

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

C07K 16/18

C07K 1/16 C12N 15/79



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02137509.7

[43] 公开日 2004 年 4 月 21 日

[11] 公开号 CN 1490334A

[22] 申请日 2002.10.18 [21] 申请号 02137509.7

[71] 申请人 缪金明

地址 201204 上海市浦东新区白杨路 360 弄 5  
号 1101 室

[72] 发明人 缪金明

权利要求书 1 页 说明书 9 页 附图 1 页

[54] 发明名称 基因特异性抗体的亲和纯化方法

[57] 摘要

本发明是一种涉及亲和纯化基因免疫所产生的特异性抗体的方法，该方法将带有特定基因和 6 × His 的真核细胞表达质粒免疫动物，制备含有基因特异性抗体 (IgG) 的血清或卵黄免疫球蛋白 (IgY) 粗提物；将该质粒在体外转染真核细胞，培养后将细胞裂解液加到金属离子螯合树脂柱，由于重组蛋白带有 6 × His 片段，可以与树脂中的金属离子螯合，被吸附于树脂表面，制成亲和层析柱；在进行特异抗体亲和层析时，将含有基因特异性抗体 (IgG) 的血清或卵黄免疫球蛋白 (IgY) 粗提物加到亲和层析柱，基因特异性抗体与相应的抗原重组蛋白充分结合后，先洗掉非特异性的抗体和杂蛋白，最后洗柱收集基因特异性的抗体。该方法纯化的抗体将消除目前多克隆抗体 (IgG 或 IgY) 纯度低所产生的交叉结合现象。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种亲和纯化基因免疫所产生的特异性抗体的方法，该方法包括：
  - a) 将带有特定基因和 6×His 的真核细胞表达质粒免疫动物，产生含有基因特异性抗体的血清或卵黄免疫球蛋白粗提物；
  - b) 将该质粒在体外转染真核细胞或制备原核表达质粒转化原核细胞，培养后将细胞裂解液加到金属离子螯合树脂柱，由于重组蛋白带有 6×His 片段，可以与树脂中的金属离子螯合，被吸附于树脂表面，制成亲和层析柱；
  - c) 在进行特异抗体亲和层析时，将含有基因特异性抗体的血清或卵黄免疫球蛋白粗提物加到亲和层析柱，特异性抗体与相应的抗原重组蛋白充分结合后，先洗掉非特异性的抗体和杂蛋白，最后洗柱收集基因特异性的抗体。
2. 根据权利要求 1 所描述的真核细胞表达质粒，其特征在于这些质粒可以在体内和体外的真核细胞中高水平表达，质粒带有特定的被表达基因和 6×His 序列，这些质粒包括 pcDNA3.1/GS、pVIVO2 和 pVAC+pBOOST 等。
3. 根据权利要求 1 所描述的免疫动物，其特征在于免疫动物是哺乳类动物，如兔、羊、马、驴等，免疫后收集动物血清提取基因特异性免疫球蛋白 (IgG)。
4. 根据权利要求 1 所描述的免疫动物，其特征在于免疫动物是鸟类动物，如鸡、鸭、鹅等，免疫后收集蛋，从蛋黄中提取基因特异性卵黄免疫球蛋白 (IgY)。
5. 根据权利要求 1 所描述的真核细胞，其特征是这些真核细胞可以高水平表达外源性基因，例如 FreeStyle-293F、COS-7、CHO 细胞等。
6. 根据权利要求 1 所描述的原核细胞，其特征是这些原核细胞可以转化原核表达质粒如 pRSET 并高水平表达外源性基因，这些原核细胞包括大肠杆菌 BL21(DE3)等。
7. 根据权利要求 1 所描述的金属离子螯合树脂，其特征在于这些树脂内螯合有二价金属离子，包括钴 (Co)、镍 (Ni)、锌 (Zn)、铜 (Cu) 等，其中 Co<sup>2+</sup>螯合树脂 (Talon, Clontech) 或 Ni<sup>2+</sup>-NTA (镍-次氨基三乙酸) 树脂 (Qiagen) 有商品供应。

