

犬血清IgG的纯化、抗体制备及其鉴定

胡晓苗¹, 余为一^{1*}, 张丹俊² (1. 安徽农业大学动物科技学院, 安徽合肥230036; 2. 安徽省农业科学院畜牧研究所, 安徽合肥230031)

摘要 [目的] 探讨犬血清IgG的纯化方法。[方法] 采用硫酸铵盐析法结合SephadexG 200凝胶柱层析提取纯化犬血清IgG, 利用SDS PAGE电泳和免疫印迹法鉴定所得产品的纯度和免疫活性。[结果] 获得的纯化犬血清IgG的SDS PAGE图谱中存在2条蛋白条带, 表明获得了高纯度的犬血清IgG; 重链分子量为58 kD, 轻链分子量为27 kD, IgG分子量为170 kD。特异性检测发现犬血清IgG重链和轻链都能与鼠抗犬血清IgG抗体结合, 表明纯化犬血清IgG具有免疫原性和反应原性。[结论] 硫酸铵盐析法结合SephadexG 200凝胶柱层析可获得纯度高、活性好的纯化犬血清IgG, 为犬血清IgG相关的免疫学试验提供了高质量的免疫材料。

关键词 犬血清IgG; 纯化; SDS PAGE电泳; 免疫印迹

中图分类号 S829.2 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)21-08940-01

Purification and Antibody Preparation of Canine Serum IgG and its Identification

HU Xiao miao et al (Animal Science and Technology College of Anhui University, Hefei, Anhui 230036)

Abstract [Objective] The research aimed to explore the purification method of canine serum IgG. [Method] The purity and immune activity of canine serum IgG were identified by SDS PAGE electrophoresis and western blot after extracted and purified by ammonium sulfate salting out method combined with SephadexG 200 gel filtration chromatography. [Result] The purified canine serum IgG showed two protein bands in the SDS PAGE map, which indicated that the obtained canine serum IgG was highly purified. The molecular weight of heavy chains, light chains and IgG were 58 kD, 27 kD and 170 kD, resp. Specific detection showed that the heavy chains and light chains of canine serum IgG all could bind with mouse anti canine serum IgG, which indicated that the purified canine serum IgG had immunogenicity and reactionogenicity. [Conclusion] The purified canine serum IgG with high purity and activity were obtained by ammonium sulfate salting out method combined with SephadexG 200 gel filtration chromatography, which provided high quality immune material for canine serum IgG related immune experiment.

Key words Canine serum IgG; Purification; SDS PAGE; Western blot

IgG 主要分布于动物血清中, 占血清总量的免疫球蛋白(Ig) 75%。抗毒素、抗病毒和大多数抗菌抗体均为IgG。目前, 犬IgG的纯化及分子量的测定国内很少涉及。鉴于与犬IgG有关的用于犬病菌、病毒血清学检测方法很不完善, 对其研究具有重要的理论意义和应用前景, 特别用免疫球蛋白制备的多克隆或单克隆抗体作为研究工具尤为重要。因此, 笔者研究探讨了分离纯化高纯度的犬IgG的关键技术, 以期今后的相关研究储备资源, 为探讨犬血清IgG相关免疫学知识奠定基础。

1 材料与方法

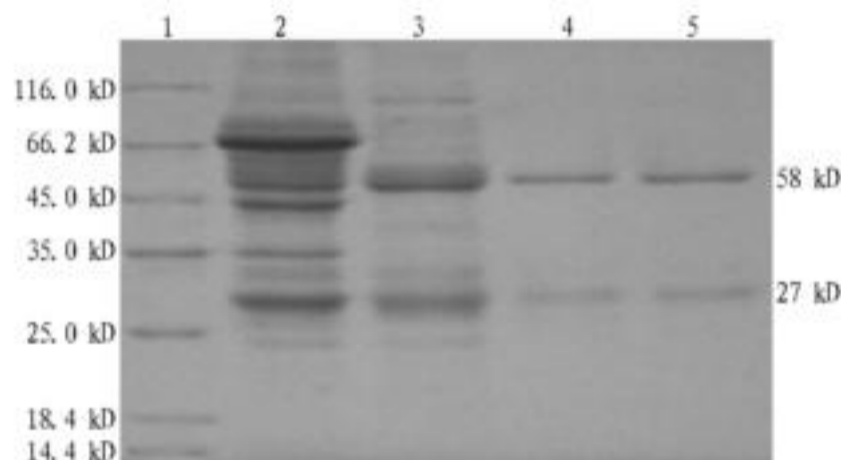
1.1 材料 犬血清采自健康成年德国牧羊犬; SephadexG 200购自上海生工生物工程有限公司。

