

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.  
G01N 33/531 (2006.01)  
C07K 16/06 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710190243.6

[43] 公开日 2008年4月9日

[11] 公开号 CN 101158681A

[22] 申请日 2007.11.23

[21] 申请号 200710190243.6

[71] 申请人 东南大学

地址 211109 江苏省南京市江宁开发区东南  
大学路2号

[72] 发明人 沈传来 谢 维 张建琼

[74] 专利代理机构 南京经纬专利商标代理有限公司  
代理人 叶连生

权利要求书2页 说明书11页

[54] 发明名称

自身抗体的互补式亲和层析纯化方法

[57] 摘要

自身抗体的互补式亲和层析纯化方法，能高度特异性地从人血清或免疫动物血清中提取纯化抗组织细胞自身抗原的多克隆抗体。对于组织细胞中因组成成分较多而不适宜于用基因工程表达和单克隆抗体亲和层析获得的自身抗原，其对应的自身抗体也种类繁多，适合于用本方案进行多克隆抗体的纯化。所获得的高度特异性自身抗体可以作为抗体标准品，用来制作基于各类免疫学实验方法的自身抗体定量检测试剂盒，对自身免疫性疾病的诊断、治疗、预后和疗效观察具有重要价值。在纯化抗人精子抗体的实践中，该方法科学可行，耗费低廉，所得免源性抗人精子多克隆抗体具有极高的纯度和特异性。

1、一种自身抗体的互补式亲和层析纯化方法，其特征在于该方法为：  
首先用互补式亲和层析法纯化制备自身抗原：

11) 收集人的目的组织细胞，用 NP-40 萃取细胞膜抗原，再用超声波粉碎组织细胞，超速离心后取上清液，作为粗制抗原 A 液，

12) 用目的组织细胞免疫实验动物，取抗血清，经盐析法粗提  $\gamma$  免疫球蛋白，称免疫血清 IgG；同时取未被免疫的该种实验动物的混合血清，经盐析法粗提  $\gamma$  免疫球蛋白，称未免疫血清 IgG；用正常人混合全血清免疫实验动物，取抗血清，同样经盐析法粗提  $\gamma$  免疫球蛋白，称抗人全血清 IgG，

13) 用 Sepharose-4B 琼脂糖凝胶分别与上述的免疫血清 IgG、未免疫血清 IgG 和抗人全血清 IgG 偶联成免疫亲和层析 A 柱、B 柱和 C 柱，

14) 取粗制抗原 A 液过亲和层析 A 柱，收集与 A 柱上 IgG 结合的抗原物质，浓缩后为粗制抗原 B 液；再取粗制抗原 B 液过亲和层析 B 柱，收集不与 B 柱上 IgG 结合的抗原物质，浓缩后为粗制抗原 C 液；最后取粗制抗原 C 液过亲和层析 C 柱，收集不与 C 柱上 IgG 结合的抗原物质，浓缩后为精制抗原液；

然后用互补式亲和层析法纯化制备抗自身抗原的多克隆抗体：

21) 收集自身抗体阳性的病人血清或者用自身抗原免疫接种的实验动物的抗血清；用盐析法及 DEAE52 纤维素柱纯化 IgG 型和 IgA 型免疫球蛋白，并分别称为粗制 IgG 型抗体 D 液和粗制 IgA 型抗体 D 液，

22) 收集不含目的自身抗原的健康人的混合血清；收集不含目的抗原的人的组织细胞，并制备成组织细胞裂解液，

23) 用 Sepharose-4B 琼脂糖凝胶分别与上述的精制抗原液、不含目的抗原的健康人混合血清以及不含目的抗原的人组织细胞裂解液偶联成亲和层析 D 柱、E 柱和 F 柱，

24) 取粗制 IgG 型或 IgA 型抗体 D 液过亲和层析 D 柱，收集与 D 柱上自身抗原相结合的抗体物质，浓缩后为粗制 IgG 型或 IgA 型抗体 E 液；后者过亲和层析 E 柱，收集不与 E 柱上蛋白相结合的抗体物质，浓缩后为粗制 IgG 型或 IgA 型抗体 F 液；F 液再过亲和层析 F 柱，收集不与 F 柱上蛋白相结合的抗体物质，浓缩后为精制自身抗体液 IgG 型或者 IgA 型。

2、根据权利要求1所述的自身抗体的互补式亲和层析纯化方法，其特征在于：在步骤13)和步骤23)用 Sepharose-4B 琼脂糖凝胶制备亲和层析 A、B、C、D、E 和 F 柱时，用非 Sepharose-4B 的琼脂糖凝胶代替。

3、根据权利要求1所述的自身抗体的互补式亲和层析纯化方法，其特征在于：在步骤24)用亲和层析 D、E 和 F 柱联合进行互补式亲和层析时，只用 D 柱或者用 D 柱和 E 柱联合。

