

DOI: 10. 3969/j. issn. 1671-9638. 2013. 04. 001

· 论 著 ·

## 白假丝酵母菌天冬氨酸蛋白酶 Sap2 多克隆抗体的制备、纯化及鉴定

仇 萌, 邹先彪, 李 蕾

(中国人民解放军总医院第一附属医院, 北京 100048)

**[摘 要]** 目的 制备白假丝酵母菌天冬氨酸蛋白酶 Sap2 多克隆抗体, 并对其进行鉴定。方法 提取白假丝酵母菌基因组 DNA 为模板, 经聚合酶链反应(PCR)获取 SAP2 目的基因; 双酶切 SAP2 基因与原核表达载体 pMAL-c2x(+), 构建 pMAL-c2x/SAP2 重组质粒; 在大肠埃希菌 BL21(DE3)感受态细胞中经 IPTG 诱导表达出可溶性的融合蛋白; 用可溶性 Sap2 免疫小鼠制备抗血清, 间接酶联免疫吸附试验(ELISA)检测抗血清效价, 亲和层析法纯化抗血清后, 利用 Western 免疫印迹(Western Blot)检测抗体特异性。结果 该研究成功制备了抗 Sap2 多克隆抗体, 抗体效价  $>1:51\ 200$ ; Western Blot 检测结果表明, 该抗体可特异性识别 Sap2 蛋白。结论 纯化后的 Sap2 作为抗原免疫小鼠, 有较好的抗原性和免疫原性, 可成功制备多克隆抗体, 并具有高特异性, 为快速检测侵袭性白假丝酵母菌感染奠定了基础。

**[关 键 词]** 白假丝酵母菌; 分泌型天冬氨酸蛋白酶; 多克隆抗体; 抗原; 抗体

**[中图分类号]** R392.11 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2013)04-0241-06

## Preparation, purification and identification of polyclonal antibody against secretory aspartyl proteinase 2 of *Candida albicans*

QIU Meng, ZOU Xian-biao, LI Lei (The First Affiliated Hospital, General Hospital of PLA, Beijing 100048, China)

**[Abstract]** **Objective** To prepare and identify polyclonal antibodies against secretory aspartyl proteinase 2(Sap2) of *Candida albicans*. **Methods** *Candida albicans* genomic DNA was extracted as template, target gene fragment SAP2 was obtained by standard PCR amplification; SAP2 and plasmids pMAL-c2x(+) were cleaved with two restriction endonucleases, and digested products were joined, then the recombinant plasmid pMAL-c2x/SAP2 was constructed; Sap2 was expressed as soluble form after induced by IPTG in *Escherichia coli* strain BL21(DE3). Nine BALB/c mice were immunized with soluble Sap2, so as to produce antiserum against Sap2. The titer of antiserum was determined by indirect enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA). After purified by ProteinG affinity chromatography, anti-Sap2 polyclonal antibody was resolved by SDS-PAGE and its specificity was determined by Western Blot. **Results** Anti-Sap2 polyclonal antibody was successfully prepared and the titer was  $>1:51\ 200$ . The antibody could specifically recognize Sap2 by Western Blot analysis. **Conclusion** Soluble Sap2 protein can be used as antigen to immunize animal. It has better antigenicity and immunogenicity. Polyclonal antibody against Sap2 can be prepared by animal immunization and expressed high specificity, which has laid the foundation for development of rapid diagnosis of invasive *Candida albicans* infection.

**[Key words]** *Candida albicans*; secretory aspartyl proteinase; polyclonal antibody; antigen; antibody

[Chin Infect Control, 2013, 12(4):241-246]

随着医学技术的飞速发展,免疫抑制剂、皮质类固醇激素、抗菌药物等在临床广泛应用,器官移植、

[收稿日期] 2012-11-19

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30671892)