1.2 饱和硫酸铵沉淀法 按照朱立平等方法^[1-2]。沉淀3次, 饱和硫酸铵浓度分别为50%、33%、33%。最后所得沉淀用PBS溶解, 装入透析袋, 于4℃下透析72 h除盐, 其间每天换液至少3次。

1.3 SephadexG 200 凝胶层析 处理后的凝胶按李建武的方法装柱^[3-4]。用0.01 mol/L pH值为7.4的PBS平衡24 h, 最后上样和洗脱, 同时收集洗脱液, 用20%磺基水杨酸检测收集样品中蛋白质的有无, 收集物保存于-20℃冰箱。

1.4 纯化犬血清IgG 纯度鉴定 按照李建武、张龙翔等的方法^[4]。在还原变性条件下(SDS PAGE)鉴定IgG样品。SDS PAGE电泳分离胶浓度为12%, 浓缩胶浓度为5%, 分子量标准为14.4~116.0 kD。

1.5 犬血清IgG 特异性检测(Western blot) 按照周本正的方法^[5], 样品经SDS PAGE后, 应用半干法转印至硝酸纤维素膜。

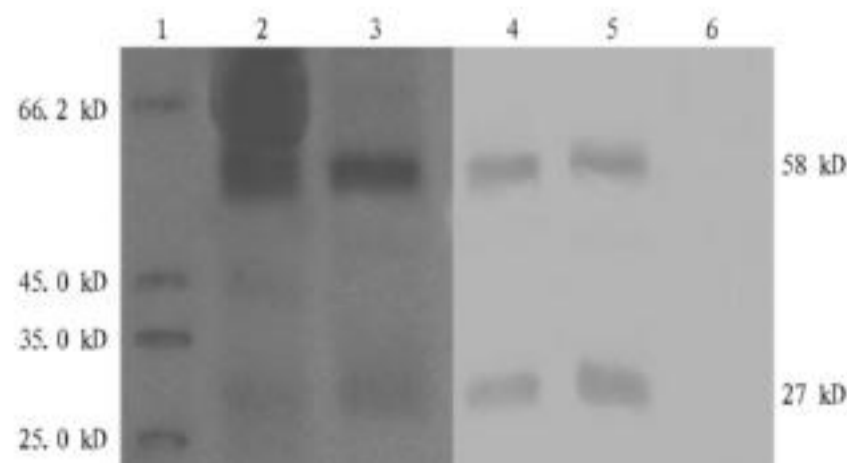


注: 1 为蛋白分子量标样; 2 为20倍稀释的犬血清; 3 为20倍稀释的盐析产物; 4、5 为经纯化的IgG。

Note: 1. Marker; 2. Canine serum 20×; 3. Salted product out of canine serum 20×; 4, 5. Purified IgG.

图1 纯化犬血清IgG的SDS-PAGE图谱

Fig. 1 Identification of purified canine IgG by SDS PAGE



注: 1 为蛋白分子量标样; 2 为20倍稀释的犬血清; 3 为经纯化的IgG蛋白; 4 为20倍稀释的犬血清; 5 为经纯化的IgG蛋白; 6 为阴性对照。

Note: 1. Marker; 2. Canine serum 20×; 3. Purified IgG; 4. Canine serum 20×; 5. Purified IgG; 6. Negative control.

