

# 用亲和层析法制备免疫纯的抗乙型肝炎抗原的抗体

北京生物制品研究所 生物化学室  
诊断用品室

用于检测乙型肝炎抗原 (HB Ag) 的诊断血清, 一般是用初步提纯的 HB Ag 免疫动物所得到的免疫血清经正常人血清在液相吸收处理后制成。这种诊断血清只能用于灵敏度较低的检测方法, 如琼脂扩散、对流电泳等。对灵敏度较高的检测方法如反向被动血凝、血球免疫粘连、放射免疫分析等则需有高度纯化的抗体, 而高纯度的抗体的获得需有高纯度的抗原来免疫动物。高纯度 HB Ag 的制备比较困难, 经数十小时的超速离心所制出的抗原, 用于免疫动物所得抗血清也常不能达到使用要求, 仍需经过吸收处理<sup>[1]</sup>。我们用亲和层析法从一般的马抗 HB Ag 抗血清制得免疫纯的抗 HB Ag 抗体, 已初步应用于反向被动血凝及血球免疫粘连试验, 得到了较好的结果。

## 材料及方法

### 一、马抗 HB Ag 的抗血清

用 HB Ag-抗体复合物免疫马匹获得抗血清。对流电泳法测出其抗 HB Ag 滴度为 1:128—1:256; 抗正常人血清蛋白滴度为 1:64—1:128。免疫电泳法检查除含抗 HB Ag 的抗体 (简称本抗体) 外, 尚含抗正常人血清甲、乙、丙种球蛋白抗体及少量的抗血清球蛋白抗体 (简称杂抗体) (图 4)。

### 二、正常人血清

为健康人多份混合血清, 经反向被动血凝法检查, HB Ag 为阴性。

### 三、4% 珠状琼脂糖凝胶

用瑞典出品的 Sepharose 4B 或我们参考 Hjerten 法<sup>[2]</sup>自制的 4B。制法如下: 取日本纯琼脂 (鹿印: Agar fine powder, B. R.) 3.2 克, 放 250 毫升圆底烧瓶中, 加水 80 毫升, 在沸水浴中搅拌溶解。另取甲苯 122.5 毫升, 四氯化碳 37.5 毫升及 Span 80 (司班 80, 山梨糖醇单油酸酯, 上海红卫制药厂出品) 0.9 克, 混合溶解构成油相并预热至 60—70°C。在溶化的琼脂 (60—

70°C) 中迅速加入油相, 并在 60—70°C 保温下剧烈搅拌 3—5 分钟, 生成水/油的乳状液。迅速冷却。继续剧烈搅拌 5—10 分钟使已分散成小珠状的琼脂凝固。用布氏漏斗抽滤以除去油相, 加乙醚洗涤 3—4 次 (每次约 100—150 毫升) 使成松散状。倾入大量水中漂洗 4—5 次, 每次均倾去极微细的颗粒。过 60 目尼龙筛, 绝大部分应能通过。显微镜下观察为圆珠状, 无粘连, 直径 0.05—0.15 毫米。装直径 2.5 厘米的色层柱, 再用 0.03M 磷酸盐缓冲液 (pH 6.8) 流洗 3—4 天, 可得珠状琼脂糖凝胶 (简称自制 4B) 80 毫升, 加 0.02% NaN<sub>3</sub>, 放普通冰箱保存备用。经用细胞色素 C 吸附试验<sup>[3]</sup>检查, 其非特异吸附能力低于瑞典进口的 4B。

