DOI:10.16016/j.1000-5404.1986.03.003

应用抗人Clq单克隆抗体亲和层析柱分离人血清中Clq的研究

谢佩蓉 王剑平 王雪峰 冯庆和 郑 萍 朱锡华

(免疫学研究室)

提 要 本文报道了一种以抗人 Cl_q单克隆抗体亲和层析柱分离人血清中 Cl_q的方法。该法简便快速，可于24～48小时内完成。Cl_q产量约为7～10mg/100ml血清。该制剂经双向扩散及免疫电泳试验，未发现免疫球蛋白污染；SDS-PAGE 分析表现典型的Cl_q亚单位结构；经红细胞凝集和胶乳凝集试验测定，其生物学活性比较好。抗人Cl_q单克隆抗体Sepharose 4B 柱反复使用10余次，4℃冰箱保存将近一年仍保持活性。

关键词 Cl_q； 单克隆抗体； 亲和层析

Clq 是补体第一成分的一个亚单位，其在补体经典途径中发挥着重要作用。许多理论研究如 Clq的结构与功能、Clq 的生物合成、免疫复合物沉积肾小球基底膜的机制与Clq的关系等[1-3]，均需要高度纯化的Clq制品。此外在免疫复合物病的循环免疫复合物的检测、血清中 Clq水平以及抗人 Clq 单克隆抗体(Monoclonal Antibodies略为McAb)的筛选等实际工作中，也都需要高度纯化的Clq。因此多年来人们对自血清或血浆 中分离Clq 的工作，进行了大量研究[4-8]。但要获得没有免疫球蛋白污染（特别是 IgG）、操作步骤简单、产量高、纯度好的分离方法，至今尚未完全达到，鉴于 McAb 具有高特异性、高免疫活性和均一性等优点，用它制成亲和层析柱，从复杂的混合物中分离单一成分，是一个比较好的方法[9-10]。

用抗人Clq McAb亲和层析柱分离Clq，国内外均未见报道。我们试用自制的抗人Clq McAb做成亲和层析柱，进行人血 清 中分离Clq的试验，发现所分离的Clq制品，纯度、活性及产量都比较高，而且方法简便，适用于一般实验室，现简述于后。

材 料 和 方 法

一、鼠抗人Clq McAb 由本室建立的分泌抗人Clq McAb杂交瘤细胞系 D_5[11]，按常规方法制备的小鼠腹水，ELISA 效价为 10^{-5}，经盐析法和DEAE-纤维素层析法纯化。

二、鼠抗人Clq McAb亲和层析柱的制备

按文献[12]方法制备。活化的Sepharose 4B为瑞典产品 (phamacia Fine chemical)，使用前按说明书进行处理。抗体偶联率为 71.49%，偶联量为4mg/ml Sepharose 4B。

三、人Clq的分离

(一) 提取优球蛋白 取正常人血清（来自健康供血员）50～70ml，装透析袋对0.005M EDTA 2,000ml透析过夜，以25000×g低温离心30分钟，弃去上清，沉淀物以同样溶液洗涤一次，以原血清量的1/10溶于pH7.5 0.75M NaCl 0.01 M EDTA 溶液，4℃冰箱放置1小时，再以25000×g 离心30分钟，弃去不溶性沉淀物，收集上清即为优球蛋白，冻存备用。

(二) 鼠抗人Clq McAb 亲和层析柱分离Clq

1. 淋洗 用pH7.5 0.01M PBS淋洗层析柱 (1.3×6.0cm) 约2～3个床体积，流速60～90 ml/h。

2. 加样 取上述优球蛋白对pH7.5 0.01M PBS透析平衡约1小时，缓慢加入抗人Clq McAb

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

亲和层析柱，流速10～15ml/h， 样品全部进入柱床，用PBS淋洗，流速60ml/h，收集流出液，约5ml为一组分。

3．解离洗脱 用pH2.8 0.2M甘氨酸盐酸解离洗脱，流速60ml/h，收集解离洗脱液（一组分约5ml），及时用1/10N NaOH中和，并立即对 pH 7.5 0.75M NaCl 0.01M EDTA 透析平衡。

以上收集的各组分于分光光度计280nm 测A值后，分装冻存－30℃冰箱备用。

四、免疫化学分析

（一）双向扩散及免疫电泳试验 按 Campbell[13]等方法进行。抗人全血清及抗人 Clq 血清本室自制，抗人IgG、IgM、IgA 购自北京生物制品研究所。

（二）SDS-PAGE 按Poh1 等的方法。

五、生物学活性测定

（一）胶乳颗粒凝集试验（简称乳凝）[14] 用甘氨酸缓冲液一系列二倍稀释的 Clq制品，与等量 IgG 致敏的胶乳颗粒混合，室温孵育 2 小时后，观察结果。呈现明显凝集的 Clq 最高稀释度，即为效价。以缓冲液替代Clq作为对照。

