

文章编号:1000-7423(2003)-05-0300-03

# 东方田鼠血清 IgG 抗体的快速纯化法

蒋守富<sup>1</sup> 潘彩娥<sup>1</sup> 何艳燕<sup>1</sup> 朱民<sup>1</sup> 李浩<sup>2</sup> 石耀军<sup>2</sup> 魏梅雄<sup>1</sup>

**【摘要】** 目的 探索快速、高效纯化东方田鼠血清 IgG 抗体的方法。方法 采用 G 蛋白或 A 蛋白亲和层析法,对 3 种东方田鼠血清 IgG 抗体进行纯化,比较抗体纯度和回收率。结果 获得的 IgG 抗体纯度和回收率均以 G 蛋白亲和层析法为高。纯化的抗体活性高,与酶标二抗的吸附力分别为非 IgG 洗脱物的 8.5 倍和未纯化血清 IgG 的 3.1 倍。结论 G 蛋白亲和层析法纯化东方田鼠血清 IgG 快速、活性高,具有实用价值。

**【关键词】** 东方田鼠;亲和层析;G 蛋白;IgG

中图分类号:R383.24

文献标识码:A

## A Rapid Procedure to Purify Serum IgG from *Microtus foticus*

JIANG Shou-fu, PAN Cai-e, HE Yan-yan, ZHU Min, LI Hao, SHI Yao-jun, WEI Mei-xiong  
(1 Shanghai Municipal Center for Disease Control & Prevention, Shanghai 200336;  
2 Shanghai Institute of Veterinary Parasitology, Chinese Academy of Agricultural Sciences,  
Key Laboratory of Animal Parasitology, Ministry of Agriculture, Shanghai 200232)

**【Abstract】 Objective** To evaluate the procedure to purify IgG antibodies from *Microtus foticus* serum. **Methods** IgG antibodies from sera of three groups of *Microtus foticus* were purified by protein G or protein A affinity chromatography, their purity and binding capacity were compared. **Results** The protein G affinity chromatography was more efficient than protein A affinity chromatography. The antibodies isolated from protein G affinity chromatography showed a higher purity and better activity than that from protein A affinity chromatography monitored by SDS-PAGE and ELISA. The ability of the purified IgG to bind the second antibodies were 8.5 times and 3.1 times that of non-IgG proteins and unpurified sera, respectively. **Conclusion** The protein G affinity chromatography is a rapid, convenient and reliable procedure for *Microtus foticus* serum IgG purification.

**【Key words】** *Microtus foticus*, affinity chromatography, protein G, IgG

Supported by the Shanghai Municipal Foundation for the Development of Science and Technology (No. 20014909002)

东方田鼠(*Microtus foticus*, Mf)是日本血吸虫非适宜宿主,具有抗血吸虫病的天然抵抗力。无论是野生东方田鼠,还是室内繁殖的东方田鼠,均能抑制侵入其体内的日本血吸虫幼虫的发育<sup>[1,2]</sup>。东方田鼠血清在体外具有杀伤日本血吸虫童虫作用,并可被动转移给小鼠,使之获得部分抗血吸虫病保护力<sup>[3,4]</sup>。研究显示,东方田鼠血清中天然存在着抗日本血吸虫抗体,且以抗童虫抗体水平最高<sup>[5]</sup>。有效地分离纯化这些天然抗体将有助于对其进行研究分析和开发利用。为此,本文通过比较两种亲和层析法的纯化效果,首次报告利用 G 蛋白亲和层析技术,简便、快速、高效纯化东方田鼠血清 IgG 抗体的方法。

### 材料与方 法

#### 1 动物血清

东方田鼠:室内人工繁殖的有洞庭湖种群(MfDr)和宁夏种群(MfNx),体重分别为 30 ± 5 g 和 40 ± 5 g,由上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供。野生型

东方田鼠属洞庭湖种群(MfDw),在洞庭湖血吸虫病流行区现场捕获,体重为 25 ~ 60 g。

SD 大鼠:200 ± 2 g,购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司。

昆明系小鼠(Kunming mouse, Km):20 ± 2 g,复旦大学医学院实验动物部提供。

感染昆明系小鼠(Kunming mouse infected with *S. japonicum*, PKm):25 ± 2 g,实验感染日本血吸虫尾蚴 42 d 的昆明系小鼠。

上述各鼠均摘眼球采血,单个收集血清,除大鼠为 10 份血清外,其余各为 30 份血清,按组混合后分装,置 -70℃ 冻存储备。层析前分别经 10 000 g 离心 10 min,0.45 μm 孔径滤膜过滤除去细胞碎片。

