

· 论 著 ·

人绒毛膜促性腺激素 α 亚单位的纯化及其特异性多抗的制备戚大梁¹, 王 强¹, 易维京^{2△}

(1. 中国人民解放军第 149 医院检验科, 连云港 222042;

2. 第三军医大学检验系临床生物化学教研室, 重庆 400038)

摘要:目的 纯化人绒毛膜促性腺激素(HCG) α 亚单位,制备其多克隆抗体,为进一步研究其功能及临床应用奠定基础。方法 将临床医用注射 HCG 纯品经尿素处理后,上分子筛分离 HCG- α 。经纯化、鉴定后,用 HCG- α 亚单位免疫新西兰兔,分离抗血清,通过 rProtein A 纯化 IgG 抗体,随后采用 HCG- α 及 HCG- β 制备的抗原亲和层析柱提高 IgG 多抗的特异性,用 ELISA 法测定其抗体效价。结果 纯化的蛋白经 SDS-PAGE 电泳显示单一条带,大小与 HCG- α 相应分子质量相同。HCG- α 多抗效价达 1:1 000 000,降低了与 HCG- β 的交叉反应。结论 建立了简单易操作的分离 HCG- α 亚单位的方法,并制备了高特异性、高效价的 α 亚单位多克隆抗体。

关键词:分子筛;免疫亲和层析;绒毛膜促性腺激素;纯化;多克隆抗体**中图分类号:**R446.61;R335.5**文献标识码:**A**文章编号:**1671-8348(2010)07-0789-03Purification and polyclonal antibody preparation of HCG- α QI Da-liang¹, WANG Qiang¹, YI Wei-jing^{2△}

(1. Department of Laboratory Medicine, No. 149 Hospital of People's Liberation Army,

Lianyungang, Jiangsu 222042, China; 2. Department of Clinical Biochemistry, College of Medical Laboratory,

Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To purify human chorionic gonadotropin(HCG)- α and prepare its polyclonal antibody in order to investigate the function of HCG- α in the clinical diagnostician. **Methods** The clinical medical pure HCG was used to purify the protein of HCG- α , which was treated with urea and subsequently injected into molecular sieve to get the purified HCG- α . After identification and purification, the protein of HCG- α was used to immunize New Zealand rabbits for preparing polyclonal antibody and the antiserum was obtained. Then the IgG antibody was purified with rProtein A from antiserum. Immuno-affinity chromatography prepared with HCG- α and HCG- β antigen was used to increase the specificity of polyclonal IgG antibody. The antibody titer was determined by ELISA method. **Results** The purified protein showed one band after SDS-PAGE, which was identified with the molecular weight of HCG- α . The titer of polyclonal antibody was 1:1,000,000. **Conclusion** The polyclonal antibody of HCG- α is prepared and can be used in further study.

Key words: immuno-affinity chromatography, human chorionic gonadotropin, purification, polyclonal antibody

人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin, HCG)是由胎盘滋养层细胞合成的糖蛋白激素,具有刺激性腺活动、维持早期妊娠的功能。临床上除用于治疗习惯性流产及性功能障碍、避孕疫苗、调节人类生育外^[1-3],近年来,还作为诊断试剂,广泛应用于诊断早孕和一些妇科肿瘤等^[4-6]。

同为糖蛋白激素家族,HCG与促甲状腺激素(TSH)、促卵泡激素(FSH)、黄体生成素(LH)等一样,具有相同的 α 亚单位,而特异性则由HCG- β 亚单位决定。临床医学检验中,为保证HCG免疫检测的特异性,多采用HCG- β 亚单位特异性单克隆抗体与HCG- α 亚单位多克隆抗体配对的方法^[7]。而在制备HCG免疫检测试剂的过程中,由于HCG- α 亚单位多克隆抗体不能持续生产且易存在较大的批间差异,因此,本研究旨在建立一套HCG- α 亚单位抗原的纯化及其特异性多克隆抗体的纯化制备工艺,为研制HCG免疫检测试剂提供价格低廉的高质量HCG- α 多克隆抗体奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 材料 医用HCG纯品5 000 IU/mg(丽珠医药集团股份有限公司);免疫用新西兰兔来自第三军医大学动物中心。