### 四、溴化氰 (CNBr)

特纯一级品, 含量 >97.0% (在后来的实验中改用自制的溴化氰)。

### 五、免疫电泳、琼脂扩散、对流电泳

均按常规法进行, 使用 1.2% 的纯琼脂。用稀释抗体法测定本抗体及杂抗体的对流电泳效价。

### 六、正常人全血清蛋白亲和凝胶的制备

主要参考 Cuatrecasas 法<sup>[4]</sup>。将 4B 在 G3 玻璃抽滤漏斗中用水充分洗涤, 抽至表面无水, 称取 10 克。取 CN Br 2 克在乳钵中加水 10 毫升研碎, 使 CN Br 大部分溶解后倒入 4B 中, 在电磁搅拌下滴加 2N NaOH, 同时用 pH 计测定, 使维持在 pH 11.0。在 15—20°C 反应 10—12 分钟。然后用 500 毫升冰冷的水在 G3 玻璃抽滤漏斗上快速洗涤至中性, 再用冰冷的 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> (pH 9.0) 250 毫升洗涤, 全部洗涤时间为 2—3 分钟。加入已用 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> (pH 9.0) 平衡过夜的人血清 5 毫升 (200—400 毫克蛋白质), 并补加 NaHCO<sub>3</sub> 至总体积 20 毫升, 放  $\phi 16 \times 180$  毫米试管中, 加塞, 置旋转圆盘上 (1 转/5 分) 上下颠倒转动 24 小时 (10—20°C)。然后装  $\phi 1 \times 14$  厘米色层柱, 用 pH 9.0 的 0.1 M NaHCO<sub>3</sub>、pH 8.5 的 0.1 M 硼酸钠-硼酸-

1 M NaCl、pH 4.1 的 0.1 M 醋酸钠-醋酸-1 M NaCl 缓冲液依次流洗，每种 150—200 毫升。收集全部流洗液，测定 280 毫微米波长之光密度值以备计算偶联上的蛋白质量。最后用 pH7.4, 0.01 M 磷酸盐-0.1 M NaCl 缓冲液(PBS) 平衡备用。此外，我们也曾按 Porath 的方法<sup>[5]</sup>进行偶联，此方法主要特点为活化时不加 NaOH 而用 pH11.9 的磷酸钾缓冲液维持 pH 恒定。

## 七、免疫纯抗 HB Ag 抗体的制备方法

马抗 HB Ag 抗血清经用半饱和硫酸铵沉淀后，再用半饱和硫酸铵溶液洗涤一次，制出球蛋白部分，加生理盐水至原体积备用。取 1 毫升样品用上述 pH 7.4 PBS 稀释至 5 毫升，上柱，待样品全部进入凝胶层后用少量 PBS 洗涤，再用 PBS 流洗。加样及流洗流速均为 5 毫升/小时。用自动部分收集器收集，每管 5 毫升，并用 LKB 8300 Uvicord II 型紫外光吸收计自动描记 280 毫微米波长的光密度。至流穿蛋白峰的光密度值小于 0.05 时可再加样品 1 毫升(用 PBS 稀释至 5 毫升)，依法流洗。然后用 pH2.4 的 0.1 M 甘氨酸-HCl 缓冲液约 50 毫升解吸。用水约 100 毫升流洗后再用 7 M 脲溶液约 50 毫升解吸。用水彻底洗涤后换 PBS 平衡备用。典型的蛋白流穿峰及解吸峰见图 1。将流穿峰各管合并浓缩至原体积(1 毫升)，即为免疫纯的抗 HB Ag 抗体。

## 实验结果

### 一、瑞典的 Sepharose 4B 与自制 4B 经 CN Br 活化后偶联人全血清蛋白质能力的比较

从表 1-(1) 可见，自制 4B 与瑞典的 4B 经 CNBr 活化后偶联人全血清蛋白质之能力是相同的，约为 18—21 光密度/克湿重 4B，如以人血清的  $E_{280}^{1\%} = 10$  计，则 18—21 毫克/克湿重 4B。加入 CNBr 量以 2 克/10 克 4B 为合适，增加至 3 克并不能增加偶联量。表 1-(2) 初步表明，应用 Porath 的方法<sup>[5]</sup>亦可制备人全血清蛋白质亲和凝胶，但偶联量较低，结果不够稳定。这可能与所用 CNBr 量较少有关。但是我们考虑到此法是用缓冲液来维持 pH 恒定的，其缓冲能力有一定限度，所以没有增加 CNBr 量来作进一步的比较。