4、根据权利要求1所述的自身抗体的互补式亲和层析纯化方法，其特征在于：在步骤11)时不是收集目的组织细胞，而是收取含有目的抗原的人的体液，继而不用 NP-40 萃取细胞膜抗原和超声波粉碎组织细胞，直接用含有目的抗原的人的体液免疫实验动物。

## 自身抗体的互补式亲和层析纯化方法

### 技术领域

本发明是一种以互补式免疫亲和层析为主要创新点的特异性纯化自身抗体的技术方案,尤其适用于对组织细胞中因组成成份较多而不适宜于用基因工程表达和单克隆抗体亲和层析获得的自身抗原的多克隆抗体纯化,属于抗原抗体制备和检测的免疫学技术领域。

### 背景技术

在很多人的体内存有自身抗原,它们种类繁多,可以刺激机体免疫系统发生免疫反应,产生针对自身抗原的抗体和致敏淋巴细胞,由此而引起很多的自身免疫性疾病。如何从机体的组织细胞或体液中提取纯化这些自身抗原,在技术上一直有难度,主要问题是获得的抗原特异性不高,不易剔除机体的其他正常组织成分,因此利用这些自身抗原制作试剂盒检测特异性自身抗体时普遍存有很高的非特异性反应,即假阳性较多。如何从机体血清中特异性地纯化这些自身抗原的抗体就更加困难,尤其是针对那些组成成份众多的自身抗原的抗体。由于难以获得特异性和纯度很高的自身抗体的标准品,自身抗体的定量检测就很难进行,因此目前国内外绝大多数自身抗体的定量检测试剂盒都只能半定量,以相对单位数作为机体体液中自身抗体的相对含量,而且各厂家自行定义各自的相对单位数,互不可比。

例如,不孕症占我国已婚夫妇的8-15%,其中很多夫妇是因为机体对精子抗原和子宫内膜抗原等发生了免疫反应,产生的抗精子抗体和抗子宫内膜抗体能破坏精子和子宫内膜导致不孕,因此检测这些自身抗体的有无和含量是不孕症诊断和疗效观察的重要指标。但是,检测抗体必须要有特异性的抗原。如何纯化精子抗原、子宫内膜抗原等自身抗原呢?近年来国内外文献报道的方法主要有:超声波粉碎、反复冻融破碎精子细胞或子宫内膜细胞等物理方法;化学试剂如LTS、DTT、NP-40及Triton X-100等化学萃取法或胶原酶消化法;基因克隆表达单种精子抗原以及利用单克隆抗体制备亲和层析柱的纯化法等。

后两种方法纯化所得抗原的特异性最高,但是缺点也非常明显。基因工程技术只能克隆表达单一组分的抗原,而很多自身抗原的组成成份繁多,如精子抗原多达100余种,子宫内膜抗原也种类繁多,用基因克隆表达的仅包括极少数组分的抗原来检测机体内的抗精子抗体和抗子宫内膜抗体极易导致漏检,因而离实际应用尚远;另一个缺点是很多自身抗原从基因到蛋白质序列都不清楚,不能进行基因克隆表达。利用单克隆抗体制备亲和层析柱进行亲和层析,同样也只能纯化单一组分的自身抗原,而且需要制备单克隆抗体。单抗的制备不但技术繁杂,很多时候无法用含有目的抗原的机体组织细胞或体液作为靶抗原进行单克隆抗体的筛选,从而无法得到单抗,也因此很多自身抗原无法通过单抗的亲和层析法来纯化。物理法和化学法提取的自身抗原纯度较差,极难清除与机体血清中其他成分的非特异性反应。

在自身抗体的纯化方面,国内少有报道,国外主要是制备针对基因工程表达的自身抗原的单克隆抗体。这些单克隆抗体的克隆数有限,大多用于科研中。象其他任何抗体的定量检测一样,抗精子抗体的定量检测也需要有抗精子抗体的标准品。但是人类精子抗原多达数百种,而且大多数未能进行基因确定和克隆表达,因此无法利用基因重组抗原筛选出如此众多的单克隆或多克隆抗体。不同抗原成份诱导产生的抗体,其亲和力差异很大。即使能获得少数几种基因重组精子抗原,其对应的单克隆抗体或者几种单抗的混合物只能与精子的极少数抗原决定簇结合,因此它们在与固相载体上包被的成份和决定簇均相当复杂的抗原结合时,机率很小,同时它们的亲和力也不足以代表体内几百种精子抗原的对应抗体的亲和力。这种亲和力差异将直接导致定量检测结果的不同。相比之下,从抗血清中提取纯化的人工主动免疫或自然免疫状态下产生的多克隆抗体,因其针对的抗原成份和决定簇的多样性和随机性,更能代表定量检测中待测标本中抗体与抗原的结合能力,因此更适合于作为定量检测自身抗体时的抗体标准品。

