

根直径相等的粗玻璃棒，将洁净的载玻片放于玻棒上。滴加数滴血细胞悬液，使铺展，再滴加干净的 0.06 M 氯化钾低渗液至充满整张载玻片，盖好培养皿，继续低渗 10 分钟。

5. 沿培养皿壁缓缓地倒入 50% 酒精和冰醋酸(1:2)组成的混合固定液，注意不要浸着载玻片，盖上培养皿，蒸气固定 60—90 分钟。吸去混合固定液，加入无水酒精，蒸气固定 10 分钟。从培养皿中取出载玻片，倾去上面的低渗液，略为干燥，将无水酒精和冰醋酸(1:3)混合固定液滴满载玻片上，固定 5—10 分钟。倾去固定液，然后将载玻片倾斜约 30 度，吸取新配固定液自载玻片高端滴下，如此反复 3—4 次。空气干燥。

6. 在一块洁净的玻璃板上平放一玻片作支架，将染色体制片有细胞的一面朝下，架一端于玻片上。用 pH 6.8 的磷酸缓冲液稀释的

(1:10)Giemsa 染液充满于玻片与玻板之间的空隙处，染色 30 分钟，用蒸馏水冲洗，除去过剩的染液，阴干。取 24 × 50 mm 的盖玻片，用加拿大树胶封片，即可长期保存。

本法操作简便，所用仪器极其简单，药品价格便宜、容易购买，普通实验室和水产养殖单位就可开展工作。此外，该法可避免体外培养中常出现的细菌侵染，由于关键步骤在体内生理条件下进行，减少了体外因素对染色体形态可能产生的影响。

参 考 文 献

- [1] Ojima, Y. S. Hitotsumachi and M. Haya-shi: 1970. *Japan J. Genetics*, 45 (2): 161—162.
- [2] Heckman, J. R. and P. E. Brubaker: 1970. *Progressive Fish Culturist*, 32: 206—208.

讲 座

用于纯化抗原性物质的单克隆抗体亲和层析术(一)

黄 嘉 陵

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

Köhler 和 Milstein 于 1975 年创建的淋巴细胞杂交瘤技术^[1]，之所以能够导致免疫学乃至整个生物学领域中的一场革命，其关键就在于单克隆抗体所特有的高度专一性。这一特性，不仅已使其成为一种可对生物体系中存在的各种抗原或抗原决定簇进行探测、鉴别、定位、跟踪以及结构与功能研究的精确工具。而且，还可使其与固相载体偶联，制成具高度专一性的免疫吸附剂，而成为一种几乎可用以分离纯化任何抗原性物质的有效手段^[2]。

由于单抗亲和层析术具有简便、快速、产率高、容量大、以及特别适于含量极微又不甚稳定而难以借常规方法提纯的生物活性物质的纯化等优点，而最早用于细胞膜蛋白的纯化。

1979 年，Sunderland 等和 Parham 报道^[3,4]，分别采用此术，由大鼠胸腺细胞和人淋巴细胞，分离纯化大鼠白细胞共同抗原(L-C)、及人 HLA-A₂ 和 HLA-B₇ 抗原，获得成功。嗣后，Dalchau 等又报道了^[5,6]，采用此术分离得到人白细胞专一的膜糖蛋白抗原，和人脑-粒细胞-T 淋巴细胞抗原的结果。直至 1980 年，Secher 和 Burke^[7]采用抗干扰素单抗亲和层析柱，经过一步简单的吸附和洗脱程序，便将干扰素纯化了 5000 倍，从而进一步显示了单抗亲和层析术的威力之后，始被广泛地用于纯化淋巴因子、生长因子、凝血因子、激素、酶、糖蛋白、毒素、受体、癌胚抗原、病毒抗原、细胞抗原、寄生虫抗原等不同类型的抗原

性物质^[8-35],而发展成为一个在纯化天然或遗传工程产物方面,极富潜力和经济价值的领域。

以下主要就细胞膜抗原的单抗亲和层析纯化法^[34,35],作一介绍。

一、单克隆抗体亲和层析柱的制备

在单抗亲和层析术的全过程中,亲和层析柱的制备是一个牵动全局的重要环节。因为柱的优劣将直接影响抗原性物质的分离效果。整个制备可分二步进行。首先,生产抗体。然后,通过共价键结合,使其与适当的固相载体偶联,即可制成亲和层析柱。其中,以第一步最为关键。只有获得数量足够、具有高度专一性和适当亲和力的单克隆抗体,才能从根本上保证纯化的成功。