## 基因特异性抗体的亲和纯化方法

发明目的：本发明是一种涉及亲和纯化基因免疫所产生的特异性抗体的方法，主要用于基因免疫后所产生的基因特异性抗体的纯化，为基因免疫制备哺乳动物 IgG 或鸟类动物 IgY、提高特异性抗体的纯度提供一种实用方法。

发明领域：生物医学

### 技术背景

随着蛋白质组学研究的不断推进，蛋白芯片技术已经成为重要的功能基因组技术平台。蛋白芯片技术是蛋白质-蛋白质之间的相互作用的高通量蛋白表达技术平台。固定在支撑物表面的蛋白质可以是抗体、抗原、受体、配体、酶、底物以及蛋白结合因子等。其中抗体芯片应用最多。

抗体芯片 (Antibody Microarray, 抗体微阵列), 是蛋白质芯片的一种, 是检测生物样品中蛋白表达模式的新方法。这种新技术使得研究人员可以在一次实验中比较生物样品中成百上千的蛋白质的相对丰度, 因而可以用于检测某一特定的生理或病理过程相关蛋白的表达模式。

目前抗体芯片所采用的抗体, 均是来自市售的单克隆抗体。目前现有技术制备单克隆抗体的方法是, 先纯化抗原蛋白, 免疫小鼠, 最后制备单克隆的骨髓瘤融合细胞株, 其中抗原的制备纯化成为单克隆抗体制备的瓶颈。为了克服这种限制, 已经推出了采用基因免疫的方法直接制备抗体, 由于有现成的 cDNA 表达质粒, 因而可以直接制备成千种供蛋白芯片需要的抗体。

基因免疫 (也称 DNA 免疫) 是根据人体所有抗原都由其 DNA 编码这一基本原理, 将基因文库中的编码蛋白质的 DNA 片段插入特定的真核细胞表达质粒中, 然后将表达质粒通过肌肉注射或基因枪方法导入哺乳动物或鸟类动物。被表达的蛋白质可在宿主体内正确地糖基化, 从而诱导对抗原的高质量的免疫反应。这些表达质粒能在大肠杆菌内扩增, 但不能在哺乳动物细胞内复制。常用的质粒载体启动子多为来源于病毒基因组的巨细胞病毒 (CMV) 早期启动子, 具有很强的转录激活作用; 另外, 表达质粒 DNA 中还可包含一些合适的增强子、终止子、内含子、免疫激活序列及多聚腺苷酸信号等。

采用对哺乳动物的基因免疫, 如羊、兔、马、驴等, 可以在动物血清内获得抗该基因产物的多克隆抗体, 这些抗体多为 IgG 类型, 少数可为 IgM。然而, 血清中的抗体是所有免疫球蛋白的混合物, 一般的蛋白 A、蛋白 G 等亲和纯化方法收集到的是这些免疫球蛋白混合物, 这对于高通量蛋白芯片来说, 会增加交叉反应, 显然不符合要求。

采用对鸡等鸟类动物的免疫, 是因为免疫后的特异性抗体可大量存在于鸡蛋的蛋黄中, 易于采集和分离, 而且表达量高, 抗体耐酸耐热。鸡卵黄免疫球蛋白 G 抗体 (IgY) 是一种 7S 免疫球蛋白 (7SIgG), 与哺乳动物 IgG 略有不同。该蛋白质分子量约为 180kDa, 含两个亚单位, 即 67 ~ 70kDa 的重链和 22 ~ 30kDa 的

轻链，又称 IgY (Yolk Immunoglobulin)，存在于免疫后母鸡的卵黄中。虽然 IgY 的制备方面优于哺乳动物 IgG 的制备，也仍然存在类似血清中抗体混合体的问题，目前虽然多家公司生产销售 IgY 专用的快速纯化试剂盒，特异性抗体的纯化问题仍然没有解决。因此，基因特异性抗体的纯化是基因免疫制备蛋白芯片的关键技术。