2001年,我们报道了利用两种多克隆抗体制备两种亲和层析柱(A柱和B柱),对人精子膜抗原进行互补式亲和层析纯化,获得了纯度很高的精子膜抗原,制成了抗精子抗体的定性酶标检测试剂盒,经过了南京金陵男科医院、郑州博赛生物工程公司等4家单位的试用,并参加了东南大学首届科技成果展。(沈传来、张建琼、贾力敏等。亲和层析纯化精子膜抗原的方法及精子抗体的检测,上海免疫学杂志,2001;21:102-104)。2002年以后,为了从病人血清或免疫动物血

清中高度特异性地纯化抗精子抗体，以进一步制备抗精子抗体定量检测试剂盒，我们开始改进精子抗原的纯化方案，并在此基础上进一步设计精子抗体的纯化方案。最终，我们制备了亲和层析 A、B、C 柱纯化精子抗原，再制备亲和层析 D、E、F 柱，进一步从抗人精子的兔抗血清中提取纯化了抗精子多克隆抗体，用于精子抗体的定量酶标检测。免疫印迹实验证实所得的抗精子多克隆抗体不与正常人全血清、正常人组织细胞裂解液以及牛血清白蛋白等可能出现在检测系统中的成份发生反应，为其成为自身抗体定量分析中的抗体标准品奠定了基础。目前市场上尚无基于抗体标准品的精子抗体定量检测试剂盒，只有从国外进口的以 IU/ml 为相对计量单位的半定量检测试剂盒。

迄今为止，未有其他人报道过利用本发明方案从人血清或免疫动物血清中提取纯化抗自身抗原的多克隆抗体。

## 发明内容

**技术问题：**本发明目的在于提供一种自身抗体的互补式亲和层析纯化方法，应用此方法纯化的自身抗体不但特异性和纯度极高，而且组分众多，特别适用于组成成份较多的自身抗原所诱导的自身抗体的纯化。

**技术方案：**该方案避免了基因克隆表达和单克隆抗体制备等繁杂技术，只需制备多克隆抗体、血清蛋白、组织细胞裂解液和亲和层析柱，操作简便，耗费低廉，实验室条件要求不高，相对省时省力。本方案纯化所得的多克隆自身抗体可以作为抗体标准品，用来制作基于各类免疫学实验方法的自身抗体定量检测试剂盒，对自身免疫性疾病的诊断、治疗、预后和疗效观察具有重要价值。

为了解决从血清中纯化自身抗体的技术难题，我们利用多克隆抗体、血清蛋白、组织细胞裂解液等制备 6 种亲和层析柱，建立了以互补式亲和层析为主要创新点的纯化方法。

该方法为：

首先用互补式亲和层析法纯化制备自身抗原：

11) 收集人的目的组织细胞，用 NP-40 萃取细胞膜抗原，再用超声波粉碎组织细胞，超速离心后取上清液，作为粗制抗原 A 液，

12) 用目的组织细胞免疫实验动物，取抗血清，经盐析法粗提  $\gamma$  免疫球蛋白，称免疫血清 IgG；同时取未被免疫的该种实验动物的混合血清，经盐析法粗提  $\gamma$

免疫球蛋白，称未免疫血清 IgG；用正常人混合全血清免疫实验动物，取抗血清，同样经盐析法粗提  $\gamma$  免疫球蛋白，称抗人全血清 IgG，

13) 用 Sepharose-4B 琼脂糖凝胶分别与上述的免疫血清 IgG、未免疫血清 IgG 和抗人全血清 IgG 偶联成免疫亲和层析 A 柱、B 柱和 C 柱，

14) 取粗制抗原 A 液过亲和层析 A 柱，收集与 A 柱上 IgG 结合的抗原物质，浓缩后为粗制抗原 B 液；再取粗制抗原 B 液过亲和层析 B 柱，收集不与 B 柱上 IgG 结合的抗原物质，浓缩后为粗制抗原 C 液；最后取粗制抗原 C 液过亲和层析 C 柱，收集不与 C 柱上 IgG 结合的抗原物质，浓缩后为精制抗原液；

然后用互补式亲和层析法纯化制备抗自身抗原的多克隆抗体：

21) 收集自身抗体阳性的病人血清或者用自身抗原免疫接种的实验动物的抗血清；用盐析法及 DEAE52 纤维素柱纯化 IgG 型和 IgA 型免疫球蛋白，并分别称为粗制 IgG 型抗体 D 液和粗制 IgA 型抗体 D 液，

22) 收集不含目的自身抗原的健康人的混合血清；收集不含目的抗原的人的组织细胞，并制备成组织细胞裂解液，

23) 用 Sepharose-4B 琼脂糖凝胶分别与上述的精制抗原液、不含目的抗原的健康人混合血清以及不含目的抗原的人组织细胞裂解液偶联成亲和层析 D 柱、E 柱和 F 柱，