(一) 单克隆抗体的生产

1. 分泌单抗的淋巴细胞杂交瘤细胞系的建立 按常规方法进行,除须严格把关,以确保瘤系分泌的抗体对靶抗原具有高度专一性外,尚须注意下列几个问题:

(1) 瘤系的性质

目前用于融合的小鼠骨髓瘤系,主要有P3-X63/Ag8(分泌小鼠IgG₁,具K轻链),NS-1(合成K轻链,但不分泌)和不产生任何免疫球蛋白的细胞系(如SP2/0、X63/Ag8-653)这三类。前两类细胞产生的非专一性重链或轻链,会同免疫小鼠脾细胞产生的专一性抗体的重链和轻链随机组合,形成杂交免疫球蛋白,影响抗体的专一性和亲和力。因此,最好采用第三类不产生免疫球蛋白的骨髓瘤细胞系。

(2) 克隆化的效力

对选出的杂交瘤系进行适当克隆化,于高效价抗体的稳定生产至关重要。这包括,开始可由融合孔中去除其它非专一性的杂交瘤,和随后可以去除由于染色体丢失而产生的非分泌性变种,以及为保险起见,在临注入小鼠腹腔繁殖之前再克隆化,以去除新出现的突变种。千万不可掉以轻心。否则,再有价值的杂交瘤

细胞系,也终将丢失。

(3) 抗体的亲和力

由于亲和层析纯化抗原,均毫无例外地包括吸附和洗脱这两个相关联的过程。因此,对用于纯化抗原的单抗,尚须根据其亲和力作适当选择。亲和力太小,抗原吸附不上;亲和力过大,又洗脱不下。一般认为,亲和力较低的单抗,更符合亲和层析的要求。但其最适范围,尚未见有报道。其测定方法,可参见^[36,37]。

2. 免疫腹水或血清的产生 可通过体外培养,也可通过体内繁殖杂交瘤细胞生产抗体。前法虽可免除宿主免疫球蛋白的污染,较易纯化,但在一般培养条件下,培养抗体浓度甚低,仅10~100微克/毫升。而后法可得抗体浓度高达1~10毫克/毫升的腹水或血清,即便纯化较难,目前仍较多采用。

体内繁殖法有二种。一是在小鼠中背部脊柱两侧皮下各注射 $1-5 \times 10^6$ 杂交瘤细胞。待瘤长大后,由尾静脉采血分离血清。或切除肿瘤,制成细胞悬液,再用于接种。另一是在1-9周前注入0.5毫升降植烷预处理的小鼠腹腔内注入 $10^6 \sim 10^7$ 杂交瘤细胞。待十天左右出现腹水后,用9号注射针穿刺收集腹水。

免疫腹水或血清经 $1000 \times g$ 离心10分钟除去细胞和其它碎片后,即可贮于 $-40^\circ C$ 备用。

3. 免疫腹水或血清中单抗的纯化 免疫腹水或血清中,除杂交瘤细胞分泌的抗体之外,尚含接种小鼠本身分泌的免疫球蛋白、白蛋白、其它血清蛋白质及大量脂类物质。故于使用前,还须对其作适当纯化。

首先,将冷冻贮存的免疫腹水或血清融化,使其通过玻璃棉塞或粗布,以除去大块聚集的脂类及细胞碎片。而后调pH至4.8,于 $4^\circ C$ $20000 \times g$ 离心30分钟,以除去纤维蛋白,浮于液面的脂类及其它不溶性物质,再将pH调回中性。

然后,按硫酸铵沉淀法,于 $4^\circ C$ 搅拌下缓慢滴加等体积饱和硫酸铵,继续搅拌30分钟,再于 $4^\circ C$ $10000 \times g$ 离心30分钟,将沉淀