[作者简介] 仇萌(1981-),女(汉族),山东省济宁市人,主治医师,主要从事病原真菌学研究。

[通讯作者] 邹先彪 E-mail: xbzou@126.com

介入治疗、导管插管等技术也普遍开展,艾滋病等免疫障碍性疾病的逐渐流行,侵袭性白假丝酵母病呈持续上升趋势。侵袭性白假丝酵母病在侵袭性真菌病中居首位,且预后较差,病死率高。侵袭性白假丝酵母菌感染临床表现多样,缺乏特异性,早期诊断非常困难。常规的涂片检测操作简便,但检出率低,阴性结果也不能排除诊断,常需其他辅助方法。血培养阳性仍是假丝酵母菌血症诊断的金标准,但耗时长(1~4周),阳性率低(50%左右)。近年来,更多研究集中在免疫学检测,即抗原、抗体及代谢产物的血清学检测,如烯醇化酶、葡聚糖、甘露聚糖蛋白、热休克蛋白 90 及分泌型天冬氨酸蛋白酶等。本研究针对白假丝酵母菌重要的毒力因子——天冬氨酸蛋白酶,成功制备了多克隆抗体,为下一步建立快速诊断侵袭性白假丝酵母菌感染奠定实验室基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 试验菌株与质粒 白假丝酵母菌标准株 SC 5314 由北京大学第一医院皮肤科真菌实验室惠赠;原核表达载体 pMAL-c2x 购自北京鼎国昌盛生物技术有限公司。

1.1.2 实验动物 采用 6 周龄 BALB/c 小鼠 9 只,体重(20±2)g,SPF 级,由维通利华实验动物中心提供。

1.1.3 工具酶及主要试剂 Pyrobest DNA 聚合酶、T4DNA 连接酶、LA Taq DNA 聚合酶、限制性内切酶 EcoR I 及 Sal I 均购自 TaKaRa 公司;RNase I 购自 Sigma 公司;IPTG 购自上海生工生物工程公司;DNA 片段玻璃奶纯化回收试剂盒购自北京博大泰克生物科技有限公司;酸化玻璃珠购自 sigma 公司;克隆用大肠埃希菌(*E. coli*) TOP10 购自康为世纪生物科技有限公司;表达用 *E. coli* BL21 (DE3)感受态细胞购自天根生化科技北京有限公司;Amylose resin(直链淀粉树脂)及 Factor Xa 蛋白酶购自 NEB 公司;弗氏完全佐剂及弗氏不完全佐剂购自 Sigma 公司;羊抗鼠 IgG-HRP 购自北京索莱宝生物科技有限公司;HiTrap™ protein G HP 亲和层析柱购自 Amersham Pharmacia Biotech 公司;ECL Western Blot Kit 高灵敏度化学发光检测试剂盒购自北京康为世纪生物科技有限公司。

### 1.2 方法

1.2.1 白假丝酵母菌总 DNA 提取 将白假丝酵

母菌 SC 5314 株接种于马铃薯斜面培养基,37℃ 孵育 48 h,挑选数个大的、新鲜培养的克隆,通过玻璃珠法提取白假丝酵母菌总 DNA。

### 1.2.2 聚合酶链反应(PCR)扩增 SAP2 目的片段

查找 GenBank 中白假丝酵母菌 SC 5314 株的 SAP2 核苷酸序列(Genbank, XM\_705969),根据 SAP2 的编码序列和原核表达载体 pMAL-c2x 序列的酶切位点设计引物,上游引物:5'-CCG CAATTC ATGCAAGCTGTCCAGTGAC-3';下游引物:5'-CCGGTTCGACGGTCAAGGCAGAAATAC-3'(下划线部分为 EcoR I、Sal I 酶切位点,斜体部分为保护性碱基)。以白假丝酵母菌 SC 5314 的全基因组 DNA 为模板,根据以上引物,利用 Pyrobest DNA 合成酶进行 PCR 扩增,获得 SAP2 目的片段(169~1 194 bp)。PCR 条件为 94℃ 预变性 5 min,94℃ 变性 30 s,50℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 1 min,共 30 个循环,最后 72℃ 延伸 10 min,4℃ 贮存 PCR 产物。采用柱式胶回收,PCR 产物纯化试剂盒回收及纯化 SAP2 目的片段。