1.1.2 试剂 CNBr activated Sepharose 4FF, rProtein A Sepharose Fast Flow, HiPrep 16/60 Sephacryl S-100 HR等纯化所用层析柱及填料均购自美国Amersham公司;HRP标记

的羊抗兔IgG购自北京中杉金桥生物技术有限公司;其他试剂均为分析纯;实验用水为去离子双蒸水。

1.2 方法

1.2.1 HCG- α 及HCG- β 亚单位的分离纯化 用2 mL含10 mol/L尿素的PBS将30 mg HCG纯品溶解后,于37℃放置1 h。待S-100分子筛经含2 mol/L尿素的PBS平衡后,将溶解的HCG纯品通过2 mL的上样环注入分子筛,流速为1.5 mL/min,以每管3 mL收集流出液。经SDS-PAGE电泳鉴定蛋白纯度。

1.2.2 HCG- α 多克隆抗体制备 采用快速免疫方案制备HCG- α 多克隆抗体,其具体方案如下:首次免疫,用注射器将纯化的HCG- α 亚单位与弗氏完全佐剂按1:1乳化,终浓度为0.3 mg/mL,在新西兰兔的背部和四肢多点注射(每个位点50~100 μ L),共注射1 mL;再次免疫,于首次免疫3 d后,采用与首次免疫完全相同的剂量和方式于不同位点免疫;第3次免疫,将HCG- α 亚单位与弗氏不完全佐剂按1:1乳化,终浓度为0.3 mg/mL,在新西兰兔的背部和四肢多点注射免疫。第3次免疫7 d后,用ELISA方法检测抗体滴度,并采用Western Blot对制备得到的多克隆抗体进行鉴定。

1.2.3 HCG- α 及HCG- β 抗原亲和层析柱的制备 HCG- α 及HCG- β 抗原亲和层析柱制备方法依照CNBr activated sepharose 4FF说明书,简述如下:取适量HCG- α 及HCG- β 蛋白用

△ 通讯作者。

耦联缓冲液(0.1 mol/L NaHCO_3 , 0.5 mol/L NaCl , pH 8.3)稀释后,与经 1 mmol/L HCl 冲洗后的 CNBr activated sepharose 4FF 填料混合,4 °C 耦联过夜;次日,使用 0.1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0)冲洗并放置 2 h 后灭活未耦联填料;最后使用 0.1 mol/L 醋酸,0.5 mol/L NaCl (pH 3.0)和 0.1 mol/L Tris-HCl ,0.5 mol/L NaCl (pH 8.0)交替冲洗,4 °C 保存或立即使用。

1.2.4 HCG- α 多克隆抗体的抗原亲和纯化 采用颈动脉插管的方法获取免疫后新西兰兔血,分离血清,经 rProtein A 纯化 IgG,将获得的抗体先经过 HCG- β 蛋白亲和层析柱去除与 HCG- β 结合的交叉抗体。再将抗体缓慢通过 HCG- α 亲和层析柱完全结合,经 PBS 平衡后,使用 0.1 mol/L 甘氨酸-盐酸(pH 3.0)洗脱抗体,然后,立即用 1 mol/L Tris-HCl (pH 9.0)中和洗脱得到的抗体至 pH 8.0 左右。

1.2.5 纯化的 HCG- α 多克隆抗体的鉴定 采用 ELISA 测定纯化前后的 HCG- α 多克隆抗体的效价及特异性。分别用 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的纯化 HCG- α 及 HCG- β 蛋白包被高结合力的酶标板,经 1% BSA 封闭后加入不同稀释倍数的亲和纯化前后的多克隆抗体,洗板后加入 HRP 标记的山羊抗兔工作液,37 °C 孵育 1 h 后洗板,TMB 显色后终止,于 450 nm 酶标读数。最后采用 Western Blot 对处理后的多克隆抗体进行鉴定。

