

[文章编号] 1000-4718(2006)10-2078-03

尿 IgG 亚类的分离纯化和鉴定*

梁伟, 陈伟英, 余学清, 方芳, 彭晖, 李晓艳, 董秀清

(中山大学附属第一医院肾内科, 教育部肾脏病重点实验室, 广东广州 510080)

[摘要] 目的: 建立一种简便快捷的分离纯化肾病患者尿 IgG 亚类的方法。方法: 收集的肾病患者 24h 尿液经硫酸铵盐析、DEAE-cellulose 离子交换层析和葡萄球菌 A 蛋白(SPA)亲和层析等 3 步分离纯化, 即可得到 IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄ 4 种亚类, 最后用 Western blotting 和 SDS-PAGE 电泳的方法鉴定样品及其纯度。结果: SPA 亲和层析洗脱曲线显示有 4 个独立的洗脱峰, Western blotting 和 SDS-PAGE 方法鉴定表明提纯的样品为高纯度的 IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄。结论: 本方法通过 3 步即可一次性将样品中的 4 种不同的 IgG 亚类全部分离纯化, 且纯度高, 简便快捷, 效果良好。

[关键词] IgG 亚类; 分离和提纯; 葡萄球菌蛋白质 A; 色谱法, 亲和

[KEY WORDS] IgG subclasses; Isolation at purification; Staphylococcal protein A; Chromatography, affinity

[中图分类号] R363 **[文献标识码]** A

蛋白尿是慢性肾病患者最常见的临床表现, IgG 是尿蛋白中的主要成分之一。据报道, 膜性肾病患者尿中 IgG 约占尿总蛋白的 5% 左右。IgG 是大分子免疫球蛋白, 正常时不能由肾小球滤过, 而病理条件下, 可经通透性增加的肾小球漏到原尿中。尿中 IgG 亚类成分可用来研究肾脏疾病的发病机制、诊断和疗效, 这些研究都需要有相当纯度的 IgG 亚类, 但目前尚未见文献报道其纯化方法。我们分析各种蛋白纯化方法的特点并加以摸索, 总结出结合盐析、离子层析和葡萄球菌 A 蛋白(staphylococcal protein A, SPA)亲和层析的方法, 可以一次将样品中的 IgG 各亚类全部分离纯化, 方法简便快捷, 效果良好。

材料和方法

1 样品

4℃ 留取肾病患者的 24 h 尿液, 患者 24 h 尿蛋白定量 > 1.0 g, 每升尿液中加入 0.02 mol/L NaN₃ (样品在中山大学附属第一医院肾内科留取)。

2 材料与试剂

小鼠抗人 IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄ 抗体 (Southern Biotechnology Associates, Inc), 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体 (Cell signaling 公司), 标准分子量蛋白 (Cell signaling 公司), 硫酸铵 (广州化学一厂), DEAE-cellulose (Sigma 公司), Hitrap rprotein A FF (Amersham Bioscience), 快速蛋白核酸分离仪 (Amersham Bioscience)、凝胶成像和化学发光分析系统 (Alpha Fluorchem™ 8900, 美国), Power/PA C300 电泳仪 (BioRad 公司, 美国)。

3 IgG 亚类的纯化

3.1 硫酸铵盐析 取尿液样品 1 L, 4℃ 1 500 r/min 离心 15 min, 取上清液, 在 4℃ 条件下, 缓慢加入硫酸铵 375 g, 同

时不断搅拌, 达到 50% 饱和度。4℃ 12 000 r/min 离心 30 min, 弃上清, 用 0.01 mol/L pH 7.0 的 PB 50 mL 溶解沉淀, 4℃ 4 000 r/min 离心 5 min, 取上清, 即得到尿总 IgG, 4℃ 0.01 mol/L pH 7.0 PB 透析过夜, 除去 NH₄⁺ 离子, -20℃ 冻存备用。

