

单克隆抗体的纯化

许 辉

(第四军医大学微生物教研室, 西安)

自 Köhler 等^[1]建立杂交瘤技术以来, 单克隆抗体 (McAb) 研究日益深入。含 McAb 的细胞培养上清、腹水及血清中含有大量杂蛋白和其他大分子物质, 使 McAb 的研究和应用受到一定限制。近年来, McAb 纯化的研究受到重视, 取得了进展。本文试以小鼠 McAb 的纯化为重, 综述如下。

一、单克隆抗体的稳定性

McAb 的某些理化性质与来自人或动物免疫血清的多克隆抗体 (PcAb) 不同。McAb 是一种均一的蛋白, 而 PcAb 则具有高度的异质性。王世中等^[2,3]发现, McAb IgG 经等速电泳后呈现一个主要峰, 而 PcAb 则出现 5—6 个主要峰; 在等电点聚焦电泳中, 纯化 McAb 呈现 2—3 条区带, 而纯化 PcAb (小鼠 IgG₁ 亚类) 可出现 20 余条区带。这证实了 McAb 的均一性和 PcAb 的异质性。一般说来, McAb 比 PcAb 更不稳定, 容易失活。(1) 二者对热的耐受性不同: 纯化 McAb (小鼠 IgG₁) 加热 56°C, 5 min 即失去活性, 而纯化 PcAb 在 56°C 加热 30 min, 抗体活性毫无影响^[2]; 提纯的 McAb (人或鼠), 经 63°C 加热 20 min, 再在室温与人红细胞孵育, 红细胞不发生凝集^[3]。然而, 若将提纯的 McAb 与极少量小鼠血清混合后再加热 56°C 30 min, 则对抗体活性无影响。严泳棠等^[4]将含有 McAb 的腹水在 56°C 加

热 1h, 抗体的活性仍不丧失。这提示一定量杂蛋白的存在可使 McAb 耐受加热的影响。(2) 加热后与 PEG-6000 的反应性不同: McAb 经 56°C 和 63°C 加热 10—20 min, 即有轻度聚合, 延长加热时间, 聚合度维持不变。而 PcAb 在 56°C 加热时, 情况类似, 但 63°C 加热 40 min 内, 聚合度渐增, 聚合物明显多于 McAb。(3) 对 pH 的稳定性不同: 王世中等用间接血凝试验比较了抗体活性。在 pH 6—8 条件下, McAb 活性稳定, pH 8.9 时活性明显降低; PcAb 在 pH 6—10 时活性不变^[2]。还发现 McAb 腹水的最适 pH 为 9—10, 这与纯化 McAb 不同^[4]。(4) 在不同浓度缓冲液中的稳定性: 实验表明, 在 0.075—0.1M 磷酸盐缓冲液中, McAb 和 PcAb 的血凝效价与在对照生理盐水中近似, 而低于 0.075M 或高于 0.1M 时, 二者的血凝效价均明显降低。

由于 McAb 与 PcAb 之间的这些差别, 在纯化 McAb 时必须考虑到其不稳定性, 在纯化过程中力求避免活性的损失, 以保证纯化产物的生物活性。

二、单克隆抗体纯化的方法

小鼠 McAb 主要来源于分泌 McAb 的杂交瘤细胞系培养上清、接种小鼠的腹水及其血清。其中以腹水及血清的 McAb 含

本文于 1985 年 2 月 4 日收到。

本文承汪美先教授指导审阅, 特此致谢。

量较高, 可达5—15mg/ml^[6]。目前已制备的小鼠 McAb有IgM、IgE^[6]、IgG₁、IgG_{2a}、IgG_{2b}、IgG₃。针对各类McAb的特点可采用不同的纯化方法。

(一) IgG类单克隆抗体的纯化

对于IgG类McAb的纯化, 除常用的硫酸铵(或硫酸钠)盐析法外, 还有以下方法:

1. 凝胶过滤法: Nicholas等^[7]先将含单抗的腹水过滤、离心净化, 用硫酸铵沉淀粗提后, 加于Sephadex G200柱中。以磷酸盐缓冲液洗脱, 可出现三个蛋白峰, 一个排阻峰含脂类及IgM, 两个内流峰含IgG与血清白蛋白。纯化IgG的纯度超过90%。

2. 离子交换层析法: 本法常与盐析法联合使用^[8-10]。Mason^[11]将含McAb的样品用16%Na₂SO₄沉淀粗提后, 加到DE-52层析柱, 再用70mM NaCl洗脱单抗IgG。Buchegger等^[12]用相似的方法纯化了抗癌胚抗原(CEA)的McAb, 不同的是, 用pH 8.0磷酸盐缓冲液梯度洗脱McAb。此外, 也可将样品直接加到DE-52层析柱, 再进行线形梯度洗脱^[7]。

