维普资讯 http://www.cqvip.com

5. Cox G, et al. J Virology 1993; 67:5664
6. Justewicz DM, et al. J Virology 1995; 69:7712
7. Mitchell WM, et al. Immunotechnology 1995; 1:211
8. Davis HL, et al. Hum Gene Ther 1995; 6:1447
9. Donnelly JJ, et al. Life Science 1997; 60(3):163
10.Liu MA. et al. Anitbiotics and Chemotherapy 1996; 48:100
11.Soneharak, et al. J Interferon Cytokine Rev 1996; 16:799
12.Xiang, et al. Viral Immunol 1996; 9(1):1
13.Tascon R, et al. Vaccines 96 Cold Spring Harbor Lab N.Y PP.45
14.Yen-hung Chow,et al. J of Virology 1997; 71:169
15.Nichols WW, et al. Ann N.Y Acad Sci 1995; 772:30
16.Jiao S, et al. Hum Gene Ther 1993; 3:21
17.Katsumi A, et al. Hum Gene Ther 1994; 5:1335
18.Davis HL.et al. Proc Natl Acad Sci 1996; 93:7213
19.Schirmbeck R, et al. J Virol 1995; 69(10):5929
20.Mancini M. et al. Proc Natl Acad Sci 1996; 93:12496
21.Barry MA, et al. Bio Techniques 1994; 16:68

(收稿日期 1998－05－11)

免疫亲和色谱在蛋白质分离纯化中的应用

医学检验系 黄 昕* 综述 邱宗荫 审校

中图分类号 R392－33

抗原及其抗体间的相互作用具有高度特异性。长期以来,人们利用这一性质进行抗原的鉴定、定量检测或分离纯化。免疫亲和色谱 (immunoaffinity chromatography,IAC)就是建立在免疫学反应(抗原—抗体相互作用)基础上,纯化蛋白质(抗原)的一种特殊方法[1]。

IAC的分辨率非常高,因为只有具有能被偶联抗体识别的抗原决定簇的蛋白质分子将保留于柱中。这点大大地不同于一些基于基团分离的亲和色谱方法(如:纯化球蛋白的凝集素柱或纯化丝氨酸蛋白水解酶的苯甲脒柱)。IAC可以一步获得高纯度的蛋白质,并且具有从很稀的溶液中浓缩蛋白质的能力。

Tozer等人在1962年首先将多克隆抗体偶联于色谱基质分离纯化抗原[2]。Kohler和Milston[3]成功地创建了单克隆抗体 (monoclonal antibody, McAb)技术,才促使IAC在蛋白质纯化方面大量应用。在70年代后期,IAC的成功不仅在于单抗的使用,也包括易衍生化的、硬性大孔径琼脂糖基质的使用。最先应用偶联单抗免疫亲和色谱纯化的蛋白质是干扰素－α_2。干扰素－α_2的纯化证明了IAC的两大优点,即:具有纯化蛋白质原液中极低含量抗原的能力和获得高纯度的终产品。

1 抗体

单克隆抗体的选择是决定免疫亲和色谱纯化方案成功或失败的首要因素。一般认为亲和常数在10^{-8}M数量级或更低的单抗可能是最适合的[4],因为它们与抗原相互作用的亲和势足以在清洗杂蛋白时保留抗原,但又相当微弱,可在相对温和的条件下洗脱抗原。

单抗用作IAC的配体时,必须在偶联反应中以及在抗原洗脱的条件下保持其生物学活性。长期以来,人们多凭经验选择化合物将单抗固定于基质上,然后研究它是否仍然能够结合抗原,如果保持抗原结合能力,再摸索抗原洗脱条件。虽然这样做是有效的,但浪费时间和材料。Hornsey等人[5]最先寻求建立一种理性方法,他们确定了一组潜在的洗脱剂,并检测抗原是否能经受它们的处理。Bonde等人采用一种简单、快速的ELISA方法[6],测定单抗在一系列洗脱试剂中是否保持其生物学活性。将上述两种方法结合起来,有可能合理地

* 男,1967－12出生,讲师,博士

维普资讯 http://www.cqvip.com

选择用作IAC配体的单抗。

至今为止,主要因单抗的成本较高,导致IAC吸附剂的价格较贵,从而限制了IAC的应用。噬菌体抗体谱克隆(repertoire cloning)技术[7]的出现有可能显著改善这种状况。Berry等人将特异识别溶菌酶的Fv片段偶联于基质上,一步纯化了血清样品中的溶菌酶[8],并且比使用完整的单抗更有效。用酶学方法处理单抗后获得的Fv片段也得到相似的结果[8]。此外,也可将与单抗超变区一段序列一致的合成肽作为IAC的配体[10]。