1.2.3 重组原核表达质粒的构建及鉴定 将含有 pMAL-c2x 的 *E. coli* TOP10 接种至 2 mL Amp<sup>r</sup> LB 液体培养基中(ampicillin:100 μg/mL),于 37℃ 剧烈振荡(200 r/min)培养过夜增菌,用 SDS 碱裂解法提取质粒 DNA。将纯化的 SAP2 基因片段与原核表达质粒 pMAL-c2x 在 37℃ 下经过 EcoR I 和 Sal I 双酶切 2 h。双酶切产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后,在紫外灯下收取双酶切目的片段及质粒,用 DNA 片段玻璃奶快速回收至纯化试剂盒纯化双酶切产物。按载体 DNA 与插入 DNA 片段的比例[1:3~1:4(摩尔比)]估算出连接中各自 DNA 加入的量,在 T4DNA 连接酶的作用下,充分混匀,16℃ 过夜连接,连接产物 4℃ 保存。用 CaCl<sub>2</sub> 法制备并转化 *E. coli* TOP10 感受态细胞,挑选阳性克隆菌提质粒,进行酶切鉴定和测序分析。

### 1.2.4 SAP2 基因原核表达

1.2.4.1 少量 IPTG 诱导表达 将重组原核表达载体 pMAL-c2x/SAP2 转化感受态细胞 BL21 (DE3),挑取单菌落至 3 mL Amp<sup>r</sup> LB 培养基中(ampicillin:100 μg/mL,蔗糖 0.2 mol/L),37℃ 剧烈振荡过夜培养,次日分别取 150 μL 过夜培养菌液转接于 2 支含 5 mL Amp<sup>r</sup> LB 培养基的试管中,37℃ 振荡继续培养 2.5 h;OD<sub>600</sub> 为 0.6~0.8 时,向其中一支试管中加入 IPTG 至终浓度 0.2 mmol/L,以 16℃ 继续诱导培养 14 h,同时设不加 IPTG 诱

导的菌液为对照组。4 000 r/min 离心 10 min 收集菌体沉淀,重悬于 1 mL 的 PBS 中,诱导组利用超声破碎仪破菌,并在 13 000 r/min,4℃ 离心样品 20 min,留取诱导上清及诱导沉淀样品。最后取 10  $\mu$ L 留取的样品,加入 5 $\times$  loading buffer 中,混匀后煮沸 20 min,冷却后 10 000 r/min 离心 1 min,采用 SDS-PAGE 电泳检测目的蛋白的表达情况。

1.2.4.2 大量诱导表达目的蛋白 按照试表达的条件扩大培养基至 1 L,其余条件同上。

1.2.5 目的蛋白纯化 从 4℃ 冷柜中取出 Amylose Resin 10 mL 装入 2.5 cm $\times$ 10 cm 的层析柱中,自然沉降后装好柱头,利用平衡缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4; 0.2 mol/L NaCl; 1 mmol/L EDTA)平衡约 9 个柱体积,超声破碎后离心上清(13 000 r/min, 30 min)40 mL 上柱,控制流速 1 mL/min,流穿样品收集后再次上柱,重复 3 次,以确保蛋白与层析柱充分结合。用平衡缓冲液冲洗纯化柱约 12 个柱体积,至检测不到蛋白洗出为止。取出介质(10 mL)装入 50 mL 离心管中,加入 300  $\mu$ L Xa 因子封好管口后,置于静音螺旋混合仪上,4℃ 混合过夜酶切。酶切后的介质重新装柱,收集流穿,再用平衡缓冲液冲洗约 2 个柱体积收集流穿液,即为酶切后目的蛋白。

1.2.6 鼠抗血清制备 取可溶性 Sap2 蛋白用 PBS 稀释后配制成 0.5 mg/mL 溶液,初次免疫时,将等量 rSap2 和弗氏完全佐剂各 500  $\mu$ L 混合后充分乳化。选取 9 只 6 周龄 BLAB/c 小鼠,经左/右侧后肢胫前肌注射 rSap2 蛋白,初次免疫剂量为每只 50  $\mu$ g。初次免疫后第 14、21、28 d 加强免疫,免疫剂量为每只 25  $\mu$ g,共加强免疫 3 次。加强免疫时与弗氏不完全佐剂 1:1 混匀,方法同上。末次免疫后 7 d 采尾静脉血 50~100  $\mu$ L,并以 13 000 r/min 离心 5 min,获取血清约 30~50  $\mu$ L,采用间接酶联免疫吸附试验(ELISA)测定效价。

