维普资讯 http://www.cqvip.com

参 考 文 献

1.Gene Gulser® II Electroporation System Instruction Mannual Bio－RAD
2.卢圣栋，主编.现代分子生物学实验技术 高等教育出版社 396
3.Fredick M, Ausubel, 3 rd ed. Short protocol in Molecular Biology 1995;9

(收稿日期 1998－10－06)

The optimal electroporation condition of recombinant plasmid

Zhou Zhi, et al
The institute of viral hepatitis

To seek for the optimal condition and improve the rate of recombinant plasmid transfection by electroporation. Methods: PLXSN－S was transfected into several eukaryotic cell lines including p815, pA317, $HepG_2$, El_4 by electroporation and the effects of a few factors (such as voltage, capacity and the temperature of media et al) on the rate of transfection were investigated .Result (1) Low voltage (200～300v), high capacitance (900～1000uF) is a favaorable condition for the eukaryotic cells above. (2) Ice bathing may improve the rate of transfection. (3) the optimum time is in the range of 15～30ms .Conclusion:Electroporation was a highly effective method and by optimizing the condition, the rate of transfection may be markedly improved

KEY WORDS Electroporation; Gene transfection; Eukaryotic cell

132-134

免疫亲和色谱定向偶联方法的研究

7

医学检验系生物分析化学教研室 黄 昕*
中心实验室 邱宗荫

R392.11

提 要 将初步纯化属小鼠IgG_1亚类的抗G_3单克隆抗体(MG_{3t}—随机偶联于CNBr－Sepharose 4B凝胶，并成功地定向偶联于rProtein A－SepharoseFF凝胶，两种偶联反应的结合率分别达到91.7%和86.6%。MG_{3t}－rProtein A Sepharose FF的抗原结合容量是MG_{3t}－CNBr－Sepharose 4B的1.8倍，因此，单克隆抗体通过其Fc区与rProtein A结合，留出正确定向的抗原结合位点，能够提高免疫亲和吸附剂的结合容量。

关键词 免疫亲和色谱；定向偶联方法；单克隆抗体
中图分类号 R392.33

免疫亲和色谱(immunoaffinity chromatography, IAC)具有特异性好，结合容量大和洗脱条件温和等优点[1]，能从复杂的生物样品中有效分离目的蛋白。因此，该方法被广泛地应用于生物工程产品的纯化。在IAC中，单克隆抗体与基质偶联有多种不同的方法，至今为止最常用的是溴化氢法(随机偶联)，但此法制备的免疫亲和吸附剂存在结合抗原效率差的问题[2]。我们以属小鼠IgG_1亚类的抗GM－CSF/IL－3融合蛋白(G_3)单克隆抗体作为配体，对单抗(IgG_1)定向偶联于rProtein A基质进行研究，获得了满意的偶联效率，并且与溴化氢法相比，可明显提高免疫亲和吸附剂的抗原结合容量。

1 材料和方法

1.1 抗G_1单克隆抗体(MG_{3t}) 自行研制，属小鼠IgG_1亚类[3]。

1.2 rProtein A－Sepharose FF和CNBr－Sepharose 4B凝胶 购自Pharmacia公司。

1.3 主要试剂

1.3.1 二甲基庚二酸亚胺脂－二盐酸化物 购自Sigma公司。

* 男，1967－11出生，讲师

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.3.2 饱和硫酸铵溶液 称取$(NH_4)_2SO_4$ 1000g，加入1000ml双蒸水中，加温搅拌使其尽量溶解，室温冷却后放4℃冰箱保存备用。