目前,抗体工程整个领域以及抗体Fv或Fab片段在细菌中表达的研究非常活跃,人们将有能力相对价廉地生产大量的抗原结合分子,从而降低IAC 吸附剂的价格。

2 基质(matrices)

近年来,商品化的色谱基质越来越多,但选择适当基质的标准未变。理想的基质应该具备:(1)硬度较好,能承受柱中高流速引起的压力;(2)亲水性,疏水程度增加会诱发非特异结合;(3)大孔径,表面积/体积之比大,且孔径要足够大以便于蛋白质大分子的扩散;(4)颗粒大小一致;(5)易于衍生化;(6)稳定性好,能够承受极端的pH值和高浓度的离液序列高的(chaotropic)试剂;(7)无毒;(8)非特异性吸附低。

早期,人们曾使用纤维状纤维素作为IAC的基质[2],但因其较差的流动性质未被继续使用。最常用的基质是以交联方式存在的珠状琼脂糖,虽然聚丙烯酰胺珠在早期的亲和色谱中被广泛使用,但其机械稳定性差,导致流速很低。介于以上两种基质之间的是葡聚糖或琼脂糖与丙烯酰胺的共聚物。合成基质(如:Trisacryl,Azlactone等)因为它们能够有效地抵抗生物降解和具有多种活化化合物,在免疫亲和色谱中得到越来越多的应用。

3 基质活化和偶联(activation and coupling)

大部份基质在偶联抗体之前,均需要进行化学活化。活化基质通常经过与抗体表面赖氨酸残基的$-NH_2$反应将抗体偶联,偶联反应也可通过与抗体表面的-OH、-COOH或-SH进行。

在小配体的亲和色谱中,间隔臂(spacer arm)常插在基质和配体之间,以尽量减少空间位阻对蛋白质与其配体相互作用的影响[1]。在IAC中,配体本身就是蛋白质大分子,因此,空间位阻将不会阻碍抗体与抗原的相互作用。最常使用的基质活化方法是溴化氰法,用溴化氰活化多糖类基质具有简单、效果好的特点。许多活化好的、稳定的基质已商品化,在仅仅需要少量基质时可以购买。如果有装备良好的化学实验室而基质的需要量大,自己进行活化更为经济。表1中列出了一些常用的活化化合物。

表1 基质活化常用的化合物

活化物	反应基团	参考文献
溴化氰	NH_2	1
二环氧乙烷	NH_2,OH,SH	11
苯醌	NH_2	12
羰基二咪唑	NH_2	13
氰尿酰氯	NH_2	14
二乙烯基砜	NH_2,OH	15
表氯醇	NH_2,OH,SH	16
肼	NH_2	17
N-羟基琥珀酰亚	NH_2	18
三氯乙磺酰氯	NH_2,SH	19

随着新合成基质的不断出现,以及为了尽量避免传统方法活化凝胶存在的渗漏问题,人们不断探求能够产生稳定的基质-单抗结合键的新偶联技术。其中包括:1.FMP(2-fluoro-1-methyl-pyridinium toluene-4-sulfonate)法[20]。FMP活化任何有-OH的基质,然后与配体上的一个$-NH_2$或-SH偶联。此反应过程易经反应溶液酶颜色进行监测;2.NCC(norbornene carbonochlo-ridate)法[21]。NCC的使用范围较广,可活化纤维素、Sepharose、Spheron、Trisacryl和TSK Toyopearl等基质。使用分光光度法(λ=270nm)可监测配体(McAb)与NCC活化基质的偶联反应。3.TDO(4,6-diphenylthieno[3,4-d]-1,3-dioxol-2-one-5,5-dioxide)法[23]。是一种活化异丁酸酯聚合物的新方法,反应在中性

