

用对比分离纯化法论证人血清 抗-HBe IgG的异质性*

传染病研究所 吕新法 幸明太 王可宁 胡中荣 金建华 赵忠良

内容提要 本文通过高、低两组不同的人抗-HBe 阳性血清用多种分离 IgG 的方法,进行了对比分离纯化研究。发现人抗-HBe IgG 存在着多种异质性表现。从而提出在单克隆抗-HBe 尚未普及前提下应如何挑选人抗-HBe 阳性血清以及提取多克隆抗体的最佳方法。

关键词 乙型肝炎抗体/分离和提纯; 免疫球蛋白 G 类;
免疫球蛋白同种异型

人血清抗-HBe IgG 常用纤维素层析法分离而得^[1,2], 将其制成酶结合物或用作 ELISA 的包被抗体, 常导致系统检测结果的波动, 严重时甚至不能获得实验结果。针对上述问题, 我们分别用 DEAE 梯度洗脱法、QAE Sephadex A-50 柱层析法和硫酸铵分级沉淀结合纤维素层析梯级洗脱法等, 对高、低滴度人抗-HBe 阳性血清作系统的对比分离纯化, 并对人抗-HBe IgG 的异质性进行了探讨。

1 材料和方法

1.1 试剂 DEAE DE22, Whatman; QAE Sephadex A-50, Sephadex G-50, Pharmacia; 硫酸铵、乙二胺、醋酸、醋酸铵、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钾以及磷酸氢二钾均为 A. R 级的国产试剂。

1.2 人抗-HBe 阳性血清 低滴度 (ID 法 $\leq 1:16$) 计 4 批, 860101、860623、870322、山东 1 号; 高滴度 (ID 法 $\geq 1:32$) 计 2 批, 870914 和 870123。

1.3 硫酸铵盐析法 作高、低滴度人血清

抗-HBe IgG 的第一步预纯化。

1.4 DEAE 柱层析 用以下两种方法^[3]洗脱解离蛋白质。

1.4.1 梯度洗脱: 采用 pH 8.0, 0.005~0.30mol 磷酸钾缓冲液, 使加在柱上 (48×2.2cm) 的人血清 IgG 大部分不被吸附而洗脱出来, 达到分离的目的。

1.4.2 梯级洗脱: 又称分级洗脱。选用恒定 pH, 变更盐浓度的方法, 用 pH 8.0, 浓度为 0.005、0.01、0.05、0.10、0.30mol 的磷酸钠或磷酸钾缓冲液, 每个梯级约 500 ml, 依次展层 24h, 进行部分收集, 每管经 A280nm 定位, 收集有关管号液浓缩后, 分别测定各峰段的 ID 滴度。

1.5 QAE Sephadex A-50 柱层析 QAE Sephadex A-50 为强碱性阴离子交换剂^[4], 操作时需装一根对样品起平衡作用的辅助柱 (Sephadex G-50, 14×2.5cm), 与展层用的 QAE Sephadex A-50 (40×2cm) 柱串联后, 经 pH 7.0, 0.1mol 乙二胺醋酸缓冲液平衡, 立刻展层, 收集第一峰即为 IgG。

2 结果

2.1 硫酸铵盐析 抗-HBe 滴度不同的人血

* 本课题获省科委资助

清用33%饱和硫酸铵沉淀,发现ID滴度 $\leq 1:16$ 的人抗-HBe阳性血清者,其抗-HBe活性全部存在于上清中;而 $\geq 1:32$ 者其活性主要(80%)存在于沉淀物中,上清中仅占20%。

2.2 DEAE纤维素柱层析

2.2.1 梯度洗脱:低滴度(860101批)人血清11ml经50%饱和硫酸铵作3次沉淀,取末次沉淀的溶解物,经pH8.0, 0.005mol磷酸钠缓冲液透析至平衡,上柱后再经同液洗涤,最后进行梯度0.005~0.30mol洗脱,获得如图1的结果。