2 结果

2.1 HCG- α 及 HCG- β 亚单位的分离纯化 蛋白经分子筛后,由纯化仪按每管 3 mL 自动收集流出液,经 A280 检测分段收集洗脱蛋白(图 1),收集的蛋白经 15% 变性 SDS-PAGE 电泳显示:HCG- α 及 HCG- β 亚单位得到有效分离,P3 为高纯度 HCG- β ,P5 为高纯度 HCG- α (图 2)。经 Lowry 法测蛋白浓度,HCG- α 浓度为 0.6 mg/mL,总量 6.2 mg;HCG- β 浓度为 1.0 mg/mL,总量 12.0 mg。

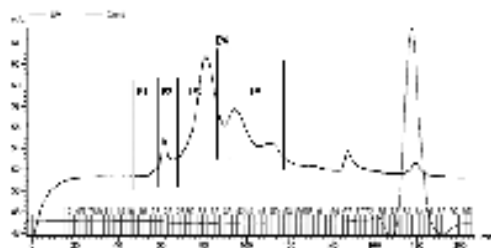
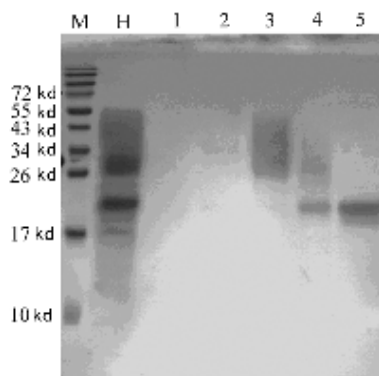


图 1 分子筛分离 HCG- α 及 HCG- β 的纯化图

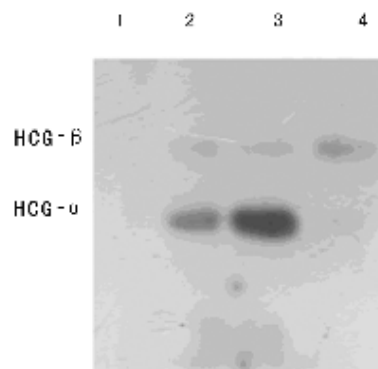


M:Marker;H:未分离 HCG;1:蛋白 P1;2:蛋白 P2;3:蛋白 P3;4:蛋白 P4;5:蛋白 P5。

图 2 分离蛋白的 SDS-PAGE 电泳图

2.2 HCG- α 多克隆抗体制备 经 3 次免疫后兔血清 ELISA 检测 HCG- α 多克隆抗体滴度均大于 10^6 ,颈总动脉放血后,每

只新西兰兔得到分离血清约 80 mL,血清经 rProtein A 纯化 IgG 后,Western Blot 鉴定表明所获多克隆抗体能与天然 HCG 及分离的 HCG- α 结合,同时也存在与 HCG- β 的交叉反应(图 3)。



1:阴性对照为胎牛血清;2:未分离 HCG;3:纯化的 HCG- α ;4:纯化的 HCG- β 。

图 3 HCG- α 多克隆抗体的 Western Blot 鉴定

2.3 HCG- α 多克隆抗体的抗原亲和纯化 将经 rProtein A 纯化得到的约 600 mg 的 HCG- α IgG 多抗,先缓慢流经 HCG- β 抗原亲和层析柱后,再将抗体缓慢通过 HCG- α 亲和层析柱,PBS 平衡 HCG- α 亲和层析柱,洗脱后获得蛋白共计 15.8 mg。

2.4 亲和层析处理后的 HCG- α 多克隆抗体的鉴定 亲和层析处理前的 HCG- α 多克隆抗体由于免疫原中存在少量的 HCG- β 蛋白,使制备的抗体与 HCG- β 存在较大的交叉性(图 4A),而亲和层析纯化后与 HCG- β 交叉反应被去除,且效价明显提高(图 4B),Western Blot 结果显示,亲和层析处理后的 HCG- α 多克隆抗体不再与 HCG- β 存在交叉反应。