3.2 离子层析纯化尿总 IgG 称取 DEAE-cellulose 干粉 8 g, 按干重 1:10 的比例, 置于 0.5 mol/L NaOH 中浸泡 30 min, 水洗至 pH 7.0, 改用 0.5 mol/L HCl 浸泡 30 min, 水洗至 pH 值 > 4.0 即可, 再用 0.5 mol/L NaOH 浸泡 30 min, 水洗至 pH 7.0, 用 0.01 mol/L pH 7.0 的 PB 平衡后, 装柱, 床体积约为 62 mL (长 20 cm, 内径 1.0 cm)。取盐析获得的总 IgG 溶液 50 mL 1 次加样, 用 0.01 mol/L pH 7.0 PB 平衡 (速度为 0.2 mL/min), 收集穿透峰, 合并各管, 得到总 IgG 纯品, -20℃ 冻存备用。

3.3 亲和层析分离 IgG 各亚类 取 SPA 预装柱 (Hitrap rProtein A FF, 5 mL) 1 根, 平衡液 (0.1 mol/L pH 7.0 柠檬酸盐/磷酸盐缓冲液, 含 0.02 mol/L NaN₃) 流洗平衡 (5 mL/min), 上样, 取样品 1 次性过柱 (样品量根据蛋白含量确定, 1 mg SPA 结合 40 mg IgG), 流速为 2 mL/min, 继续上述平衡液平衡 2 个柱体积 (5 mL/min), 收集穿透峰, 合并各管, 得到 IgG₃。接着分别改用 pH 5.0, 4.5, 2.2 的上述缓冲液洗脱, 收集洗脱峰, 依次得到 IgG₄、IgG₂、IgG₁, 紫外分光光度计测定蛋白含量, 冷冻干燥, -20℃ 冻存。

4 IgG 亚类的鉴定

样品用 Western blotting 方法鉴定, I 抗为小鼠抗人 IgG 亚类 (G₁、G₂、G₃、G₄) 抗体, II 抗为辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体, 分离胶、积层胶的浓度分别为 6% 和 5%, 每槽上样含蛋白 10 μg, 电泳, 转膜, 曝光, 显影。

5 IgG 亚类纯度鉴定

[收稿日期] 2005-01-10 [修回日期] 2005-03-18

* [基金项目] 广东省自然科学基金资助项目 (No. 04009432)

样品用 SDS - PAGE 方法进行纯度鉴定,分离胶、积层胶的浓度分别为 6% 和 5%,每槽上样蛋白 10 μg,电泳方法同 Western blotting,考马斯亮蓝 R - 250 染色,自动图像分析仪分析。

结 果

1 DEAE - cellulose 离子层析洗脱曲线

结果见图 1,从加样起约 8 mL 开始出现穿透峰,共收集 35 mL 结束,68 mL 处开始出现洗脱峰,80 mL 处结束。

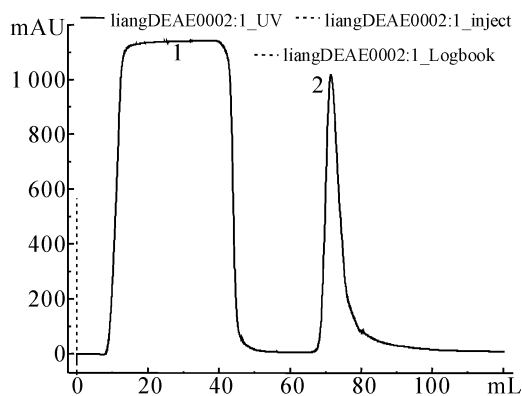


Fig 1 The elution curve of purification of the urine total IgG with DEAE - cellulose axion exchange chromatography in 0.2 mL/min condition, peak 1 contains total IgG.

图 1 DEAE - cellulose 离子层析纯化尿总 IgG 洗脱曲线

2 SPA - sepharose 亲和层析洗脱曲线

结果见图 2,从加样起 1 mL 开始出现穿透峰,共收集 33 mL,收集完毕,在 46 mL、80 mL、158 mL 处分别出现第 1、2、3 个洗脱峰,分别收集 16 mL、21 mL、14 mL。

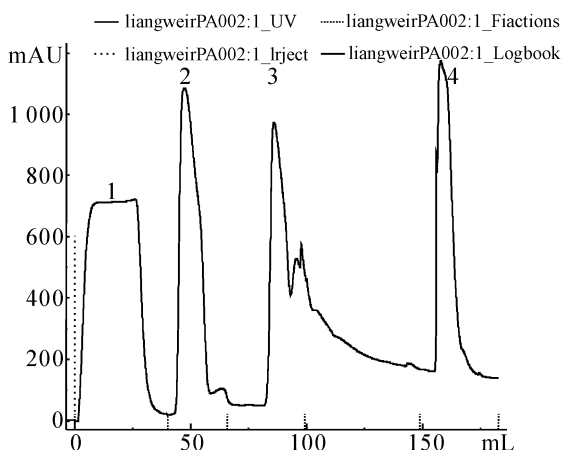


Fig 2 The elution curve of purification of the urine IgG subclasses with the SPA, peak 1 is IgG₃, peak 2 is IgG₄, peak 3 is IgG₂, peak 4 is IgG₁.

