

双亲和柱分离纯化高纯度抗体 Fab 酶切片段*

戚大梁, 王 强, 易维京[△]

(中国人民解放军第二二二医院一四九临床部, 江苏连云港 222042)

摘要:目的 建立利用抗原亲和柱及蛋白 G 亲和柱纯化木瓜蛋白酶酶切产物中高纯度 Fab 片段的方法。方法 以抗体对应的抗原蛋白与 NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow 活化偶联填料偶联制备抗原免疫亲和层析柱, 将抗体木瓜蛋白酶酶切产物分别通过蛋白 G 柱及抗原亲和柱制备抗体的 Fab 片段。通过 SDS-PAGE 电泳、ELISA 测定及临床类风湿因子阳性血清的干扰实验鉴定其制备效果。结果 抗体木瓜蛋白酶酶切产物分别通过蛋白 G 柱及抗原亲和柱后可以依次去除抗体 Fc 片段及未切开的抗体、木瓜蛋白酶及失活的 Fab 抗体片段, 最终获得高纯度、高活性的 Fab 抗体片段。SDS-PAGE 电泳、ELISA 测定抗体 Fc 片段被完全去除, 双抗夹心 ELISA 检测能消除类风湿因子阳性血清导致的假阳性。结论 成功建立了双亲和柱分离纯化抗体 Fab 片段的方法, 该方法适用于快速、高质量、大规模制备 Fab 抗体片段。

关键词:亲和层析; 木瓜蛋白酶; 抗原结合片段

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.04.033

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)04-0460-03

Double affinity chromatography separation and purification of high-purity antibody Fab fragment*

Qi Daliang, Wang Qiang, Yi Weijing[△]

(Department of the 149th Clinics, the 82nd Hospital of PLA, Lianyungang, Jiang Su 222042, China)

Abstract: Objective To establish efficient method to purify Fab fragment, which is prepared from antibody digested with papain, by using antigen affinity column chromatography and Protein G column chromatography sequentially. **Methods** The antibody-specific antigen protein was conjugated with NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow to prepare the antigen affinity chromatography column. The antibody was digested with papain and then the digested product went through antigen chromatography column and Protein G column sequentially to collect Fab fragment. The purified Fab fragment was identified through SDS-PAGE, ELISA and interfere test with human serum containing rheumatoid factor (RA). **Results** The Fc fragment, undigested intact antibody, papain, and inactivated Fab fragment were sequentially removed during purification through antigen affinity chromatography and Protein G chromatography. Results showed that Fc fragment was completely removed. This method could avoid the false-positive result caused by RA in serum samples during sandwich ELISA. **Conclusion** An approach to purify Fab fragment with double affinity column chromatography, which can be used for the rapid, high quality and large scale preparation of Fab fragment, is successfully developed.

Key words: affinity chromatography; papain; antigen binding fragment

单克隆抗体技术是 1975 年英国科学家 Milstein 和 Kohler 所发明, 目前广泛应用于临床治疗及诊断领域, 是免疫学领域的重大突破^[1]。鼠源性单克隆抗体经常需要切除其 Fc 段以减少免疫治疗过程中的人抗鼠反应 (HAMA) 及临床检测时导致的假阳性干扰^[2-3]。木瓜蛋白酶能水解 IgG 的部位是在铰链区二硫键连接的 2 条重链的近 N 端, 裂解后可得到 3 个片段, 2 个相同片段称为抗原结合片段 (Fab) 及 1 个可结晶片段 (Fc)。抗体经木瓜蛋白酶酶切后需要分离 Fab 片段及 Fc 片段, 并除去加入的木瓜蛋白酶才能使用。目前, 常用的方法是通过蛋白 G/A 除掉 Fc 段后采用凝胶过滤的方式通过相对分子质量大小进行分离, 该方法比较费时, 一次只能处理 1~2 mL 样本, 不适于大规模制备^[4]。也有报道通过蛋白 A 和蛋白 G 不同亲和部位不同进行快速亲和纯化分离, 但该方法并不适用于不同抗体亚类的鼠单克隆抗体^[5]。本文介绍的通过抗原亲和柱及蛋白 G 亲和柱纯化的方式建立的 Fab 制备方案, 不仅弥补以