24) 取粗制 IgG 型或 IgA 型抗体 D 液过亲和层析 D 柱，收集与 D 柱上自身抗原相结合的抗体物质，浓缩后为粗制 IgG 型或 IgA 型抗体 E 液；后者过亲和层析 E 柱，收集不与 E 柱上蛋白相结合的抗体物质，浓缩后为粗制 IgG 型或 IgA 型抗体 F 液；F 液再过亲和层析 F 柱，收集不与 F 柱上蛋白相结合的抗体物质，浓缩后为精制自身抗体液 IgG 型或者 IgA 型。

在步骤 13) 和步骤 23) 用 Sepharose-4B 琼脂糖凝胶制备亲和层析 A、B、C、D、E 和 F 柱时，用非 Sepharose-4B 的琼脂糖凝胶代替。

在步骤 24) 用亲和层析 D、E 和 F 柱联合进行互补式亲和层析时，只用 D 柱或者用 D 柱和 E 柱联合。

在步骤 11) 时不是收集目的组织细胞，而是收取含有目的抗原的人的体液，继而不用 NP-40 萃取细胞膜抗原和超声波粉碎组织细胞，直接用含有目的抗原的人的体液免疫实验动物。

有益效果：

①本发明提供了一种从人血清或免疫动物血清中特异性纯化自身抗体的技术方案。

②应用本方案纯化的自身抗体不但特异性和纯度极高。

③本方案特别适用于纯化组成成份较多的自身抗原所诱导的多克隆自身抗体。因为组成成份较多的自身抗原很多从基因到蛋白质序列都不清楚，不能进行基因克隆表达而获得，也不能通过单克隆抗体的亲和层析而全部获得。这些自身抗原所诱导机体产生的自身抗体种类众多，因抗原很难获得，也因此很难纯化组份众多的针对同一种自身抗原的自身抗体。

④本方案避免了基因克隆表达和单克隆抗体制备等繁杂技术，操作简便，耗费低廉，实验室条件要求不高，相对省时省力。

⑤应用本方案纯化所得的多克隆自身抗体可以作为抗体标准品，用来制作基于各类免疫学实验方法的自身抗体定量检测试剂盒，对自身免疫性疾病的诊断、治疗、预后和疗效观察具有重要价值，因此能创造很好的经济效益和社会效益。

#### 具体实施方式：

本发明的自身抗体的互补式亲和层析纯化方法为：

首先用互补式亲和层析法纯化制备自身抗原：

11) 收集人的目的组织细胞，用 NP-40 萃取细胞膜抗原，再用超声波粉碎组织细胞，超速离心后取上清液，作为粗制抗原 A 液，

12) 用目的组织细胞免疫实验动物，取抗血清，经盐析法粗提  $\gamma$  免疫球蛋白，称免疫血清 IgG；同时取未被免疫的该种实验动物的混合血清，经盐析法粗提  $\gamma$  免疫球蛋白，称未免疫血清 IgG；用正常人混合全血清免疫实验动物，取抗血清，同样经盐析法粗提  $\gamma$  免疫球蛋白，称抗人全血清 IgG，

13) 用 Sepharose-4B 琼脂糖凝胶分别与上述的免疫血清 IgG、未免疫血清 IgG 和抗人全血清 IgG 偶联成免疫亲和层析 A 柱、B 柱和 C 柱，

14) 取粗制抗原 A 液过亲和层析 A 柱，收集与 A 柱上 IgG 结合的抗原物质，浓缩后为粗制抗原 B 液；再取粗制抗原 B 液过亲和层析 B 柱，收集不与 B 柱上 IgG 结合的抗原物质，浓缩后为粗制抗原 C 液；最后取粗制抗原 C 液过亲和层析 C 柱，收集不与 C 柱上 IgG 结合的抗原物质，浓缩后为精制抗原液；

然后用互补式亲和层析法纯化制备抗自身抗原的多克隆抗体：

21) 收集自身抗体阳性的病人血清或者用自身抗原免疫接种的实验动物的抗血清；用盐析法及 DEAE52 纤维素柱纯化 IgG 型和 IgA 型免疫球蛋白，并分别称为粗制 IgG 型抗体 D 液和粗制 IgA 型抗体 D 液，

22) 收集不含目的自身抗原的健康人的混合血清；收集不含目的抗原的人的组织细胞，并制备成组织细胞裂解液，

23) 用 Sepharose-4B 琼脂糖凝胶分别与上述的精制抗原液、不含目的抗原的健康人混合血清以及不含目的抗原的人组织细胞裂解液偶联成亲和层析 D 柱、E 柱和 F 柱，

24) 取粗制 IgG 型或 IgA 型抗体 D 液过亲和层析 D 柱，收集与 D 柱上自身抗原相结合的抗体物质，浓缩后为粗制 IgG 型或 IgA 型抗体 E 液；后者过亲和层析 E 柱，收集不与 E 柱上蛋白相结合的抗体物质，浓缩后为粗制 IgG 型或 IgA 型抗体 F 液；F 液再过亲和层析 F 柱，收集不与 F 柱上蛋白相结合的抗体物质，浓缩后为精制自身抗体液 IgG 型或者 IgA 型。