本发明为了解决基因抗体制备中特异抗体纯化的问题，采用体外表达带 6×His 重组蛋白的方法制备亲和层析柱纯化基因特异的抗体方法，其原理如下（附图）：

将商业途径获得的真核细胞表达质粒或自己制备的真核细胞表达质粒 1，通过在原核细胞中大量扩增后，进行真核表达质粒的动物免疫，免疫动物可以是哺乳动物 17 如兔、羊、马、驴等，也可选择鸟类动物 16 如鸡、鸭、鹅等，前者收集血清提取基因特异性 IgG (15)，后者收集蛋，从蛋黄中提取基因特异性 IgY (14)。同时将真核细胞表达质粒在体外转染 293 - F 细胞 2 或其他真核细胞，培养后收获细胞并裂解细胞，将细胞裂解液加到 Talon 树脂柱 (Clontech) 或 Ni-NTA (镍-次氨基三乙酸) 树脂 5 制备的层析柱 6 (Qiagen)，由于重组蛋白带有 6×His 片段，可以与树脂中的 Co 或 Ni 离子螯合 8，被吸附于树脂表面，而杂蛋白 9 则被洗脱掉。这样就制成了用于吸附特异性抗体的亲和层析柱 7。在进行特异抗体亲和层析时，将初步纯化的 IgG 抗体或 IgY 抗体加到亲和层析柱 12，充分结合后，特异性抗体与重组蛋白结合 13，然后洗脱掉非特异性的 IgG 抗体或 IgY 抗体 11，最后洗柱收集特异性的 IgG 抗体或 IgY 抗体 10。

本发明的具体操作步骤如下：

## 1. 基因免疫过程及抗体的初步纯化

### 1) cDNA 真核表达质粒的制备

真核细胞表达质粒的获得途径有 2 条，即从商业途径获得和自己制备。目前已有 2500 多种全长 cDNA 真核表达质粒的商品供应，也可以用 cDNA 克隆自行组建真核表达质粒。所选的质粒载体必须是能在大肠杆菌中高拷贝地扩增，而在动物细胞内则能高效表达，但不复制，也不含有向宿主细胞基因组内整合的序列。可采用的真核细胞表达质粒有：pcDNA3.1 (InvitroGen, USA)、pVIVO2 和 pVAC+pBOOST (InvivoGen, USA)，其中 pVAC+pBOOST 是专用于 DNA 免疫的。

本发明以 pcDNA3.1/GS 质粒为基本骨架，这些质粒带有细菌复制子 (ori)，真核生物的启动子和 PolyA 加尾信号。启动子来源于病毒基因组 CMV，PolyA 来自牛生长激素基因；筛选基因选用新霉素抗性基因。基因下游含有 6×His 片段，用于重组蛋白的亲和层析、分析等用途。

### 2) DNA 免疫

DNA 免疫方式主要有两种：肌肉注射和基因枪皮下导入。

免疫动物的选择，可选择哺乳动物如兔、羊、马、驴等，也可选择鸟类动物如鸡、鸭、鹅等，前者收集血清提取特异性 IgG，后者收集蛋，从蛋黄中提取特异性 IgY。

肌肉注射法：在注射之前进行质粒扩增，先将质粒转化到大肠杆菌，培养扩增，然后应用质粒 DNA 抽提试剂抽提质粒，按照 DNA 免疫程序进行注射。

基因枪法：一般先将质粒 DNA 包被在金微粒子表面，用基因枪将被 DNA 包着的金颗粒加速，有效地将 DNA 带入靶组织。该方法效率高，几十纳克的 DNA 即可获得强烈的免疫应答；缺点是制备 DNA 包被的金颗粒操作较复杂，并有特殊的设备要求。

免疫流程一般采用多部位、分次加强免疫的方法，一个月后开始出现抗体滴度的升高。

### 3) 血清 IgG 收集及初步处理

哺乳动物的免疫，一般基因免疫 30 天开始产生抗体，以后逐渐增加。免疫到达 3 个月后，可取少量静脉血，分离血清，与重组抗原蛋白做免疫双扩散试验，如果血清效价 $>1:16$ ，即可放血。

