

· 论 著 ·

蛋白A的固定及在抗体亲和纯化中的应用

唐秀, 李素霞*, 赵健, 范立强

(华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237)

摘要: 目的 以蛋白A作配基偶联活化的Sephacrose 4FF后纯化兔免疫蛋白IgG。方法 以环氧氯丙烷(ECH)活化凝胶, 正交试验确定最佳活化条件; 以纯化数据确定抗体兔免疫蛋白IgG纯化最佳缓冲液盐浓度。结果 Sephacrose 4FF最佳活化条件: ECH浓度20% (v/v), 0.8 mol/L NaOH添加量为1 mL/1 g Sephacrose 4FF湿胶, 活化时间2.5 h, 反应温度40°C。结论 建立将活化琼脂糖凝胶Sephacrose 4FF与蛋白A偶联的条件, 可应用于纯化兔免疫蛋白IgG。

关键词: 环氧氯丙烷; 活化; 琼脂糖凝胶4FF; 重组蛋白A; IgG;

中图分类号: Q503 文献标识码: A 文章编号: 1672-979X (2013) 01-0001-03

Immobilization of Protein A and Its Application in Antibody Affinity Purification

TANG Xiu, LI Su-xia, ZHAO Jian, FAN Li-qiang

(State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract: Objective To isolate the IgG from rabbit using Sephacrose 4FF coupled with protein A. **Methods** The optimum conditions of Sephacrose 4FF activated by epichlorohydrin were determined by an orthogonal experiment with four factors and three levels, and the optimum salt concentration for IgG purification was determined by changing the buffer concentration. **Results** The optimum conditions of Sephacrose 4FF activated by epichlorohydrin were as follows: 20% (v/v) epichlorohydrin, 1 mL 0.8 mol/L sodium hydroxide for incubation of 1 g Sephacrose 4FF at 40°C for 2.5 h. **Conclusion** Proper condition for Sephacrose 4FF coupled with protein A can be established for the purification of IgG from rabbit.

Key Words: epichlorohydrin; activation; Sephacrose 4FF; recombinant protein A; IgG

金黄色葡萄球菌蛋白A (Staphylococcal protein A, SPA) 是连接在金黄色葡萄球菌 (Staphylococcus aureus) 壁上的一种蛋白^[1-2], 简称蛋白A。通过溶葡萄球菌的消化作用可初步分离出此蛋白^[1], 进一步纯化还需多步操作。通过基因重组技术也可获得此目的蛋白。

蛋白A具有与人及许多动物如豚鼠、猪、小鼠、猴等IgG结合的能力, 因此, 将IgG或IgG的Fc段偶联到琼脂糖凝胶上可用于分离此蛋白; 也可用于纯化易与之结合的IgG^[3-5]。蛋白A通过疏水作用结合IgG的Fc段, 这种结合不会影响被纯化抗体的活性。结合后的蛋白A-IgG可在高盐或低pH等条件下解离, 以用于抗体分离纯化及免疫学检测。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

重组蛋白A (本实验室生产); Sephacrose 4FF (Bestarose, 博格隆); 含有免疫抗体IgG的兔血清 (本实验室保存); 环氧氯丙烷 (ECH)、二甲亚砜

(DMSO)、硼氢化钠 (NaBH₄), 其余试剂均为国产分析纯。

UV-2100紫外可见分光光度计 (尤尼柯); JA1003电子精密天平 (上海精科), Avanti J-25高速冷冻离心机 (美国贝克曼库尔特), ECP3000电泳仪 (北京六一)。

1.2 环氧氯丙烷法活化琼脂糖凝胶

取保存于20%乙醇水溶液中的Sephacrose 4FF介质5 mL (沉降体积) 用蒸馏水反复洗涤, 除去乙醇后置入G3烧杯玻璃漏斗真空抽干5 min。

取抽滤后的介质依次用20%, 50%和70% (v/v) DMSO水溶液清洗, 每次清洗后真空抽滤至干。向处理后的介质中依次加入70% (v/v) DMSO, ECH (终浓度15%, v/v), 0.8 mol/L NaOH和NaBH₄水溶液 (2 mg/mL), 置40°C恒温空气浴床上振荡反应2 h (170 r/min)^[6]。反应结束后用大量去离子水冲洗直至清洗液中无环氧基检出。清洗液中环氧基采用硫代硫酸盐测定。以酚酞为指示剂, 如清洗液