（二）红细胞凝集试验[8] Clq 制品用 pH7.4 巴比妥缓冲液进行一系列倍比稀释，与等量致敏绵羊红细胞相混合，室温孵育 3 小时，显微镜下观察凝集现象。呈现明显凝集的 Clq最高稀释度，即为效价。以巴比妥缓冲液替代Clq作为对照。

六 蛋白定量 按280nm $E^{1\%}_{1cm}$6.8计算。

实 验 结 果

一、人Clq的分离 人血清经予处理的优球蛋白，过抗人Clq McAb Sepharose 4B柱，经PBS淋洗出现第一峰，甘氨酸盐酸解离出现第二峰，分别收集蛋白液，于分光光度计波长280nm 测蛋白液的A值并进行乳凝试验。结果如图 1 所示，绝大部分 Clq与抗人Clq McAb结合，用甘氨酸盐酸解离的 Clq，其A值与乳凝效价相一致。以 280nm $E^{1\%}_{1cm}$6.8计算 Clq 浓度[5]，产量约为 7～10mg/100ml血清。

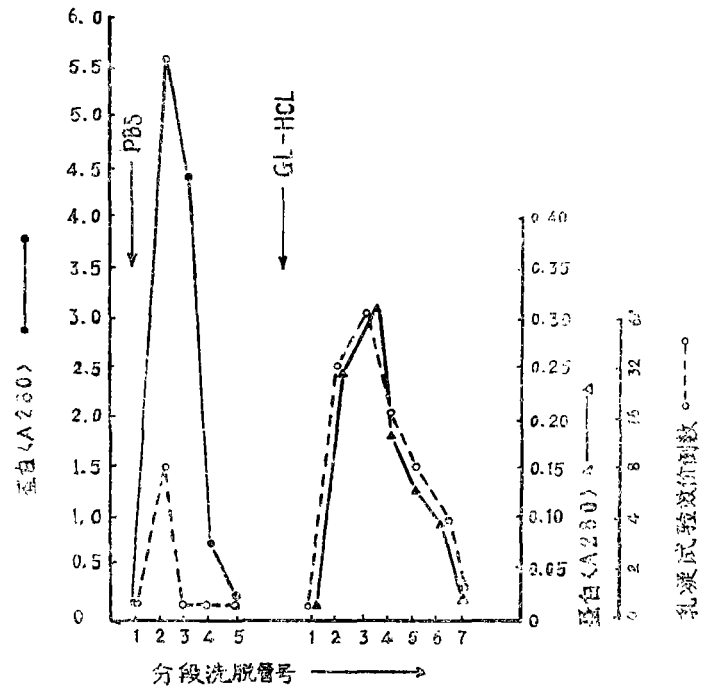
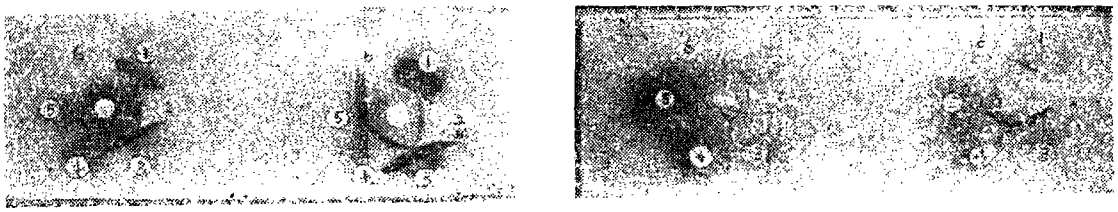


图 1 抗人ClqMcAb亲和层析柱洗脱及解离情况

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

二、免疫化学分析

（一）双向免疫扩散　取正常人全血清、优球蛋白、层析第一峰、分离的人Clq分别与抗人全血清、抗人Clq、抗人IgG、IgM、IgA进行双向免疫扩散试验，结果如图2所示，正常人血清及优球蛋白与抗人全血清形成多条沉淀线，与抗人Clq、抗人IgG、IgM、IgA分别于不同位置形成一条沉淀线；经层析柱吸附后洗脱的杂蛋白，与抗人Clq未出现沉淀线，再次说明优球蛋白中的Clq与层析柱偶联的抗人Clq McAb结合，而与抗人IgG、IgM均有沉淀反应出现；纯化后的Clq则仅分别与抗人全血清及抗人Clq呈现单一沉淀线，未见有IgG、IgM及IgA等杂蛋白。



