



兔抗狨猴 IgG-HRP 标记抗体的制备及初步鉴定

丛日旭,刘先菊,滕永康,向志光,佟巍,张丽芳,阮研硕,刘云波*

(中国医学科学院医学实验动物研究所,北京 100021)

【摘要】 目的 狨猴血清中纯化 IgG 抗体,制备兔抗狨猴抗血清,并纯化抗血清中 IgG,HRP(辣根过氧化物酶)标记兔抗狨猴 IgG。**方法** HiTrap™ Protein G 亲和层析纯化狨猴和兔抗狨猴血清 IgG,十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)进行纯度鉴定,免疫琼脂双扩散法(double immunodiffusion assay)测定制备的兔抗狨猴抗血清效价,改良“简易过碘酸钠标记法”制备兔抗狨猴 IgG-HRP 标记抗体,酶联免疫吸附测定法(ELISA)及蛋白免疫印迹法(Western blotting)对兔抗狨猴 IgG-HRP 标记抗体进行工作浓度测定及特异性鉴定。**结果** 狨猴和兔抗狨猴血清纯化 IgG 纯度分别大于 95%、97%;兔抗狨猴 IgG 抗血清的效价为 1:64。ELISA 和 Western blotting 鉴定了兔抗狨猴 IgG-HRP 酶标抗体参考工作浓度为 1:256 000、1:15 000,特异性明显。**结论** 制备狨猴 IgG-HRP 标记抗体并初步鉴定,包括 ELISA 及 Western blotting 的特异性及使用浓度,为狨猴病原体免疫学检测体系及分子免疫学检测体系储备了资源。

【关键词】 狨猴;抗体制备;酶标抗体

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 06-0101-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.06.018

Preparation and identification of rabbit anti-marmoset IgG-HRP conjugate antibody

CONG Rixu, LIU Xianju, TENG Yongkang, XIANG Zhiguang, TONG Wei, ZHANG Lifang, RUAN Yanshuo, LIU Yunbo*
(Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS) & Peking Union Medical
Collage (PUMC), Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective To purify marmoset serum IgG, prepare and identify the antiserum and the rabbit anti-marmoset antibody IgG-HRP (horseradish peroxidase). **Methods** Using SDS-PAGE analysis to identify the serum IgG from HiTrap™ Protein G. The antiserum titer was determined by double immunodiffusion assay. The rabbit anti-marmoset IgG was labeled with HRP by improved sodium periodate method. ELISA and western blotting were used to evaluate the concentration and specificity of rabbit anti-marmoset IgG-HRP. **Results** The purity of purified marmoset serum IgG determined by SDS-PAGE was higher than 95%, and the anti-serum titer of the anti-marmoset IgG polyclonal antibody was 1:64. The concentration of rabbit anti-marmoset IgG-HRP identified by direct ELISA was 1:256 000, and that by western-blotting was 1:15 000, with a strong specificity. **Conclusions** The IgG-HRP marker antibody is prepared and the specificity and concentration are identified by ELISA and western blotting. It reserves the resources for the detection system of marmoset pathogens and the molecular immunological testing system.

【Key words】 marmoset; preparation of antibodies; rabbit anti-marmoset IgG-HRP

[基金项目]北京市科技计划(Z161100000216154);国家重点研究计划(2017YFA0105201)。

[作者简介]丛日旭,女,硕士研究生,研究方向:动物学。E-mail: congrixu0805@163.com

[通信作者]刘云波,教授,研究方向:实验动物质量控制。E-mail: yunbolu@126.com

普通狨猴(common marmoset, *Callithrix jacchus*) 属于灵长目(primates) 狨猴科(callitrichidae) 由于具有独特的微小体型、多胎繁殖、易在笼具环境里饲养及操作方便、与人类细胞因子或激素的存在交叉反应、独特的行为和认知特点等优点^[1-2], 被不同生物医学研究领域的研究学者们广泛关注, 是脑发育、行为学、病毒学、免疫学、生殖生理等学科的重要实验动物模型^[3-5], 尤其是近年来在神经学科方面的研究价值, 已逐渐得到有关学者的关注及认可。此外, 自 2009 年以来, 国外有关学者陆续报道了转基因狨猴^[6-7], 随着“帕金森综合征”等转基因狨猴的问世这一突破性进展, 又为生物医学的深入探索性研究提供了重要的实验动物模型, 狨猴也因此将进一步发挥它的研究价值。但由于普通狨猴及其他非人类灵长类患病种类繁多, 为了排除患病个体, 保障人员安全与提高实验的准确性, 需要建立相应的诊断方法。其中血清学方法是诊断疾病的有效手段之一。