维普资讯 http://www.cqvip.com

pH条件下可很快完成,适合于偶联pH稳定范围窄的单抗。

在免疫亲和色谱中,存在IAC吸附剂结合抗原效率差的问题。造成的原因可能有:(1)抗体的不正确定位—单抗与基质偶联时,抗原结合位点被占。(2)单抗与基质多点结合,改变了抗原结合位点并使其失去活性。(3)在基质替代水平较高时,单抗分子相互之间挨得较近,在空间上阻碍了抗原接近其结合位点。人们提出了单克隆抗体定向偶联的概念[23]以便解决上述问题。第一种定向偶联的方法就是将蛋白A(protein A)固定在基质上,然后单抗再与之相连,蛋白A只与IgG的Fc区相结合,从而使参与相互作用的抗原结合位点游离。Lobb等人应用此方法纯化了重组内皮性白细胞粘附分子1[24]。蛋白G与蛋白A类似,也能与IgG的Fc区紧密结合,与蛋白A相比,其能结合的IgG种类更多,如:兔IgG2a、IgG2b,人IgG3等。

其它的定向偶联方法包括在单抗与基质偶联之前,用某些方式改造单抗。第一种,也是最常用的方案是将单抗Fc区的碳水化合物中的-OH在温和条件下用偏高碘酸钠氧化,或末端半乳糖残基与半乳糖氧化酶反应,而形成醛基与含酰肼的基质偶联[25]。第二种方案是使单抗或单抗片段生成自由的巯基。单抗或F(ab')2片段用β-巯基乙醇还原,在它们的绞链(hinge)区生成-SH,然后可以与含碘乙酰基团的基质反应,形成稳定的硫醚键而被偶联于基质上[28]。

4 渗漏(Leakage)

所有的IAC柱均会程度不同地渗漏一定量的抗体或抗体片段。渗漏是IAC吸附剂结合抗原能力下降的一个原因,此外,单抗因洗脱剂引起变性而失去活性时,将使IAC吸附剂无法再结合抗原。当IAC吸附剂容量显著下降时,要判断究竟主要是由上述两种情况中的哪种情况引起。Antonsen等人[26]使用一系列洗脱剂(如:gly-HCl缓冲液pH 2.5、KSCN、DMSO或乙二醇等)处理一组抗BSA单抗(IgG1),它们结合活性丧失的范围为0—75%。同时,用^{125}I标记的单抗进行的实验表明,一星期后渗漏的损失为3.6% 。因此,他们认为在保持吸附剂容量方面,单抗的选择是最重要的,结合容量的显著下降主要是单抗失去活性而不是渗漏引起的。然而,当在纯化产品中能检测到渗漏的抗体时,可能会对任何用于治疗的产品造成污染。

人们对偶联抗体脱落和基质的稳定性进行了大量研究。Pharmacia公司对Superdex、Sepharose和Saperose等基质稳定性的研究表明,在免疫亲和色谱中,不可能发生基质的降解。Koelsch等人研究了偶联于聚甲基丙烯酸酯上肽的渗漏[27],结果显示发生断裂的键是肽-基质连接键附近的肽键,且仅仅只有一小部分肽在发生渗漏后,其柱上保留物仍具有高稳定性,这表明不同的偶联条件对肽稳定性的影响有差异。Leckband和Langer[28]研究了被偶联肝素酶的稳定性,指出主要的渗漏源是与基质非共价结合的分子,它们可以在柱子使用前经彻底清洗而去除。

检测单抗的渗漏主要采用以下两种方法。第一种方法是用^{125}I标记单抗,使用小型柱,检测吸附剂的放射活性渗漏。其缺点是不能对实际应用柱进行检测,而且会由于单抗的放射性损伤引起较明显的渗漏。检测单抗渗漏较好的方法是使用ELISA技术,直接测定柱流出液中单抗的含量。Beer等人[29]建立了两种ELISA法用于检测单抗和单抗Fc、Fab片段的渗漏,基质-单抗结合键的溶剂分解作用和基质的降解等原因均可能造成单抗的渗漏,单抗因蛋白水解作用使柱流出液中存在单抗片段。ELISA法的灵敏度也比放射标记法高,能够测定Pg级的单抗。关于偶联单抗渗漏的研究是综合性的,包括选择不同的单抗、基质和偶联化合物进行实验。除基质和偶联化合物之外,单抗本身的性质也会影响其渗漏量。