#### 2 层析材料及仪器

层析柱为容积 1 ml 的 G 蛋白 Sepharose 高性能亲和层析预装柱(HiTrap protein G HP)或 A 蛋白 Sepharose 高性能亲和层析预装柱(HiTrap protein A HP),均为 Amersham Biosciences(瑞典)产品,批号分别是 Lot 292894 和 294045。层析仪 AKTA purifier,垂直电泳仪 SE250,均为瑞典 Pharmacia 公司产品。754 型紫外分

基金项目:上海市科学技术发展基金项目资助(No. 20014909002)

作者单位:1 上海市疾病预防控制中心,上海 200336;

2 中国农业科学院上海家畜寄生虫病研究所,农业部动物寄生虫学重点开放实验室,上海 200232

光光度计(上海第三分析仪器厂)、550 型酶标仪(Bio-Rad)。

### 3 仪器自动操作法

将层析柱安装于 AKTA purifier 层析仪。主要步骤为:先用 5 ml 0.02 mol/L (pH 7.0) 磷酸钠缓冲液 (PB) 洗出保护剂溶液,再用等量 PB 缓冲液平衡柱床,注入 1 ml 已平衡的血清样品,继用 7 ml PB 缓冲液洗柱以去除未结合蛋白(野生型东方田鼠及阳性昆明小鼠的洗柱液用 10 ml),然后以 5 ml 0.1 mol/L (pH 2.7) 甘氨酸缓冲液洗脱已结合的 IgG (HiTrap protein A HP 的洗脱液为 pH 3.0 的柠檬酸缓冲液),同时收集流出液(每管收集 1 ml)。以上纯化过程的流速均设置为 1 ml/min。每 ml 收集液中加入 45  $\mu$ l 1 mol/L (pH 9.0) Tris-HCl 予以中和,并测定 OD<sub>280</sub> 和 OD<sub>260</sub>,按紫外分光光度法<sup>16</sup> 计算抗体蛋白浓度。抗体纯度比较采用 SDS-PAGE 电泳法,其分离胶浓度为 10%,浓缩胶浓度为 4%,交联度 2.6%。加样前,将样品与样品缓冲液混匀后于沸水中煮沸 5 min。用考马斯亮蓝 R250 染色。

### 4 手工操作法

基本同仪器自动操作法。将层析柱直接放在试管架上即可用注射器进行操作,参照仪器层析结果,只收集主要蛋白峰的第 2 ml 样品,以提高纯化效率。层析过程中的流速控制在 16 滴/min (1 ml/min)。

### 5 抗体效价鉴定

用 ELISA 鉴定抗体的生物活性,即将各组鼠血清、纯化的 IgG 抗体(甘氨酸缓冲液洗脱物)以及非 IgG 蛋白(PB 缓冲液洗脱物),与 pH 9.6 的碳酸缓冲液按 1:200 稀释后包板,4  $^{\circ}$ C 过夜,充分洗涤后,分别与酶标 G 蛋白或 A 蛋白(HRP-protein G、HRP-protein A)及羊抗鼠 IgG (HRP-GAM/IgG) 置 37  $^{\circ}$ C 孵育 2 h,加底物 OPD 显色,测定 OD<sub>490</sub> 值。

## 结 果

### 1 抗体纯度比较

东方田鼠宁夏种群、洞庭湖种群(野生型和室内繁殖型)以及作为对照的大鼠、昆明小鼠、血吸虫抗体阳性昆明小鼠的血清在纯化前,以及在 G 蛋白亲和层析纯化过程中用 PB 缓冲液洗下的未结合蛋白和甘氨酸缓冲液洗脱的已结合的 IgG 抗体蛋白,经 SDS-PAGE 电泳分析,各组抗体蛋白带均只有两条,一条为重链,另一条为轻链,表明 G 蛋白亲和层析纯化的抗

体纯度很高。尤其是室内繁殖的东方田鼠,其血清中的 IgG 基本上全部与 G 蛋白结合并被洗脱。虽然野生型东方田鼠的 PB 洗脱物中残留少量 IgG,但与其它东方田鼠血清抗体的回收量比较,并不影响抗体的纯化效率。另外,大鼠和小鼠的血清 IgG 抗体与 G 蛋白的结合也很完全(图 1)。

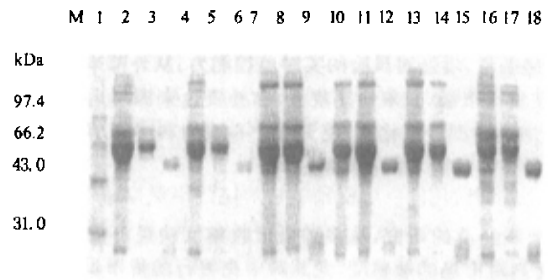


图 1 各组血清经 G 蛋白亲和层析后的 SDS-PAGE 谱 M 标志物 1,4,7,10,13,16 血清 2,5,8,11,14,17 PB 缓冲液洗脱物 3,6,9,12,15,18 甘氨酸缓冲液洗脱物 1-3 Km 4-6 Rat 16-18 PKm 7-9 MfNx 10-12 MfDw 13-15 MfDr