3. 亲和层析法: 用于McAb纯化的亲和层析法以偶联于固相载体的配基不同可分三种, 即Protein A Sepharose CL-4B法, 抗体-Sepharose 4 B法和抗原-Sepharose 4 B法。

(1) Protein A Sepharose CL-4B法: 金黄色葡萄球菌A蛋白(SPA)具有与许多种属IgG的Fc段结合的特性, 它可被偶联到Sepharose CL-4B上制成免疫吸附剂, 用于提纯IgG抗体。Prowse等^[13]根据Protein A Sepharose CL-4B与不同的小鼠IgG亚类有不同的亲和力, 从小鼠血清中提纯了IgG亚类, 发现用不同pH的缓冲液分段洗脱, 可分离小鼠IgG亚类,

以pH6.0—7.0, 4.5—5.0和3.5—4.0分别将IgG₁、IgG_{2a}和IgG_{2b}洗脱。Underwood等^[14]研究了用Protein A Sepharose CL-4B纯化抗流感病毒血凝素McAb的洗脱液pH值范围和它们对SPA的亲合力。属于IgG₁亚类的A₁₂₄和A₂₀₀对SPA的偶联常数较小, 洗脱的pH值较高(A₁₂₄为pH5.0—7.5, A₂₀₀为pH5.2—7.5); 属于IgG_{2a}的A₇₁、A₁₉₅、A₁₅₈偶联常数大, 洗脱所用的pH亦较低(分别为3.8—5.4, 3.5—5.2, 3.5—5.2), A₁₁₀(IgG_{2b}偶联常数与IgG_{2a}相似, 洗脱的pH值为3.5—5.2。Bohn^[15]测定了抗DNP的IgG₁亚类McAb的等电点, 为6.3—7.2。上述结果提示, 不同的IgG亚类洗脱的pH值范围可能与其对SPA的亲合力以及本身的等电点有关。

Protein A Sepharose CL-4B的使用方法已有介绍^[16,17], 其基本程序是先将样品通过处理和平衡好的Protein A Sepharose CL-4B, 用起始缓冲液洗脱杂蛋白, 再用洗脱液解离被吸附的McAb。Ternynck^[18]用Protein A Sepharose CL-4B纯化了抗HRP的McAb(IgG₁), 从每毫升腹水中可提取2—5mg McAb。Protein A Sepharose CL-4B在pH2—11是稳定的^[17], 根据需要可在该范围内选择不同的洗脱液。Johnson^[19]研究了不同洗脱液的解离效果, 以0.2M甘氨酸-盐酸和5M胍基-盐酸蛋白产量较高。若欲纯化的McAb为IgG₁, 还可用0.1M pH5.0柠檬酸-磷酸盐缓冲液作为解离剂^[20]。Protein A Sepharose CL-4B用于IgG亚类的纯化尚有争论。Underwood等^[14]的研究表明, IgG₁可在较高的pH范围被洗脱, 这与Prowse等^[16]的结果一致。对于IgG_{2a}和IgG_{2b}, 洗脱的pH范围相似, 因而不能通过pH梯度将二者分开。

(2) 抗体-Sepharose 4B法: 将抗体偶联于 Sepharose 4B 制成免疫吸附柱纯化抗原的方法已为人们所熟悉。抗原的吸附与解离条件与 Protein A Sepharose CL-4B法相似^[1,2]。抗体-Sepharose 4B法纯化产物的纯度取决于抗体的特异性。陈登鸿等^[23]将兔抗鼠 IgG与 Sepharose 4B 偶联, 制成兔抗鼠 IgG-Sepharose 4B, 纯化了 CBH-2 杂交瘤细胞(由鸭 Ig 免疫 Balb/c 小鼠脾细胞与 NS-1 骨髓瘤细胞融合产生)所分泌的 IgG 型单克隆抗体的培养上清。Bazin 等^[24]用小鼠抗大白鼠 K 链的 McAb 作配基, 偶联到 Sepharose 4B 制成免疫吸附柱, 从培养上清中纯化了具有大白鼠 K 链的 McAb。用 Protein A Sepharose CL-4B法从含小牛血清的杂交瘤培养上清中提纯 McAb, 常混有少量的牛 IgG^[14]。而使用抗体-Sepharose 4B法则可避免牛 IgG 的干扰。