1.2.7 间接 ELISA 法测定抗血清效价 用包被缓冲液将 rSap2 稀释至终浓度 5  $\mu$ g/mL,加入 96 孔酶标板中,每孔 100  $\mu$ L,4℃ 过夜。PBST 洗板 3 次,加 150  $\mu$ L/孔封闭液,37℃ 封闭 2 h, PBST 洗板 3 次,将抗血清倍比稀释,稀释比例依次为 1:100、1:200、1:400、1:800、1:1 600、1:3 200、1:6 400、1:12 800、1:25 600、1:51 200,每孔 100  $\mu$ L,37℃ 孵育 1 h。同时用 PBS 作空白对照,正常小鼠血清作阴性对照。洗板 4 次。取辣根酶标记的羊抗鼠 IgG 按 1:2 000 稀释后,每孔 100  $\mu$ L,37℃ 孵育 30 min,洗

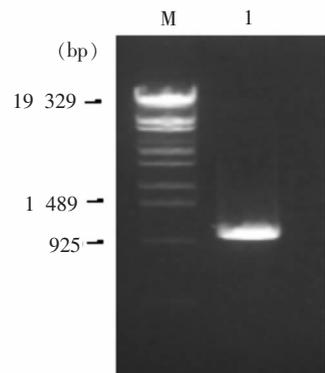
涤 4 次。每孔加入 100  $\mu$ L TMB 底物缓冲液,37℃ 显色 15 min 后,每孔加入 50  $\mu$ L 终止液(2 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>),将酶标板放入酶标仪,以 450 nm 单波长测定各孔 OD 值,以 OD<sub>450</sub>>2.1 倍阴性对照孔的血清最高稀释倍数作为抗血清 ELISA 效价。

1.2.8 抗血清的纯化 将抗血清用 PBS 稀释 4 倍,0.45  $\mu$ m 微孔滤膜过滤备用。准备 5 mL protein G 亲和层析填料,装入层析柱,利用 10 倍于床体积并经过预冷的 PBS 缓冲溶液平衡亲和柱至基线平稳,将流速调整为 1 mL/min,并将预装柱与蠕动泵和检测仪、记录仪连接好,注意避免气泡进入。按 1 mL/min 流速,将抗血清样品上柱,收集流穿液;将流穿液再次上柱,继续平衡至基线平稳。加入 2 倍柱体积的 pH 2.7 甘氨酸洗脱液洗脱,夹住流出管,静置 5 min 后收集洗脱液,重复 3 次。之后立即加入 100  $\mu$ L 1 mol/L Tris-HCl(pH 8.0)的中和缓冲液,使其 pH 值接近 7.0。用结合液冲洗柱子至 pH 值与结合液相同,再用 PBS 平衡至基线。用 BCA 法测定纯化后多克隆抗体的浓度。

1.2.9 鼠抗 rSap2 多克隆抗体的特异性鉴定 将可溶性 Sap2 蛋白上样 5  $\mu$ g 行 SDS-PAGE 电泳,转膜后将抗 Sap2 多克隆抗体 1:1 000 稀释作一抗,HRP 标记的羊抗鼠 IgG(工作浓度 1:10 000)作二抗,使用 ECL Western Blot Kit 高灵敏度化学发光检测试剂盒显色,行 Western 免疫印迹(Western Blot)分析。