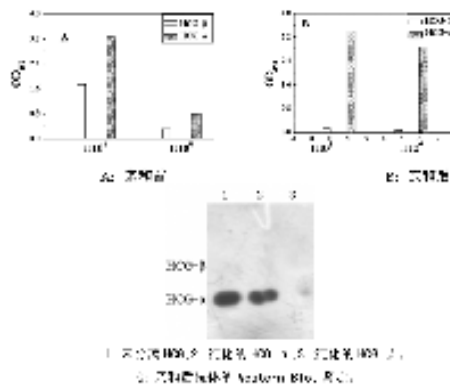


图 4 亲和前后抗体特异性及效价测定

3 讨论

HCG 主要是由胎盘组织的滋养层细胞分泌的一种糖蛋白,相对分子质量约为 35~45 kd,由 α 和 β 亚单位以非共价键方式连接而成^[2,8]。HCG 检测在临床中应用十分广泛,主要用于诊断早孕和一些妇科肿瘤等。目前 HCG 检测方法以免疫学检测为主,多由 β 亚单位特异性单抗及 α 亚基多抗组成,因此,需要分离大量的 HCG- α 亚单位作为免疫抗原用于制备多克隆抗体。

HCG- α 及 HCG- β 亚单位分离的方法已有文献报道^[9-10],主要是通过尿素及丙酮裂解 HCG- α 及 HCG- β 亚单位后,采用离子交换或分子筛进行分离。本文采用类似的方法,但不同的是,在分子筛的流动相中加入 2 mol/L 的尿素,且证实了其能有效地分离 HCG- α 及 HCG- β ,主要原因为长时间的分离过程中能减少 HCG- α 及 HCG- β 的重新聚合。

蛋白耦联技术目前在医学科研中应用广泛,对应产品众多。以此技术建立的抗原亲和纯化方法对于提高抗体质量效果显著,尤其适用于多克隆抗体制备,以提高其特异性和效价^[11]。本文采用纯化的 HCG- α 及 HCG- β 亚单位蛋白分别与 CNBr activated sepharose 4FF 填料耦联,制备性质稳定且可重复利用的抗原亲和层析柱。纯化的抗体先流经 HCG- β 抗原亲和层析柱,去除能与 HCG- β 发生交叉反应的抗体,由于制备的 HCG- β 纯度高,不影响 HCG- α 的效价。再将抗体流经 HCG- α 抗原亲和层析柱,纯化获得 HCG- α 特异的多克隆抗体。此过程既去除了与 HCG- β 交叉反应的抗体及其他无关多抗,同时也浓缩了 HCG- α 特异性多抗,提高了抗体效价。

本文建立了完整的从 HCG- α 抗原分离至抗体制备、纯化的简单方案,成本低廉,操作简单易行。所制备得到的多抗特异性好,效价高,并能有效减少多抗制备过程中的批间差异,为制备高质量的 HCG 检测试剂奠定基础。

参考文献:

- [1] Delves PJ, Lund T, Roitt IM. Antifertility vaccines[J]. Trends Immunol, 2002, 23(4): 213.
- [2] 杨亚君, 张建华, 漆洪波. HCG 对妊娠的作用及临床作用[J]. 重庆医学, 2004, 33(5): 706.
- [3] Järvelä IY, Ruokonen A, Tekay A. Effect of rising HCG levels on the human corpus luteum during early pregnancy[J]. Hum Reprod, 2008, 23(12): 2775.
- [4] Hotakainen K, Lintula S, Ljungberg B, et al. Expression of human chorionic gonadotropin subunit type I genes predicts adverse outcome in renal cell carcinoma[J]. J Mol Diagn, 2006, 8(5): 598.
- [5] Duffy MJ, Crown J. A personalized approach to cancer treatment: how biomarkers can help[J]. Clin Chem, 2008, 54(11): 1770.
- [6] Schmid P, Nagai Y, Agarwal R, et al. Prognostic markers and long-term outcome of placental-site trophoblastic tumours: a retrospective observational study[J]. Lancet, 2009, 374(9683): 48.
- [7] Prasad PV, Chaube SK, Shrivastav TG, et al. Isolation of alpha- and beta-subunits of peak-I HCG and generation of highly specific polyclonal antisera[J]. J Immunoassay Immunochem, 2005, 26(4): 345.
- [8] Cole LA. Human chorionic gonadotropin and associated molecules[J]. Expert Rev Mol Diagn, 2009, 9(1): 51.
- [9] Rodríguez AM, Rodríguez OZ, Conde IB, et al. Purification of human chorionic gonadotropin from pregnancy urine by immunoaffinity chromatography using a monoclonal antibody antibeta chain HCG[J]. Hybridoma, 2005, 24(5): 258.
- [10] 金东华, 诸葛洪祥, 钱峰, 等. 人绒毛膜促性腺激素 α 亚基 cDNA 克隆、表达及纯化[J]. 苏州大学学报, 2003, 23(5): 511.
- [11] Gam H, Tham SY, Latiff A. Immunoaffinity extraction and tandem mass spectrometric analysis of human chorionic gonadotropin in doping analysis[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2003, 792(2): 187.