本文鉴于“狨猴微生物、寄生虫学检测标准制定”, 制备了兔抗狨猴 IgG-HRP 并对其工作浓度初步鉴定, 为狨猴病原微生物及突发传染病的血清学检测体系、制定实验用狨猴病原微生物标准提供了技术资源。

1 材料和方法

1.1 实验动物

狨猴 5 只, 3~4 岁, 体重 280~340 g, 由中国医学科学院医学实验动物研究所提供[SCXK(京)2014-0011][SYXK(京)2017-0027], 实验动物伦理委员会批准号:LYB18003。饲养在实验动物资源北方中心慢病间狨猴饲养室(普通环境)。

1.2 主要试剂及仪器

弗氏完全佐剂(Sigma, F5881); 辣根过氧化物酶 HRP(Sigma, P2088); BCA 试剂盒(Thermo, 23227); 琼脂糖(Biowest, 111860); 脱脂奶粉(BD, 232100); TMB(Solarbio, PR1200); 分子蛋白量标准(Thermo Fisher, 26619); Western blotting 显色底物(Millipore, WBKLS0500)。

低温离心机(Thermo, Heraeus Fresco 21 centrifuge); 蛋白分离纯化系统(Bio-Rad, DUO-FLOW); 电泳仪(Bio-Rad, 163BR10305); 酶标仪(Perkin Elmer EnSpire® 2300 Multimode Plate Reader); 全自动化学发光成像分析系统(Tanon 5500); HiTrap™ Protein

G(GE Healthcare, 71-7001-00 AR); Sephacryl™ S-300 High Resolution(GE Healthcare, 17-0599-10)。

1.3 实验方法

1.3.1 血清的收集

根据实验动物操作规范, 保定狨猴, 消毒, 采集后肢静脉血, 并结束时压迫止血, 将血液放于室温静置 1.5 h 后, 低温离心机 4℃, 4000 r/min, 离心 20 min, 吸取上层血清。

1.3.2 狨猴血清 IgG 纯化和纯度鉴定

亲和层析柱法是利用生物大分子在一定条件下能紧密的结合(抗原-抗体), 可以将目的抗原从溶液中转移和分离和提纯。参考文献报道的方法^[9-13]。安装预处理的亲和层析柱 Protein G 5 mL, 紫外监测设为 0.05, 血清用 20 mmol/L, pH 7.0 PBS 结合缓冲液(binding buffer) 4.5 倍稀释后过滤(0.45 μm NC), 上样速度设为 1 mL/min, 用 50 mL(10 倍柱体积(CV))的结合缓冲液洗去未与 protein G 结合的杂蛋白, 25 mL(5 倍 CV)的 0.1 mol/L, pH 2.7 甘氨酸洗脱液洗脱目的蛋白即狨猴 IgG, 接收洗脱峰。合并各管蛋白溶液, BCA 法测定蛋白含量。

10% SDS-PAGE 电泳鉴定亲和层析纯化狨猴 IgG 的纯度是否符合免疫原的条件。

1.3.3 狨猴抗血清的制备和纯化

用 1.3.2 纯化的狨猴 IgG 作为免疫原, 对健康成年新西兰大白兔进行免疫^[14], 初次免疫采用 IgG 剂量为每次 0.5 mg, 与弗氏完全佐剂 1:1 混合, 采用背部多点皮下注射法每点 0.1~0.2 mL, 一只动物注射点数约为 8~10 点, 共计注射每只 1 mL。两周后采用 IgG 剂量为每次 0.25 mg, 加强免疫 3 次, 免疫方法同初次免疫。免疫结束 1 周后, 保定采血(兔耳缘静脉), 4000 r/min, 20 min, 分离血清。

Double immunodiffusion assay, 1% 琼脂糖对血清效价进行测定。

兔抗狨猴抗血清纯化及鉴定按照 1.3.2 进行。

1.3.4 兔抗狨猴 IgG-HRP 的制备和工作浓度测定

采用改良的“简易过碘酸钠(NaIO₄) 标记法”^[15]制备兔抗狨猴 IgG-HRP。

1.3.4.1 用 ELISA 法测定标记抗体的工作浓度^[14]