图 2 SPA 分离纯化尿 IgG 亚类洗脱曲线

3 SDS - PAGE IgG 亚类纯度鉴定

结果见图 3,除 IgG₃、IgG₄ 列出现两条淡薄的杂带,分别位于 120 kD、20 kD 处,其它亚类未出现明显杂带。表明纯化后的 IgG 亚类纯度很高,IgG₃、IgG₄ (分别为第 4、5 泳道)约为 94%,IgG₁、IgG₂ 亚类(分别为第 2、3 泳道)均在 96% 以上,而

单纯盐析提取的总 IgG (第 1 泳道)纯度很低,约 31%。

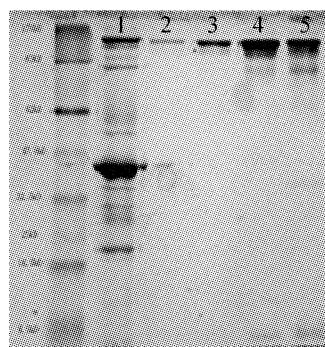


Fig 3 The identification of the sample purity with SDS - PAGE electrophoresis. 1: total IgG; 2: IgG₁; 3: IgG₂; 4: IgG₃; 5: IgG₄.

图 3 SDS - PAGE 电泳鉴定样品纯度

4 Western blotting 鉴定 IgG 亚类

结果见图 4、5、6、7,在相应的分子量位置出现明显条带,说明提取的样品即为相应的 IgG 亚类。

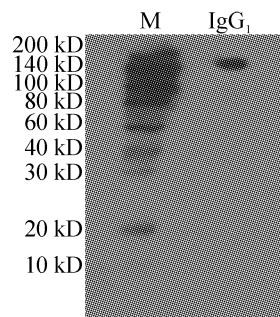


Fig 4 The identification of the IgG₁ with Western blotting.

图 4 Western blotting 鉴定 IgG₁

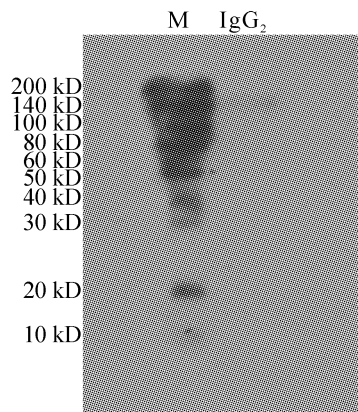


Fig 5 The identification of the IgG₂ with Western blotting.

图 5 Western blotting 鉴定 IgG₂

讨 论

IgG 是人体内主要的免疫球蛋白,分为 IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄ 4 个亚类,它们的分子结构相似,均由两条轻链和两条重链组成,主要差别在铰链区的氨基酸组成和二硫键数目不同。

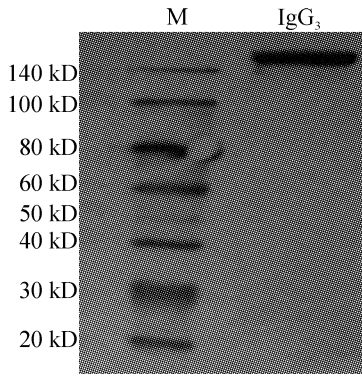


Fig 6 Identification of the IgG₃ with Western blotting.

图6 Western blotting 鉴定 IgG₃

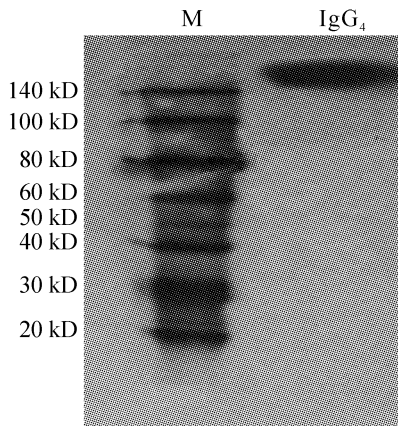


Fig 7 Identification of the IgG₄ with Western blotting.