### 4) 蛋的收集及 IgY 初步分离

鸟类动物的免疫，用蛋作为抗体提取的来源，较传统的从哺乳动物中生产多克隆抗体的方法，方便，简单，便宜。比如用基因免疫鸡，一个月后开始收集鸡蛋。IgY 抗体存在于蛋黄中，因此在纯化之前，必须先分离出蛋黄，然后去除蛋黄中脂质物质，在此基础上进行下列特异性抗体的亲和纯化。

## 2. 体外表达制备重组蛋白

### 1) 细胞选择及质粒转染

可选择专用于真核表达的细胞株，如 COS-7、293 细胞、CHO 细胞等。FreeStyle 293-F 细胞是 293 细胞的变异株，是由人胚胎肾原代细胞转染 V 型腺病毒基因构建而成，可持续传代、悬浮培养和无血清培养基培养，并表达 E1A 腺病毒基因，参与一些病毒启动子的激活，高水平表达外源性基因蛋白。该细胞适合高密度培养、无血清大容量悬浮培养，具有很高的转染效率。

也可选择原核细胞如大肠杆菌 BL21(DE3) 作为重组蛋白表达的宿主，但是真核细胞的表达质粒在原核细胞中表达效率不高，应选择带有与动物免疫相同的 cDNA 的原核细胞表达质粒如 pRSET。原核细胞表达的特点是重组蛋白产量高，缺点是所生成的重组蛋白缺少相应的修饰，其表面糖蛋白成份可能与真核细胞表达的重组蛋白有所区别。

### 2) 蛋白定性和定量

采用 ELISA、斑点、或细胞直接染色法检测重组蛋白的表达情况。利用 Ni-NTA-HRP (Qiagen Cat. 34530) 生色反应直接测定重组蛋白中的组氨酸肽段。

## 3. 亲和层析柱制备

### 1) Talon 树脂和 Ni-NTA (镍-次氨基三乙酸) 树脂

Ni-NTA 树脂是 Qiagen 公司产品，与重组蛋白中的 6 个连续组氨酸残基具有高度亲和力，在天然的或变性的条件下均有好的亲和力，可以从稀释的液体或粗提的细胞裂解液中纯化浓缩重组蛋白。纯化步骤分 4 步，即细胞裂解、结合、洗柱和洗脱。对于细胞膜受体、细胞膜蛋白、包含体蛋白等，可采取强变性剂溶解蛋白。这种重组蛋白的 6×His 部分与 Ni-NTA 的结合非常强，

只有在 100–250mM 咪唑强力竞争下才能解离。

Talon 是 Clontech 公司产品，也是采用四螯合位点的螯合剂，金属离子为钴，具有比 Ni-NTA 更强的亲和力，因此具有更好的分辨率，杂蛋白更少，同时金属离子在蛋白分离时，不容易被拉下来，可以重复使用。树脂的重组蛋白结合容量为 6–8mg/ml。

## 2) 细胞溶解

为了让细胞内蛋白质充分释放出来，必须使细胞裂解，一般使用 1% NP40、1% Tween 20 或 1% Triton X-100 使细胞破碎，同时又保证重组蛋白保持在天然状态。

## 3) 体外表达蛋白过柱及亲和层析柱的制备

细胞溶解产物，经离心后，加到 Talon 或 Ni-NTA 树脂柱上，使其重力过滤层析，或者负压抽吸过滤，也可以通过离心法，达到让细胞溶解产物过柱的目的。由于重组蛋白含有 6×His 片段，因此可以与树脂中的 Co 或 Ni 离子螯合被固定，这种螯合相当牢固，不容易被一般洗脱液洗脱。这样特异性抗体的亲和层析柱就制成了，可以用于下列的特异性抗体的纯化。

## 4. 基因特异性抗体的亲和层析分离

将上述制备好的亲和层析柱加入血清或初步纯化的 IgY 成份，经适当孵育后，再洗柱去除非特异性抗体，最后用适当洗脱液洗柱，收集洗脱液，这一组份即为特异性的吸附抗体。根据洗脱液的多少，选择适当的超滤浓缩法浓缩特异性抗体。可采用免疫双向沉淀法、ELISA 法或其他方法测定特异性抗体的效价。