将亲和纯化的狨猴 IgG, 稀释成 10 μg/mL 每孔加 100 μL(每孔 1 μg), 包被 96 孔酶标板, 酶标抗体作倍比系列稀释(1:8000, 1:16 000, ……1:512 000), 每孔 100 μL 分别加入酶标板; 温箱孵育(37℃, 1

h)-洗涤-显色(TMB)-终止反应(H₂SO₄)-读取 OD 值(450 nm),当 OD 值等于 1.0 时对应的兔抗狨猴 IgG-HRP 稀释度,为酶标抗体的适宜工作浓度。

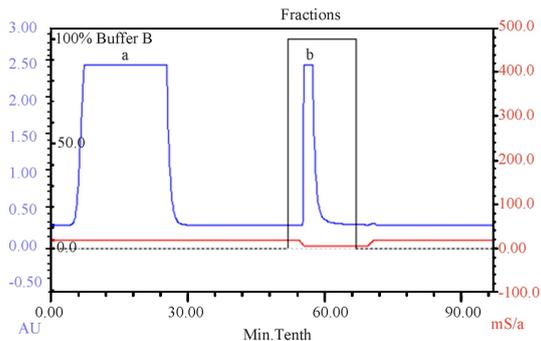
1.3.4.2 用 Western blotting 法^[9, 10, 14]检测兔抗狨猴 IgG-HRP 及狨猴 IgG 工作浓度

亲和纯狨猴 IgG,上样量分别为 25、20、15、10、5、2.5 ng;进行 10% SDS-PAGE 电泳,100 V,2 h;电转 PVDF 膜,110 V,1 h,将兔抗狨猴 IgG 酶标抗体用 PBST + 5% 脱脂奶粉(1:1)做系列稀释 1:5000、1:10 000、1:15 000,与 IgG-PVDF 孵育(1 h),洗涤,曝光成像留取结果。

2 结果

2.1 狨猴 IgG 的亲亲和层析纯化

紫外检测仪显示到两个蛋白质吸收峰:结合缓冲液洗脱的血清中未与 protein G 亲和柱结合的蛋白所显示的峰(穿流峰)(见图 1a);洗脱缓冲液使目的蛋白 IgG 与亲和层析柱分离的峰(洗脱峰)(见图 1b)。收集洗脱峰的液体是与亲和柱结合的狨猴 IgG。



注:(a)穿流峰;(b)洗脱峰。

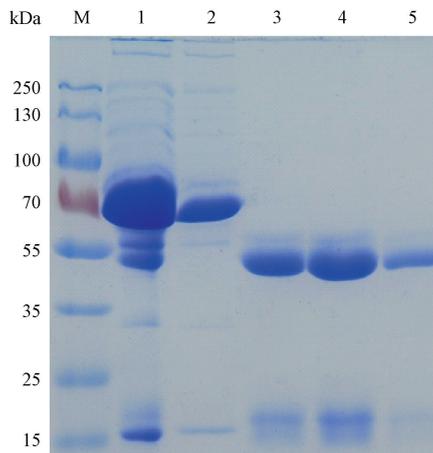
图 1 狨猴 IgG 亲和纯化紫外监测峰图

Note:(a) Passing through the peak. (b) Elution peak.

Fig. 1 UV-monitoring of the marmoset IgG purified using protein G affinity chromatography

2.2 狨猴 IgG 的 SDS-PAGE 电泳分析

还原的亲和层析狨猴血清 IgG(100℃,4 min),经 10% SDS-PAGE 电泳分离,考马斯亮蓝(Coomassie brilliant blue)R250 染色,脱色观察结果,其纯度可大于 95%(见图 2),除重链(55 × 10³)和轻链(25 × 10³),上样量达到 30 μg 时未见杂蛋白(见图 2, Lane 4 所示)。染色结果说明亲和层析 Protein G 与狨猴血清 IgG 具有较强的结合力,形成了紧密复合物,得到高纯度的狨猴 IgG。



注: M 为分子蛋白量标准; Lane 1 为狨猴血清; Lane 2 为穿流峰蛋白; Lane 3~5 亲和纯狨猴 IgG 加样量为 20 μg, 30 μg, 10 μg。

图 2 狨猴血清 IgG 纯度电泳鉴定

Note. M: Standard protein marker. Lane 1: The complete serum of marmoset; Lane 2: Washed off protein. Lane 3-5: Samples from the protein G affinity chromatograph added 20 μg, 30 μg, and 10 μg loading amount, respectively.

