

DEAE-52 层析对猪血清 IgG 提纯得率的影响

刘生杰¹, 余为一^{2,*}, 朱茂英¹, 刘成文³, 聂传朋¹, 李东伟¹

(1. 阜阳师范学院生物系, 安徽 阜阳 236041; 2. 安徽农业大学生命科学学院, 安徽 合肥 231072

3. 阜阳市畜牧局, 安徽 阜阳 236015)

摘 要: 目的: 提纯猪血清 IgG, 并分析 DEAE-52 层析对 IgG 得率的影响。方法: 用硫酸铵盐析和 DEAE-52 阴离子交换层析两步法提纯猪血清 IgG, 以 SDS-PAGE、Bradford 法浓度测定和免疫双扩散来分析 DEAE-52 层析对 IgG 得率的影响。结果: DEAE-52 层析获得两个分开明显无重叠洗脱峰, 两峰均含有 IgG, 其中第一峰蛋白纯度达 95.7%, 得率为 3.0~4.0 mg/ml 血清; 第二峰 IgG 纯度 59%。结论: DEAE-52 层析能使猪血清 IgG 在两个洗脱峰中分布, 两步法能从层析第一峰获得电泳纯 IgG, 对层析第二峰进一步纯化能大幅提高 IgG 得率。

关键词: 猪 IgG; 提纯; 层析; 得率; 影响

Effects of DEAE-52 Anion-exchanging Chromatography on Yield Rate of IgG Purified from Swine Serum

LIU Sheng-jie¹, YU Wei-yi^{2,*}, Zhu Mao-ying¹, LIU Cheng-wen³, NIE Chuan-peng¹, LI Dong-wei¹

(1. Department of Biology, Fuyang Teachers College, Fuyang 236041, China;

2. School of Life Science, Anhui Agricultural University, Hefei 231072, China;

3. Husbandry Bureau of Fuyang, Fuyang 236015, China)

Abstract: Objectives: To purify immunoglobulin G (IgG) from swine serum and analyze the effects of DEAE-52 chromatography on the yield rate of IgG. Methods: Porcine IgG was separated and purified from swine serum by two-step methods, SDS-PAGE and Bradford assaying kit with saturated ammonium sulphate (SAS) precipitation followed by DEAE-52 cellulose anion-exchanging chromatography. The effects of DEAE-52 chromatography on the yield rate of IgG were determined by SDS-PAGE and Bradford assaying kit with double immunodiffusion (DI). Results: Two different eluate peaks are obtained in DEAE-52 chromatography. IgG is also found in different eluate peaks of chromatogram by SDS-PAGE and DI. The yield rate and purity of IgG in first eluate peak are 3.0~4.0 mg/ml serum and 95.7% respectively. But the purity in second eluate peak is lower. Conclusion: DEAE-52 chromatography leads the porcine IgG to distribute in two different eluate peaks. The IgG of electrophoretic purity can be purified from the first eluate peak of DEAE-52 chromatogram by two-step methods. The yield rate of IgG can be largely increased by IgG and further purified from the second eluate peak.

Key words: porcine immunoglobulin G (IgG); purify; chromatography; yield; effect

中图分类号: TS251.93 Q503

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)04-0087-03

免疫球蛋白G (Immunoglobulin G, IgG) 因具有多种生物学活性被广泛用于医学临床、免疫学实验、抗血清与单抗制备、食品与饲料工业等。猪血中含有大量 IgG, 应用潜力和经济价值巨大, 但提取纯度和得率高是有效利用 IgG 的关键; 由于血清蛋白种类多, 目前还没有技术能实现一步纯化, 须多种方法结合方能奏效^[1]。血清 IgG 提取方法主要有硫酸铵盐析法、辛酸吸附法、色谱法、超滤法等。其中辛酸法回收率高于硫酸铵法,