溶于原腹水1/10体积的PBS,对PBS透析除去硫酸铵后,即可供用。

对属IgG类的单抗,还可通过DEAE-纤维素柱层析或Protein A-琼脂糖柱层析,进行纯化。

若采用DEAE-纤维素柱层析,可取免疫腹水或血清30毫升,对5 mM Tris-HCl、pH 8.0的缓冲液透析,而后加到已经同一缓冲液平衡的100毫升DEAE-纤维素(DE 52)柱上,以上述缓冲液洗涤至280 nm的吸收值低于0.01,再用0—500 mM NaCl的同一缓冲液作线形梯度洗脱,收集含抗体的前半部洗脱液供用。或对25 mM Tris-HCl、0.1 M NaCl、pH 8.4的缓冲液透析后,加到已经同一缓冲液平衡的100毫升DEAECL 6 B柱上,继以上述缓冲液洗涤,即可由流出液的第一个吸收峰中获得足够纯度的抗体。

若采用Protein A-琼脂糖柱层析,则可将4毫升免疫腹水或血清,同1毫升pH 8.0的0.5 M磷酸缓冲液混合,慢慢加到以pH 8.0的0.1 M磷酸缓冲液平衡的5毫升Protein A-Sephacryl CL-4 B柱上,继以同一缓冲液洗涤至流出液中无蛋白可检出。然后,以含0.15 M NaCl的pH 6、pH 4.5和pH 3.0的0.1 M柠檬酸缓冲液进行分部洗脱。收集含抗体部分,立即以pH 9.0的1 M Tris-HCl缓冲液中和,而后对PBS透析。

而对属IgM类的单抗,则可继半饱和硫酸铵沉淀后,溶于少量50 mM Tris-HCl、0.5 M NaCl、pH 7.8缓冲液、对同一缓冲液透析1-2小时,再上凝胶过滤柱Sephadex G-200或Sephacryl S-200,作进一步纯化。

此外,还可藉高压液相层析,对IgG类的单抗进行快速纯化。例如,上Mono QTM柱,以0—0.35 M NaCl的20 mM三乙醇胺-HCl、pH 7.7缓冲液,作线形梯度洗脱,10-20分钟即可完成一次分离过程。

(二) 单克隆抗体与Sephacryl 4 B的偶联
通常,制备单抗亲和层析柱,均以Sephacryl-

se 4 B作为固相载体。Sephacryl 4 B上的羟基经溴化氰活化,即可与单抗的氨基偶联,形成不溶性免疫吸附剂。可直接采用市售已经溴化氰活化的Sephacryl 4 B,与单抗偶联。但人们往往因其价格较贵又不甚稳定而宁愿于临偶联前进行活化。

取10毫升经蒸馏水洗涤压积的Sephacryl 4 B,与20毫升刚溶入500毫克溴化氰的蒸馏水混合,在冰浴中磁力搅拌下滴加2 N NaOH,使pH保持在11。约经10分钟反应后,立即倾入砂芯漏斗,用预冷的200毫升蒸馏水快速洗涤。再按5—10毫克蛋白/毫升活化凝胶,迅速移入经对0.1 M NaHCO₃、0.5 M NaCl、pH 8.5缓冲液透析平衡的单抗溶液。置旋转混合器上,于室温缓慢混合2小时,或于4℃过夜。然后,将悬液移入砂芯漏斗抽滤,测定OD 280 nm以计算偶联率。再将偶联后的凝胶悬于pH 8.0、1 M乙醇胺液或0.2 M甘氨酸液,以封闭未偶联的活性基团。最后,用0.1 M醋酸、1 M NaCl、pH 4.0缓冲液和0.025 M Tris、1 M NaCl、pH 8.5缓冲液交替洗涤,以除去非共价吸附的蛋白,即可以0.025 M Tris、0.15 M NaCl、0.02% NaN₃、pH 7.3缓冲液洗涤平衡,贮于4℃供用。

二、抗原的增溶溶解

若靶抗原为水溶性抗原,便可直接使用单抗亲和层析柱进行纯化。然而,有许多抗原都是因其疏水部分插入细胞膜双分子类脂层而在水液中不甚稳定的膜蛋白质。对于这类抗原,必须通过适当增溶使其由膜中溶解出来,方可进一步纯化。

其法有二。一是在严格控制条件下,用酶切除插入膜双分子类脂层的疏水区域。但因酶的切点较多,而很难得到接近天然状态的抗原分子。最有效的,还是采用去垢剂,使蛋白质分子的疏水部分脱离膜的双分子类脂层,插入去垢剂微囊,从而使膜蛋白分子得以在水液中达到稳定的方法。

