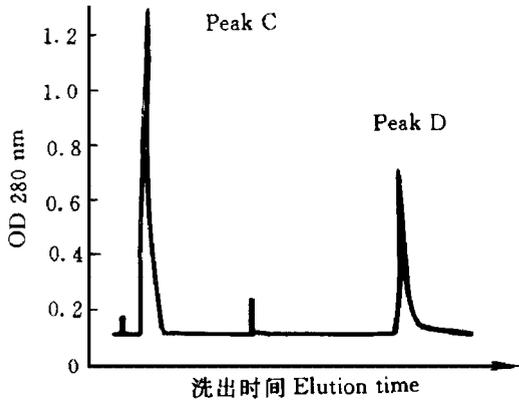


图6 免疫亲和色谱图(Anti-BSA-POROS HY)

Fig. 6 Pattern of immunoaffinity chromatogram (Anti-BSA-POROS HY)

柱: 0.46 cm × 4 cm, 上样量0.5 mL, 上样缓冲液、平衡缓冲液为20 mmol/L 磷酸缓冲液, pH 7.0, 洗脱缓冲液为100 mmol/L 甘氨酸缓冲液, pH 2.8。

- 1 Scouten. W. H. Affinity Chromatography, bioselective adsorption on inert matrices. New York: Wiley, 1981. 124
- 2 That T, Neeta Khatter. Chromatography, 1990 (510): 281-291
- 3 Klemperer, F. Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie, 1893 (31): 356-382
- 4 Akita E M, LiChan E C. J Dairy Sci, 1998, 81(1): 54-63
- 5 Miller G W, Segre D. J Immunol, 1972, 109(1): 74-83
- 6 Schade R, Bürger W, Schoneberg T et al. Alternativen zu Tiërexperimenten, 1994 (11): 75-84
- 7 Promega Notes Magazine Number 54, 1995. 3
- 8 Lubert Stryer, Biochemistry (Second Edition), 33 section: Immunoglobulin, W. H. Freeman and Company, 1980. 210

Immunoaffinity Purification of Specific Immunoglobulin from Egg Yolk

CHEN Tian-bao, LI Long, XU Xiao-hua, ZHANG Rong-zhen, RAO Ping-fan
(Institute of Biotechnology Fuzhou University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: Immunoaffinity column (Sephacrose-4B) was made with bovine serum albumin (BSA) and used to isolate anti-BSA antibody from egg laid by hens which were immunized with BSA. Polyclonal antibody was eluted under different conditions (pH 5.0-2.8) because of its different affinity against antigen. SDS-PAGE and double-immunodiffusion analysis confirmed that antibody isolated from egg yolk was electrophoretically pure and specific. According to the separation aim in this paper, the final elution buffer was 0.1 mol/L glycine-HCl buffer, pH 2.8. The final antibody yield was higher than 90%. As a new development in chromatographic media, POROS has its maximum pressure limit of 21 MPa. It has been widely used because of its high performance, high flow and large capacity. The sugar residue of the antibody was then oxidized and coupled to the hydrazide activated POROS HY. Pure targeted protein (BSA) was obtained through the POROS HY column. The tendency of specific antibody production was investigated during the immunization period. The amount of specific antibody has increased obviously after boost immunization.

Key words: immunoaffinity chromatography; specific IgY; perfusion chromatography