## 2 结果

2.1 SAP2 目的片段 PCR 扩增 SAP2 目的片段,1%琼脂糖凝胶电泳显示,在约 1 026 bp 处有一清晰条带,与预期分子量大小一致。见图 1。

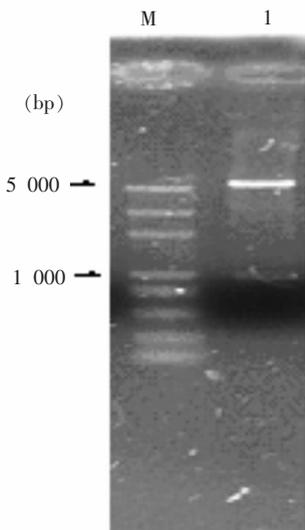


M:  $\lambda$ -EcoT14 I digested DNA marker; 1: SAP2 gene

图 1 PCR 扩增产物 SAP2 基因

Figure 1 Gel electrophoresis of PCR product of SAP2

2.2 重组载体的酶切鉴定结果 酶切后,质粒 DNA 在凝胶上出现一条与 pMAL-c2x 质粒大小 (6 700 bp) 相符的条带和一条与 SAP2 基因片段大小 (1 026 bp) 相符的条带。见图 2。



M: DL2000 plus DNA marker; 1: pMAL-c2x/SAP2 fragment

图 2 重组载体 pMAL-c2x/SAP2 双酶切鉴定

Figure 2 Identification of recombinant plasmid pMAL-c2x/SAP2 by restriction endonucleases digestion

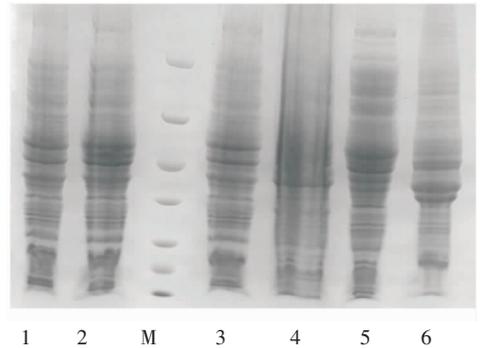
2.3 重组载体的测序结果 将重组载体 pMAL-c2x/SAP2 送至公司测序,测序结果与 GenBank 中白假丝酵母菌标准株 SC 5314 的 SAP2 基因序列进行同源性对比,发现 1 处发生碱基置换,即 468 位 A → T,但编码的氨基酸相同,且 SAP2 基因插入的方向正确,保证了氨基酸序列的编码正确性,表明重组质粒构建成功。

2.4 重组载体 pMAL-c2x/SAP2 的可溶性表达 转入 *E. coli* BL21 (DE3) 的 pMAL-c2x/SAP2 在 16℃ 下经 IPTG 诱导 14 h 表达出目的蛋白,通过 SDS-PAGE 电泳分析目的蛋白主要以可溶性蛋白形式存在,表达量约占总蛋白的 10%,沉淀占总表达量的 10%。见图 3。

2.5 目的蛋白纯化 将诱导表达的蛋白超声破碎后,用淀粉树脂对其亲和层析纯化及蛋白酶切后,结果显示,41 kD 处有一明显条带,蛋白纯度 >90%。见图 4。

2.6 抗血清的效价检测 通过间接 ELISA 法检测抗体,其滴度值见表 1,滴度曲线见图 5。效价达到

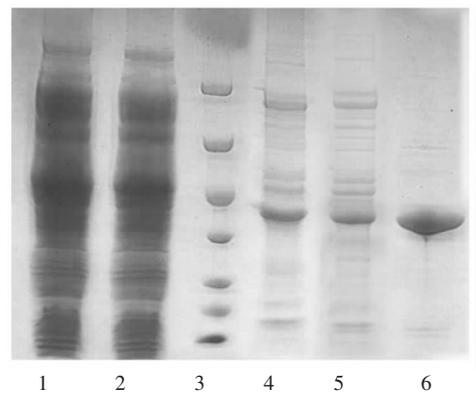
1 : 51 200 以上,以免疫前小鼠血清作为阴性对照,显色呈阴性,表明 rSap2 蛋白免疫小鼠产生了较高滴度的抗体。