Fig. 2 Detection of IgG from the marmoset serum purified by affinity chromatography

2.3 狨猴 IgG 抗血清的效价检测及纯度分析

1.3.3 中的兔抗狨猴 IgG 的血清,中央孔加入 1 mg/mL 纯化狨猴 IgG 10 μL,1~6 分别加入 10 μL 不同倍比稀释的抗血清,放入湿盒内 37℃,18 h 后观察抗原、抗体的特异性复合物的白色沉淀线,由图可见抗血清的效价达到了 1:64(见图 3 A)。

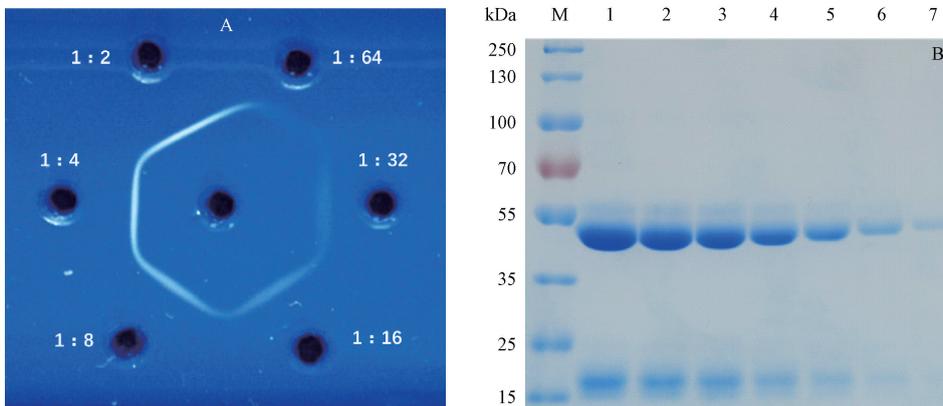
Protein G 亲和层析纯化兔抗狨猴 IgG 抗血清的还原型 IgG,经 10% SDS-PAGE 电泳鉴定(见图 3B),亲和层析的得到高纯度的抗血清 IgG,其纯度大于 97%。实验结果满足制备酶标抗体的基本要求:抗体纯度高、含杂蛋白少、特异性强、效价高。

2.4 ELISA 法测定兔抗狨猴 IgG 酶标抗体的工作浓度

与狨猴 IgG 反应的不同稀释度的兔抗狨猴 IgG-HRP 酶标抗体,OD 值分别为 3.728、3.705……0.584(见图 4)由此可见,以 1:256 000 稀释时,其 OD 值为 1.037,即 1:256 000 为兔抗狨猴 IgG-HRP 酶标抗体的稀释度。

2.5 Western blotting 法检测酶标记抗体及狨猴 IgG 工作浓度

PVDF 膜曝光结果,以 1:15 000 稀释的酶标抗体孵育,并在狨猴 IgG 加样量为 5 μg 可以显示清晰、特异的印迹反应(见图 5),酶标抗体灵敏度较强,1:15 000 兔抗狨猴 IgG-HRP 稀释度及 5 μg 的 IgG 可作为 Western blotting 的最适起始工作浓度。



注:A:兔抗狨猴 IgG 血清免疫双扩散效价;B: M 为分子蛋白量标准,Lane 1~7 抗血清纯化 IgG,上样量为 30、25、20、15、10、5、2.5 μg 。

图 3 兔抗狨猴 IgG 抗体效价检测和纯化

Note. A: Double-immunodiffusion of the anti-serum for IgG of marmoset. B: M was standard protein marker. Lane 1-7: The antiserum from the protein-G affinity chromatograph added 30 μg , 25 μg , 20 μg , 15 μg , 10 μg , 5 μg , and 2.5 μg loading amount, respectively.

