

研究简报

单克隆抗体亲和层析提纯
嗜水气单胞菌 HEC 毒素

陈琼 陈怀青 陆承平*

(南京农业大学动物医学院, 210095)

PURIFICATION OF *AEROMONAS HYDROPHILA* HEC
TOXIN WITH MONOCLONAL ANTIBODY
AFFINITY CHROMATOGRAPHY

Chen Qiong, Chen Huaqing and Lu Chengping

(College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, 210095)

关键词 嗜水气单胞菌, HEC 毒素, 单克隆抗体, 亲和层析

Key words *Aeromonas hydrophila*, HEC toxin, Monoclonal antibody, Affinity chromatography

HEC 毒素是嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila* stanier)产生并分泌的一种外毒素,是该菌重要的毒力因子。与其他细菌外毒素相比,HEC 毒素同时具备溶血性、肠毒性、细胞毒性及动物致死性,性质独特,值得深入研究。本试验建立了单克隆抗体免疫亲和层析法,成功地获得了 HEC 毒素的纯品,为进一步研究 HEC 毒素的结构和功能打下了良好的基础。

1 材料与方法

1.1 单克隆抗体(McAb) 嗜水气单胞菌 HEC 毒素单克隆抗体由作者自行研制^[1]。本试验选用 4E2 株 McAb 的腹水。

1.2 HEC 毒素的制备 将嗜水气单胞菌 J-1 株接种改良肉汤,28℃ 振荡培养,180r/min 24h,离心后的上清用 60%饱和硫酸铵盐析,即获粗制 HEC 毒素。

1.3 亲和层析柱的制备 参照武建国等的方法^[2]进行。10ml 压积的 Sepharose 4B (Pharmacia 公司产品)用 0.5g 溴化氰(Merck-Schuchardt 公司产品)活化。McAb 用辛酸法提纯后,取 15mg 溶于 0.1mol/L NaHCO₃ 溶液(含 0.5mol/L NaCl)中,加入抽干活化的 Sepharose 4B,4℃ 缓慢磁力搅拌 26h,以充分偶联。将偶联了 McAb 的 Sepharose 4B 装入 1.5×10cm 的层析柱内,用 pH7.4, 0.01mol/L PB 溶液(含 0.5mol/L NaCl)流洗过夜,并收集洗脱液,直至洗脱液 OD₂₈₀<0.02 为止。合并洗脱液,测其蛋白含量,并计算偶联率。

层析柱使用之前,先用 1.0mol/L 乙醇胺溶液(pH8.0)室温封闭 2h,随后依次用 pH4.0 醋酸缓冲

* 高校博士点基金资助项目。* 通信作者。

1996年6月24日修回。

液和 pH8.0 硼酸缓冲液交替洗涤 2 次,每次 1 个柱体积,再用 3.0mol / L KCNS 洗 1 个柱体积,以封闭 Sepharose 4B 上未连接 McAb 的位点和结合不紧密的 McAb。最后用 PBS 平衡备用。

1.4 亲和层析 将粗制的 HEC 毒素低速离心,除去不溶物。取 5ml 上清加至亲和层析柱,待其完全进入 Sepharose 4B 柱内后,关闭柱出口,室温过夜,使 HEC 毒素充分结合到 Sepharose 4B 凝胶上。次日用 PB 流洗 12h,至 OD₂₈₀<0.02。然后改用 3.0mol / L KCNS 洗脱,15 滴 / min,分部收集洗脱液,每管 3—4ml,测其 OD₂₈₀ 值。合并 OD₂₈₀>0.1 的洗脱液,用 PBS 透析。最后用浓缩胶浓缩,并测定蛋白质含量。亲和层析柱用 PB 流洗平衡,重复使用。

1.5 HEC 毒素的溶血性测定 HEC 毒素在 96 孔微量滴定板上用 PBS(pH7.4)倍比稀释,然后加入等体积的人 O 型红细胞,37℃ 作用 1h,记录结果,以溶解 50%红细胞作为滴定终点。

1.6 HEC 毒素的溶血抑制试验 HEC 毒素用 PBS 在 96 孔微量滴定板中倍比稀释,加入等体积的 1 : 10 多克隆抗体(PAb)^[3],37℃ 孵育 1h,再加等体积 1% 人 O 型红细胞,37℃ 作用 1h,记录结果。

1.7 Dot-ELISA 检测 参照陈怀青等的方法进行^[4]。浓缩后的层析洗脱收集液用 PBS 倍比稀释至 1 : 2¹⁰,分别取 2μl 点样于 NC 膜,而后按常规方法操作。

2 结果

2.1 McAb 的偶联率 根据偶联率公式:

$$\text{偶联率} = [P - (E - B)] / P \times 100\%$$

其中 P 为偶联前抗体 OD₂₈₀ 值

B 为洗脱液总的 OD₂₈₀ 值

E 为空白,各种缓冲液总的 OD₂₈₀ 值

计算得到的偶联率为 92%,也就是说用于偶联的 15mg McAb 中有 13.8mg 已结合到了 Sepharose 4B 琼脂糖珠上。

2.2 HEC 毒素的洗脱曲线 用 3.0mol / L KCNS 溶液洗脱结合在 Sepharose 4B 上的 HEC 毒素,先流出近 1 个柱体积后开始收集,每管 3—4ml,以 KCNS 溶液作为空白对照,所收集的 8 管洗脱液 OD₂₈₀ 值分别为-0.04,0.956,0.6,0.43,0.23,0.108,0.078 及 0.050,以管数为横座标,OD₂₈₀ 值为纵座标,可见 HEC 毒素洗脱峰高而窄(图 1)。