### 本发明的优点

1. 体内免疫和体外表达共用一个真核表达质粒，减少成本，增加抗原抗体结合的质量；
2. 亲和层析柱制备后，可反复使用；
3. 利用重组蛋白的 6×His，可简便进行重组蛋白的定量、特异抗体的定量，操作简便；
4. 特异性抗体纯度高，可达 99% 以上。

以下结合实例详细解释本发明的实施过程。

### 附图：基因免疫的抗体纯化流程

- |                      |                         |
|----------------------|-------------------------|
| 1 真核细胞表达质粒           | 11 被洗脱掉的非特异性抗体          |
| 2 可体外转染高表达的真核细胞      | 12 结合有重组蛋白 - 抗重组蛋白抗体的树脂 |
| 3 带有 6×His 多肽片段的重组蛋白 |                         |

4	细胞表达的杂蛋白	13	树脂 - 重组蛋白 - 抗重组蛋白抗体
5	Ni 或 Co 离子螯合的树脂	14	从鸟类动物的蛋中初步提纯的 IgY 抗体
6	装填在柱内的螯合树脂		
7	结合有重组蛋白的树脂	15	从哺乳动物的血清中初步提纯的 IgG 抗体
8	树脂与蛋白的连接方式		
9	被洗脱掉的细胞杂蛋白	16	鸟类动物
10	最终收集到的纯化抗体	17	哺乳动物

## 实例 1 基因特异性 IgY 抗体的纯化

### 1. 基因免疫

#### 1) 相关候选表达基因克隆的筛选和 cDNA 真核表达质粒的制备

任何 cDNA 克隆或表达质粒均可用于本发明。本实例选择白细胞介素 (ILs)、血细胞生长因子的 cDNA 克隆。这些克隆是从 Invitrogen 公司获得的, 该公司已有 2500 多种全长 cDNA 真核表达质粒供应。获得的 cDNA 克隆, 最好进行重新测序。这些质粒是以 pcDNA3.1/GS 质粒为基本骨架, 这些质粒带有细菌复制子 (ori), 真核生物的启动子和 PolyA 加尾信号。启动子来源于病毒基因组 CMV, PolyA 来自牛生长激素基因; 筛选基因选用新霉素抗性基因。基因下游含有 6xHis 片段, 用于重组蛋白的亲亲和层析、分析等用途。

#### 2) DNA 免疫

采用肌肉注射免疫法。在注射之前进行质粒扩增, 先将质粒转染到大肠杆菌, 培养扩增, 然后应用质粒 DNA 抽提试剂盒 (MidiPrep Kit, Qiagen) 抽提质粒, 最后按照 DNA 免疫程序进行注射。DNA 免疫过程是将总量 50 ~ 300 $\mu$ g 的真核细胞表达质粒 DNA 溶解在 200 $\mu$ l 0.9% 生理盐水中, 分 3 次多部位注射到鸡的股四头肌肌肉内, 每 2 周加强注射一次。30 天以后开始收集鸡蛋, 滴度逐步升高, 并可维持 1 - 6 个月。为保持高滴度抗体的产生, 每 1 个月加强注射一次。

#### 3) 鸡蛋收集及 IgY 初步分离

从鸡蛋中纯化 IgY, 首先用 IgY 纯化系统 (EGGstractIgY, Promega, Cat #. G1531) 中的一种分离器将蛋白和蛋黄分开。用沉淀溶液 A 将蛋黄中大量的脂肪除去。用溶液 B 进一步纯化抗体。用这两种溶液沉淀得到 75% 纯度的 IgY 抗体。在此基础上进行下列特异性抗体的亲和纯化。

### 2. 体外表达制备重组蛋白

#### 1) 质粒转染

选择 FreeStyle 293 - F 细胞作为真核表达宿主细胞。质粒转染前应去除残余余酚和氯化钠, 一般应采用 MidiPrep Kit (Cat #. K1910-01) 进行纯化。转染时细胞培养液初始体积 30ml, 密度  $1 \times 10^6$  细胞/ml, 即细胞总数为  $3 \times 10^7$ , 质粒 DNA