1: Total bacteria of BL21 (DE3) transformed with pMAL-c2x without IPTG induction; 2: Total bacteria of BL21 (DE3) transformed with pMAL-c2x with IPTG induction; M: Protein marker (from top to bottom: 116, 66, 45, 35, 25, 18, 14, 4 kD); 3: Total bacteria of BL21 (DE3) transformed with pMAL-c2x/SAP2 without IPTG induction; 4: Total bacteria of BL21 (DE3) transformed with pMAL-c2x/SAP2 with IPTG induction; 5: Supernatant of BL21 (DE3) transformed with pMAL-c2x/SAP2 with IPTG induction; 6: Precipitation of BL21 (DE3) transformed with pMAL-c2x/SAP2 with IPTG induction

图 3 重组载体 pMAL-c2x/SAP2 的诱导表达

Figure 3 Expression of recombinant plasmid pMAL-c2x/SAP2 with IPTG induction



1: Supernatant of BL21 (DE3) transformed with pMAL-c2x/SAP2 with IPTG induction; 2: The eluent collected after adding the supernatant into Amylose Resin column; 3: Protein marker (from top to bottom: 116, 66, 45, 35, 25, 18, 14, 4 kD); 4: The eluent collected after washing the column with binding buffer; 5: Purified MPB-Sap2 protein; 6: Target protein cleaved by Xa factor

图 4 目的蛋白的纯化

Figure 4 Purification of target protein

表 1 间接 ELISA 法测定抗血清的滴度值

Table 1 Titer of antiserum detected by indirect ELISA

Titer	Negative control	Blank	Dilution ratio									
			1 : 100	1 : 200	1 : 400	1 : 500	1 : 1 600	1 : 3 200	1 : 6 400	1 : 12 800	1 : 25 600	1 : 51 200
OD	0.04	0.03	2.95	2.49	2.13	1.75	1.42	1.13	0.83	0.48	0.26	0.13

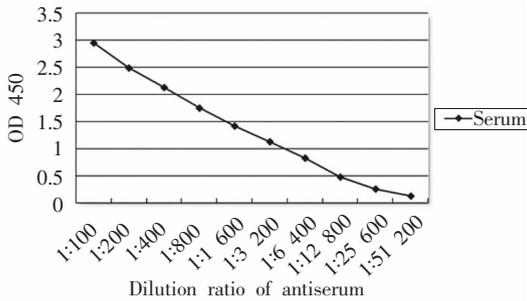


图 5 间接 ELISA 法测定抗血清的滴度曲线图

Figure 5 Curve chart of the titer of antiserum detected by indirect ELISA

2.7 抗血清的纯化 将抗血清进行 Protein G 亲和层析纯化后行 SDS-PAGE 电泳检测, 25 kD 和 55 kD 处可见 2 条清晰的条带, 即抗体的轻链和重链, 无杂蛋白带出现, 见图 6。纯化后的抗体经 BCA 法测定浓度为 1.5 mg/mL。

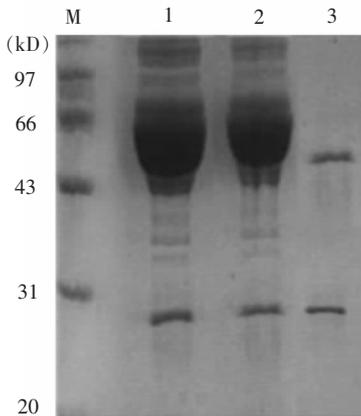
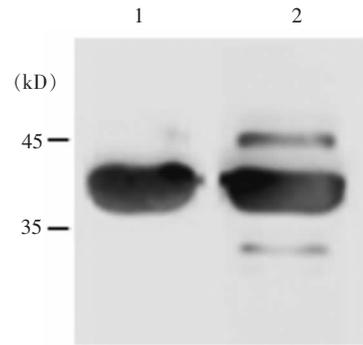