Fig. 1 SDS-PAGE of different serum samples purified by protein G affinity chromatography M Marker Lanes 1,4,7,10,13,16 Sera Lanes 2,5,8,11,14,17 PB buffer elution fraction Lanes 3,6,9,12,15,18 Glycine buffer elution fraction Lanes 1-3 Km Lanes 4-6 Rat Lanes 16-18 PKm Lanes 7-9 MfNx Lanes 10-12 MfDw Lanes 13-15 MfDr

采用 A 蛋白亲和层析法对上述血清 IgG 抗体进行纯化,经 PB 缓冲液洗下的未结合蛋白和柠檬酸缓冲液洗脱的已结合的 IgG 抗体蛋白,其 SDS-PAGE 电泳谱显示,各组抗体蛋白带也呈现两条主带,位置与 G 蛋白纯化法重链和轻链相同,但野生型东方田鼠的重链上方还出现 2 条非 IgG 抗体蛋白带,小鼠(包括血吸虫抗体阳性小鼠)的重链上方存在 1 条非 IgG 蛋白带,表明 A 蛋白亲和层析法对这些鼠血清 IgG 抗体纯化的纯度不如 G 蛋白高。而且,野生型东方田鼠 PB

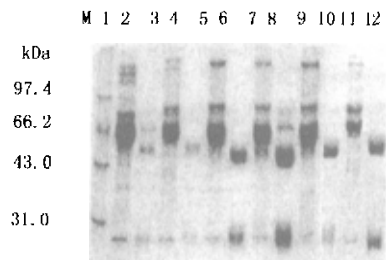


图 2 各组血清经 A 蛋白亲和层析后的 SDS-PAGE 谱 M 标志物 1,3,5,7,9,11 PB 缓冲液洗脱物 2,4,6,8,10,12 柠檬酸缓冲液洗脱物 1,2 Km 3,4 Rat 11,12 PKm 5,6 MfNx 7,8 MfDw 9,10 MfDr

Fig. 2 SDS-PAGE of different serum samples purified by protein A affinity chromatography M Marker Lanes 1,3,5,7,9,11 PB buffer elution fraction Lanes 2,4,6,8,10,12 Citric acid buffer elution fraction Lanes 1,2 Km Lanes 3,4 Rat Lanes 11,12 PKm Lanes 5,6 MfNx Lanes 7,8 MfDw Lanes 9,10 MfDr

洗脱物中也残留少量 IgG(图 2)。

### 2 抗体含量比较

不同鼠血清各 1 ml,分 2 次经亲和层析纯化,用紫外分光光度法测定每 ml 血清中纯化的 IgG 抗体回收量,结果各组均以 G 蛋白亲和纯化法高于 A 蛋白亲和纯化法,尤其在东方田鼠宁夏种群和洞庭湖种群(室内繁殖型)以及健康或血吸虫抗体阳性的昆明小鼠中表现突出,分别比 A 蛋白亲和纯化法高出 11.5%、11.4%、25.1% 和 17.6%。东方田鼠的 IgG 与 G 蛋白或 A 蛋白的亲合力均明显高于正常小鼠和大鼠 IgG,其回收量高出 68% 以上。

此外,用同一层析预装柱对昆明小鼠血清作连续 10 次纯化,抗体回收量的变异系数(CV)为 3.16%,显示良好的重复性。

### 3 抗体活性鉴定

ELISA 结果显示,东方田鼠、大鼠或小鼠,经 G 蛋白纯化的 1 ml 血清 IgG 抗体(甘氨酸缓冲液洗脱物),与 3 种二抗(酶标 G 蛋白、A 蛋白、羊抗鼠 IgG)的吸附力均明显高于非 IgG 蛋白(PB 缓冲液洗脱物),分别为后者的 10.6、10.4 和 6.2 倍,平均 8.5 倍;也明显高于未纯化的血清,分别相差 2.3、3.7 和 3.5 倍,平均 3.1 倍。表明所纯化的抗体为 IgG,且活性也高(图 3)。