Fig. 3 Purification of the rabbit anti-marmoset IgG antibody

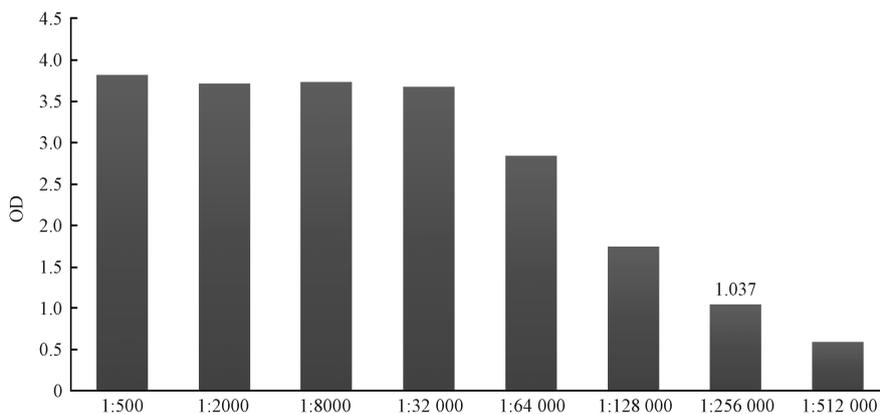


图 4 兔抗狨猴 IgG-HRP ELISA 效价测定

Fig. 4 Determination of the rabbit anti-marmoset IgG-HRP titer by direct ELISA

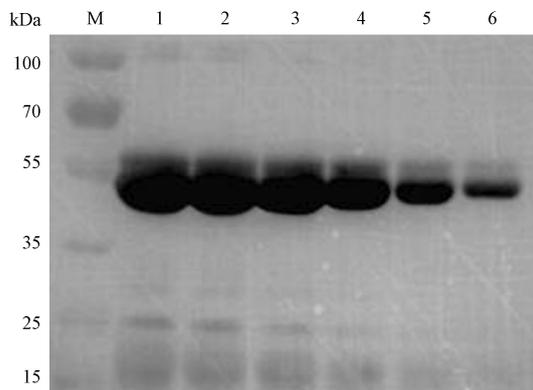
3 讨论

标记抗体是免疫技术的关键试剂,其质量主要取决于标记抗体的纯度、敏感性及其特异性。本文力求采用高质量的辣根过氧化物酶与高效价、HPLC 纯的兔抗狨猴 IgG,通过改良的“简易过碘酸钠标记法”制备了兔抗狨猴 IgG-HRP 酶标抗体,经过自装的 Sephacryl™ S-300 High Resolution 柱子进行分子过滤纯化、低温超滤离心透析浓缩,获得高质量的兔抗狨猴 IgG-HRP 酶标抗体,经 ELISA 及 Western blotting 进行鉴定,其纯度、敏感性及其特异性均符合使用要求。

如图 1 所示,用高效液相色谱亲和层析法 (high performance liquid affinity chromatography, HPLC) 及

HiTrap™ Protein G HP 亲和柱纯化得到狨猴血清总 IgG,经 SDS-PAGE 电泳鉴定,其纯度 $\geq 95\%$ (见图 2);免疫兔子获得兔抗狨猴 IgG 抗血清 (即狨猴 IgG 多克隆抗体, whole IgG PcAb),免疫双扩散测定抗血清效价为 1:64 (见图 3A);再用亲和柱纯化抗血清 IgG, PAGE 电泳鉴定 HPLC 纯度 $\geq 97\%$ (见图 3B)。本文目的是制备了兔抗狨猴 IgG-HRP 标记抗体,其 ELISA 工作浓度达 1:256 000 (见图 4),Western blotting 工作浓度达 1:15 000,且具有较强的特异性 (见图 5)。

本文初步制备了抗狨猴 IgG-HRP 酶标抗体结合物,随着“狨猴微生物、寄生虫学检测标准制定”工作的不断深入和技术试剂的需求,会继续制备有关抗狨猴 IgG 的各种发光标记抗体、各种酶标记抗体及胶体金标记抗体,以适用于诸如酶组化技术 (APAAP)、酶



注:兔抗狨猴 IgG 酶标抗体稀释度为 1:15 000,曝光时间 10 s 显色; M 为蛋白分子量标准; Lane 1~6:亲和纯狨猴 IgG:25、20、15、10、5、2.5 μg。

图 5 兔抗狨猴 IgG 酶标抗体及狨猴 IgG 的 western blotting 工作浓度测定

Note. Western blot result of the marmoset IgG specifically responding with 1:15 000 rabbit anti-marmoset IgG-HRP. M: Standard protein marker. Lane 1~6: Samples from the protein-G affinity chromatograph were added 25 μg, 20 μg, 15 μg, 10 μg, 5 μg, and 2.5 μg, respectively.