图2 犬血清IgG的Western blotting分析

Fig. 2 Analysis of canine serum IgG by Western blotting

作者简介 胡晓苗(1971-), 男, 安徽望江人, 硕士研究生, 研究方向: 预防兽医学。* 通讯作者。

收稿日期 2008-05-09

(下转第9078页)

表1 squalocin 和bullatacin 在大鼠微粒体中的 K_M 和 V_{max} Table 1 K_M and V_{max} of squalocin and bullatacin in rat microsomes

底物	米氏常数 K_M $\mu\text{mol/L}$	最大反应速率 V_{max} $\text{nmol}/(\text{ng}\cdot\text{min})$
Substrate	Michaelis constant	Maximum reaction rate
squalocin	1.6 \pm 0.5	0.6 \pm 0.2
bullatacin	2.0 \pm 0.4	0.7 \pm 0.2

3 讨论

传统的测酶动力学的方法是通过测定代谢物的生成速率并用米氏方程拟合曲线求得 K_M 和 V_{max} 。对于未知代谢物的化合物,寻找和合成代谢物的工作十分耗时且成本昂贵。而底物消除法通过检测反应体系中底物的消除情况,根据相应的数学公式就可以计算其动力学参数,无需了解化合物的代谢途径、代谢产物的种类等信息,也不需要合成代谢物的标准品,是一种方便、快捷、适合高通量筛选的酶动力学参数测定方法。但此法也有一定的局限性:低清除率的化合物在短时间内无法明显观察到底物的消除,而且测量误差对应增大,不适宜使用此法;化合物的生物转化可能会有几种代谢途径,也可能会有多个酶参与,因此通过底物消除反映出的酶动力学行为可能是多种代谢方式的综合效果,测定的参数为表观动力学参数。当化合物有几种代谢途径时,用此法测得的酶动力学参数对高 V_{max} 、低 K_M 的代谢方式影响不大;当低 V_{max} 、低 K_M 和高 V_{max} 、高 K_M 的代谢方式同时存在时,高 V_{max} 、高 K_M 的代谢方式将起决定作用^[10]。

在肝微粒体中,主要存在细胞色素P450酶系,这是动物体中参与外源物质代谢的主要酶系。在该试验中,在微粒体孵育体系中由NADPH启动反应,因此可以推测细胞色素P450参与了squalocin和bullatacin的生物转化。从底物随时间的消除曲线可以看出,squalocin和bullatacin在微粒体中的代谢速率很快,因此底物消除法适用于它们的表观酶动力学参数的测定。但对于哪种P450亚酶参与squalocin和bullat-

acin生物转化以及它们的代谢物有待进一步研究。

我国有着丰富的天然产物资源,随着天然药物化学的发展和中药现代化概念的提出,大量的天然活性成分或单体化合物被提取出来,成为我国制药工业中药物研发和制备具有自主知识产权药物的重要资源^[11]。但这些天然药物和活性成分应用于临床还需要经过临床前的安全评价,而体外试验中P450酶的酶动力学特征是一个重要的参考指标。在未知代谢物的情况下,底物消除法成为高效、准确、快速测定这些参数的可行方法之一。