1.3.3 偶联缓冲液Ⅰ 称取$NaHCO_3$ 8.4g、NaCl 9.2g，溶解于1000ml双蒸水中，调pH至8.3。

1.3.4 偶联缓冲液Ⅱ 称取硼砂19.1g，NaCl 175.2g，溶解于1000ml双蒸水中，调pH至9.0。

1.4 单克隆抗体的纯化

1.4.1 离心 取BALB/C小鼠腹水，1000 r/min离心，吸取上清液，20000 r/min离心，30min。

1.4.2 选择性沉淀 用饱和硫酸铵溶液将离心后BALB/C小鼠腹水中的免疫球蛋白沉淀[4]，达到初步纯化单抗的目的。

1.5 单克隆抗体的偶联

1.5.1 MG_{31}－CNBr－Sepharose 4B的制备 参照文献[5]并作适当的改进。将纯化的MG_{31}单抗与CNBr－Sepharose 4B凝胶在偶联缓冲液Ⅰ中混和，室温下反应2h，再用0.1mol/L Tris－HCl 缓冲液(pH8.0)封闭已偶联凝胶(MG_{31}－CNBr－Sepharose 4B)。最后用0.1mol/L醋酸盐缓冲液(pH4.0)和0.1mol/LTris－HCl缓冲液(pH8.0)交替清洗MG_{31}－CNBr－Sepharose 4B三次。

1.5.2 MG_{31}－rProtein A－Sepharose FF的制备 参照Sisson等人的方法[6]，并作较大的改进。将纯化MG_{31}单抗与rProtein A－Sepharose FF凝胶在偶联缓冲液Ⅱ中混合，室温下反应1h，随后已偶联的凝胶(MG_{31}－rProtein A－Sepharose FF)与交联剂二甲基庚二酸亚胺－二盐酸化物反应两次，再用0.2mol/L乙醇胺溶液(pH8.2)进行封闭，最后用0.1mol/L gly－HCl缓冲液(pH3.0)和0.1mol/L硼酸盐缓冲液(pH9.0)交替清洗MG_{31}－rProtein A－Sepharose FF三次。

1.6 免疫亲和吸附剂的抗原结合容量测定 取1.0ml免疫亲和吸附剂加入已知含量的G_3溶液中，轻轻混匀，室温放置24h，200－400r/min离心，10min，吸取上清液，测定G_3含量，G_3前、后含量之差即为免疫亲和吸附剂的抗原结合容量。

1.7 蛋白质含量测定 采用紫外吸收法和Folin酚试剂法。

2 结果

2.1 抗G_3单抗的纯化 含MG_{31}单抗的BALB/C小鼠腹水经离心和饱和$(NH_4)_2SO_4$沉淀法纯化后，经偶联缓冲液充分透析，纳氏试剂检测无NH_4^+。测得偶联缓冲液Ⅰ中蛋白浓度为10.12mg/ml；偶联缓冲液Ⅱ中蛋白浓度为9.73mg/ml。

2.2 MG_{31}－CNBr－Sepharose 4B制备的检测 取30.36mg MG_{31}单抗与0.8g CNBr－Sepharose 4B进行偶联反应，得到免疫亲和吸附剂约3.0ml。测定表明MG_{31}单抗基本上被偶联结合至CNBr－Sepharose 4B上，结合率大于90%，见表1。

表1 偶联反应Ⅰ的结合率

	体积 (ml)	蛋白浓度 (mg/ml)	总蛋白量 (mg)	结合率 (%)
纯化抗体溶液	6.0	5.06	30.36	
偶联后清洗溶液	21.0	0.12	2.52	91.7

2.3 MG_{31}－rProtein A－Sepharose FF制备的检测 取19.46mg MG_{31}单抗与2.0ml rProtein A－Sepharose FF进行偶联反应，用二甲基庚二酸亚胺－二盐酸化物作交联剂，将MG_{31}单抗共价交联于rProtein A－Sepharose FF上，结合率约为86.6%，见表2。

表2 偶联反应Ⅱ的结合率

	体积 (ml)	蛋白浓度 (mg/ml)	总蛋白量 (mg)	结合率 (%)
纯化抗体溶液	4.0	4.87	19.46	
偶联后清洗溶液	20.0	0.13	2.6	86.6

2.4 免疫亲和吸附剂的抗原结合容量 MG_{31}－CNBr－Sepharose 4B的抗原结合容量为360μg/ml凝胶；MG31－rProtein A－Sepharose FF的抗原结合容量为640μg/ml凝胶。结果表明将MG_{31}单抗定向偶联于rProtein A－Sepharose FF，与随机偶联于CNBr－Sepharose 4B相比，提高了免疫亲和吸附剂的抗原结合容量。