但纯度低于后者; 超滤法更适合于工业化生产^[2]; 色谱法多与粗提方法结合纯化抗体。DEAE-52 阴离子交换层析色谱是常用的抗体纯化方法, 获得抗体纯度高, 然而 DEAE-52 层析如何影响 IgG 得率尚未见报道。本实验应用饱和硫酸铵盐析结合 DEAE-52 层析提纯猪血清 IgG, 并通过 SDS-PAGE 和免疫双扩散分析了 DEAE 层析对 IgG 纯化得率的影响, 为提高纯化 IgG 得率提供参考。

收稿日期: 2007-05-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(30671537); 安徽省教育厅自然科学基金项目(2004kj307)

作者简介: 刘生杰 (1971-), 男, 讲师, 硕士研究生, 研究方向为动物免疫学。E-mail: lsj9699@sina.com

* 通讯作者: 余为一 (1952-), 男, 教授, 博士, 研究方向为预防兽医学。E-mail: yuwei1@ahau.edu.cn

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

新鲜猪血液由阜阳市颍南屠宰场提供,血清由常规方法制备。

Bradford 试剂盒 北京天根生物公司; DEAE-52 上海生工生物工程技术有限公司; 羊抗猪 IgG 血清长沙欧迈公司。

1.2 方法

1.2.1 饱和硫酸铵盐析

按文献[3]方法改进。

1.2.2 DEAE-纤维素层析^[4]

取盐析蛋白 PBS 溶液对缓冲液 A (25mmol/L Tris-HCl、pH 8.8 35mmol/L NaCl) 透析后离心, 上清作上样母液。称 2g DEAE-52 纤维素预处理、缓冲液 A 平衡、装柱, 柱规格 1.5cm × 30cm, 柱床高 25cm; 用缓冲液 A 平衡至流出液电导率等于缓冲液 A; 取 2ml 上样母液加入层析柱。上样后用缓冲液 A 平衡, 至流出液在 280nm 波长洗脱曲线变得平直止; 后以等量缓冲液 A 和缓冲液 C (25mmol/L Tris-HCl pH 8.8、500mmol/L NaCl) 连续梯度洗脱; 控制流速 1ml/min。上样 15min 后分部收集并记录波峰, 每管 2ml, 合并同一波峰收集管后分别对 PBS 溶液透析、浓缩、鉴定、-20℃ 保存。

1.2.3 纯度鉴定和分子量测定

用 SDS-PAGE 电泳法^[5]和 AlphaImager 凝胶图像处理软件。

1.2.4 蛋白浓度测定

Bradford 法, 取样品 (盐析粗提物、DEAE 一、二峰) 各 50μl, 按 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒步骤进行。用标准曲线软件绘 BSA 标准曲线并计算样品浓度。对 5 次层析结果进行比较。

1.2.5 层析峰抗原性鉴定

用免疫双扩散法^[6]。

2 结果与分析

2.1 盐析

得到 18ml 近无色澄清盐析粗提蛋白的 PBS 溶解液。

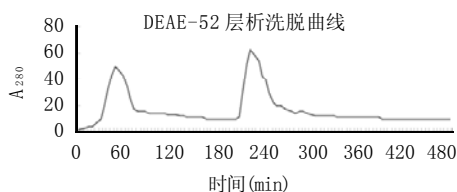


图1 DEAE-52 纤维素层析洗脱曲线
Fig.1 Elution curve by DEAE-52 chromatogram

2.2 DEAE-52 纤维素层析

0~150min 缓冲液 A 平衡洗脱, 获得第一峰; 150min 开启缓冲液 A-C 线性连续洗脱, 获得第二峰 (图 1); 两个吸收峰界限分开明显, 无重叠。