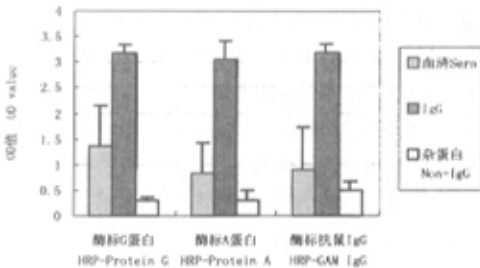


图 3 IgG 纯化前后的活性比较

Fig.3 Comparison of IgG activity before and after purification

### 4 手工纯化优势

手工操作法纯化血清 IgG 抗体简便易行。还可选择性收集第 2 ml 样品。因为根据 G 蛋白纯化过程图(以室内繁殖的洞庭湖种群东方田鼠为例,图 4),在注入洗脱液后,各鼠的蛋白主峰只出现在第 2 ml 收集管内,其纯度显而易见,含量也占全部回收量的 70% 以上。

### 讨 论

常用的抗体纯化方法有盐析法、离子交换法、凝胶过滤法、亲和层析法等多种,亲和层析法操作较温和、简便、快速、纯度高、活性物质回收率高,具有实用价

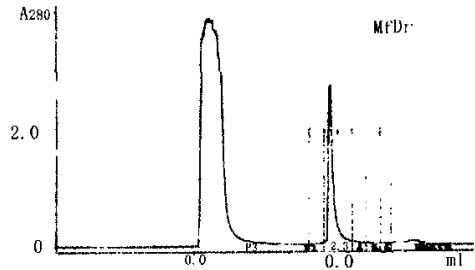


图 4 G 蛋白亲和层析法对东方田鼠血清 IgG 抗体的纯化过程 Fig.4 Purification of IgG from *Microtus fots* serum by protein G affinity chromatography

值<sup>[6]</sup>。邓瑞春等<sup>[7]</sup>将亲和层析法与辛酸法和离子交换凝胶过滤法进行比较,前者纯化的抗体纯度高、免疫活性好。在亲和层析法中,使用较多的是 A 蛋白亲和层析法和 G 蛋白亲和层析法。A 蛋白具有 5 个<sup>h</sup> IgG 的 Fc 段结合的区域,吸附 IgG 的能力较强。但 A 蛋白亦可与 IgA 或 IgM 的 Fc 段发生较弱的结合,还能吸附血清白蛋白或其它非 IgG 抗体。

G 蛋白特异性地与 IgG 的 Fc 段结合,其结合力较 A 蛋白强,范围也大于 A 蛋白,能与包括人在内的多种动物 IgG 产生高度的亲合力。邓瑞春等<sup>[8]</sup>和白丽等<sup>[9]</sup>分别用 G 蛋白亲和层析法纯化人和多种动物血清 IgG 抗体和纯化大鼠 IgG1 和 IgG2a 亚类抗体。本文采用 G 蛋白亲和层析法,对 3 个种群的东方田鼠以及大鼠和小鼠血清 IgG 抗体进行纯化,获得的抗体纯度和回收率均高于 A 蛋白亲和层析法。纯化抗体与酶标二抗的吸附力分别为非 IgG 洗脱物的 8.5 倍和未纯化血清 IgG 的 3.1 倍。使用市售预装柱纯化,再生方法简单、重复性好,用时短、效率高,具有实用价值。尤其是手工操作法,更不失为一种简便、高效和实用的抗体纯化方法。

### 参 考 文 献

- [1] 李浩,何艳燕,林娇娇,等. 东方田鼠抗日本血吸虫病现象的观察[J]. 中国兽医寄生虫病,2000,8(2):12-15.
- [2] 贺宏斌,左家铮,刘柏香,等. 室内繁殖和野生东方田鼠感染日本血吸虫的比较[J]. 实用寄生虫病杂志,1995,3:72-74.
- [3] 刘金明,傅志强,李浩,等. 东方田鼠 ADCC 体外杀伤日本血吸虫童虫效果的初步观察[J]. 寄生虫与医学昆虫学报,2001,8:212-219.
- [4] 罗新松,何永康,喻鑫玲,等. 东方田鼠血清被动的转移小白鼠抗血吸虫感染的保护性研究[J]. 中国人兽共患病杂志,1998,14(5):75-76.
- [5] 蒋守富,魏梅雄,林娇娇,等. 东方田鼠天然抗日本血吸虫抗体及 IgG 亚类的初步研究[J]. 中国血吸虫病防治杂志,2001,13:1-3.
- [6] 方福德,周吕,丁谦,等. 现代医学实验技巧全书(上册)[M]. 第 1 版. 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1995:550-561.
- [7] 邓瑞春,张明伟,白云秀,等. A 蛋白亲和层析法纯化动物血清抗体的效果比较[J]. 免疫学杂志,1999,15:128-130.
- [8] 邓瑞春,白云秀,张明伟,等. G 蛋白亲和层析法纯化动物血清、抗体效果比较[J]. 生物技术通讯,1999,10:198-200.
- [9] 白丽, Dent L. 应用 Protein G 纯化细胞培养上清中的大鼠单抗[J]. 免疫学杂志,1999,15:207-209.