20 – 40 $\mu$ g, 293fectin 30 – 45 $\mu$ l。转染程序如下：

- a) 在细胞指数生长期，调整细胞密度到 $1 \times 10^6$ 细胞/ml，28ml体积；
- b) 收集细胞（无菌），1000rpm离心5分钟；
- c) 新鲜预温FreeStyle 293表达培养基，重悬细胞在125ml培养瓶内，轻微振荡10 – 30秒，保证细胞呈单个悬浮状态；
- d) 用1ml Opti-MEM稀释30 $\mu$ g质粒DNA，混匀；用1ml Opti-MEM稀释33 – 45 $\mu$ g 293fectin，混匀，室温留置5分钟，两者混合，混匀，室温留置20 – 30分钟，让DNA – 293fectin复合体形成；
- e) 将DNA-293fectin复合体加到细胞培养瓶中，阴性对照单加Opti-MEM培养基；
- f) 37°C、8% CO<sub>2</sub>培养，125rpm旋转培养瓶；
- g) 48小时后收集细胞，进行以下重组蛋白纯化操作。

## 2) 蛋白定性和定量

采用 ELISA、斑点或细胞直接染色法检测重组蛋白的表达情况。利用 Ni-NTA-HRP (Qiagen, Cat #: 34530) 生色反应直接测定重组蛋白中的组氨酸肽段。其程序如下：

- a) 将细胞培养液或细胞溶解物 10 $\mu$ l 点滴在硝酸纤维素膜上，37°C 干燥 2 小时，用 TBS (10 mM Tris·Cl, pH 7.5, 150 mM NaCl) 洗膜 2 次，10 分钟；
- b) TBS 配置的 3% BSA 浸膜 1 小时，TBS – Tween (20 mM Tris·Cl, pH 7.5; 500 mM NaCl; 0.05% (v/v) Tween 20; <Sigma, Cat. No. P1379>) 洗膜 3 次；
- c) TBS – Tween 1/1000 稀释 Ni-NTA-HRP，浸膜 1 小时；
- d) TBS – Tween 洗膜 3 次，用 HRP 染色液染色 1 – 5 分钟；
- e) 用蒸馏水洗膜终止反应，根据显色程度判断重组蛋白的表达多少。

## 3. 亲和层析柱制备

### 1) 选择 Talon 树脂作为层析柱填充物

Talon 是 Clontech 公司产品，是采用四螯合位点的螯合剂，金属离子为钴 (Co<sup>2+</sup>)，具有比 Ni-NTA 更强的亲和力，因此具有更好的分辨率，杂蛋白更少，同时金属离子在蛋白分离时，不容易被拉下来，可以重复使用。树脂的重组蛋白结合容量为 6 – 8mg/ml。本实例采用 Talon 重组蛋白纯化试剂盒 (Clontech, Cat #: K1253-1)。

### 2) 细胞溶解

为了让细胞内蛋白质充分释放出来，必须使细胞裂解，一般使用 1% NP40、1% Tween 20 或 0.2% Triton X-100 (20 mM Tris·Cl, pH

7.5; 500 mM NaCl; 0.05% (v/v) Tween 20; 0.2% (v/v) Triton X-100 (<Sigma, Cat. No. X-100>) 使细胞破碎, 同时又保证重组蛋白保持在天然状态。

### 3) 体外表达蛋白过柱及亲和层析柱的制备

细胞溶解产物, 经离心后, 加到 Talon 树脂柱上, 使其重力过滤层析, 达到让细胞溶解产物过柱的目的。由于重组蛋白含有 6xHis 片段, 因此可以与树脂中的 Co 离子螯合被固定, 这种螯合相当牢固, 不容易被一般洗脱液洗脱。这样特异性抗体的亲和层析柱就制成了, 可以用于下列的特异性抗体的纯化。其步骤如下:

- a) 加1ml抽提缓冲液平衡Talon柱, 700×g离心2分钟洗柱, 重复2次;
- b) 加入上述细胞裂解液, 轻轻摇动使树脂悬浮, 静置2分钟;
- c) 700×g离心2分钟, 加洗液2ml, 离心2分钟;
- d) 加入含0.02%叠氮钠的TBS, 4°C保存, 待用于亲和层析抗体分离。