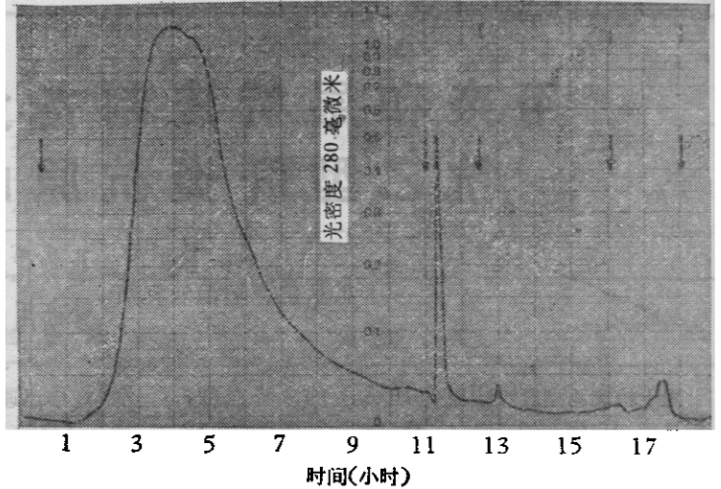


图 1 亲和层析法提纯马抗 HB Ag 抗体的蛋白浓度曲线  
左起箭头 1 为加样，用 0.01 M 磷酸盐-0.1 M NaCl pH 7.4 流洗，流速 5 毫升/小时；箭头 2 为加 0.1 M 甘氨酸-HCl pH 2.4 解吸；箭头 3 为水洗；箭头 4 为 7 M 脲溶液解吸，箭头 5 为水洗；峰 1 为流穿峰；峰 2—4 为相应的解吸峰。解吸及水洗流速为 30—40 毫升/小时。

### 二、马抗 HB Ag 纯抗体的制备

我们利用制得的人全血清蛋白亲和凝胶提纯马抗 HB Ag 抗体共 6 批，结果见表 2。

从表 2 可见马抗 HB Ag 抗血清(经半饱和硫酸铵沉淀初步提纯)通过人全血清蛋白亲和层析柱后，其中所含的抗正常人血清蛋白抗体被全部吸收，对电泳滴度从 1:64 或 1:128 下降到零，而抗 HB Ag 抗体滴度则维持不变或只稍为降低。使用瑞典 4B 或自制 4B 制成的亲和凝胶的实验结果无大差别。可见自制 4B 的非特异性吸附作用不大，不致引起抗 HB Ag 抗体的损失。根据记载，亲和层析柱可反复使用数十次之多。我们已使用了 8 次，尚未见失效。

### 三、亲和层析法制备的抗 HB Ag 抗体的免疫学纯度

对本法制备的抗 HB Ag 抗体，除了作本抗体及杂抗体的电泳滴度测定之外，还用琼脂扩散法及免疫电泳法检查其纯度(图 2—5)。从照片可见在电泳及琼脂扩散试验中，经提纯的抗体对正常人血清不发生沉淀线而只对 HB Ag 阳性血清发生单一的沉淀线；未经提纯的抗体则对正常人血清及 HB Ag 阳性血清均发生沉淀线。在免疫电泳中，未经提纯的抗体，对 HB Ag 阳性血清及正常人血清均产生多条沉淀线；经提纯者则只与 HB Ag 阳性血清产生一条沉淀线，其位置在  $\alpha_2$ 、 $\beta$ -球蛋白之间，且距抗体槽较远，表明该种抗原是分子量较大的物质。此外，我们还用马抗人全血清蛋白的抗血清，以电泳及琼脂扩散法