上方方案的缺点, 同时具有去除非特异性抗体及失活抗体片段的作用, 极大的提高了 Fab 抗体的质量, 是一种较为完美的解决方案。

1 材料与方 法

1.1 材料 实验所使用的 NT-proBNP 鼠单克隆抗体 6C7 和 3B7 (亚类均为 IgG1) 及所对应的 NT-proBNP 重组蛋白均由第三军医大学临床生化教研室提供, 血清标本收集于本院检验科。

1.2 试剂 蛋白 G Sepharose Fast Flow 及 NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow 活化偶联填料购自 Amersham 公司; 生物素化试剂购及 HRP 标记的亲和素购自 Pierce 公司; HRP 标记的山羊抗小鼠购自北京中杉金桥生物技术有限公司; 小牛血清为四季青公司产品; BSA 购自北京鼎国生物技术有限公司; 其他试剂均为分析纯, 实验用水为去离子双蒸水。

1.3 方法

* 基金项目: 南京军区医学科技创新经费资助项目 (11MA048)。通讯作者, E-mail: yiweijing149@163.com。

作者简介: 戚大梁, 男, 副主任技师, 主要从事临床检验诊断的研究。 △

1.3.1 抗原免疫亲和柱的制备 严格按照 NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow 偶联填料说明书操作步骤进行:将 20 mg 的 NT-proBNP 重组蛋白完全溶于 10 mL 的偶联缓冲液 (0.2 mol/L NaHCO₃, 0.5 mol/L NaCl, pH 8.3) 中。取 5 mL 的活化填料置于层析管中,用冰冷的 1 mmol/L 稀盐酸冲洗填料去除保护溶剂,将溶好的蛋白液加入填料密封于 4 ℃ 过夜。次日,流出蛋白液并收集,交替使用缓冲 A (0.5 mol/L 乙醇胺, 0.5 mol/L NaCl, pH 8.3) 及缓冲 B (0.1 mol/L 醋酸, 0.5 mol/L NaCl, pH 4.0) 反复冲洗填料,至少 5 次,之后将填料保存于 PBS 中备用。测定偶联后的蛋白浓度及体积便可以测定偶联效率。

1.2.2 抗体木瓜蛋白酶的酶切 抗体最佳酶切条件的摸索采用《分子免疫学实验指南》提供的方法进行,获得最佳酶切条件后即可进行大规模抗体酶切^[4]。取 20 mg NT-proBNP 6C7 抗体溶于 10 mL PBS 中,加入 10 mL 含有 0.1 mg/mL 木瓜蛋白酶的缓冲液 (0.02 mol/L EDTA, 0.02 mol/L 半胱氨酸的 PBS 溶液,现配现用),置于 37 ℃ 的水浴箱中孵育 2 h 即可。

1.2.3 酶切产物的纯化分离 将抗体的木瓜蛋白酶酶切产物用 Tris-HCl (1.0 mol/L, pH 8.0) 调节 pH 到 7.5~8.0,通过蛋白 G 柱收集流出蛋白 (蛋白 P1),PBS 充分平衡层析柱后,用 HCl-甘氨酸 (0.1 mol/L, pH 2.7) 洗脱蛋白 (蛋白 P2),收集的蛋白 P1 直接通过抗原亲和柱收集流出蛋白 (蛋白 P3),PBS 充分平衡层析柱后,用 HCl-甘氨酸 (0.1 mol/L, pH 2.7) 洗脱蛋白 (蛋白 P4),蛋白 P4 用 Tris-HCl (1 mol/L, pH 8.0) 调节 pH 到 7.5~8.0,透析于 PBS 中分装即可。