(3) 抗原-Sepharose 4B法: 本法是将抗原偶联于 Sepharose 4B 上, 来纯化与抗原相应的 McAb。其优点一是不受 Ig 类与亚类的限制, 二是它所吸附的皆为与抗原相对应的特异性抗体。Bohn 等^[25]将半抗原 DNP 通过牛血清白蛋白(BSA)偶联于 Sepharose, 纯化了抗 DNP 的单克隆 IgG₁ 抗体。但应用较多的还是用完全抗原作为配基。Bazin 等^[24]将 IgG₁-Kappa 骨髓瘤蛋白偶联于 Sepharose 制成免疫吸附柱, 将小鼠抗大白鼠 K-1 的 McAb (M-ARK-1) 上柱, 洗脱杂蛋白后, 以 pH 梯度洗脱解离 McAb, MARK-1 洗脱的 pH 为 3.5—4.5。也有用人血清白蛋白(HSA)^[26]和人类血管球基底膜^[27]作为抗原偶联于 Sepharose, 纯化相应 McAb 的报道。

4. 其他方法: Russo^[28]发展了辛酸沉淀法。把辛酸加入人、马、绵羊和兔血清中, 能沉淀除 IgG 外的大多数蛋白质,

因而可用于纯化 IgG 类 McAb。它的优点是能减少硫酸铵盐析时所引起的凝聚物形成。Stanker 等^[29]用羟基磷灰石柱作高压液相层析, 从小鼠腹水中一步纯化了 IgG 类 McAb, 并认为该法具有简单、迅速的优点, 能处理大量腹水。Wolfgang 等^[30]建立了以 Sephadex G-75 为支持物的等电点聚焦电泳纯化 McAb 的方法。D-EAE Affi-Gel-blue 层析也可有效地用于 McAb 的纯化^[31-33]。

(二) IgM、IgE 类单克隆抗体的纯化
提纯 IgM 类 McAb, 常用凝胶过滤法。Nicholas 等^[8]将 Sephadex G₂₀₀ 柱提取的免疫球蛋白用 5 mM Tris-HCl, pH 7.5 充分透析使 IgM 沉淀, 经离心后获得纯 IgM。纯化 IgM 类 McAb 还可使用 Sephareryl S-300^[34]。Bouvet 等^[35]用低离子强度缓冲液 (0.005 M pH 8.0 P.B) 平衡 Sephadex G₂₀₀, 用含 1.7 M NaCl 的 0.05 M pH 8.0 磷酸盐缓冲液洗脱。除通常出现的第三峰外, 出现含 IgM 的第四峰。多克隆 IgM 主要出现在第一峰而不在第四峰。这提示在稀溶液中, 多克隆 IgM 与单克隆 IgM 在可溶性上有明显的差别。亲和层析法也是提纯 IgM 及 IgE 的有效手段。陈登鸿等^[23]用抗体亲和层析法纯化了 IgM; Bohn 等^[25]用 DNP-BSA-Sepharose 纯化了抗 DNP 的单克隆 IgM; Kelly^[36]用 DNP-BSA-Sepharose 纯化了相应的单克隆 IgE 抗体。此外, 羟基磷灰石柱高压液相层析法也可用于 IgM 类 McAb 的纯化^[29]。

三、纯化单克隆抗体的鉴定⁽³⁷⁾

除了对 McAb 进行生物学、免疫学和理化性质的鉴定外, 还需作如下鉴定:

(一) 特异性抗体活性的鉴定

用特异性抗原作免疫学试验测定纯化 McAb 的抗体活性。盐析法纯化的 McAb 活性损失较小。McAb 的活性并不因在半饱和硫酸铵中放置时间的延长而逐渐降低^[8]；亲和层析法则常因 McAb 洗脱条件而有不同程度的损失。

(二) 纯度鉴定

取纯化 McAb 通过双向琼脂扩散试验、聚丙烯酰胺凝胶电泳、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳、等电点聚焦电泳等免疫化学方法，判定纯化 McAb 的免疫学纯度和电泳纯度。就纯化产物的纯度而言，以亲和层析法最佳；离子交换法和凝胶过滤法其次；盐析法则纯度较低，不能将 IgG 与 IgM 分开，且常含有少量杂蛋白。