图 6 SDS-PAGE 分析纯化的抗 Sap2 多克隆抗体

Figure 6 SDS-PAGE analysis of the purified anti-Sap2 polyclonal antibody

2.8 Western Blot 分析多克隆抗体的特异性 经 Western Blot 分析, 多克隆抗体能与 Sap2 蛋白特异性结合, 在分子量约为 41 kD 处有蛋白杂交带, 见图 7。



1: Purified antibody; 2: Antiserum before purification

图 7 Western Blot 分析抗 Sap2 多克隆抗体特异性

Figure 7 Western Blot analysis of specificity of anti-Sap2 polyclonal antibody

### 3 讨论

白假丝酵母菌归于隐球菌科假丝酵母菌属, 致病力强, 在人体免疫力极低情况下, 易发生侵袭性感染, 常危及生命。白假丝酵母菌毒力因子包括其黏附性、菌丝形成、表型转换及胞外水解酶等。胞外水解酶中的 Sap 与白假丝酵母菌的致病性密切相关, 可水解宿主细胞的膜蛋白, 通过黏附、入侵组织破坏宿主的防御系统来避免或抵御杀菌剂的进攻<sup>[1]</sup>。

本研究从白假丝酵母菌标准菌株 SC 5314 中克隆出 SAP2 基因, 与原核载体 pMAL-c2x 双酶切后成功构建重组表达质粒 pMAL-c2x/SAP2。载体的选择对后期表达出大量可溶性蛋白至关重要。pMAL-c2x 载体是一种高效的蛋白融合表达及纯化系统, 含有 MBP 的 *E. coli malE* 基因, 其下游的多克隆位点有利于目的基因插入, 利用 tac 强启动子和 *malE* 翻译的转录起始信号可以高效表达目的基因。我们选用了 *E. coli* BL21(DE3) 作为蛋白表达的宿主菌, 此菌种具备 ompT 蛋白酶缺陷和 Lon 蛋白酶缺陷的特点<sup>[2]</sup>, 使得 BL21(DE3) 表达外源蛋白时, 不但细胞裂解后的蛋白酶解作用降低, 同时胞内转化也减少, 从而提高蛋白表达水平。外源基因在 *E. coli* 中高表达时, 为尽量避免包涵体出现, 本研究摸索了 IPTG 浓度、低温诱导、最佳温度等影响融合蛋白表达效率的条件。于 37°C 用 0.5 mmol/L、

1 mmol/L IPTG 分别诱导 4、8、12 h 表达重组蛋白,得到的均为包涵体,将诱导温度降至 16℃,IPTG 浓度降至 0.2 mmol/L,诱导时间延长至 14 h,得到了理想的诱导效果。为获得高纯度的目的蛋白,选用直链淀粉树脂对带 MBP 亲和和标签的融合蛋白进行亲和层析纯化,并用生理缓冲液洗脱,避免了去污剂对蛋白活性的影响。一般来讲,*E. coli* 中合成的融合蛋白通常都是较好的免疫原,但目的蛋白 N 端 MBP 标签的存在,可能会影响其生物活性,故获得天然的具有生物活性的靶蛋白,需要将标签去除,*E. coli* malE 蛋白编码序列下游是编码 Xa 因子识别位点的序列,通过载体上带有位点专一性的蛋白酶 Factor Xa 切除 MBP 标签,获得高纯度融合蛋白,为下一步免疫动物制备多克隆抗体奠定基础。

单克隆抗体虽具备较高的特异性、稳定性和重复性,但存在制备复杂、耗时、成本昂贵等缺点。与之相比,多克隆抗体制备周期短、成本低,制备方法快速、简单,可广泛应用于检测领域,具备良好的应用前景。多克隆抗体成功制备的关键取决于抗原的质量。抗体的高效价、高特异性与抗原的纯度、浓度密切相关。本研究免疫动物的抗原为纯化后的 Sap2 可溶性蛋白,不带任何标签,纯度 >90%,浓度为 6.5 mg/mL,具备较强的免疫原性。