图7 Western blotting 鉴定 IgG₄

由于人 IgG 各亚类的性质、结构非常相似,且尿中 IgG 及其亚类含量又较低,因此分离纯化 IgG 及其亚类相对比较困难。据文献报道^[1,2],IgG 亚类的分离纯化方法除 SPA 亲和层析外,还有免疫亲和层析法和链球菌 G 蛋白(streptococcal protein G, SPG)亲和层析法。其中免疫亲和层析法纯化效果最好,但其缺点是需要 4 种不同的亲和层析柱,除盐析和离子层析两步外,还需 4 步层析才可达到目的,步骤繁琐,耗时多,且免疫亲和层析柱价格昂贵。SPG 分离效果和 SPA 效果相当,且其纯化 IgG₃的效果优于 SPA。但是由于 SPG 蛋白结合 IgG 的能力很强,相应洗脱条件强度也高,且 SPG 本身具有破坏 IgG 分子结构的作用,因此对 IgG 分子破坏较严重,而 SPA 则可弥补两者的不足,且分离效果亦非常理想。SPA 能特异性结合人 IgG,且结合 IgG 亚类的能力强弱不同,结合力由强

至弱依次为: IgG₁ > IgG₂ > IgG₄ > IgG₃, 其中 IgG₃ 和葡萄球菌 A 蛋白几乎不能结合,故在第 3 步的亲和层析中首先被流洗出来形成穿透峰,进而用不同的洗脱条件可将其它 3 个 IgG 亚类分离开来。

DEAE - cellulose 离子交换层析和 SPA 亲和层析洗脱曲线显示,在设定的洗脱条件下洗脱峰形高尖,相邻峰间隔一定距离而无重叠(IgG₂ 的洗脱峰拖尾稍明显,可能是 IgG₂ 和葡萄球菌 A 蛋白结合能力较强的原因),提示蛋白分离效果较好,用 SDS - PAGE 电泳鉴定分离得到的蛋白纯度,示 SPA 亲和层析分离的各亚类纯度均在 94% 以上,比单纯盐析所提取的总 IgG 的纯度(约 31%),有很大的提高。IgG₃、IgG₄ 的纯度稍低可能是由于亲和层析时,样品中的 IgG₃ 不被 SPA 吸附,直接通过层析柱形成穿透峰被收集,IgG₄ 则可能是紧接 IgG₃ 收集,两个峰之间的距离较近,未充分用平衡液平衡 SPA 柱而导致的。图 1 中第 1 样品孔是盐析后的总 IgG 的电泳图,图像分析仪分析显示,盐析法提取的总 IgG 纯度约 31%,说明盐析法分离纯化尿 IgG 的效果较差,杂蛋白较多,但是比尿液中的 IgG 的浓度可至少提高 5 - 6 倍。本文盐析法纯化 IgG 的纯度比其它文献报道偏低(大多文献报道纯度可达 60% - 70%),可能是相对于腹水和血清,尿中 IgG 浓度偏低,盐析时 IgG 较难形成沉淀而被分离,不过,盐析法仍可作为蛋白初步纯化重要方法,对目标蛋白起初步分离和浓缩的作用,为蛋白的下一步分离纯化做准备。

[参 考 文 献]

- [1] Laars BJ, Goran K. Purification and some properties of streptococcal protein G, a novel IgG - binding reagent [J]. J Immunol, 1984, 133(2): 969 - 974.
- [2] Phillips AP, Martin KL, et al. The choice of methods for immunoglobulin IgG purification: yield and purity of antibody activity [J]. J Immunol Methods, 1984, 74(2): 385 - 393.
- [3] 巴德年. 当代免疫学技术与应用[M]. 第 1 版. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1998. 271 - 273, 316 - 319.
- [4] 朱立平,陈学清. 免疫学常用实验方法[M]. 第 1 版. 北京: 人民军医出版社, 2000. 61 - 62.
- [5] 沈关心,周汝麟. 现代免疫学实验技术[M]. 第 1 版. 武汉: 湖北科学技术出版社, 1998. 28 - 32.