(三) Ig 类别与亚类的鉴定

采用抗 Ig 类与亚类的标准抗血清与纯化 McAb 进行双向琼脂扩散、放射免疫测定和酶联免疫测定等方法确定其 Ig 类别与

亚类。

(四) 稳定性

McAb 必需具有一定的稳定性，才能作为一种标准化的试剂。McAb 的稳定性可通过测定在不同条件下抗体滴度的变化来确定。这对于其应用与保存具有实际意义。

(五) 亲和力

了解 McAb 亲和力对于其用途的选择具有意义。亲和力高的 McAb 适用于作为标记抗体。而用作免疫吸附剂的配基，则亲和力要适宜，不可过高或过低。

综上所述，McAb 纯化的方法较多，可根据纯化的目的来选择。对纯化 McAb 的纯度要求较高者，可采用亲和层析法或离子交换法。若对 McAb 的纯度要求不高，但要求纯化产物具有良好的生物学活性者，可采用盐析等简便方法，亦可取得良好效果。

参 考 文 献

- [1] Köhler, G. et al., *Nature*, 256:495, 1975.
- [2] 王世中等, 中华微生物学与免疫学杂志, 3(2):109, 1983.
- [3] 王世中等, 杂交瘤专题讨论会议论文摘要汇编(上海市免疫学会, 卫生部上海生物制品研究所), 第7、11页, 1933, 内部资料.
- [4] 严泳棠等, 上海免疫学杂志, 4(3):145, 1984.
- [5] Nowinski, RC. et al., *Virology*, 93:111, 1979.
- [6] Liu, F. et al., *J. Immunol.*, 124(6):2728, 1980.
- [7] Nicholas, J. et al., *J. Immunol. Meth.*, 53(2):150, 1982.
- [8] Forghani, B. et al., *J. Viro. Meth.*, 5(5, 6):317, 1982.
- [9] Müller, C., *J. Immunol. Meth.*, 131(2):877, 1983.
- [10] Solomon, B. et al., *Mol. Immunology*, 21(1):1, 1984.
- [11] Mason, D.W. et al., *Bilchem. J.*, 187, 1:1980.
- [12] Buchegger, F. et al., *J. Immunol. Meth.*, 49(2):129, 1982.
- [13] Ey, P.L. et al., *Immunochemistry*, 15:429, 1978.
- [14] Underwood, P.A. et al., *J. Immunol. Meth.*, 60(1-2):33, 1983.
- [15] Bohn, A. et al., *Immunology*, 47:297, 1982.
- [16] Ivan, Lefkovies, *Immunol. methods* Academic Press N.Y., 1931, 2:3.
- [17] Pharmacia Fine Chemicals, *Affinity Chromatography principles & method* 1979, p51.
- [18] Ternynck, T., *J. Immunol. Meth.*, 58(1-2):110, 1983.
- [19] Johnson, G. et al., *J. Immunol. Meth.*, 15(1):29, 1977.

(下转第18页)

- (20) Uotila, M. et al., *J. Immunol. Meth.*, 42:11, 1981.
- (21) Bureau, D., *J. Immunol. Meth.*, 41 (3) :387, 1981.
- (22) Clark, M.R. et al., *J. Immunol. Meth.*, 66 (1) :81, 1984.
- (23) 陈登鸿等, 上海免疫学杂志, 3(4):223, 1983.
- (24) Bazin, H. et al., *J. Immunol. Meth.*, 66:261, 1984.
- (25) Bohn, A. et al., *Immunology*, 47(2):297, 1983.
- (26) Lapreste, C. et al., *Mol. Immunol.*, 20(5):549, 1983.
- (27) Pressey, A. et al., *Clin. Exp. Immunol.*, 54(1):178, 1983.
- (28) Russo, C. et al., *J. Immunol. Meth.*, 65:269, 1983.
- (29) Stanker, L.H. et al., *J. Immunol. Meth.*, 76:157, 1985.
- (30) Wolfgang, S. et al., *Immunol. Methods*, Academic Press, N.Y., 1: 123, 1979.
- (31) Righi, M., *J. Viro. Meth.*, 6(4):203, 1983.
- (32) Bruck, C. et al., *J. Immunol. Meth.*, 53(3):313, 1982.
- (33) Portetelle, D. et al., *J. Viro. Meth.*, 6 (1):19, 1983.
- (34) Rumpold, H. et al., *J. Immunol. Meth.*, 129 (4):1458, 1982.
- (35) Bouvet, J.P. et al., *J. Immunol. Meth.*, 66 (2) :299, 1984.
- (36) Kelly, K.A. et al., *J. Immunol. Meth.*, 39:317, 1980.
- (37) Hurrell, J.G.R., *Monoclonal Hybridoma antibodies; Techniques and Applications*, Boca Raton, CRC Pr., 1982, p.38.