长期以来,人们就认识到IAC中偶联抗体渗漏的问题。Kowal和Parsons使用戊二醛交联已被偶联的抗体,从而提高了它们的稳定性[30],虽然这样能有效地减少渗漏,但也会降低IAC吸附剂的抗原结合容量。为了防止因去垢剂或Chaotropes引起的单抗轻链裂解而造成的渗漏发生,可还原链间二硫键,将形成的-SH与双马来酰亚胺共价连接[31]。这种方法处理后的单抗在剧烈洗脱条件(如6M尿素)下比未处理的单抗要稳定得多。

维普资讯 http://www.cqvip.com

难以归纳出一种能确保单抗或单抗片段渗漏最小的方法,然而,可采取许多预防措施尽量减少渗漏。IAC吸附剂合成后,应对其进行彻底清洗,然后在使用之前,按纯化步骤预处理。单抗偶联于基质上的量应保持在与能接受的抗原结合容量一致的最小量。Beer等人以交联的琼脂糖为基质,得到偶联化合物连接单抗和基质的稳定顺序如下:N-羟基琥珀酰亚胺>CNBr>1,1'-羰基二咪唑>三氟乙磺酰氯>酰肼[32]。

表2 IAC纯化的部分蛋白质

蛋白质	吸附剂	洗脱液	参考文献
重组人IFN-γ	CDI-Silica gel McAb	0.1M gly-HCl, pH 2.6	33
P33蛋白	Protein G-Sepharose McAb	0.1M gly-HCl, pH 2.5	34
脂蛋白颗粒LpA-Ⅰ和LpA-Ⅰ A-Ⅱ	CNBr-Sepharose McAb	0.1M NaAC-HAC (1mM EDTA),pH 3.0	35
bcl-2蛋白	protein A-Sepharose CNBr-Sepharose McAb	0.05M 二乙胺, pH 11.5	36
人FSH受体	Affi-Gel 10 McAb	50mM柠檬酸钠(0.05% Tritonx-100),pH 2.5	37
重组人IFN-α_A	CNBr-Sepharose McAb	0.1M gly-HCl, pH 2.5	38

5 IAC纯化产品

免疫亲和色谱纯化的产品范围很广。人们使用IAC制备了大量具有潜在治疗价值的蛋白质,如:Monoclate(IAC制备的人第Ⅷ因子)和Mononine(IAC制备的人第Ⅸ因子),因为它们在商业上的重要性,获取其具体纯化情况非常困难。IAC还被应用于一些蛋白质(如:组织纤维酶原激活蛋白和腓肠碱性磷酸酶)的大规模纯化。表2列出了部分最近用IAC纯化的蛋白质。

即使在最好的操作方案中,IAC吸附剂仍渗漏微量的单抗,增加一步凝胶过滤能减少产品中IgG的含量。现在对治疗产品中含有微量(ng/mg)IgG可能造成的后果没有明确的结论,因为一方面,在肿瘤的诊断或治疗时注射了数克小鼠IgG的病人,即使其体内产生了抗鼠IgG抗体,但并没有出现免疫副反应。另一方面,Bove发现用Monoclate 治疗的一个病人在首次用药后出现过敏性反应[39],虽然绝大多数用Monoclate(含<50ng IgG/100u)治疗的病人没有副反应发生和产生任何亚类的抗鼠IgG抗体。

6 结束语

免疫亲和色谱在实验室被广泛用于蛋白质的分离纯化,目前IAC在治疗产品大规模生产上的应用受到价格、配体的渗漏和IAC吸附剂抗原结合容量低等问题的限制。单抗问世后,不少生物技术公司在研制适宜于培养杂交瘤细胞的生物反应器及其培养基,比较成熟的有气升式或深层发酵罐、中空纤维培养罐和牛淋巴液体外循环培养法等[40],这些大规模生产单抗技术的建立和不断完善将降低IAC吸附剂的价格。随着新的合成基质和偶联化合物的出现以及对IAC研究的深入,必将使免疫亲和色谱在工业性生产纯化蛋白质的应用逐渐得到发展。

免疫亲和色谱是最具选择性、简单、快速和有效的蛋白质纯化方法之一,单抗能够区分非常相似的抗原和克服其他方法不能解决的分离难题。现在,IAC是较成熟的、其局限可被接受的技术。今后,它仍将是在纯化有单克隆抗体的蛋白质时优先选择的方法。