2.3 纯度鉴定和分子量测定

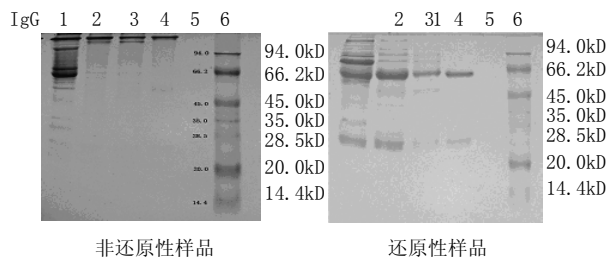


图2 电泳分析
Fig. 2 SDS-PAGE analysis of purified IgG

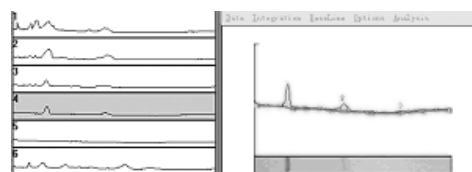


图3 纯度分析
Fig. 3 Purity analysis by AlphaImager

SDS-PAGE 电泳图谱见图 2。对图 2 (右) 4 泳道进行凝胶图像分析得图 3。2 泳道表明盐析能除去 IgG 外大部分血清蛋白, 仅留少量蛋白杂带。3 泳道保留了 2 泳道几乎全部蛋白成分。4 泳道为 DEAE 第一峰, 经巯基乙醇处理后仅有两个条带, 凝胶图像测定分子量分别约为 57、25kD (图 2 右), 和 IgG 的 H 链、L 链分子量吻合, 故确定第一峰纯化蛋白为 IgG, 纯度达到 95.7% (图 3); 3 泳道也含有 IgG 成分, 纯度为 59%。同理测得盐析物中 IgG 纯度为 61.4%。

2.4 浓度测定

2.4.1 提取蛋白原液浓度和得率

实验结果见表 1。

表1 蛋白浓度及得率
Table 1 Concentration and yield rate of each protein sample

样品名称	盐析粗提蛋白	层析第一峰(未浓缩)	层析第二峰(未浓缩)
蛋白液量(ml)	18.0	50.0	62.0
蛋白浓度(mg/ml)	14.4	0.156	0.148
蛋白得量(mg)	259.2	7.8	9.176
蛋白得率(mg/ml血清)	12.96	3.9	4.588

2.4.2 层析纯化效果比较

在上样相同情况下,五次DEAE-52层析第一峰的蛋白得率稳定在3~4mg/ml血清之间;层析第二峰蛋白得率在4.2~5.0mg/ml血清之间。统计分析五次层析差异不显著(图4)。

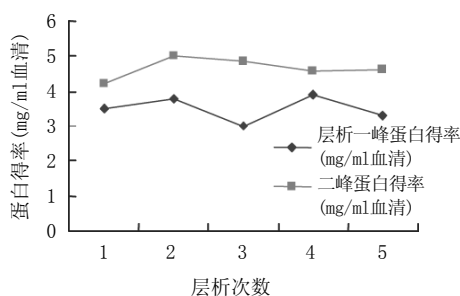
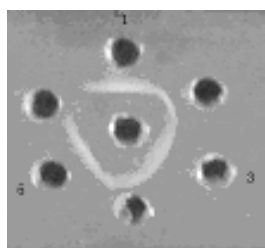


图4 DEAE-52层析峰比较

Fig.4 Comparison with peak I and II of each DEAE-52 chromatogram

2.5 免疫双扩散

由图5知,羊抗猪IgG血清和猪血清只有一条沉淀线,特异性强;进而表明DEAE第一、二峰收集液中均含有猪IgG。



孔1. 猪血清(1/20); 孔2. 猪血清(1/40); 孔3. DEAE第一峰(浓缩液); 孔4. DEAE第一峰(未浓缩); 孔5. DEAE第二峰(浓缩液); 孔6. DEAE第二峰(未浓缩); 中央孔. 羊抗猪IgG血清。

图5 免疫双扩散

Fig.5 Results of double immunodiffusion

3 讨论

饱和硫酸铵盐析能够除去IgG以外的大部分血清蛋白,得率高、粗提纯度也较高,作为经典粗提方法能为进一步纯化IgG提供得率保证。但经过层系后获得蛋白总量也有一定的损失。

DEAE-52层析出现两个分隔明显、无重叠的洗脱峰,且两个峰都有IgG存在,其中第一峰IgG纯度高,能够满足免疫学实验要求纯度,所以第一峰IgG往往是两步法纯化目的物,但得率却稳定在3~4mg/ml血清的低水平;第二峰IgG纯度很低,但这也必然降低第一峰IgG纯化得率,然而本试验也证明层析第二峰还含有不少IgG,仍有可进一步纯化空间。此现象在猪血清IgG