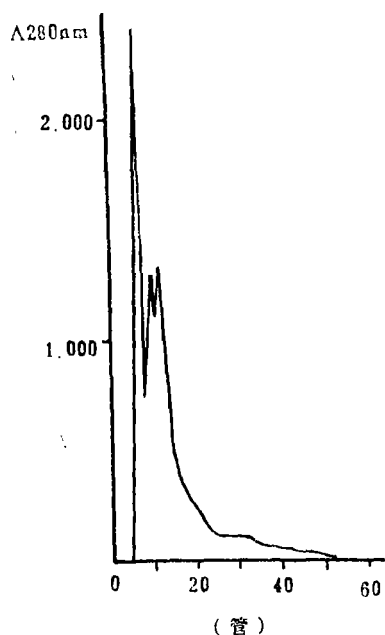


图1 经50%饱和硫酸铵3次沉淀,取末次沉淀的溶解物澄清后上DEAE DE22柱(48×2.2cm)用梯度洗脱分离的结果

2.2.2 梯级洗脱:a.取低滴度(860101)血清48ml,经饱和硫酸铵50%和33%两次分级沉淀,弃沉淀,取上清,再将饱和硫酸铵加至50%饱和,取沉淀,用pH7.4, 0.01mol PB, 0.2mol NaCl溶解,透析平衡后离心上柱,结果如图2所示;b.当用新采的高滴度(870914)人血清取代时,经饱和硫酸铵50%和33%两次分级处理,取33%饱和的上

清,再加饱和硫酸铵达50%饱和,取沉淀溶解后上柱,获图3的结果;其33%饱和的沉淀用同一缓冲液溶解、透析平衡、离心后上柱,结果如图4所示。当用磷酸钾缓冲液代

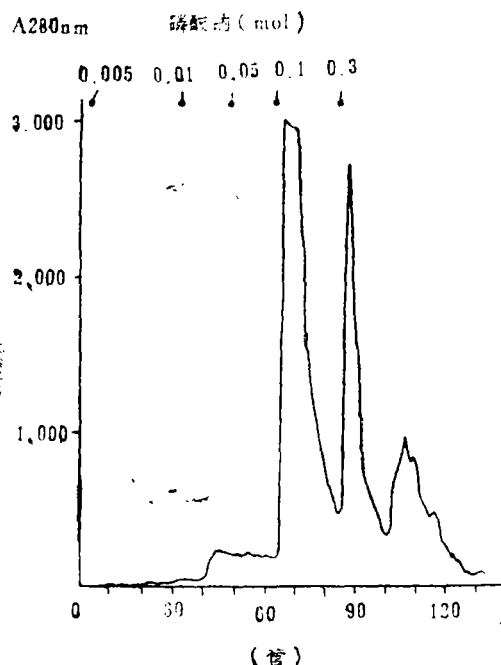


图2 860101批人血清经不同饱和硫酸铵3次分级沉淀,末次沉淀溶解物平衡澄清后上柱,用梯级洗脱分离的结果

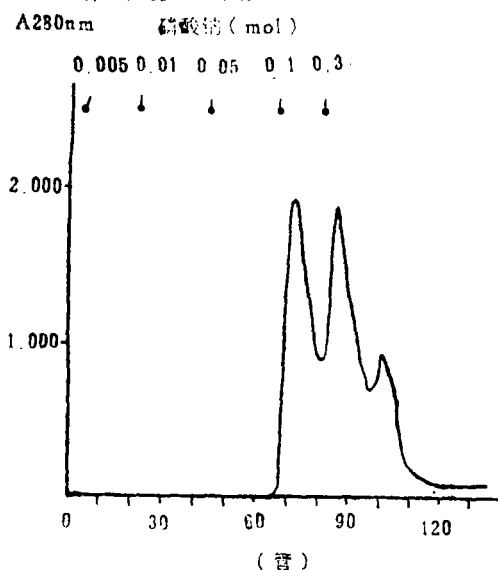


图3 870914批人血清经50%, 33%饱和硫酸铵两次分级沉淀,取上清,并追加饱和硫酸铵至50%饱和,取沉淀溶解物平衡澄清后上柱层析,用梯级洗脱分离的结果

替磷酸钠缓冲液时,发现洗脱人抗-HBe IgG有效的克分子盐浓度降低一档。用低滴度山东1号血清亦获得同样结果,图形类同,但多出一峰即第四峰。如将梯度洗脱的抗-HBe IgG重新用梯级洗脱法予以纯化,结果获得一个清晰的4峰图(图5)。