在步骤 13) 和步骤 23) 用 Sepharose-4B 琼脂糖凝胶制备亲和层析 A、B、C、D、E 和 F 柱时，可用非 Sepharose-4B 的琼脂糖凝胶代替。

以亲和层析 A、B、C、D 柱进行互补式亲和层析，纯化自身抗体；以亲和层析 A、B、C、D、E 柱进行互补式亲和层析，纯化自身抗体。

取含有目的抗原的人的体液、细胞裂解液或者组织细胞悬液，免疫实验动物如羊、马、兔、豚鼠、大鼠、小鼠、猪等，获得免疫血清 IgG、IgA 或者 IgM；同时从该种实验动物血清中获得未免疫血清 IgG、IgA 或者 IgM；同上制备亲和层析 A、B、C 柱进行互补式亲和层析，从人体液中、细胞膜内或者细胞膜表面获得精制抗原液；再同上制备亲和层析 D、E 和 F 柱进行互补式亲和层析，获得精制的抗人自身抗原的多克隆抗体。

下面以抗人精子自身抗体的纯化为实例阐述本发明方案的具体实施方式：

①收集人的目的组织细胞，用 NP-40 萃取细胞膜抗原，再用超声波粉碎组织细胞，超速离心后取上清液，作为粗制抗原 A 液；

②用目的组织细胞免疫实验动物，取抗血清，经盐析法粗提  $\gamma$  免疫球蛋白 (IgG)，称免疫血清 IgG；同时取未被免疫的该种实验动物的混合血清，经盐析法粗提 IgG，称未免疫血清 IgG；用正常人全血清免疫实验动物，取抗血清，同样经盐析法粗提 IgG，称抗人全血清 IgG；

③用 Sepharose-4B 琼脂糖凝胶分别与上述的免疫血清 IgG、未免疫血清 IgG 和抗人血清 IgG 偶联成亲和层析 A 柱、B 柱和 C 柱；

④取粗制抗原 A 液过亲和层析 A 柱，收集与 A 柱上 IgG 结合的抗原物质，浓缩后为粗制抗原 B 液；再取粗制抗原 B 液过亲和层析 B 柱，收集不与 B 柱上 IgG 结合的抗原物质，浓缩后为粗制抗原 C 液；最后取粗制抗原 C 液过亲和层析 C 柱，收集不与 C 柱上 IgG 结合的抗原物质，浓缩后为精制抗原液。

⑤收集自身抗体阳性的病人血清或者用自身抗原免疫接种的实验动物的抗血清；用盐析法及 DEAE52 纤维素柱纯化血清 IgG ( $\gamma$  免疫球蛋白) 和血清 IgA ( $\alpha$  免疫球蛋白)，并分别称为粗制 IgG 型抗体 D 液和粗制 IgA 型抗体 D 液；

⑥收集不含目的自身抗原的健康人的混合血清；收集不含目的抗原的人的组织细胞，并制备成组织细胞裂解液；

⑦用 Sepharose-4B 琼脂糖凝胶分别与上述的精制抗原液、不含目的抗原的健康人混合血清以及不含目的抗原的人组织细胞裂解液偶联成亲和层析 D 柱、E 柱和 F 柱；

⑧取粗制 IgG 型或 IgA 型抗体 D 液过亲和层析 D 柱，收集与 D 柱上自身抗原相结合的抗体物质，浓缩后为粗制 IgG 型或 IgA 型抗体 E 液；后者过亲和层析 E 柱，收集不与 E 柱上蛋白相结合的抗体物质，浓缩后为粗制 IgG 型或 IgA 型抗体 F 液；F 液再过亲和层析 F 柱，收集不与 F 柱上蛋白相结合的抗体物质，浓缩后为精制自身抗体液 (IgG 或者 IgA 型)。冷冻真空干燥成粉剂后保存备用。

### 抗精子抗体的互补式亲和层析纯化方法

#### 1. 人精子膜抗原的粗提, 制备粗制抗原 A 液:

收集新鲜正常精液 100-500ml, 用 0.01mol/L, pH7.4 的 Tris-HCl 缓冲液反复洗涤 6 次, 取精子沉淀加入抗原提取液 (Tris 0.061g, EDTA 0.012g, NaCl 0.07g, NP-40 50ul, 加蒸馏水至 100ml, 调 pH9.0), 4°C 磁力搅拌 30 分钟, 而后另加 4 种蛋白酶抑制剂 (PMSF, 1mmol/L; Leupeptin, 10ug/ml; Aprotinin, 10ug/ml; Iodoacetamide, 1.8mg/ml), 分装试管, 放冰杯中进行超声波粉碎, 300uA, 1min/次, 间隔 2 min, 12-15 次。而后离心 1200 rpm/min, 10min, 去残渣碎片。上清置超速冷冻离心机, 27000g 离心 50min。上清经聚乙二醇浓缩后, PBS 溶液透析 48h 以上即成粗制抗原 A 液。BCA 法蛋白定量后, 分装置 -70°C 保存备用。