收稿日期: 2012-03-07

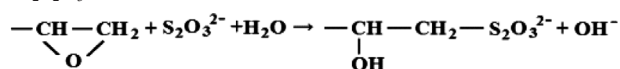
作者简介: 唐秀 (1986-), 女, 山东临沂人, 硕士研究生, 从事重组蛋白的研究与应用 E-mail: tangxiu125114@126.com

*通讯作者: 李素霞, 女, 副教授, 硕士生导师 Tel: 021-64252255 E-mail: lisuxia@ecust.edu.cn

变红表明有氢氧根离子生成,清洗液中存在游离的环氧基(清洗液用大量去离子水清洗后,若含有游离环氧基,能与硫代硫酸钠发生反应产生氢氧根离子,见本文1.3的反应式),需要再加去离子水冲洗至溶液不变色。

1.3 环氧基修饰密度的定量分析

琼脂糖介质上的环氧基修饰密度用硫代硫酸钠滴定法测定^[7]。经去离子水清洗后的活化Sephacrose 4FF介质置入G3漏斗中真空抽干5 min,随后称取0.5 g置入磨口锥形瓶,并加入约3 mL 1.3 mol/L硫代硫酸钠和酚酞指示剂1~2滴,锥形瓶封口后于室温下振荡反应30 min。环氧基能与Na₂S₂O₃发生如下反应:



反应后的溶液用0.1 mol/L盐酸标准溶液滴定直至溶液由红色变为无色。根据消耗的盐酸标准溶液的体积由下式计算环氧基修饰密度:

$$S = \frac{M_{\text{HCl}}(V_0 - V_1)}{W/\rho}$$

式中S为环氧基修饰密度(mol/mL),M_{HCl}为HCl浓度(mol/L),V₀、V₁为滴定前后HCl体积(mL),ρ为Sephacrose 4FF介质密度(1.02 g/mL),W为Sephacrose 4FF介质的质量(g)。

定义活化度为每1 mL活化凝胶Sephacrose 4FF中含有的环氧基μmol为一个活化度,也称作环氧基修饰密度(μmol/mL)。

对照实验中,保存于20%乙醇水溶液中的Sephacrose 4FF介质经去离子水清洗滤干后直接在水溶液中活化。

1.4 蛋白A与活化胶的偶联

以pH 7.5的硼酸-硼砂为缓冲液,加入SPA 25(20 mg)纯样品和活化后的琼脂糖凝胶Sephacrose 4FF 1 g,30℃反应16 h,抽干反应液,洗涤2次后再次真空抽干。用15 mL 0.2 mol/L乙醇胺屏蔽未反应的环氧端基,于室温下反应5 h。反应结束后,用去离子水清洗,然后用0.1 mol/L含NaCl的磷酸缓冲液(pH 7.4)和5倍体积去离子水冲洗并抽干,保存于4℃,20%乙醇溶液中。

1.5 抗体纯化

1.5.1 缓冲液的配制 平衡缓冲液:pH 7.4,20 mmol/L磷酸盐缓冲液(PBS,分别含0.15、0.25、0.3、0.75 mol/L NaCl)。洗脱缓冲液:pH 2.8,0.1 mol/L甘氨酸缓冲液。中和缓冲液:pH 9.0,1 mol/L Tris-HCl缓冲液。

一些纯化载量较少的抗体可适当提高平衡缓冲液中的盐浓度(可达3 mol/L)和pH值(可达pH 8.2),以提高抗体和介质的吸附力。但是,有时高pH会增加杂蛋白吸附,使用时应根据实际情况调节。

以上缓冲液使用前均需经0.45 μm滤膜过滤。

1.5.2 纯化方法 (a)装柱:偶联了重组蛋白A的Sephacrose 4FF填料装柱后,用洗脱缓冲液洗3~5个柱床体积洗掉乙醇

和杂质,用平衡缓冲液流洗5~10个柱床体积平衡柱。(b)上样:将含免疫抗体IgG的兔血清样品上柱,均匀上样,可将流出液反复上样,以更好地结合IgG(样品先用平衡缓冲液稀释5~10倍,以保证样品液的pH和平衡缓冲液接近)。