(一) 采用去垢剂增溶的基本方法

去垢剂分离子性和非离子性两类。用于增溶的有弱阴离子性去垢剂脱氧胆酸钠, 和包括 Brij 99、Brij 96、Lubrol PX、NP-40、Tween 40 和 Triton X-100 在内的各种非离子性去垢剂。其中, 以脱氧胆酸钠溶解膜蛋白效果最佳。且微囊较小, 仅 1000—10000 道尔顿, 而不致缩小蛋白分子大小的原有差异, 给随后的凝胶过滤分离带来影响。不过, 尚有会溶解核膜、在溶液 pH 太低或离子强度高和特别是在含双价阳离子时变粘, 以及随后不宜采用离子交换层析, 等电点聚焦等基于电荷的方法进行分离等缺陷。非离子性去垢剂虽不如脱氧胆酸盐那样有效, 却不会破坏细胞核, 而特别适于有核细胞膜蛋白的增溶溶解。其中, 以 Brij 最为有效。惟 Brij 96 在 4℃ 停留数小时后, 易从溶液析出。但若加入双倍量的 Brij 99, 即可加以克服。

1. 采用脱氧胆酸盐的增溶溶解 此法甚为有效, 但仅适用于无核细胞或去核膜制剂。因为脱氧胆酸盐会破坏核膜, 结果导致 DNA 释放, 使溶液变粘, 致无法进行亲和层析。不过, 也有例外。如脑匀浆也可采用此法增溶。这可能同脑组织的膜多核少有关。其法如下: 将经 20000×g 离心 20 分钟沉淀的脑匀浆, 按每毫升含 10 毫克匀浆蛋白, 悬于 0.01 M Tris、0.02% NaN₃、pH 8.4(4℃) 缓冲液, 加等体积含 4% 脱氧胆酸钠的同一缓冲液, 置冰浴, 于搅拌下温育 1 小时, 而后于 80000×g 离心 75 分钟, 即可获得含膜抗原的上清液。

2. 采用非离子性去垢剂的增溶溶解 其法与上相似, 即按每毫升含 10 毫克匀浆蛋白或 5×10⁸ 细胞, 悬于 0.01 M Tris、0.15 M NaCl、0.02% NaN₃、pH 7.3(4℃) 缓冲液, 加等体积含 4—10% 去垢剂的上述缓冲液, 置冰浴, 于搅拌下温育 1 小时, 经 1500×g 离心 15 分钟除去细胞核后, 再经 80000×g 离心 75 分钟, 即得含膜抗原的上清液。

不同非离子性去垢剂的增溶效果不尽相

同, 尚须根据靶抗原特性作适当选择。Brij 的浓度, 似以添加等体积 10% 的溶液时更为有效。尤其是在增溶溶解血小板糖蛋白 Ib 时, 其产量远较添加等体积 4% 的溶液时为高。

3. 继非离子性去垢剂处理后再用脱氧胆酸盐的增溶溶解 先按“2”法, 用非离子性去垢剂将细胞膜裂解成含靶抗原的小片段。然后, 借超离心将膜片段收集起来, 悬于较小体积的 0.01 M Tris、0.02% NaN₃、pH 8.4(4℃) 缓冲液, 再按“1”法, 用脱氧胆酸盐进行增溶处理。有时为求简便, 也可略去超离心一步, 而直接在含有非离子去垢剂的悬液中, 加 1/3 体积 4% 的脱氧胆酸盐增溶。惟溶液中同时存在两种去垢剂, 难免会造成一些麻烦。

(二) 去垢剂存在下的抗原检测

在增溶和纯化抗原的过程中, 往往必须借助靶抗原对单抗与靶抗原供体结合的抑制作用, 来检测各分部中的靶抗原含量。此时, 若靶抗原供体对去垢剂的裂解作用敏感, 便须对其作适当保护, 或另择非裂解系统。为此, 可采用下列绪法:

1. 以戊二醛固定靶抗原供体 将靶抗原供体用无蛋白基质洗涤三次, 配成每毫升 2×10⁸ 细胞或 2—4 毫克匀浆蛋白的悬液。加等体积以同一缓冲液配制的 0.25% 戊二醛, 于室温温育 5 分钟。随后, 添加 1/10 体积 10% BSA 或血清以终止反应, 并以含蛋白基质离心洗涤三次。最后, 将其悬于含蛋白缓冲液, 即可分装冻存。