1.2.4 Fab 抗体片段的鉴定 Fab 抗体的鉴定包含两方面,一是 Fc 段是否完全切除,二是制备的 Fab 是否具有活性,均可采用 ELISA 法进行测定。抗体 Fc 段测定方法:按 5 μg/mL 包被 NT-proBNP 重组蛋白,用 0.1% 的 PBST 溶液分别将未酶切的全抗体及 Fab 抗体稀释一系列不同的稀释度,加入包被板在 37 ℃ 孵育 1 h,洗板后与抗体稀释液稀释的 HRP 标记山羊抗小鼠 (Fc 特异性) 反应,洗板 TMB 显色后测定 OD₄₅₀,评价测定效果。抗体活性测定方法:将等量的未酶切全抗体及 Fab 抗体用生物素化试剂进行生物素化 (参照说明书进行)。按 5 μg/mL 包被 NT-proBNP 重组蛋白,用 0.1% 的 PBST 溶液分别将生物素化的全抗体及 Fab 抗体稀释一系列不同的稀释度,加入包被板在 37 ℃ 孵育 1 h,洗板后与抗体稀释液稀释的 HRP 标记亲和素反应,洗板 TMB 显色后测定 OD₄₅₀,评价测定效果。

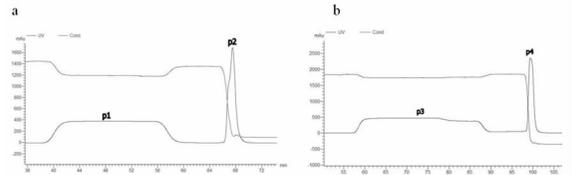
1.2.5 类风湿因子阳性血清的干扰实验 检测使用的血清均经过 Roche Elecsys E170 系统及专用试剂测定,以大于 125 pg/mL 判断为阳性。共测定阴性标本及阳性标本各 24 份,另外测定 24 份类风湿阳性血清。建立 6C7 未酶切抗体和其 Fab 抗体与配对抗体 3B7 的双抗夹心 ELISA 法检测 NT-proBNP 血清及重组校准品。按 4 μg/mL 包被 NT-proBNP 6C7 抗体及对应抗体 Fab 片段,用含 1% 的小牛血清 PBS 液封闭后即可使用。检测时每孔加入 50 μL 血清或校准品,再加入抗体稀释液稀释的 HRP 标记的 3B7 抗体 50 μL,震荡混匀后,37 ℃ 孵育 1 h,洗板 TMB 显色后测定 OD₄₅₀。

2 结果

2.1 抗原免疫亲和柱偶联效果 经 Lowry 法测定收集的偶联后液体中蛋白浓度为 102 μg/mL,总体积为 15.5 mL,通过偶联效率计算公式:偶联效率=(蛋白总量-未偶联蛋白)÷蛋

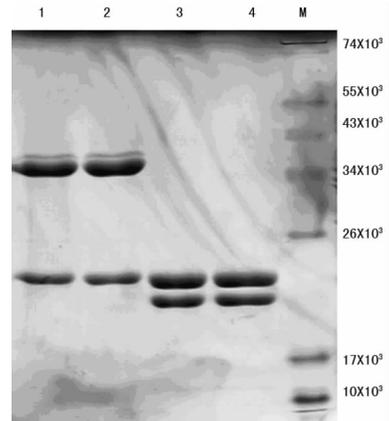
白总量×100%。计算获得偶联率为 92.1%,平均每毫升的偶联填料中偶联蛋白 3.68 mg。

2.2 酶切产物的纯化分离 酶切产物通过蛋白 G 柱纯化后收集流出蛋白 P1 及洗脱蛋白 P2 (图 1a)。P1 主要成分为 Fab 抗体、木瓜蛋白酶、失活的抗体及片段;P2 的主要成分是切的 Fc 片段及未切开的抗体。P1 经过抗原亲和柱纯化后获得流出蛋白 P3 及洗脱蛋白 P4 (图 1b)。P3 成分为木瓜蛋白酶、失活的抗体及片段;P4 即为最终的 Fab 抗体。将 P4 与完整 IgG 变性 SDS-PAGE 电泳鉴定:抗体轻链位置相同,抗体重链完全切除 Fc 段相对分子质量由 40×10³ 减少到 20×10³ (图 2)。



a: 蛋白 G 纯化监测图; b: 抗原亲和柱纯化监测图。

图 1 抗体酶切纯化监测图



1, 2: 为完整 IgG 抗体; 3, 4: Fab 抗体; M: 蛋白相对分子质量标记物。

图 2 Fab 抗体变性 SDS-PAGE 电泳鉴定结果

2.3 Fab 抗体片段的鉴定 间接 ELISA 检测抗体 Fc 片段显示:完整 IgG 分子显色 (A 排) 而 Fab 抗体完全不显色 (B 排),说明 Fc 特异性的 HRP 标记山羊抗小鼠不与 Fab 结合,证明 Fab 抗体中 Fc 被完全切除。间接 ELISA 检测抗体免疫活性显示:完整 IgG 分子显色和 Fab 抗体均显色,且显色效果一致,证明 Fab 抗体保持了较好的抗原结合活性。见附图 1 (见《国际检验医学杂志网站主页“论文附件”》)。