## 2. 制备免疫血清 IgG、未免疫血清 IgG 和抗人全血清 IgG:

收集多人的新鲜正常精液 100ml, 用生理盐水洗涤 6 次, 沉淀用生理盐水重悬, 计数精子量, 常规皮下多点注射实验兔 2 只, 免疫接种 3-4 次/只, 每次间隔 2 周,  $1 \times 10^6$  个精子/次。最后一次免疫后第 7 天取全部兔血清, 分装于  $-20^{\circ}\text{C}$  保存备用; 同时取一只未经免疫接种的实验兔, 取其全部血清, 同上保存备用; 另外收集数名未婚少女的全血清数毫升, 与福氏完全佐剂混匀成油包水样后常规皮下多点注射实验兔 2 只, 3-5 次/只, 1-2ml/次/只, 每次间隔 2 周。从第二次免疫开始, 混合全血清与福氏不完全佐剂混匀。最后一次免疫后第 7 天取全部兔血清, 分装于  $-20^{\circ}\text{C}$  保存备用。

取上述用人精子免疫的兔血清、未被免疫的兔血清以及用人全血清免疫的兔血清, 分别经 33%硫酸铵盐析法在  $4^{\circ}\text{C}$  常规提取总 IgG 型免疫球蛋白, 沉淀用 PBS 缓冲液溶解后于  $4^{\circ}\text{C}$  透析过夜, BCA 法蛋白定量后置  $-20^{\circ}\text{C}$  保存备用, 分别称为免疫血清 IgG、未免疫血清 IgG 和抗人全血清 IgG。

## 3. 制备亲和层析 A 柱、B 柱和 C 柱:

取上述免疫血清 IgG、未免疫血清 IgG 和抗人全血清 IgG 分别与溴化氰活化的 Sepharose-4B 偶联成亲和层析 A 柱、B 柱和 C 柱。具体方法如下: 取 2-5g 溴化氰活化的 Sepharose-4B 干胶于烧杯中, 用 1mM HCl 溶液溶解, 待膨胀后移至抽滤用的漏斗中, 用 1mM HCl 溶液抽洗 15min, 接着用 100-200ml 的 HCl 溶液抽洗至液面与琼脂凝胶面平齐, 使凝胶恢复光泽活性。取上述血清 IgG 液, 融化后  $4^{\circ}\text{C}$  超速离心去除 Ig 的聚集体, 经 BCA 法蛋白定量后用 0.1mol/L  $\text{NaHCO}_3$ /0.5mol/L NaCl 溶液稀释 IgG 液至 5mg/L。将等体积的处理后凝胶与等体积的 IgG 液混合于烧杯中, 置室温不断搅拌 1-2h。再用 5 倍于凝胶体积的 0.1mol/L  $\text{NaHCO}_3$ /0.5mol/L NaCl 溶液抽洗凝胶, 至液面与凝胶面平齐, 而后将凝胶溶解于 pH8.0 的 50mmol/L 甘氨酸溶液中, 置  $4^{\circ}\text{C}$  16h, 以封闭凝胶上剩余的活性基团。于玻璃层析管中装柱后用 5 倍于凝胶体积的 0.1M Acetate Buffer(pH4.0)/0.5M NaCl 抽洗, 再用 5 倍于凝胶体积的 0.1M Tris-HCl Buffer(pH8.0)/0.5M NaCl 抽洗, 并重复二个循环。最后将偶联好的亲和层析柱保存于 TSA 溶液中, 置  $4^{\circ}\text{C}$  条件下可保存 1-2 年。

## 4. 互补式亲和层析纯化精子膜抗原:

常规亲和层析的方法见《精编分子生物学实验指南》(颜子颖、王海林译,

北京：科学出版社，1998：382)。本互补式亲和层析的主要步骤为：

①取粗制抗原 A 液过亲和层析 A 柱，收集与 A 柱上 IgG 结合的抗原物质：取与 A 柱凝胶等体积的粗制抗原 A 液（1-10mg/ml），上柱后室温作用 3h，而后用以下溶液依次洗涤 A 柱，流速 1ml/min，直至流出组分的 OD280 吸光度 < 0.02 为止：5 倍柱床体积的洗涤缓冲液，pH8.0

5 倍柱床体积的 Tris 缓冲液，pH8.0

5 倍柱床体积的 Tris 缓冲液，pH9.0

然后以 5 倍柱床体积的三乙醇胺溶液洗脱 A 柱，直至流出组分的 OD280 吸光度 < 0.02 为止，流速 1ml/min，同时收集洗脱液，并立即用 1mol/L Tris-HCl (Ph6.7) 缓冲液中和，以免洗脱下来的蛋白质在硷性条件下变性，即：将每一个柱床体积的洗脱液收集于含有 0.2 体积的 1mol/L Tris-HCl (Ph6.7) 缓冲液的试管中，聚乙二醇浓缩后调 pH 值至 7.4 左右即为粗制抗原 B 液。