提纯中尚未见报道,有文献在用硫酸铵盐析和DEAE-Sephrose FF纯化牛初乳IgG^[7-8]、硫酸铵和DEAE-52纯化牛血清IgG^[9]进行阶段洗脱时出现三个洗脱峰,每个峰都有IgG,与本试验现象类似,但这些文献没对IgG在不同层析峰中分布原因进行探讨报道。层析峰个数多少可能与物种差异有关,而IgG能在不同洗脱峰中分布可能是由IgG不同亚类造成,不同亚类IgG有不同离子交换能力导致它们在不同波峰中分布,所以这也是DEAE-52层析第一峰纯化猪IgG得率较低的主要原因。不同的离子交换能力也必然反映不同亚类IgG蛋白结构的差异性,结构差异可能体现在氨基酸组成或蛋白构象的微小差异上,这有待进一步实验探讨。因此要提高猪血清IgG总得率还要对层析第二峰进一步纯化;这和牛血清三个层析峰都要进一步纯化^[9]有差别,所以提高动物血清IgG提纯得率应视不同的物种来对提纯方法作相应的调整与改进。

抗体提纯得率也受其他因素的影响。溶血血清应弃去,因细胞内蛋白水解酶能破坏抗体结构影响抗体活性和提取得率^[10]。盐浓度、pH和加盐速度等对盐析效果影响很大,因为不同蛋白是在特定的盐浓度下方能有效破坏其水化膜而沉淀析出;不同蛋白等电点不同,只有在等电点时沉淀才更充分;加盐过快会出现共沉淀使后续纯化困难。但这些不是造成本试验抗体纯化得率低的主要因素,因为这些因素主要在粗提过程中发挥作用。

实验未见IgM,主要原因有二:其一是正常血清中IgM含量较少而难以获得;其二是33%盐析过程更有利于IgG的沉淀析出,而不利于IgM沉淀析出,所以此法不宜IgM提取。

总之两步法中DEAE-52层析能获得两个均含IgG洗脱峰,两步法能从层析第一峰获得电泳纯IgG,但IgG在不同层析峰中分布导致第一峰猪血清IgG纯化得率低,对第二峰进一步纯化能大幅提高IgG纯化得率。

参考文献:

- [1] 刘生杰,余为一. 免疫球蛋白IgG和IgM分离纯化技术现状与展望[J]. 阜阳师范学院学报:自然科学版, 2006, 23(3): 27-31.
- [2] 张和平,岳喜庆,冯巧萍. 饱和硫酸铵法提取血清中IgG最佳条件的研究[J]. 中国乳品工业, 2006, 34(1): 4-8.
- [3] 王三虎,谢岩黎,张录华. 猪血清中免疫球蛋白提取工艺[J]. 郑州粮食学院学报, 1998, 19(3): 75-78.
- [4] 朱正美,刘辉. 简明免疫学技术[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 129-131.
- [5] 陈钧辉,陶力,李俊,等. 生物化学实验[M]. 北京: 科学出版社, 2003: 110-114.
- [6] 沈萍,范秀容,李广武. 微生物学试验[M]. 3版. 北京: 高等教育出版社, 1999: 169-171.
- [7] 范丽娟,潘道东. 免疫初乳中IgG的分离与纯化[J]. 食品科学, 2005, 26(8): 146-149.
- [8] 王晓工,薄金岭. 牛初乳中IgG1、IgG2的制备色谱分离与纯化[J]. 齐齐哈尔大学学报, 2004, 20(1): 11-14.
- [9] 岳喜庆,冯巧萍,张和平,等. 牛血清免疫球蛋白的盐析法提取与纯化[J]. 中国乳品工业, 2005, 33(3): 16-21.
- [10] 王彦彬,李艳伍,郑杰,等. 酶标兔抗鸡IgG的制备[J]. 河南农业科学, 2004(2): 53-54.