参考文献

- [1] 张帅,曾鑫年,黄田福,等.番荔枝内酯结构类型及作用机制研究进展[J].西北农林科技大学学报,2005,33(12):21-26.
- [2] ZAFRA POLO MC, GONZ LEZ MC, ESTORNELL E, et al. Acetogenins from Annonaceae, inhibitors of mitochondrial complex I[J]. Phytochemistry, 1996, 42(2):253-271.
- [3] ZAFRA POLO MC, HGADERE B, GALLARDO T, et al. Natural acetogenins from annonaceae, synthesis and mechanisms of action[J]. Phytochemistry, 1998, 48(7):1087-1117.
- [4] ALALI F Q, LIU X X, MCLAUGHIN J L. Annonaceous acetogenins: Recent progress[J]. J Nat Prod, 1999, 62(3):504-540.
- [5] HU Y H, RUPPRECHT J K, LIU Y M, et al. Bullatacin and bullatadione: Two highly potent bioactive acetogenins from Annona bullata[J]. J Nat Prod, 1989, 52(3):463-477.
- [6] 谢冰芬,冯公侃,朱孝峰,等.阿诺宁的抗癌作用研究[J].癌症,2002,21(4):379-382.
- [7] OBACH R S. The prediction of human clearance from hepatic microsomal metabolism data[J]. Curr Opin Drug Discov Devel, 2001, 4(1):36-44.
- [8] OBACH R S. Nonspecific binding to microsomes: Impact on scale-up of in vitro intrinsic clearance to hepatic clearance as assessed through examination of verapamil, nifedipine, and propranolol[J]. Drug Metab Dispos, 1997, 25(12):1359-1369.
- [9] HOUSTON J B, CARLILE DJ. Prediction of hepatic clearance from microsomes, hepatocytes, and liver slices[J]. Drug Metab Rev, 1997, 29(4):891-922.
- [10] OBACH R S, REED HAGEN A E. Measurement of Michaelis constants for cytochrome P450-mediated biotransformation reactions using a substrate depletion approach[J]. Drug Metab Dispos, 2002, 30(7):831-837.
- [11] 张卫东.中药现代化研究新思路——天然药物化学与生物学研究相结合[J].中国天然药物,2007,6(1):2-5.

(上接第8940页)

2 结果与分析

2.1 犬血清IgG的纯化及鉴定 将用盐析与层析后获得的样品,进行SDS-PAGE鉴定。由图1可见,2条蛋白条带由于IgG在SDS-PAGE条件下被2-巯基乙醇(2-ME)还原,所以IgG被降解成重链(H链)和轻链(L链)2个亚单位,表明用该法可获得高纯度的犬IgG。根据标准蛋白质Marker的标准曲线,计算获得犬血清重链分子量58 kD,轻链27 kD, IgG分子量为170 kD。

2.2 犬IgG抗体的制备及其特异性鉴定 将纯化的犬IgG免疫小鼠,再与经PAGE电泳和转移至硝酸纤维薄膜的纯化IgG反应。由图2可知,犬血清IgG重链(58 kD)和轻链(27 kD)都能与鼠抗犬血清IgG抗体结合,说明纯化的IgG具免疫原性和反应原性。

3 结论与讨论

有关动物免疫球蛋白纯化方法的报道很多,研究采用硫酸铵盐析法结合Sephadex G 200凝胶柱层析提取纯化犬血清IgG获得了较好的结果。饱和硫酸铵盐析法是抗体分离纯化

中最常用的技术之一,具有溶解度大、对温度不敏感、分离效果好、对抗体有稳定结构等优点^[6]。研究采用50%、33%和33%的饱和硫酸铵沉淀蛋白的3个临界点,以去除犬血清中大量的纤维蛋白、白蛋白等杂蛋白,对犬血清IgG进行了初步纯化。Sephadex G 200凝胶柱层析是利用分子筛作用来分离纯化分子大小不同的物质,G 200有效分离范围是5~250 kD^[7]。犬IgG分子量为170 kD,在分离范围内。

参考文献

- [1] 朱立平,陈学清,张建中,等.免疫学常用实验方法[M].北京:人民军医出版社,2000:52-55.
- [2] 岳喜庆,冯巧萍,张和平,等.牛血清免疫球蛋白的盐析法提取与纯化[J].中国乳品工业,2005,33(3):16-21.
- [3] 杨健雄.生物化学与分子生物学实验技术教程[M].北京:科学出版社,2002:113-114.
- [4] 李建武.生物化学实验原理和方法[M].北京:北京大学出版社,1994.
- [5] 周本正.实用电泳及免疫电泳技术[M].武汉:湖北科学技术出版社,1998:145-183.
- [6] 冯仁青,郭振泉.现代抗体技术及其应用[M].北京:北京大学出版社,2006:106-110.
- [7] 吴冠芸,潘华珍.生物化学与分子生物学实验常用数据手册[M].北京:科学出版社,2002:51-52.