2.3 亲和层析 HEC 毒素的回收率 亲和层析前上样量 5ml,溶血价为 2⁸;亲和层析后收集的洗脱液约 20ml,经浓缩胶浓缩为 5ml,其溶血价为 2⁶(表 1)。由于洗脱前后测定溶血价时毒素的体积相同,故可算得亲和层析后 HEC 毒素的回收率为 25%。

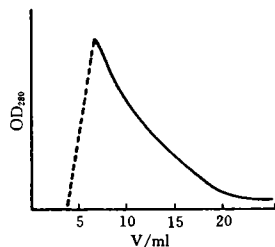


图 1 HEC 毒素亲和层析洗脱曲线

Fig.1 The curve of chromatography washing and affinity of HEC toxin

表 1 HEC 毒素亲和层析前后溶血价的比较

Tab.1 Comparison of hemalytic activities of HEC toxin before and after purification

毒素 Toxin	1 : 2	1 : 4	1 : 8	1 : 16	1 : 32	1 : 64	1 : 128	1 : 256	1 : 512	1 : 1024
粗制 HEC 毒素	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
层析纯化 HEC 毒素	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
PAb 中和后层析										
纯化 HEC 毒素	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-

2.4 洗脱产物的鉴定 为验证亲和层析洗脱液所致的溶血确实是 HEC 毒素所致,而不是其他物质所引起的非特异性溶血,采用免疫学方法对洗脱液进行了检验。用 PAb 进行中和之后,洗脱液的溶血效

价降低 3 个孔,其溶血活性被相应抗体特异性地抑制。而 Dot-ELISA 检测,发现洗脱液稀释至 1:32 时仍有棕色斑点出现。这表明洗脱液中的溶血活性物质是 HEC 毒素。经测定,1 次亲和层析可获 3mg 纯的 HEC 毒素。

3 讨论

3.1 提纯嗜水气单胞菌外毒素的方法有多种,如硫酸铵盐析、离子交换层析、分子筛过滤、疏水层析及 SDS-PAGE 电泳等。由于使用某一种方法难以获得高纯度的毒素,因而多采用几种方法的组合^[5,6],但又存在着操作步骤较多、耗时较长等问题,致使毒素的生物学活性易受破坏,并有降解的可能性,因而提纯的得率较低,仅为百分之几。本试验同时用 McAb 亲和层析法与硫酸铵盐析-DEAE-纤维素层析-Sephadex G-200 分子筛过滤协同法分别提纯嗜水气单胞菌 HEC 毒素,协同法提纯后 HEC 毒素的溶血价从 1:512 降至 1:8,活性下降 64 倍(资料);而用亲和层析法,溶血价从 1:256 降至 1:64,只降低 4 倍。同时,协同法耗时 1 周,而亲和层析法仅 12h。由此可见,McAb 亲和层析法是提纯嗜水气单胞菌 HEC 毒素较好的方法,在国内外未曾见报道,也为 McAb 用于细菌毒素的研究开拓了新路。

3.2 以往亲和层析多用常规多克隆抗体作配体。由于抗体成分复杂,亲和力多样化,不易得到特异性高的提取物。而将单克隆抗体应用于亲和层析带来了突破,作为配体的 McAb 只针对单一的抗原决定簇。因而抗原抗体的结合是单一决定簇的结合,特异性极强,容易获得高纯度的抗原。这也是 McAb 亲和层析法不可替代的优点之一。

3.3 另一方面,McAb 较 PAb 亲和力小,而且结合抗原的位点单一。因此所获得的抗原尽管纯度高,但是得率低,是其缺点。本试验亦存在这个问题。为此,需要增加配体的亲和力,如数株 McAb 混合使用,可获得更好的结果。

参 考 文 献

- [1] 陈 琼,陆承平.嗜水气单胞菌HEC毒素单克隆抗体的研究.南京农业大学学报,1993,16(增刊):81—84.
- [2] 武建国.实用临床免疫学检验.南京:江苏科学技术出版社.1990,38—44.
- [3] 涂小林,陆承平.嗜水气单胞菌毒素的提纯及其特性分析.微生物学报,1992,32(6):432—438.
- [4] 陈怀青等.用点酶法检测鱼类致病性嗜水气单胞菌HEC毒素.动物检疫,1993,10(4):7—9.
- [5] Asao T, et al. Purification and Characterization of an *Aeromonas hydrophila* hemolysin. *J. Clin. Microbiol.*, 1986, 24(2): 228—232.
- [6] Rose JM, et al. Purification and chemical characterization of a cholera toxin-cross-reactive cytolytic enterotoxin produced by a human isolate of *Aeromonas hydrophila* Infect. Immun., 1989, 57(11): 1165—1169.