2.4 类风湿因子阳性血清的干扰实验 三种不同检测方法在检测 NT-proBNP 阳性血清及阴性血清时结果一致,未出现漏检及假阳性情况。但在 24 例类风湿因子样本中,完整 IgG 分子 6C7 配对中出现 10 例阳性结果,而在 Roche E170 验证仅有 2 例为阳性,其余 8 份均为假阳性,6C7 切除 Fc 段以后配对仅检测出 2 例阳性,与 Roche E170 检测结果一致,因此切除 Fc 段后能消除类风湿因子对检测的干扰。

3 讨论

在单抗使用中常需要其进行改造,最常见是切除 Fc 段以减少治疗过程中导致的人抗鼠反应及诊断过程的假阳性问题。Fab 及 F(ab)₂ 是最常见的抗体片段,分别由木瓜蛋白酶及胃蛋白酶酶切获得。虽然 F(ab)₂ 保持 IgG 二价结合优于 Fab 抗

体,但 Fab 抗体 Fc 切除更完全、分子量更小易穿透等优点使其在医学上使用更加广泛^[6]。我国首个抗体药物即是由一株肝癌单克隆抗体 Fab 片段与碘 131 偶联的偶合物^[7]。

Fab 是由木瓜蛋白酶水解 IgG 的铰链区二硫键连接的 2 条重链的近 N 端获得,其酶切过程受缓冲环境、pH 及温度的影响^[8],一般先通过小规模酶切摸索最佳的酶切条件。酶切条件选择的一般条件是在相同酶切效果下最低的木瓜蛋白酶浓度及最短的酶切时间,因为过度酶切会影响 Fab 的产量及活性。抗体经酶切后的 Fab 分离一般均采用传统的蛋白 G/A 亲和层析及凝胶过滤或离子交换的方式,本文介绍的纯化方式与之比较具有以下优势:(1)操作快速简单,凝胶过滤每次处理及上样至少需要 6 h 以上,且需要专业的纯化设备。亲和层析纯化每步完成仅需半小时,手工及仪器均可完成。(2)适合大规模制备,凝胶过滤每次上样体积限制 2~5 mL,最大每次处理数十毫克的抗体,本方法仅需扩大亲和柱体积,即可完成克级抗体的处理。(3)Fab 抗体质量更高,双亲和层析法不仅可以完全去除 Fc 片段及加入的木瓜蛋白酶,还能去除酶切失活的 Fab 抗体及腹水制备过程中混入的“杂抗体”,达到二次纯化效果,这是其他纯化方式无法完成的。

NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow 活化偶联填料是 Amersham 公司的产品,是一种平均粒径 90 μm 的,含 16~23 μmol NHS/mL 活化基团的高效偶联填料,广泛应用于各类蛋白质相互作用研究及蛋白纯化研究^[9-10]。本研究选用该填料是利用其以下优点:(1)高偶联率,制备的抗原亲和柱平均每毫升的偶联填料中偶联蛋白 3.68 mg,偶联率为 92.1%,5 mL 填料理论结合对应抗体达 100 mg,适合大规模制备。(2)高稳定性,NHS-activated Sepharose 偶联蛋白后非常稳定,偶联分子不易脱落,即使在苛刻洗脱条件下也能保持稳定,避免脱落的偶联分子对制备的 Fab 抗体的污染。此外,耐高压及易清洗的特点利于填料的反复使用,适用于科研及生产。

本文成功建立了一种简单易行的抗体分离纯化抗体 Fab 片段的方法,该方法不仅操作简单,而且能提高纯化 Fab 抗体片段的纯度及亲和力,适用于科研或者生产中快速、高质量、大规模制备 Fab 抗体片段。

(上接第 459 页)