单纯使用免疫原免疫动物,免疫效应低,联合佐剂可增强机体对抗原的特异性免疫应答,从而扩大免疫应答效应。与不使用佐剂相比,使用佐剂抗原的剂量可减少 10~20 倍<sup>[3]</sup>。免疫得到的抗血清经纯化后可提高特异性,有利于实验室检测 Sap2 抗原的研究。因为抗血清中含白蛋白等其他蛋白成分,可干扰抗体标记反应及抗原抗体反应,应进行纯化提取单一的 IgG 抗体成分。多克隆抗体纯化方法包括硫酸铵沉淀法、凝胶过滤层析法、离子交换层析及亲和层析法等。大量研究<sup>[4-8]</sup>证明,亲和层析法是一种最有效的生物活性物质纯化方法,与其他纯化方法相比,除通过对抗体特异性吸附和分离就提纯数百倍外,抗体在纯化过程中得到浓缩,结合到亲和配基后,其余能破坏蛋白成分的蛋白水解酶可以被去除,性质更加稳定,提高了活性回收率。故亲和层析法纯化抗体可以减少纯化步骤,缩短纯化时间,具备耗时短、效率高的优点。Protein G 是从链球菌表面分离出的一种胞壁蛋白,具有 IgG Fc 段结合位点,与金黄色葡萄球菌的 Protein A 相比,可与人、山羊、绵羊、兔、豚鼠、马、猪、猴、小鼠等更多种哺乳动物的 IgG 特异性结合,尤其对小鼠的 IgG 有高亲

和力<sup>[9]</sup>,目前,已广泛应用于纯化多克隆抗体和单克隆抗体。Protein G 是通过基因工程制备的重组蛋白,去除了天然链球菌 G 蛋白与白蛋白结合的区域,减少了交叉反应和非特异性结合,故具有更高的特异性<sup>[10-11]</sup>。本研究中使用的是 HiTrap™ Protein G HP 亲和层析柱,这是一种新的基于重组蛋白 G 的层析介质,使用了多位点交联技术,捕获抗体效率高且经济实惠,其动态结合能力比市面上其他基于蛋白 G 的层析介质要高 20%,可获得高纯度高质量的多克隆抗体。将纯化后的抗体进行 Western Blot 分析,结果显示在 41 kD 位置形成特异性条带,制备的抗 Sap2 多克隆抗体能够特异性识别 Sap2 抗原,表明抗体特异性高,为下一步建立快速诊断侵袭性白假丝酵母菌感染奠定了实验室基础。

#### [参考文献]

- [1] Calderone R, Fonzi W. Virulence factors of *Candida albicans* [J]. Trends Microbiol, 2001, 9(7): 327-335.
- [2] Damerou K, St John A C. Role of Clp protease subunits in degradation of carbon starvation proteins in *Escherichia coli* [J]. J Bacteriol, 1993, 175(1): 53-63.
- [3] Jain S, Ponnmarappan S, Kumar O, et al. Effect of adjuvants on antibody titer of synthetic recombinant light chain of botulinum neurotoxin type B and its diagnostic potential for botulism [J]. J Microbiol Biotechnol, 2011, 21(7): 719-727.
- [4] Gagnon P. Technology trends in antibody purification [J]. J Chromatogr A, 2012, 1221: 57-70.
- [5] Ayyar B V, Arora S, Murphy C, et al. Affinity chromatography as a tool for antibody purification [J]. Methods, 2012, 56(2): 116-129.
- [6] Liu H F, Ma J, Winter C, et al. Recovery and purification process development for monoclonal antibody production [J]. MAbs, 2010, 2(5): 480-499.
- [7] Grodzki A C, Berenstein E. Antibody purification: affinity chromatography-protein A and protein G Sepharose [J]. Methods Mol Biol, 2010, 588: 33-41.
- [8] Schenk J A, Fettke J, Lenz C, et al. Secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) might contaminate murine monoclonal antibodies after purification on protein G [J]. J Biotechnol, 2012, 158(1-2): 34-35.
- [9] 白丽, Lindsay. 应用 Protein G 纯化细胞培养上清中的大鼠单抗 [J]. 免疫学杂志, 1999, 15(3): 207-209.
- [10] Fitzgerald J, Leonard P, Darcy E, et al. Immunoaffinity chromatography [J]. Methods Mol Biol, 2011, 681: 35-59.
- [11] Arnold M, Bittermann H, Kalbfuss-Zimmermann B, et al. Antibody purification by affinity chromatography based on small molecule affinity ligands identified by SPR-based screening of chemical microarrays [J]. J Chromatogr A, 2011, 1218(29): 4649-4659.