表1 球状琼脂糖凝胶与人全血清蛋白质的偶联

实验批号	球状琼脂糖凝胶 4B		CNBr (克/10克湿重 4B)	加入蛋白质 光密度值*	偶联上蛋白 质光密度值	偶 联 (%)	偶联蛋白质 光密度/克湿重 4B
	来 源	用量(克湿重)					
(1) 按 Cuatrecasas 法 <sup>[4]</sup>							
74-6	瑞 典	10	3	268	181	67.6	18.1
74-7-1	自 制	10	3	235	179	76.4	17.9
74-7-2	自 制	10	2	235	185	78.5	18.5
74-8	自 制	50	2	1320	1053	79.8	21.1
(2) 按 Porath 法 <sup>[5]</sup>							
74-1	瑞 典	10	0.4	199	111	55.7	11.1
74-2	瑞 典	49	0.4	721	397	55.1	8.1

\* 光密度×体积(毫升)。

表2 亲和层析法提纯马抗 HB Ag 抗体

实 验 批 号	人全血清亲和凝胶			加 样 次 数	对流电泳滴度	
	4B 来 源	亲和凝 胶批号	使用第 几次		抗 HB Ag 抗体	抗正常人 血清蛋白 抗体
74-8-对照					1:128	1:64
74-8	瑞典	74-6	1	1	1:128	0
74-9-对照					1:128	1:64
74-9-1	自制	74-7合	1	1	1:128	0
74-9-2	自制	74-7合	1	2	1:128	0
74-10-对照					1:128	1:64
74-10	瑞典	74-6	2	1	1:64	0
74-11-对照					1:128	1:64
74-11	自制	74-7合	2	1	1:128	0
74-12-1	自制	74-7合	3	1	1:256	0
74-12-2	自制	74-7合	3	2	1:128	0
74-13-对照					1:256	1:128
74-13-1	自制	74-7合	4	1	1:128	0
74-13-2	自制	74-7合	4	2	1:64	0

检查纯化的马抗 HB Ag 抗体(原倍及稀释4倍时)未发现正常人血清蛋白成份,而一般液相吸收法制备者

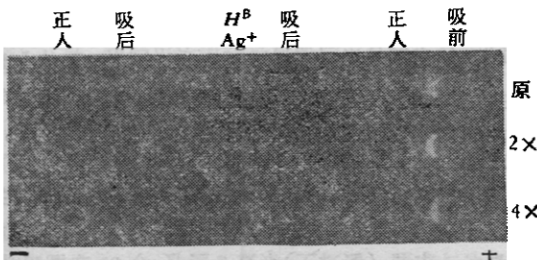


图2 纯化马抗 HB Ag 抗体对流电泳鉴定

“吸前”为未经吸收的马抗 HB Ag 抗血清;“吸后”为经亲和层析吸收后的马抗 HB Ag 抗体;“正人”为正常人血清;“HB Ag”为 HB Ag 阳性人血清。“原”为原倍抗体;“2x”“4x”各为稀释2倍、4倍的抗体。

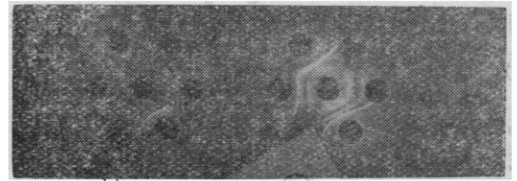


图3 纯化马抗 HB Ag 抗体琼脂双扩散鉴定

右中孔为吸收前抗体;左中孔为吸收后抗体。11时孔为正常人血清(原倍);9时孔为正常人血清(稀释4倍);5时孔为 HB Ag 阳性人血清(原倍);3时孔同5时孔(稀释4倍)。