（A）　　（B）

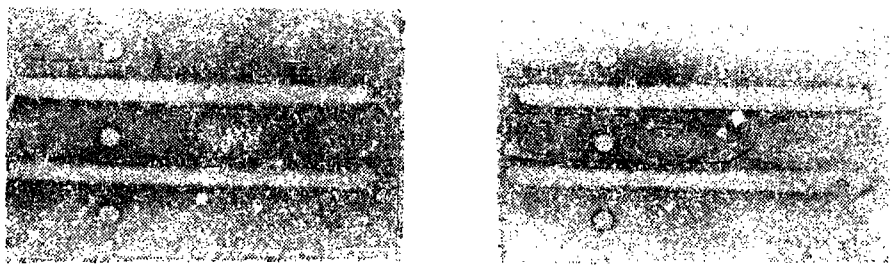
图2　双向免疫扩散试验

中间孔：（A）右—人全血清　　（B）右—层析第一峰

左—优球蛋白　　左—纯化C_{1q}

周围孔：1—6为：抗人全血清；抗人C_{1q}；抗人IgG；抗人IgM；抗人IgAj；生理盐水

（二）免疫电泳　图3表明纯化的Clq与抗人全血清及抗人Clq血清于阴极端慢γ区形成一条沉淀线，Clq经56℃30分钟灭活后则沉淀线消失。而作为对照的人全血清与抗人全血清在不同位置形成多条沉淀线，与抗人Clq则为一条沉淀线。



（A）　　（B）

图3　免疫电泳试验

（A）中间孔：正常人血清　　上下孔：纯化人C_{1q}

上槽：　抗人$C1_q$血清　　下槽：　抗人全血清

（B）中间孔：正常人血清　　上孔：人$C1_q$；下孔：灭活$C1_q$

上下槽：抗人全血清

（三）SDS-PAGE　图4为经巯基乙醇还原或不还原处理的Clq制品SDS-PAGE结果。图4A为未还原的Clq，呈现分子量为60,000和42,000二条蛋白带，是Clq经尿素及碘乙酰胺处理后解离的二个亚单位（A-B和C-C）；图4B为经巯基乙醇及碘乙酰胺还原烷化的Clq，显示分子量为29,000、27,000和22,000三个亚单位（A、

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

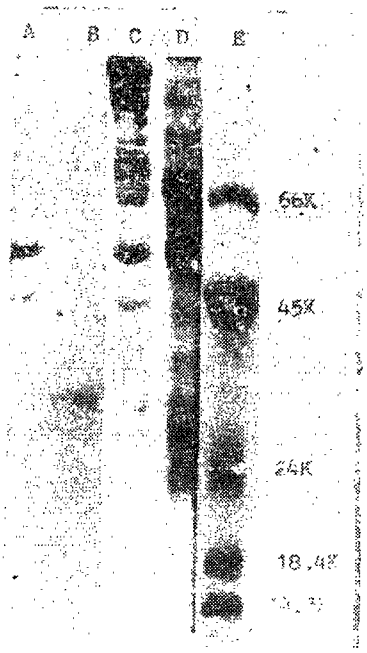


图4 SDS-PAGE

A、C为未经巯基乙醇还原的$C1_q$及优球蛋白。

B、D为经巯基乙醇还原的$C1_q$及优球蛋白。

E 为不同分子量的标准蛋白

B、C）。图4 C和D为不还原和还原的优球蛋白，均呈现多条蛋白带。图4E为标准蛋白带。

三、生物学活性检测 根据致敏胶乳颗粒上IgG及致敏绵羊红细胞IgG或IgM的Fc部分补体结合点，能与Clq球形亚单位结合的原理，从而使致敏胶乳颗粒和致敏绵羊红细胞发生凝集现象，凝集效价的高低表明Clq活性的强弱。本试验取纯化Clq（447μg/ml）进行乳凝及红细胞凝集试验，结果见表1。两种试验的效价均为1:64。

讨 论

我们以抗人Clq McAb亲和层析柱分离人血清中所得的Clq，经双向免疫扩散和免疫电泳试验、SDS-PAGE等免疫化学分析结果，表明该制剂符合Clq的特性，而且是一纯度较高的制品[14-15]。

Clq在正常血清中的浓度，各作者报道不一，分别为70μg/ml[19]、76μg/ml[7]及190μg/ml[17]，可能与试验条件不同有关。我们用分光光度计波长280nm $E^{1\%}_{1cm}$ 6.8计算纯化Clq的产量，每100ml血清获Clq约为7～10mg，与Yonemasu等[14]5mg/100ml、Reid等[4] 2～2.5mg/100ml及Schepers等[7]3.95mg/100ml血清相比，说明用该法纯化的Clq，产量是相当高的。

表1 Clq制品的生物学活性试验

试验名称	Clq稀释度							
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	对照
胶乳凝集	⧺	⧺	⧺	⧺	++	⧺	+	-
红细胞凝集	⧺	⧺	⧺	++	++	⧺	+	-