3 讨论

制备免疫亲和吸附剂时并不要求与基质偶联的单克隆抗体具有很高的纯度。在大多数情况下，

维普资讯 http://www.cqvip.com

BALB/C小鼠腹水经离心，用饱和$(NH_4)_2SO_4$沉淀法初步纯化的单抗(纯度约为70－80%)即可用于免疫亲和吸附剂的制备。腹水经选择性沉淀之后，将获得的单抗溶液用偶联缓冲液进行彻底透析脱盐极为重要，因为Tris、NH_4^+和叠氮离子等会抑制单抗与基质的偶联反应。

单克隆抗体与CNBr－Sepharose 4B的偶联是以随机定位方式进行，可导致(1)单抗的不正确定位，其抗原结合位点被占;(2)多点结合使单抗的抗原结合位点发生改变并失去活性等，从而使免疫亲和吸附剂的抗原结合容量较低。为克服随机偶联的缺点，Gersten等人[7]首先尝试将多克隆抗体与Protein A基质偶联。Protein A和Protein G具有只与免疫球蛋白分子Fc区相结合的能力，因此，单抗能够用化学交联剂定向共价偶联于Protein A基质或Protein G基质，留出其正确定位的抗原结合位点，从而提高免疫亲和吸附剂的抗原结合容量。在我们的研究中，进行两种偶联反应时，每毫升凝胶所用单抗的量相差不大，但是MG_{3t}－rProtein A－Sepharose FF的抗原结合容量为640 μg/ml凝胶，大约是MG_{3t}－CNBr－Sepharose 4B抗原结合容量的1.8倍，说明定向偶联有助于提高免疫亲和吸附剂的抗原结合容量。

Protein A结合小鼠IgG_1的能力较差。Schneider等人[8]预先用兔抗鼠免疫球蛋白包被Protein A－Sepharose CL－4B，然后再与单克隆抗体(IgG_1)结合，制备单抗(IgG_1)－抗体－Protein A－Sepharose CL－4B，此法虽然解决了单抗(IgG_1)与Protein A基质结合的问题，但是较为麻烦。用属小鼠IgG_1亚类的单抗定向偶联制备免疫亲和吸附剂时，人们一般使用Protein G基质，但其价格比Protein A基质高许多。rProtein A－Sepharose FF的价格与Protein A-Sepharose FF相同，但它的IgG结合容量更大，我们参照Sisson等人[6]和Schneider等人[8]的方法，经摸索制备MG_{3t}－rProtein A－Sepharose FF获得满意的效果，偶联效率达到86.6%。

(致谢：本校基础医学院病理生理教研室范维珂教授和生物化学教研室冯涛老师对本研究给与了大力支持和帮助，在此表示衷心感谢！)

参 考 文 献

1.Stallcup KC, et al. J Immunol 1983;127:923
2.Fowell SL, et al. J Biotechnol 1986;4:355
3.黄 昕，等.重庆医科大学学报 1998;23:217
4.Goding JW. Monoclonal antibodies:principles and practice.2nd ed. London: Academic Press 1986:108
5.Goding JW. Monoclonal antibodies:principles and practice.2nd ed. London: Academic Press 1986:225
6. Sisson TH, et al. J Immunol Methods 1990;127:215
7.Gersten DM, et al. J Immunol Methods 1978;24:305
8.Schneider C, et al. J Biol Chem 1982;257:10766

(收稿日期 1998－09－15)

Study on site－directed coupling method of immunoaffinity chromatography

Huang Xin, et al
Department of bioanalytical chemistry, faculty of medical laboratory science

We coupled anti－G_3 McAb (MG_{3t}、IgG_1) purified by ammonium sulphate precipitation method to CNBr－Sepharose 4B gel at random，and to rProtein A－Sepharose FF gel by site－directed immobilization technique successfully. The binding rate of two coupling reaction were 91.7% and 86.6% respectively. The antigen binding capacity of MG_{3t}－rProtein A－Sepharose FF was 1.8 fold that of MG_{3t}－CNBr－Sepharose 4B, thus the binding of McAbs via their Fc portions to rProtein A，leaving the antigen－combining site in thecorrect orientation for the binding of antigen，could increase the antigen binding capacity of the immunoaffinity chromatography column

KEY WORDS Immunoaffinity chromatography; Site－directed coupling method; Monoclonal antibody