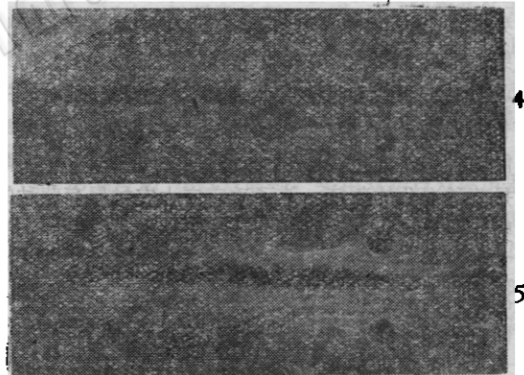


图4,5 纯化马抗 HB Ag 抗体免疫电泳鉴定

图4槽为吸收前抗体;图5槽为吸收后抗体。上孔为正常人血清;下孔为 HB Ag 阳性人血清;左侧为正极。

则含有大量的正常人血清蛋白成份。

亲和层析法纯化的抗 HB Ag 抗体的纯度还可以从反向被动血凝及血球免疫粘连试验中反映出来。反向被动血凝试验是将抗体固定于红血球表面,用来检测微量抗原的高灵敏度的方法。该试验对于所用抗体的纯度要求较高。本法制备的抗 HB Ag 抗体可直接固定于经戊二醛处理过的人“O”型红血球上,用于检测 HB Ag 时阴性对照呈小圆点,无非特异性凝集现象。血球免疫粘连试验是利用抗原抗体复合物在补体存在下能使红血球凝集的性质,用以检测微量抗原的高灵

(下转第 37 页)

(上接第 19 页)

敏度的方法。试验所用抗体不得含有抗原抗体复合物,否则即会出现假阳性。本法制备的抗体可用于血球免疫粘连试验,阴性对照明显。结果说明本法制备的抗体纯度已达到较高水平。

## 讨 论

亲和层析法是从固相酶及免疫吸附剂发展起来的一种新技术。与一般生化提纯方法不同,它是利用抗原抗体间高度免疫学特异性作为分离基础的,所以可以达到很高的纯度。液相免疫吸收法也是利用抗原抗体特异性的,但经液相吸收后的制品内含有抗原抗体复合物及多余的抗原或抗体,因而限制了所使用的范围。与其他的免疫吸附剂(如用各种偶氮化的纤维素或用双功能试剂如戊二醛制成的)相比,亲和层析法具有非特异吸附少、偶联牢固不易脱落、柱性能良好、亲和凝胶可反复应用等优点而成为广泛应用的方法。根据目前条件,采用超速离心法制备高纯度的 HB Ag,以供制备高纯度的抗 HB Ag 抗体尚有一定困难。故采用亲

和层析法从一般的抗 HB Ag 血清制出高纯度、高效的抗体供一些高灵敏度的诊断方法之用有其实际意义。

本法不需要特殊的、昂贵的仪器设备,原材料如 4B 可以按本文所述方法自制,溴化氰国内曾有生产,也可自制<sup>[6]</sup>。至于产量方面,每次可处理样品量,依样品中含有杂抗体的种类及数量而有不同,如按 100 毫升柱每次可生产抗体 10 毫升计,也不算低,因一般高灵敏度的检测方法,所用抗体量都极少。本法抗体收率高,滴度基本上没有损失,人血清消耗量也较一般的液相吸收法为低,故经济价值也是适宜的。

## 参 考 资 料

- [1] Dressman, G. R. et al: *Inf. and Imm.*, **5**: 213, 1972.
- [2] Hjerten, S.: *Biochim. Biophys. Acta*, **79**: 393, 1964.
- [3] Porath, J. et al.: *J. Chrom.*, **60**: 167, 1971.
- [4] Cuatrecasas, P.: *J. Biol. Chem.*, **245**: 3059, 1970.
- [5] Porath, J. et al.: *J. Chrom.*, **86**: 53, 1973.
- [6] 勃拉特 (Blatt, A. H.) 主编(南京大学化学系有机化学教研组译): 有机合成第二集, 104 页, 科学出版社, 1964.