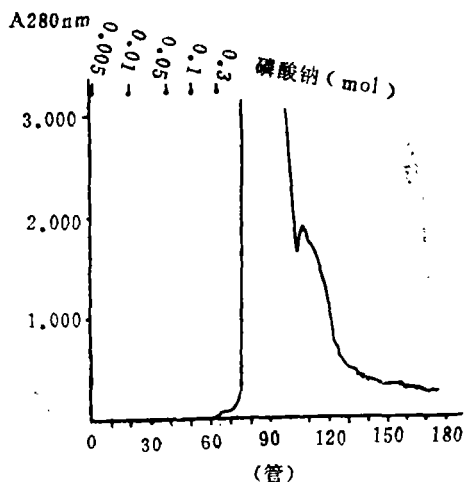


图4 870914批人抗-HBe血清,经50%、33%饱和硫酸铵两次分级沉淀,取沉淀溶解物透析平衡澄清后上柱,用梯级洗脱分离的结果

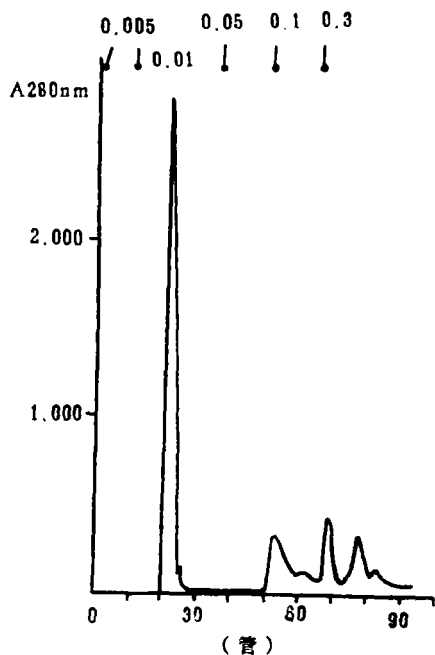


图5 DEAE DE22柱层析经梯度洗脱分离的IgG再用梯级洗脱分离的结果

2.3 QAE Sephadex A-50 柱层析 使用强碱性阴离子交换剂分离人血清抗-HBe IgG时(图6),出现类似单峰的人抗-HBe IgG,经与HRP偶联后,制成的酶结合物经过多次严格的考证均呈现一片黄色,用此种酶结合物再行分离纯化,未获成功。