*凝集程度

利用Clq进行研究工作，不仅要求Clq的纯度高，而且要有较好的活性。国外实验室多以溶血反应表示Clq的活性[6-7]，该法敏感性高，可测定少于1ng的Clq溶血活性，但该试验需有Clr、Cls、C_4、C_2等制品，我们实验室目前尚无此条件，因而采用红细胞凝集试验及胶乳凝集试验，用这些方法测定Clq活性，试剂来源方便，方法简单，一般实验室可以做到。经试验证明447μg/ml的Clq，两种试验的凝集效价均为1:64，与本室以往用低离子强度含螯合剂的溶液，分段沉淀的方法分离的Clq是可比的[8]。

由于Clq在血清中含量甚微，要从血清蛋白中纯制，必需通过多个步骤，既费事又

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

费时，且影响制品的产量和活性。单克隆抗体具有高度特异、高免疫活性及均一性等特点，且来源方便，我们在人血清提取优球蛋白之后，只通过一个抗人Clq McAb 亲和层析柱，即达到纯化的目的，一般在24～48小时内完成，所得制品纯度、产量及活性都比较满意，且层析柱反复使用10余次，4℃保存将近一年，仍保持活性。

（本文中 SDS-PAGE 由西南医院免疫室胡祖祥同志协助进行，特致谢）

参 考 文 献

1. Golan MD, et al. Conformational changes in Clq after binding to ic; detection of neoantigens with monoclonal antibodies. J Immunol 1982; 129:445

2. Muller W, et al. Biosynthesis of the first component of complement by human and guinea pig peritoneal macrophages; evidence for an independent production of the C1 subunits. J Immunol 1978; 121:1578

3. Bohnsack JF. The Clq subunit of the first component of complement binds to laminin; A mechanism for the deposition and retention of immune complexes in basement membrane. Proc Natl Acad Sci USA 1985; 82:3824

4. Reid KBM, et al. Isolation and characterization of Clq, a subcomponent of the first component of complement, from human and rabbit sera. Biochem J 1972; 130:749

5. Kolb WP, et al. Clq; Isolation from human serum in high yield by affinity chromatography and development of a highly sensitive hemolytic assay. J Immunol 1979; 122:2103

6. Pohl DA, et al. Isolation and purification of human Clq from plasma. J Immunol Methods 1980; 36:12

7. Schepers G, et al. Human Clq; Rapid isolation and quantitative determination by immunodiffusion. J Immunol Methods 1984; 67:185

8. 谢佩蓉，等。人补体Clq的分离与鉴定。第三军医大学学报 1984; 6:345

9. 周景鸿，等。在亲和层析中应用杂交瘤细胞分泌的单克隆抗体HBS/a纯化HBsAg。上海免疫学杂志 1984; 4:40

10. Novick D, et al. Monoclonal antibodies to Human α-interferon and their use for affinity chromatography. J Immunol 1982; 129:2244

11. 谢佩蓉，等。分泌抗人Clq单克隆抗体杂交瘤细胞系的建立。免疫学杂志，1985; 1:1

12. 王世中，等。免疫化学技术。科学出版社 1980; 34页

13. Campbell KD, et al. Purification and characterization of subcomponent Clq of the first of Bovine complement. Biochem J 1979; 177:531

14. Yonemasu K, et al. Clq; Rapid purification method for the preparation of monospecific antisera and the biochemical studies. J Immunol 1971; 106:34

15. Yonemasu K, et al. Structural studies on human Clq, non-covalent and covalent subunits. Immunochemistry 1972; 9:545

16. Ziccardi RJ, et al. The subunit composition and sedimentation properties of human Cl. J Immunol 1977; 118:2047

17. Kohler PF, et al. Complement-Ig relation; Deficiency of Clq associated with impaired IgG synthesis. Science 1969; 163:474

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Isolation of C1q in Human Serum with Anti-human C1q McAb Affinity Chromatography

Xie Peirong, et al
(Department of Immunology, Third Military Medical College)

This paper is to report a procedure to isolate C1q in human serum with anti-human C1q McAb affinity chromatography. This procedure is simple and rapid, which can be performed within 24 to 48 hr. The yield of C1q was 7 ~10 mg per 100ml serum. The preparations were immunoglobulin free as judged by double diffusion and immunoelectrophoresis assay and exhibited typical C1q subunit structure in SDS-PAGE. After biological activity evaluation with red cell agglutination and latex agglutination assay, this C1q preparation was found to be satisfactory in its activity. The anti-human C1q McAb sepharose 4B column can be used repeatedly and stored in 4℃ for approximately one year without loss of absorption activity.

Key words: C1q; Monoclonal antibody; Affinity chromatography

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net