

## 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 Huaiqing 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<sup>[1]</sup>。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<sup>[2]</sup>进行。10ml 压积的 Sepharose 4B (Pharmacia 公司产品) 用 0.5g 溴化氰 (Merck-Schuehardt 公司产品) 活化。McAb 用辛酸法提纯后, 取 15mg 溶于 0.1mol / L NaHCO<sub>3</sub> 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 OD<sub>280</sub> < 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 磷酸缓冲液交替洗涤 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  $OD_{280} < 0.02$ 。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  $OD_{280}$  值。合并  $OD_{280} > 0.1$  的洗脱液, 用 PBS 透析。最后用浓缩胶浓缩, 并测定蛋白含量。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)<sup>[3]</sup>, 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<sup>[4]</sup>。浓缩后的层析洗脱收集液用 PBS 倍比稀释至 1 : 2<sup>10</sup>, 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  $OD_{280}$  值

B 为洗脱液总的  $OD_{280}$  值

E 为空白, 各种缓冲液总的  $OD_{280}$  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  $OD_{280}$  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,  $OD_{280}$  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 2<sup>8</sup>; 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 2<sup>6</sup>(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%。

表 1 HEC 毒素亲和层析前后溶血价的比较

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

| 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

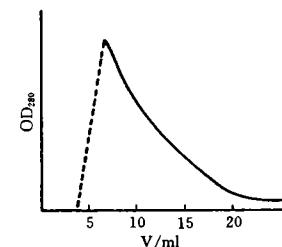


图 1 HEC 毒素亲和层析

洗脱曲线

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

价降低 3 个孔, 其溶血活性被相应抗体特异地抑制。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<sup>[5,6]</sup>, 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.