

技术与方法

过碘酸盐氧化法制备固相载体除抗非目的蛋白抗体

刘相国 杨 恭 邱并生*

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘要: Sephacryl 凝胶经过碘酸盐氧化将产生醛基, 非目的蛋白通过氨基与醛基反应结合到凝胶上制备固相载体。装柱后, 抗体经过长时间循环上样, 抗非目的蛋白的抗体被吸收, 抗体得到了纯化。用经本法处理过的抗体做免疫印迹, 特异性大大提高。

关键词: Sephacryl 凝胶, 抗体, 免疫印迹

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2001) 03-0073-03

REMOVING UNSPECIFIC ANTIBODIES WITH SEPHACRYL GEL COUPLING OF *E. COLI* PROTEIN BY PERIODATE OXIDATION

LIU Xiang-Guo YANG Gong QIU Bing-Sheng*

(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

Abstract: The total proteins of plain *E. coli* (DH5 α) were coupled to the Sephacryl S300 oxidized with periodate, and the preliminarily purified antiserum was loaded repeatedly on the column for 18 hours. The unspecific anti-*E. coli* antibodies would be absorbed and the antibodies would be purified. It was more specific to do western blot using antibodies treated by this method than using ones without treatment.

Key words: Sephacryl S-300, Antibodies, Western Blot

常规方法注射兔子制备抗血清时, 由于使用完全佐剂或者抗原的纯度不够高, 得到的抗体就比较杂^[1], 用这种抗血清与表达宿主做免疫印迹的时候, 有时会因血清中含有抗非目的蛋白的抗体而导致假阳性或非特异条带出现。已有一些方法利用无外源蛋白的宿主蛋白来吸收抗非目的蛋白的抗体从而获得特异性高的抗体, 如: 除抗大肠杆菌蛋白抗体的大肠杆菌裂解液吸收法等^[2], 但这些方法只适用于含有滴度较低的抗非目的蛋白抗体的抗血清制剂, 溴化氰活化亲和层析法能够吸收滴度较高的抗非目的蛋白抗体, 但它有严重的不足之处: (1) 溴化氰有剧毒, 活化时只能在通风橱内进行; (2) 结合的蛋白质会发生漏失, 降低吸收效率。所以, 这也不是一种理想的方法^[3,4]。

过碘酸盐氧化法制备固相载体吸收滴度较高的抗非目的蛋白抗体, 可克服上述方法的不足。首先, 过碘酸盐对人没有毒害作用, 比较安全; 其次, 活化后不必象溴化氰活化法那样立即与蛋白质结合, 过碘酸盐氧化后可保存相当长时间再与蛋白质结合; 而且, 结合的蛋白质不会发生漏失。本文以吸收抗大肠杆菌蛋白为例介绍此方法。

* 通讯作者

收稿日期: 2000-03-01, 修回日期: 2000-04-14

1 材料与方法

1.1 抗血清的制备及初步纯化

SDS-PAGE 电泳回收棉铃虫颗粒体病毒 (HaGV) 增效蛋白, 常规方法注射兔子制备抗血清, 50% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀初步纯化抗体^[1]。

1.2 非目的蛋白溶液的制备

从无外源目的蛋白表达的大肠杆菌 DH5 α 制备非目的蛋白溶液。培养 200mL 大肠杆菌 DH5 α 至静止期, 离心收集菌体, 重悬于 20mL NaHCO_3 (0.1mol/L pH9.0), 加入 40mg 溶菌酶, 室温 30min, 加入 1mg DNA 酶 I 和 40 μ L Triton X-100, 4 $^{\circ}$ C 温浴 1h, 超声波破碎 6 次后离心取上清备用。

1.3 Sephacryl S-300 凝胶的处理

将膨胀后的凝胶在蔡氏漏斗上充分洗涤, 重悬在 50mL 0.1mol/L 偏过碘酸钠溶液中, 室温 1h, 加入 5mL 10% 甘油, 混合 1h, 用 2L NaHCO_3 (0.1mol/L, pH9.0) 溶液将凝胶充分洗涤, 洗后的凝胶悬在 20mL 大肠杆菌 NaHCO_3 裂解液中, 混合 16h 后, 去除大肠杆菌裂解液, 凝胶重悬于 100mL PBS 中, 静置, 沉降 30min 后, 倒去上清, 重悬于 PBS, 加 500mg 硼氢化钠, 室温 30min, 偶尔搅拌, PBS 洗涤两次, 加 1% 吐温 20 的 PBS 至少洗 5 次, 装柱备用^[4,5]。

1.4 抗非目的蛋白抗体的吸收

4 $^{\circ}$ C 下, 凝胶柱上样适量初步纯化的抗体, 待入胶后加适量 PBS, 用蠕动泵循环上样 18h, 用少量 PBS 洗脱, 收集洗脱液备用, 计算抗体稀释的倍数。

1.5 Western blot 检测

操作方法按文献 [2]。蛋白 A 为辣根过氧化物酶标记^[5], 一抗与蛋白 A 均按 1:1000 稀释,。做免疫印迹实验的目的蛋白为大肠杆菌表达的重组 HaGV 增效蛋白^[6]。

2 结果与讨论

如图 1 所示, 在相同的条件下, 对来自于大肠杆菌的目的蛋白做免疫印迹, 用吸收过的抗体做的免疫印迹的特异性远比用没有吸收过的抗体做的要高得多, 这表明此方法是有效的。

与常规的结合高纯度抗原的亲合层析柱法纯化抗体不同, 本方法由于是将非目的蛋白结合于 Sephacryl 凝胶上, 吸收掉抗非目的蛋白的抗体, 所以非常适合于纯化不太容易得到较纯抗原的抗体。

Sephacryl 凝胶经过过碘酸盐氧化将产生醛基, 这些醛基随后将与蛋白质的氨基结合, 而 Sepharose 没有可氧化的位点, Sephadex 虽有丰富的可氧化位点, 但在氧化中会破坏凝胶的某些结构, 因而这两种凝胶都不适用于此法。

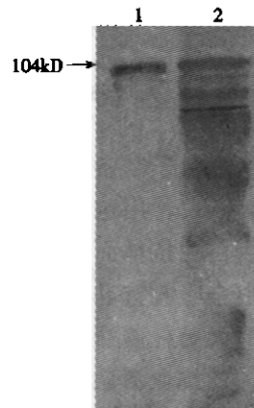


图 1 用经过吸收的和没经过吸收的抗体完成的免疫印迹比较

- 1 用经过吸收的抗体完成的免疫印迹
- 2 用未经过吸收的抗体完成的免疫印迹

参 考 文 献

- [1] Harlow E, Lane D. Antibodies-a laboratory manual. Cold spring harbor laboratory, 1988, 96: 298 ~ 299.
- [2] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 等, 金冬雁等译. 分子克隆实验指南 (第二版). 北京: 科学出版社, 1992, 590 ~ 591, 891 ~ 898.
- [3] Wright J F, Hunter W M. J Immunol Methods, 1982, 48 (3): 311 ~ 325.
- [4] Horsey V S, Prowse C V, Pepper D S. J Immunol Methods, 1986, 93 (1): 83 ~ 88.
- [5] 徐宜为. 免疫检测技术 (第二版). 北京: 科学出版社, 1997, 167 ~ 169, 374 ~ 375.
- [6] 刘相国, 杨 恭, 邱并生, 等. 微生物学报, 2000, 40 (4): 379 ~ 383.