Fig. 5 Determination of the working concentration of the rabbit anti-marmoset IgG-HRP and Marmoset IgG by western blotting

免疫技术(EA)、酶联免疫技术(ELISA)、荧光免疫技术(FITC)、化学发光免疫技术、免疫胶体金技术(GICT)、流式细胞术技术(FCM)、以及 Western blotting 等技术,以满足生物医学研究领域及狨猴病原微生物检测的各种需求。

本文最终强调,实验动物是实验动物科学的重要组成部分,是生命科学的基础支撑、活的“精密仪器”,而实验动物的标准化和动物实验的规范化研究势必会成为实验动物科学的重要工作。在我国,狨猴至今仍被定义为“实验用动物”,即狨猴作为诸多学科研究用的非人灵长类实验动物,目前尚无国家、行业或地方标准的推出。鉴于目前国内市场抗狨猴 IgG-HRP 酶标抗体的缺乏及“实验用狨猴地方标准和相关检测技术研究”、“狨猴微生物、寄生虫等级监测地方标准”制定、以及狨猴其他研究工作之所需,实时有效地完成了兔抗狨猴 IgG-HRP 标记抗体的制备及初步鉴定,为狨猴的血清学检测提供了资源。

参考文献:

- [1] Abbott DH, Barnett DK, Colman RJ, et al. Aspects of common marmoset basic biology and life history important for biomedical research [J]. *Comp Med*, 2003, 53(4): 339-350.
- [2] Okano H, Hikishima K, Iriki A, et al. The common marmoset as a novel animal model system for biomedical and neuroscience research applications [J]. *Semin Fetal Neonat Med*, 2012, 17(6): 336-340.
- [3] Zühlke U, Weinbauer G. The common marmoset (*Callithrix jacchus*) as a model in toxicology [J]. *Toxicol Pathol*, 2003, 31: 123-127.
- [4] Stassart RM, Helms G, Garea-Rodríguez E, et al. A new targeted model of experimental autoimmune encephalomyelitis in the common marmoset [J]. *Brain Pathol*, 2016, 26(4): 452-464.
- [5] Yun JW, Ahn JB, Kang BC. Modeling Parkinson's disease in the common marmoset (*Callithrix jacchus*): overview of models, methods, and animal care [J]. *Lab Anim Res*, 2015, 31(4): 155-165.
- [6] Jagessar SA, Vierboom M, Blezer EL, et al. An overview of models, methods, and reagents developed for translational autoimmunity research in the common marmoset (*Callithrix jacchus*) [J]. *Exp Anim*, 2013, 62(3): 159-171.
- [7] Sasaki E, Suenizu H, Shimada A, et al. Generation of transgenic non-human primates with germline transmission [J]. *Nature*, 2009, 459(7246): 523-527.
- [8] Coghlan A. Monkeys created with Parkinson's [J]. *New Sci*, 2016, 230(3078): 12.
- [9] 刘先菊, 林树柱, 杨帆, 等. 两种果子狸血清 IgG 纯化方法的比较 [J]. *中国比较医学杂志*, 2007, 17(11): 681-682.
- [10] 刘先菊, 林树柱, 杨帆, 等. 蝙蝠血清 IgG 的纯化及兔抗蝙蝠 IgG 酶标抗体的制备 [J]. *中国比较医学杂志*, 2008, 18(5): 37-40.
- [11] 刘先菊, 杨帆, 林树柱, 等. 貉血清 IgG 纯化及抗血清的制备 [J]. *中国比较医学杂志*, 2007, 17(11): 662-665.
- [12] 刘先菊, 杨帆, 林树柱, 等. 长爪沙鼠 IgG 的纯化及抗血清的制备 [J]. *中国比较医学杂志*, 2007, 17(11): 641-643.
- [13] 刘先菊, 林树柱, 杨帆, 等. 黑线毛足鼠和金仓鼠血清 IgG 的纯化及抗血清的制备 [J]. *中国比较医学杂志*, 2007, 17(11): 656-658.
- [14] 刘先菊, 林树柱, 杨帆, 等. 兔抗金黄地鼠酶标抗体的制备及应用 [J]. *中国实验动物学报*, 2012, 20(1): 84-87.
- [15] 金伯泉. 细胞和分子免疫学实验技术 [M]. 第四军医大学出版社, 2002

[收稿日期] 2017-10-24