(收稿日期: 2009-08-26 修回日期: 2009-09-28)

(上接第 788 页)

- year follow-up study[J]. J Bone Joint Surg Am, 2004, 86(1): 28.
- [3] Daniel J, Pynsent PB, McMinn DJ. Metal-on-metal resurfacing of the hip in patients under the age of 55 years with osteoarthritis[J]. J Bone Joint Surg Br, 2004, 86(2): 177.
- [4] Back DL, Dalziel R, Young D, et al. Early results of primary Birmingham hip resurfacings. An independent prospective study of the first 230 hips[J]. J Bone Joint Surg Br, 2005, 87(3): 324.
- [5] Girard J, Lavigne M, Vendittoli PA, et al. Hip resurfacing: current state of knowledge[J]. Rev Chir Orthop Reparatrice Appar Mot, 2008, 94(8): 715.
- [6] Bergeron SG, Desy NM, Nikolaou VS, et al. The early results of metal-on-metal hip resurfacing a prospective study at a minimum two-year follow-up[J]. Bull NYU Hosp Jt Dis, 2009, 67(2): 132.
- [7] Maguire CM, Seyler TM, Boyd HS, et al. Hip resurfacing: keys to success[J]. Bull NYU Hosp Jt Dis, 2009, 67(2): 142.
- [8] Nunley RM, Della VC, Barrack RL. Is patient selection important for hip resurfacing? [J]. Clin Orthop Relat Res, 2009, 467(1): 56.
- [9] Vail TP, Mont MA, Mcgrath MS, et al. Hip resurfacing: patient and treatment options[J]. J Bone Joint Surg Am, 2009, 91(1): 5.
- [10] Akbar M, Mont MA, Heisel C, et al. Resurfacing for osteonecrosis of the femoral head[J]. Orthopade, 2008, 37(7): 672.
- [11] Mont MA, Jones LC, Hungerford DS. Nontraumatic osteonecrosis of the femoral head: ten years later[J]. J Bone Joint Surg Am, 2006, 88(5): 1117.
- [12] Kelley TC, Swank ML. Role of navigation in total hip arthroplasty[J]. J Bone Joint Surg Am, 2009, 91(1): 153.
- [13] Kunz M, Rudan JF, Xenoyannis GL, et al. Computer-assisted hip resurfacing using individualized drill templates[J]. J Arthroplasty, 2009, 21(3): 226.
- [14] Bailey C, Gul R, Falworth M, et al. Component alignment in hip resurfacing using computer navigation[J]. Clin Orthop Relat Res, 2009, 467(4): 917.
- [15] Schnurr C, Michael JW, Eysel P, et al. Imageless navigation of hip resurfacing arthroplasty increases the implant accuracy[J]. Int Orthop, 2007, 33(2): 365.
- [16] Davis ET, Gallie P, Macgroarty K, et al. The accuracy of image-free computer navigation in the placement of the femoral component of the Birmingham Hip Resurfacing: a cadaver study[J]. J Bone Joint Surg Br, 2007, 89(4): 557.

(收稿日期: 2009-08-16 修回日期: 2009-09-28)