②取粗制抗原 B 液过亲和层析 B 柱，收集不与 B 柱上 IgG 结合的抗原物质：

将粗制抗原 B 液上 B 柱，室温作用 1h，用 5 倍柱床体积的洗涤缓冲液 (pH8.0) 洗涤 B 柱，流速 1ml/min，直至流出组分的 OD280 吸光度 < 0.02 为止；最后用 5 倍柱床体积的 Tris 缓冲液 (pH8.0) 洗脱 B 柱，并同时收集洗脱液，经聚乙二醇浓缩后即为粗制抗原 C 液。

③最后取粗制抗原 C 液过亲和层析 C 柱，收集不与 C 柱上 IgG 结合的抗原物质：将粗制抗原 C 液上 C 柱，室温作用 1h，用 5 倍柱床体积的洗涤缓冲液 (pH8.0) 洗涤 C 柱，流速 1ml/min，直至流出组分的 OD280 吸光度 < 0.02 为止；最后用 5 倍柱床体积的 Tris 缓冲液 (pH8.0) 洗脱 C 柱，并同时收集洗脱液，经聚乙二醇浓缩为 1-5ml，透析 24h 以上即为精制抗原液。BCA 法蛋白定量，SDS-PAGE 电泳鉴定纯度及成分，分装置 -70°C 保存备用。

TSA 保存缓冲液：0.002mol/L Tris-Cl；0.14mol/L NaCl；0.025% (W/V)  $\text{NaN}_3$ ；1mmol/L EDTA；20ug/ml 庆大霉素，pH8.0，置 4°C 冰冷

洗涤缓冲液：0.01mol/L Tris-Cl；0.14mol/L NaCl；0.025% (W/V)  $\text{NaN}_3$ ；0.5% (V/V) Triton X-100；0.5% (V/V) 脱氧胆酸钠，pH8.0，置 4°C 冰冷

Tris 缓冲液：50mmol/L Tris-Cl；0.1% (V/V) Triton X-100；0.5mol/L NaCl，pH8.0 或者 pH9.0，置 4°C 冰冷

三乙醇胺缓冲液：50mmol/L 三乙醇胺；0.1% (V/V) Triton X-100；0.15mol/L

NaCl, pH11.5, 置 4°C 冰冷

#### 5. 从抗精子抗体阳性血清中提取总 IgG 和总 IgA:

收集抗精子抗体阳性的病人血清或者用人精子免疫接种的兔血清;用盐析法结合 DEAE52 纤维素柱纯化总 IgG 型和 IgA 型免疫球蛋白,并分别称为粗制 IgG 型抗体 D 液和粗制 IgA 型抗体 D 液。

总 IgG 提取:取抗精子抗体 IgG 型阳性患者混合血清或兔抗血清,经常规 33%硫酸铵盐析法粗提 IgG 型免疫球蛋白,具体步骤见《精编分子生物学实验指南》(颜子颖、王海林译,北京:科学出版社,1998:436)。透析除盐后分批过 DEAE52 纤维素层析柱,用 0.01M pH7.4 PBS 缓冲液洗脱,收集洗脱液,经聚乙二醇浓缩为 2-4mg/ml 即为纯化的总 IgG 液,称为粗制 IgG 型抗体 D 液。分装置-70°C 保存备用。所有盐析、透析、层析及离心步骤均在 4°C 进行。

总 IgA 提取:取抗精子抗体 IgA 型阳性患者混合血清或兔抗血清,加等量 0.1M ZnSO<sub>4</sub>液,调 pH 值至 7.0,搅拌 1h 后离心去沉淀,上清中加等量饱和硫酸铵液,混匀后于 4°C 过夜,离心去上清后溶沉淀于 10% EDTA-Na 溶液中,透析除盐后再分批过 DEAE52 纤维素层析柱,先用 0.01M pH7.4 PBS 洗脱并弃洗脱液,再换用 0.1M pH6.4 PBS 洗脱,所收集的蛋白峰即为 IgA。聚乙二醇浓缩后再过 Sephadex G200 柱,经 0.01M pH7.4 PBS 洗脱,第一蛋白峰即为纯化的总 IgA 液,称为粗制 IgA 型抗体 D 液。分装置-70°C 保存备用。所有盐析、透析、层析及离心步骤均在 4°C 进行。

#### 6. 制备亲和层析 D 柱、E 柱和 F 柱:

收集未婚少女混合血清(不含人精子抗原);收集健康女性的组织细胞(不含人精子抗原),并常规制成组织细胞裂解液。取溴化氰活化的 Sepharose-4B 琼脂糖凝胶分别与精制精子抗原液、未婚少女混合血清以及健康女性组织细胞裂解液等偶联成亲和层析 D 柱、E 柱和 F 柱。具体偶联步骤与亲和层析 A、B、C 柱制备时的偶联步骤相同,只要改换被偶联物即可。