- [3] 房华,吴燕芬,汪瑞忠,等.全自动化学发光免疫分析仪在梅毒螺旋体抗体检测中的临床应用[J].中国皮肤性病学杂志,2010,24(7):671-672+682.
- [4] 孙峥嵘,孙皓,鲁润铭,等.梅毒螺旋体基因重组抗原酶联免疫吸附实验的探讨[J].中华微生物学和免疫学杂志,2000,20(1):78.
- [5] Wang L, Li L. Evaluation of immunoglobulin M and G Western blot and ELISA for screening antibodies to *Treponema pallidum* in blood donors[J]. Sex Transm Dis, 2009, 36(7):413-416.
- [6] 熊继红,卢建强,赵立光,等.化学发光法与 ELISA 法检测梅毒抗体的一致性比较[J].检验医学与临床,2011,8(3):284-285.
- [7] Marangoni A, Sparacino M, Mondardini V, et al. Comparative evaluation of two enzyme linked immunosorbent assay methods and three Western Blot methods for the diagnosis of culture-confirmed early Lyme borreliosis in Italy[J]. New Microbiol, 2005, 28(1):37-43.
- [8] 武建国.梅毒的实验室诊断与临床相关问题[J].临床检验杂志,

参考文献

- [1] 陈光.单克隆抗体技术历史与发展简述[J].生物学通报,2003,38(9):36-39.
- [2] Swayampakula M, Baral PK, Aguzzi A, et al. The crystal structure of an octapeptide repeat of the prion protein in complex with a Fab fragment of the POM2 antibody[J]. Protein Sci, 2013, 22(7):893-903.
- [3] Lam GK, Hopoate-Sitake M, Adair CD, et al. Digoxin antibody fragment, antigen binding (Fab), treatment of preeclampsia in women with endogenous digitalis-like factor: a secondary analysis of the DEEP Trial[J]. Am J Obstet Gynecol, 2013, 209(2):119.e1-119.e6.
- [4] 黎燕,冯健男,张纪岩.分子免疫学实验指南[M].北京:化学工业出版社,2008:265-270.
- [5] 王丹,赵美萍.利用亲和柱分离酶切产物制备抗体 Fab 片段[J].分析化学,2009,37(z1):882.
- [6] Shui X, Huang J, Li YH, et al. Construction and selection of human Fab antibody phage display library of liver Cancer[J]. Hybridoma, 2009, 28(5):341-347.
- [7] 施乐华,吴孟超.抗人肝癌单克隆抗体对荷瘤裸鼠的放射免疫定位及治疗[J].中华肿瘤杂志,1995,17(1):20-23.
- [8] Pace AL, Wong RL, Zhang YT, et al. Asparagine deamidation dependence on buffer type, pH, and temperature[J]. J Pharm Sci, 2013, 102(6):1712-1723.
- [9] Pitcovsky TA, Mucci J, Alvarez P, et al. Epitope mapping of transsialidase from *Trypanosoma cruzi* reveals the presence of several cross-reactive determinants[J]. Infect Immun, 2001, 69(3):1869-1875.
- [10] Langer RC, Schaefer DA, Riggs MW. Characterization of an intestinal epithelial cell receptor recognized by the *Cryptosporidium parvum* sporozoite ligand CSL[J]. Infect Immun, 2001, 69(3):1661-1670.

(收稿日期:2013-11-08)

2006,24(4):316-320.

- [9] 武雨霖,阮森林,王敏敏.梅毒螺旋体感染实验室诊断方法研究进展[J].中国微生态学杂志,2013,25(2):208-210.
- [10] Maple P, Ratcliffe d, Smit E. Characterization of *Treponema pallidum* particle agglutination assay-negative sera following screening by treponemal total antibody enzyme immunoassays[J]. Clinical and Vaccine Immunology, 2010, 17(11):1718-1722.
- [11] Kuznetsov Alexander Vasilevich. Molekularer Nachweis von *Treponema pallidum* mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Hybridisierung in verschiedenen Proben von Patienten mit Syphilis [D]. 2007.
- [12] Sun R, Lai DH, Ren RX, et al. *Treponema pallidum*-specific antibody expression for the diagnosis of different stages of syphilis [J]. Chin Med J (Engl), 2013, 126(2):206-210.

(收稿日期:2013-11-01)