## 4. 基因特异性抗体的层析分离

### 1) 鸟类 IgY 的特异性抗体的纯化

将上述制备好的亲和层析柱加入初步纯化的 IgY 粗提物 5ml, 4°C 孵育过夜。用 0.05mol/L pH7.0 PBS 洗至 280nm OD 值为 0, 换 3mol/L pH6.0 硫氰酸钾洗柱, 收集洗脱液, 这一组份即为基因特异性的 IgY 抗体。

### 2) 超滤浓缩

根据洗脱液的多少, 选择 Centricon Plus-20 或者 Plus-80 (Millipore) 离心法超滤浓缩。Plus-80 可将最多 80ml 洗脱液浓缩到 300μl, Centricon Plus-80 经过处理并可以重复使用。

### 3) 双向免疫扩散法测定抗体效价

测定抗体效价采用抗原抗体双稀释法, 即抗体采用 1/2、1/4、1/8、1/16、1/32 等对倍稀释, 与对倍稀释的不同浓度的重组蛋白进行双扩散试验。在抗原组或抗体组出现最弱沉淀线的浓度即为最佳抗原滴度或最佳抗体滴度。

## 实例 2. 基因特异性抗体 IgG 的纯化

### 1. 基因免疫

#### 1) 相关候选表达基因的筛选及 cDNA 真核表达质粒的选择

任何 cDNA 克隆或表达质粒均可用于本实例。自行制备表达质粒时, 可根据一般分子生物学操作, 克隆 DNA。获得的 cDNA 克隆, 最好进行重新测序。选择质粒时, 质粒载体必须是能在大肠杆菌中高拷贝地扩增, 而在动物细胞内则能高效表达, 但不复制, 也不含有向宿主细胞基因组内整合的序列。可采用的真核细胞表达质粒有: pcDNA3.1 (InvitroGen, USA)、pVIVO2 和

pVAC+pBOOST (InvivoGen, USA), 其中 pVAC+pBOOST 是专用于 DNA 免疫的。所选质粒必须带有 6×His 末端加尾部分。

## 2) DNA 免疫 – 基因枪皮下导入

通过粒子轰击技术可将质粒 DNA 导入动物组织中去,这是目前用作基因免疫的最常用最有效的转移方法。其基本程序是,先将质粒 DNA 包被在金微粒子表面,用基因枪将被 DNA 包着的金颗粒加速,有效地将 DNA 带入靶组织。按以下程序进行操作:

- a) 在 1.5ml 离心管中加入 10 $\mu$ l DNA (1mg/ml), 25 $\mu$ l 微颗粒 (约 10 $\mu$ g), 50 $\mu$ l CaCl<sub>2</sub> (2.5mol/L) 及 50 $\mu$ l 亚精胺 (0.1mol/L), 混匀后静置 10 分钟, 以利于 DNA 包裹于微颗粒表面;
- b) 离心 (10000rpm) 5 分钟, 去上清, 用 70%乙醇洗一遍;
- c) 离心 (10000rpm) 5 分钟, 去上清, 用无水乙醇洗一遍;
- d) 离心去上清, 将沉淀重悬于 100ml 无水乙醇中;
- e) 将包有 DNA 质粒微颗粒悬液用微量移液器加到基因枪载体上, 于室温下晾干, 真空保存;
- f) 使用时将微颗粒的载体用甘油粘贴于基因枪 Kapton 盘下, 紧贴待导入的部位, 启动基因枪, 驱动微颗粒进入上皮组织, 应多点基因枪注射。可用于哺乳动物和鸟类动物的 DNA 皮下导入。
- g) 时间同肌肉注射 (参见实例 1)。

## 3) 血清 IgG 收集及初步处理

一般基因免疫 90 天开始产生抗体,以后逐渐增加。免疫到达 3 个月后,可取少量静脉血,分离血清,与重组抗原蛋白做免疫双扩散试验,如果血清效价>1:16,即可放血。如效价不高,继续加大剂量加强 1~2 次,符合要求后,颈动脉放血,分离血清,分装,储存备用。