(c)洗涤:用平衡缓冲液再洗5~10个柱床体积,直至基线趋于平缓。(d)洗脱:分别以相对快速和慢速加入洗脱缓冲液,pH降至约3.0,IgG从填料上洗脱下来,立即用上述中和缓冲液中和和洗脱液至pH为中性,防止洗脱缓冲液的酸性环境引起抗体失活。

2 结果与讨论

2.1 琼脂糖凝胶活化条件的优化

根据相关的文献报道,选择对琼脂糖凝胶Sephacrose 4FF活化影响较大的因素:ECH浓度、NaOH用量、活化时间及反应温度4个因素进行正交试验以确定琼脂糖凝胶Sephacrose 4FF活化的最佳条件。采用正交表L₉(3⁴)设计方案,正交试验因素水平见表1,琼脂糖活化的影响因素直观图见图1。(“1.3”中“活化度”等同于环氧基修饰密度)

表1 Sephacrose 4FF活化条件的正交试验因素水平表

	ECH浓度 /% (v/v)	NaOH用量 /mL	活化时间 /h	反应温度 /°C	环氧基修饰密 度/μmol·mL ⁻¹
1	10	0.5	1.5	40	5
2	10	1	2	35	6.6
3	10	1.5	2.5	30	9
4	15	0.5	2	30	4
5	15	1	2.5	40	11
6	15	1.5	1.5	35	6.6
7	20	0.5	2.5	35	3
8	20	1	1.5	30	10
9	20	1.5	2	40	11
极差R	1.133	5.200	0.467	3.600	—

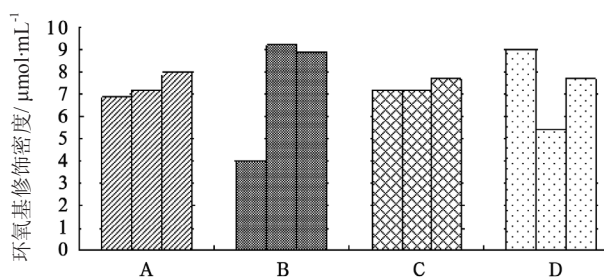


图1 琼脂糖Sephacrose 4FF活化条件的因素直观图

A: ECH浓度(% v/v), B: NaOH用量(mL/g凝胶), C: 活化时间(h), D: 反应温度(°C)

由表1中的级差值可见,NaOH用量对Sephacrose 4FF活化后环氧基修饰密度影响最大,其次是反应温度,ECH浓度和活化时间。

由图1可见,最佳水平组合为A₃B₂C₃D₁,即ECH浓度20%(v/v),NaOH用量1 mL/g凝胶,活化时间2.5 h,反应温度40℃时,琼脂糖凝胶Sephacrose 4FF的活化效果较好。

2.2 活化胶偶联基团条件

以巯基乙醇为被偶联对象,考察活化后的Sephacrose

4FF偶联巯基(-SH)的条件。

取ECH活化的凝胶Sephacrose 4FF 0.5 g(湿重), 置入10 mL 0.1 mol/L不同pH的磷酸钾缓冲液, 分别再加入200 μ L巯基乙醇, 于25 $^{\circ}$ C, 150 r/min反应16 h。反应结束后, 用大量去离子水清洗偶联后的Sephacrose 4FF并抽干, 称重后测环氧基修饰密度, 结果见表2。

表2 Sephacrose 4FF偶联巯基乙醇的pH条件

实验	偶联前pH	偶联后pH	环氧基修饰密度/ μ mol \cdot mL $^{-1}$
①	6.4	6.0	0
②	7.0	6.5	0
③	7.5	7.0	0
④	8.0	7.5	0

实验过程中分别以水和乙醇为对照, 结果未检测到-OH与活化Sephacrose 4FF偶联。由表2可见, -SH在pH 6.4~8.0条件下均可偶联到活化Sephacrose 4FF上。

2.3 抗体纯化

2.3.1 平衡缓冲液中NaCl浓度对兔血清中IgG纯化效果的影响 将1 mL偶联了重组蛋白A的Sephacrose 4FF装柱, 改变平衡缓冲液中NaCl浓度, 上样后分别测定洗脱液在280 nm的吸光度, 结果见图2。