参 考 文 献

1.Cuatrecasas P. J Biol Chem,1970; 245:3059
2.Tozer BT,et al. Biochem J,1962; 84:80
3.Kohler G,et al. Nature,1975; 256:495
4.Jack GW,et al. Chem Technol Biotechnol,1987; 39:45
5.Hornsey VS,et al. Thromb Haemostas,1987; 57:102
6.Bonde M,et al. J Biochem Biophys Methods,1991; 23:73
7.Burton DR. TIBTECH,1991; 9:169
8.Berry MJ,et al. J Chromatogr,1991; 587:161
9.Spitzmagel TM,et al. Bio/Technology,1993; 11:825
10.Welling GW,et al. J Chromatogr,1991; 548:235
11.Porath J. Methods Enzymol,1974; 34:13
12.Brandt J,et al. Biochim Biophys Acta,1975;

维普资讯 http://www.cqvip.com

386:196
13.Bethell GS,et al. J Biol Chem,1979; 254:2672
14.Finlay TH,et al. Anal Biochem,1978; 87:77
15.Fornstedt N,et al. FEBS Lett,1975; 57:187
16.Porath J,et al. J Chromatogr,1970; 51:187
17.Inman JK. Methods Enzymol,1974; 3:30
18.Frost RG,et al. Biochim Biophys Acta,1981; 670:163
19.Nillson K,et al. Biochem Biophys Res Commun,1981; 102:449
20.Ngo TT. Bio/Technology,1986; 4:134
21.Buttner W,et al. Biotechnol Bioeng,1989; 33:26
22.Hill M,et al. J Chromatogr,1992; 589:101
23.Domen PL,et al. J Chromatogr,1990; 510:293
24.Lobb RR,et al. J Immunol,1991; 147:124
25.Hoffman WL,et al. J Immunol Methods,1988; 112:113
26.Antonsen KP,et al. Biotechnol Prog,1991; 7:159
27.Koelsch R,et al. Enzyme Microb Technol,1984; 6:31
28.Leckband K,et al. Biotechnol Bioeng,1991; 37:227
29.Beer DJ,et al. J Immunol Methods,1994; 173:103
30.Kowal R,et al. Anal Biochem,1980; 102:72
31.Goldberg M,et al. Bioconjugate Chem,1991; 2:275
32.Beer DJ,et al. Bioseparation,1995; 5:241
33.Feng WK, et al. Biomed Chromatogr,1993; 7:319
34.Gingras D,et al. J Bio Chem,1996; 271:12807
35.Calvo C,et al. Hybridoma,1995; 14:603
36.Haldar S,et al. Arch Biochem Biophy,1994; 315:483
37.Vannier B,et al.Biochemistry,1996; 35:1358
38.陈华标,等.药物生物技术 1997; 4:9
39.Bove JR. Transfusion,1989; 28:603
40.顾方舟,等.生物技术的现状与未来.北京:北京医科大学 中国协和医科大学联合出版社 1990; 102

(收稿日期 1998－09－15)

长骨干骺端生长板发育的调控

儿科学院儿保科 王松艳* 综述 黎海芪 杨锡强 审校

中图分类号 R336

长骨的生长主要经过软骨内成骨,长骨干骺端生长板的发育过程即软骨内成骨过程,生长板软骨的排列、增殖、分化、生化合成紊乱及矿化过程异常均要引起长骨生长发育障碍.现已知多种细胞生长因子和激素对软骨内成骨过程起作用,调控生长板的发育、矿化过程。本文主要阐述长骨干骺端生长板发育中多种细胞生长因子、激素对该过程的调控作用。

1 软骨内成骨过程

长骨的胚基最初由间叶细胞聚集,形成软骨雏形。在长骨骨干中段,围绕软骨雏形,骨外膜新骨形成骨领而被吸收,两端发生骺软骨(干骺端生长板软骨)。在骺软骨,软骨细胞排列成柱,软骨细胞不断分裂增殖,由骨端朝向骨干依次出现静止区、增殖区、肥大区、钙化区和成骨区。随软骨细胞肥大,周围基质钙盐沉着。软骨细胞退化死亡,钙化软骨基质被由骨髓腔来的血管及结缔组织侵入,破坏形成纵行隧道。成骨细胞在残留的钙化软骨基质表面生成骨组织,形成骨小梁。随着骨干两端软骨细胞继续生长,初级骨化中心的成骨过程也从骨干中部逐渐向两端推移,骨的长度逐渐增加。骨的塑建过程中,骨长度不断增加的同时骨髓腔也不断增宽,骨干增粗。

2 生长板结构

* 女, 1964－06出生,讲师