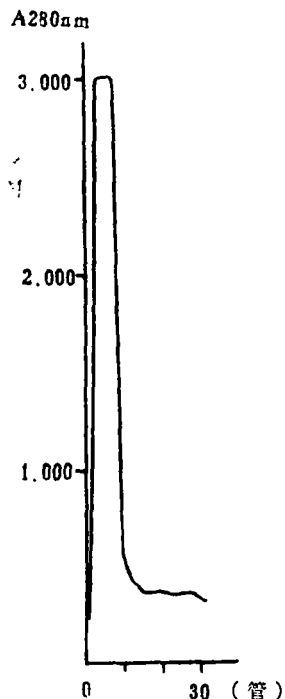


图6 870322批人抗-HBe阳性血清用QAE Sephadex A-50柱层析分离的结果

3 讨论

3.1 抗-HBe的异质性 本文运用多种方法分离IgG,包括^[6]分离豚鼠的7Sr2、7Sr1球蛋白和人血清血型抗体等特殊蛋白质的纤维素层析梯级洗脱法,加硫酸铵分级预沉淀对人血清抗-HBe IgG作了系统的对比分离纯化研究。发现ID法滴度不同($\leq 1:16$ 和 $\geq 1:32$)的两组人抗-HBe阳性血清,低滴度者在饱和硫酸铵达33%饱和时,抗-HBe活性仍存留在上清内,而高滴度者80%以上活性物质却分布在沉淀物中;在纤维素梯级层析中,前者具有宽阔的梯级跨度,从0.01~0.30mol PB,有四个峰,280nm/260nm之比分别为1.82、1.75、1.25和1.24。活性物

质所处盐浓度为 0.10mol, 后者只有一个洗脱盐浓度即 0.30mol, 有一个主峰(前半峰和后半峰)和肩峰, 280nm/260nm 之比分别为 1.97、1.12 和 1.72, 相应的滴度为 1 : 64、1 : 128、1 : 32 和 1 : 16。说明人抗-HBe 阳性血清原滴度越低者, 其抗体种类也越复杂。当硫酸铵预沉淀的饱和度仅用 50% 沉淀一次, 梯级洗脱剂由钠盐换成钾盐时, 高、低两组血清变化之一是洗脱有效的盐浓度各自降低一档; 其次, 两者有着同一的跨度, 以 0.05~0.30mol 高滴度血清分成三个孤峰, 280nm/260nm 之比分别为 2.04、1.55 和 1.38, ID 法滴度依次为 1 : 32、1 : 2 和 0; 低滴度血清组可分成四个峰, 其特定比值为 1.59、1.51、1.25、1.40, 经 ELISA 测定各峰的抗-HBe 和抗-HBc 活性, 除第 3 峰抗-HBe 阴性外, 其余均阳性。这种仅因抗-HBe 的滴度高、低不同, 出现两种截然不同的盐析表现和分布规律, 此等现象在其他抗体中确属罕见。与此同时, 同是 e 抗体为何有的在很低盐浓度下, 例如在 pH 8.0, 0.005mol PB 透析中即被沉析, 而有的在很高盐浓度下不能洗脱; 同是透析中沉淀物, 为何高滴度者其生物活性很高, 而低滴度者却测不出生物活性? 用相同的方法为何高滴度血清有明显的“富集”现象, 而低滴度者则呈现“失踪”状态。这些现象可能与 e 抗原自身的异质性相关^[6], 也可能与日本 Yamada 等^[2]报道的事实, 即人血清中 HBeAg/1 和 HBeAg/2 既可与 IgG 结合形成免疫复合物(MW 有 240 000, 400 000 和 540 000 三种), 也可以游离形式(即单体 MW 30 000 和三聚体 MW 90 000)存在。由此而激发诱生出相应的多种抗体。这些理化性质不完全相同而同时出现的抗体是构成抗-HBe IgG 异质性的主要因素。如果人血清免疫球蛋白原有轻微的异质性^[7], 则人血清中抗-HBe 是典型的异质性代表。这些特性在分离高度纯化的人血清抗-HBe IgG 时必须予以高度重视。

3.2 抗-HBe IgG 分离纯化 根据以往用 DEAE 纤维素纯化抗-HBc IgG 的经验, 通常较低盐浓度时即可将其有效成份予以洗脱。但低滴度抗-HBe 阳性人血清兼有抗-HBc 和抗 HBs^[8,9], 用 QAE Sephadex A-50 分离或 DEAE 梯度洗脱未必奏效, 因此等方法可将二种或三种不同质的 IgG 洗脱在一起, 正如图 1、图 5 所示, 它与酶交联后出现本底深, 非特异性反应等异常现象。因此, 尽管用强碱性阴离子交换剂 QAE Sephadex A-50 能分离到不含微量清蛋白的 IgG^[4], 但分离人血清抗-HBe IgG 非为最理想的一种离子交换剂, 此有待进一步探索。