#### 7. 互补式亲和层析纯化抗人精子多克隆抗体:

常规亲和层析的方法见《精编分子生物学实验指南》(颜子颖、王海林译,北京:科学出版社,1998:382)。本互补式亲和层析的主要步骤为:

①取粗制 IgG 型(IgA 型)抗体 D 液过亲和层析 D 柱,收集与 D 柱上精子抗原结合的抗体物质:取与 D 柱凝胶等体积的抗体 D 液(1-10mg/ml),上柱后室温

作用 3h, 而后用以下溶液依次洗涤 D 柱, 流速 1ml/min, 直至流出组分的 OD280 吸光度 < 0.02 为止:

5 倍柱床体积的洗涤缓冲液, pH8.0

5 倍柱床体积的 Tris 缓冲液, pH8.0

5 倍柱床体积的 Tris 缓冲液, pH9.0

然后以 5 倍柱床体积的三乙醇胺溶液洗脱 D 柱, 直至流出组分的 OD280 吸光度 < 0.02 为止, 流速 1ml/min, 同时收集洗脱液, 并立即用 1mol/L Tris-HCl (pH6.7) 缓冲液中和, 以免洗脱下来的蛋白质在硷性条件下变性, 即: 将每一个柱床体积的洗脱液收集于含有 0.2 体积的 1mol/L Tris-HCl (pH6.7) 缓冲液的试管中, 聚乙二醇浓缩后调 pH 值至 7.4 左右即为粗制 IgG 型 (IgA 型) 抗体 E 液。

②取粗制 IgG 型 (IgA 型) 抗体 E 液过亲和层析 E 柱, 收集不与 E 柱上人血清蛋白结合的抗体物质: 将抗体 E 液上 E 柱, 室温作用 1h, 用 5 倍柱床体积的洗涤缓冲液 (pH8.0) 洗涤 E 柱, 流速 1ml/min, 直至流出组分的 OD280 吸光度 < 0.02 为止; 最后用 5 倍柱床体积的 Tris 缓冲液 (pH8.0) 洗脱 E 柱, 并同时收集洗脱液, 经聚乙二醇浓缩后即为粗制 IgG 型 (IgA 型) 抗体 F 液。

③最后取粗制 IgG 型 (IgA 型) 抗体 F 液过亲和层析 F 柱, 收集不与 F 柱上人组织细胞蛋白结合的抗体物质: 将抗体 F 液上 F 柱, 室温作用 1h, 用 5 倍柱床体积的洗涤缓冲液 (pH8.0) 洗涤 F 柱, 流速 1ml/min, 直至流出组分的 OD280 吸光度 < 0.02 为止; 最后用 5 倍柱床体积的 Tris 缓冲液 (pH8.0) 洗脱 F 柱, 并同时收集洗脱液, 经聚乙二醇浓缩为 1-5ml, 透析 24h 以上即为精制自身抗体液 (IgG 或者 IgA 型)。BCA 法蛋白定量, SDS-PAGE 电泳鉴定纯度及成分, 冷冻真空干燥成粉剂后保存备用。分装置 -70°C 保存备用。

#### 8. 精制自身抗体的鉴定和保存:

取精制抗人精子自身抗体液 (IgG 或者 IgA 型), BCA 法进行蛋白定量; 10%SDS-PAGE 电泳鉴定其抗体的纯度; 而后做免疫印迹实验, 检测精制抗体与精子抗原、未婚少女全血清、人组织细胞裂解液以及牛血清白蛋白等可能在精子抗体检测系统中出现的成分的反应性, 鉴定所纯化的自身抗体的特异性; 最后冷冻真空干燥成粉剂后保存备用。

专利名称(译)	自身抗体的互补式亲和层析纯化方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN101158681A</a>	公开(公告)日	2008-04-09
申请号	CN200710190243.6	申请日	2007-11-23
[标]申请(专利权)人(译)	东南大学		
申请(专利权)人(译)	东南大学		
当前申请(专利权)人(译)	东南大学		
[标]发明人	沈传来 谢维 张建琼		
发明人	沈传来 谢维 张建琼		
IPC分类号	G01N33/531 C07K16/06		
代理人(译)	叶连生		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

自身抗体的互补式亲和层析纯化方法，能高度特异性地从人血清或免疫动物血清中提取纯化抗组织细胞自身抗原的多克隆抗体。对于组织细胞中因组成成分较多而不适宜于用基因工程表达和单克隆抗体亲和层析获得的自身抗原，其对应的自身抗体也种类繁多，适合于用本方案进行多克隆抗体的纯化。所获得的高度特异性自身抗体可以作为抗体标准品，用来制作基于各类免疫学实验方法的自身抗体定量检测试剂盒，对自身免疫性疾病的诊断、治疗、预后和疗效观察具有重要价值。在纯化抗人精子抗体的实践中，该方法科学可行，耗费低廉，所得免源性抗人精子多克隆抗体具有极高的纯度和特异性。