但即使在固定后, 去垢剂引起靶抗原供体裂解的情况, 仍偶有发生。故须对去垢剂用量适当加以控制。而且, 上述固定处理, 有时也会使某些抗原决定簇变性。因此, 常须对固定前后的靶抗原供体作平行滴定, 以判断变性程度。

2. 加入高浓度的蛋白质 若在检测系统中加入高浓度的蛋白质, 例如 BSA。因其疏水区域与去垢剂结合, 而使攻击靶抗原供体的游离去垢剂由溶液中消失。此时便可安然采用

即便对去垢剂敏感的靶抗原供体。不过,蛋白质对靶抗原供体的这种保护作用,也并非万无一失。故对检测系统中的去垢剂,也得适当加以控制。

在缺乏游离去垢剂的情况下,抗原可能出现凝集,但一般不影响其抗原性。BSA的最后浓度,可为10—30%,视去垢剂种类及浓度而定。

3. 采用多孔塑料测定板 有些借去垢剂增溶溶解的膜抗原溶液,置多孔塑料测定板小孔中温育过夜后,膜抗原会同塑料板的孔壁结合。于是,便不难采用常规固相放射免疫测定或酶联免疫测定法,对其进行检测。

4. 其它方法 可将Brij增溶溶解的脾制剂同溴化氰活化的Sephrose 4 B偶联,成为一种十分有效的通过固相结合测定白细胞抗原的靶抗原供体。只是用于增溶的去垢剂,不能与偶联反应基或琼脂糖珠发生反应。

(三) 可能出现的问题

一旦建立抗原增溶方法及其检测系统,即可进行小量试验,以检查增溶效果。

一般,先以2:1的Brij 99/Brij 96混合物,或脱氧胆酸盐进行增溶。并于每步操作末尾,由各分部取出0.2毫升样品。然后,通过定量吸收试验测其抗原含量。即取80微升以0.5%BSA/PBS稀释2~3倍的抗原样品,加80微升接近滴定终点的抗体,置冰浴温育一小时。于23500×g离心20分钟,取25微升上清液,同25微升靶抗原供体悬液混合,再置冰浴温育一小时。将上述靶抗原供体用0.1%BSA/PBS洗涤二次,悬于100微升¹²⁵I标记的抗免疫球蛋白抗体,置冰浴温育一小时。然后,再将靶抗原供体洗涤二次,即可测其结合的放射活性。

根据上述测定结果,可判明抗原已否溶解及溶解的程度。同时,也可揭示可能出现的下

列问题:

1. 抗原全然不溶或溶解甚少 若系统理想,一般可从离心后的上清液中获得高达起始组织25%—50%的抗原活性。因此,即便在抗原全然不溶或溶解甚少的情况下,也完全有可能通过进一步摸索增溶溶解的最适条件,来提高抗原产率。

2. 组织中抗原浓度过低,以致经增溶处理稀释后已无法测出 组织匀浆在添加等体积去垢剂时稀释了一倍,再加纯化过程中,抗原的最高产率只不过50%左右。因此,起始组织中的抗原浓度,必须经得起4倍以上的稀释。否则,便难以测出。为此,可设法提高检测系统的灵敏度。也可将通常使用的细胞浓度(5×10^8 /毫升)或组织蛋白浓度(10毫克/毫升),提高2—3倍。或添加其它更为有效的去垢剂。

3. 抗原决定簇为去垢剂变性

4. 单抗亲和力过低而无法同可溶性单体抗原发生反应

在上述两种情形下,均难以由待测样品测出抗原活性。但究竟源于何因,往往很难区别。为此,最好改试其它去垢剂。如仍出现同一问题,而抗原又保持溶解状态,则表明该系统因抗原决定簇易为去垢剂变性或遮盖,或因抗体亲和力过低,而不宜采用。

5. 去垢剂使戊二醛固定的靶细胞裂解 去垢剂的采用,往往会造成一些假象。特别是靶细胞,即使以戊二醛稍作固定,有时仍可为去垢剂裂解,结果导致抗原测定值偏高。因此,每次测定抗原,均须外加严格的去垢剂对照。

6. 去垢剂使单克隆抗体变性 这种情形甚少,但确有发生,结果导致抗体活性的完全丧失。

(待续)