3.3 在 DEAE 纤维素柱层析中, 洗脱缓冲液由磷酸钠改成磷酸钾时, 其有效洗脱盐浓度从 0.10mol 降到 0.05mol。这是由于活化后的 DEAE 纤维素以 Na⁺ 型存在(在生理上钠与钾离子对原生质具有对抗作用), 因此磷酸钾降低了钠型纤维素对蛋白质阴离子基团的吸附力, 从而提前洗脱下来。本文洗脱人抗-HBe IgG 的盐浓度比 Yamada 等^[2]要高 5~30 倍。用本方法分离的抗-HBe IgG 用作包被时, 经与酶结合物“配对”预试验证明, 仅需 1.7μg/ml 已能使阳性标本显色, 达 6.8μg/ml 时颜色加深, 而阴性标本无色。用本法抽提纯化的 870914 批抗-HBe IgG 先后已制成 10 多批次酶结合物, 其有效工作浓度均较高, 一般可达 1 : 400~1 : 800, 若能以相应的单克隆抗体作包被, 则显色效果更佳。鉴于 e 系统在乙型肝炎诊断、HBV 复制、传染性强弱和预后判断等方面均具有重要意义, 因此研究一种分辨力高、重复性好的分离高纯度的抗-HBe IgG 方法是当前急需解决的课题, 本文所介绍方法具有上述优点。值得推广应用。

参 考 文 献

1. 梅雅馨, 等. 中国医科大学学报 1985; 14(2):

2. Yamada E. et al. J Gen Virol 1983; 64(4) : 895
3. Weir DM. Handbook of Experimental Immunology. Blackwell Scientific Publications: Oxford, 1978; 8.1
4. 首都医院基础组生化室气管炎组(北京). 生物化学与生物物理学报 1976; 8(3) : 215
5. Peterson EA, Sober HA. J Am Chem Soc 1956; 78(4) : 751
6. Williams AE, et al. Bibl Haematol 1976; 42 : 71
7. Valmet E. Science Tools 1960; 15 : 8
8. Marie-Anne Petit, et al. Mol Immunol 1986; 23(5) : 511
9. Zuckerman AJ. Brit Med J 1979; 2(6182) : 84

(1991年1月收稿, 同年3月修回)

DEMONSTRATION OF HETEROGENEITY IN HUMAN SERUM ANTI-HBeIgG BY MEANS OF CONTRAST SEPARA- TION AND PURIFICATION

Lu Xinfu, Zhang Mintai, Wang Kening, et al
Institute of Infectious Diseases

By means of various methods for IgG isolation to carry out the study of contrast separation and purification in two groups of human sera with high and low anti-HBe titres, human anti-HBe IgG was discovered to contain varied heterogeneity. The study suggests the way to choose human anti-HBe positive sera and the best method for the extraction of polyclonal anti-HBe IgG before the popularization of monoclonal anti-HBe.

KEY WORDS Hepatitis B antibodies/isol & purif, IGG,
Immunoglobulin allotypes

类脂A部分结构对革兰氏阴性菌脂多糖诱生 白细胞介素1的抑制作用

(王明海, 等. 中华微生物和免疫学杂志 1990; 10(5) : 307)

本文是对革兰氏阴性菌沙门氏菌脂多糖、化学合成的大肠杆菌型类脂A, 以及类脂A部分结构如406成份和脂X诱导人单核细胞产生白细胞介素1(IL-1)的功能的研究报道。类脂A部分结构对脂多糖或类脂A的协同刺激实验表明, 无活性的406成份和类脂X具有抑制脂多糖或类脂A介导的IL-1释放功能。其抑制效应与类脂A部分结构的剂量明显相关。时相效应和胞浆内IL-1 β 合成的研究表明, 类脂A部分结构介导的抑制作用涉及细胞浆内IL-1蛋白分子的合成过程。上述结果提示, 作为脂多糖和类脂A生物活性的拮抗剂, 类脂A部分结构对调节革兰氏阴性菌感染中脂多糖介导的免疫反应具有重要的意义。