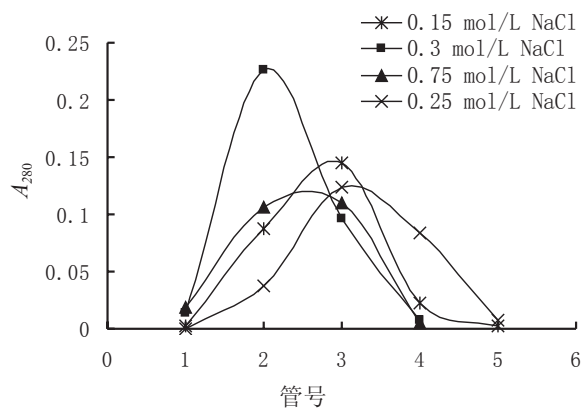


图2 平衡缓冲液中盐浓度对偶联重组蛋白A的Sephacrose 4FF亲和柱纯化兔血清中IgG的影响

由图2可见, 平衡液中含0.15 mol/L NaCl时流出曲线无拖尾, 而平衡液中含0.3 mol/L NaCl时吸附样品较多, 即流失样品较少。

2.3.2 洗脱流速对兔血清中IgG纯化效果的影响 将1 mL偶联重组蛋白A的Sephacrose 4FF装柱, 考察不同洗脱流速对抗体纯化的影响见图3。由图3可见, 在流速相对较慢的情况下, 抗体结合较多, 利于IgG纯化和收集。

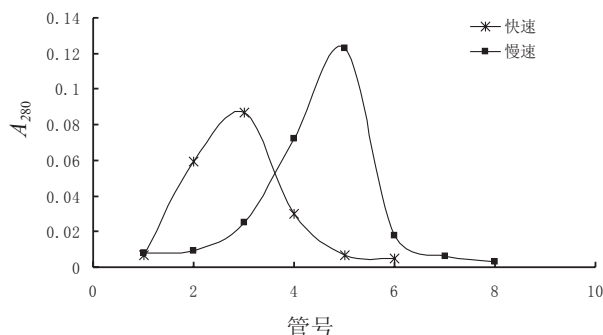


图3 流速对偶联重组蛋白A的Sephacrose 4FF亲和柱纯化兔血清中IgG的影响

3 结论

本实验室以ECH活化凝胶Sephacrose 4FF, 通过正交试验确定最佳活化条件为ECH浓度20% (v/v), NaOH用量1 mL, 活化时间2.5 h, 反应温度40 $^{\circ}$ C。在上述条件下, 以重组蛋白A作配基偶联活化的Sephacrose 4FF, 该凝胶能用于纯化兔免疫蛋白IgG, 且发现当NaCl浓度为0.3 mol/L时效果较好, 为规模化开发打下了基础。

参考文献

- [1] Björk I, Petersson BÅ, Sjöquist J. Some physicochemical properties of protein A from *Staphylococcus aureus*[J]. *Eur J Biochem*. 1972, 29(3): 579-584.
- [2] Kikuchi J, Mitsui Y, Asakura T, et al. Spectroscopic investigation of tertiary fold of staphylococcal protein A to explore its engineering application[J]. *Biomaterials*, 1999, 20(7): 647-654.
- [3] 逢少堃, 梁浩, 宋淑亮, 等. 葡萄球菌蛋白A活性机制与现代应用[J]. *生命的化学*, 2008, 28(6): 748-751.
- [4] Shpigel E, Goldlust A, Esbel A, et al. Expression, purification and applications of Staphylococcal Protein A fused to cellulose-binding domain[J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2000, 31: 197-203.
- [5] 高学慧, 尹杰超, 孙国鹏, 等. 金黄葡萄球菌蛋白A与SUMO标签的融合表达及应用研究[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2010, 30(7): 597-602.
- [6] Matsumoto I, Mizuno Y, Seno N. Activation of sephacrose with epichlorohydrin and subsequent immobilization of ligand for affinity adsorbent[J]. *J Biochem*, 1979, 85(4): 1091-1098.
- [7] Scoble J A, Scopes R K. Assay for determining the number of reactive groups on gels used in affinity chromatography and its application to the optimization of the epichlorohydrin and divinylsulfone activation reactions[J]. *J Chromatogr A*, 1996, 752(1-2): 67-76.