## 2. 体外表达制备重组蛋白

### 1) 细胞选择和质粒转染细胞

宿主细胞选择 FreeStyle 293 – F 细胞。质粒转染前应去除残余酚和氯化钠,一般应采用 MidiPrep Kit (Cat. K1910–01) 进行纯化。转染时细胞培养液初始体积 30ml,密度 1 $\times$ 10<sup>6</sup>细胞/ml,即细胞总数为 3 $\times$ 10<sup>7</sup>,质粒 DNA 20 – 40 $\mu$ g, 293fectin 30 – 45 $\mu$ l。转染程序参见实例 1。

### 2) 蛋白定性和定量

采用 ELISA、斑点或细胞直接染色法检测重组蛋白的表达情况。利用 Ni-NTA-HRP (Qiagen Cat. 34530) 生色反应直接测定重组蛋白中的组氨酸肽段。其检测程序参见实例 1。

## 3. 亲和层析柱制备

### 1) Ni-NTA (镍-次氨基三乙酸) 树脂

Ni-NTA 树脂是 Qiagen 公司产品,与重组蛋白中的 6 个连续组氨酸残基具有高度亲和力,在天然的或变性的条件下均有好的亲和力,可以从稀释的液体

或粗提的细胞裂解液中纯化浓缩重组蛋白。这种重组蛋白与 Ni-NTA 的结合非常强，只有在 100–250mM 咪唑强力竞争下才能解离。

## 2) 细胞溶解

纯化步骤分为细胞裂解、结合、洗柱和洗脱等 4 个步骤。对于细胞膜受体、细胞膜蛋白、包含体蛋白等，一般溶解度比较差，可采取强变性剂溶解蛋白。为了让细胞内蛋白质充分释放出来，必须使细胞裂解，一般使用 1% NP40、1% Tween 20 或 1% Triton X-100 使细胞破碎，同时又保证重组蛋白保持在天然状态。

## 3) 体外表达蛋白过柱及亲和层析柱的制备

细胞溶解产物，经离心后，加到 Ni-NTA 树脂柱 (Qiagen, Cat #: 30622) 上，使其负压抽吸过滤，达到让细胞溶解产物过柱的目的。该产品具有平行处理的能力，配合该公司的 BioRobot 3000 Workstation，可以一次平行处理 24 份，每个柱的蛋白结合容量最高可达 15mg，足够作为亲和层析之用。由于重组蛋白含有 6×His 片段，因此可以与树脂中的 Ni 离子螯合被固定，这种螯合相当牢固，不容易被一般洗脱液洗脱。这样特异性抗体的亲和层析柱就制成了，可以用于下列的特异性抗体的纯化。

## 4. 基因特异性抗体的层析分离

### 1) 哺乳动物血清 IgG 特异性抗体的纯化

#### a) 盐析

将哺乳动物免疫血清加等量生理盐水混匀，在电磁搅拌下缓慢加入与稀释血清等量的饱和硫酸铵，4°C 放置过夜，离心 (3000rpm/min) 30 分钟，弃上清，沉淀用生理盐水 5ml 溶解，用于下列亲和层析。

#### b) 亲和层析

将上述制备好的亲和层析柱加入血清盐析成分 5ml，4°C 孵育过夜。用 0.05mol/L pH7.0 PBS 洗至 280nm OD 值为 0，换 3mol/L pH6.0 硫氰酸钾洗柱，收集洗脱液，这一组份即为基因特异性 IgG 抗体。

### 2) 超滤浓缩

根据洗脱液的多少，选择 Centricon Plus-20 或者 Plus-80 (Millipore) 离心法超滤浓缩。Plus-80 可将最多 80ml 洗脱液浓缩到 300μl，经过处理并可以重复使用。

### 3) 双向免疫扩散法测定抗体效价

测定抗体效价采用抗原抗体双稀释法，即抗体采用 1/2、1/4、1/8、1/16、1/32 等对倍稀释，与对倍稀释的不同浓度的重组蛋白进行双扩散试验。在抗原组或抗体组出现最弱沉淀线的浓度即为最佳抗原滴度或最佳抗体滴度。

