

单克隆抗体免疫吸附剂的制备及对乙型肝炎表面抗原的吸附*

李湛勇 史林启** 宋正纪

(吸附分离功能高分子材料国家重点实验室 南开大学高分子化学研究所 天津 300071)

梁树人

(天津传染病医院 天津 300192)

摘 要 通过环氧氯丙烷活化(1,4)-2-氨基-2-脱氧- β -D-葡萄糖(壳聚糖)制备免疫吸附剂,详细讨论了环氧氯丙烷活化过程的影响因素,确定了活化的最佳条件.活化(1,4)-2-氨基-2-脱氧- β -D-葡萄糖树脂对单克隆抗体的偶联率为17.6%,对含乙型肝炎表面抗原阳性血清的吸附实验表明,制备的免疫吸附剂能使阳性转为阴性,吸附率为44%.

关键词 免疫吸附剂, (1,4)-2-氨基-2-脱氧- β -D-葡萄糖(壳聚糖), 环氧氯丙烷, 单克隆抗体, 乙型肝炎表面抗原

免疫吸附剂是指将免疫相关的生物活性物质,如抗原、抗体、能引起免疫反应的介质和调节剂、免疫复合物、免疫活性细胞等,通过适当的方法偶联到吸附剂载体上,得到的一类具有特异性吸附能力的吸附剂^[1].最初,免疫吸附剂被大量用于分离和纯化抗原、抗体等生物活性物质,自从1979年 Terman^[2]将免疫吸附剂通过血液净化的方法用于治疗狼疮性肾炎,为免疫吸附剂开辟了一个新的应用领域,近年来免疫吸附剂在治疗系统性红斑狼疮、类风湿、遗传性高胆固醇血症等免疫性疾病中取得不少成功的范例^[1].

我国是病毒性肝炎高发区,最为常见的是乙型肝炎,在患者血液中存在的主要毒性物质为乙型肝炎表面抗原(Hepatitis B surface antigen, HBsAg).目前,西医主要采用抗病毒药物和免疫调节剂进行治疗,但价格较高,疗程长,有副作用;中医采用辨病和辨证相结合,多途径、多层次整体调控,取得一些进展,但中药的特异性抗病毒作用尚不能确定^[2].本文选择(1,4)-2-氨基-2-脱氧- β -D-葡萄糖交联树脂作为载体,通过环氧氯丙烷活化,偶联抗乙型肝炎表面抗原单克隆抗体(Anti-HBsAg monoclonal antibody, Ab),制成免疫吸附剂.利用免疫吸附剂除去 HBsAg,减少对肝细胞的侵蚀,保持体液微环境的平衡,从而达到缓解和治疗的目的.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

(1,4)-2-氨基-2-脱氧- β -D-葡萄糖交联树脂自制^[4], 环氧氯丙烷(天津天泰精细化学

* 1998-04-30 收稿, 1998-05-08 修稿; 国家自然科学基金资助项目(基金号 59503005); ** 通讯联系人

品有限公司)分析纯, Anti-HBsAg monoclonal antibody(天津博泰生物技术公司), 含 HBsAg 血清(天津传染病医院提供), 立可读 EIA(TMB-快速法)检测 HBsAg 试剂盒(中外合资上海实业科华生物技术有限公司), 其余试剂均为分析纯。

UV-2101PC 紫外可见光谱仪(SHIMADZU), FTS 135 傅立叶变换红外光谱仪(BIO-RAD), pH-S-2 型酸度计(上海第二分析仪器厂), THZ-82 型恒温振荡器(上海跃进医疗器械四厂)。

1.2 环氧氯丙烷活化(1,4)-2-氨基-2-脱氧- β -D-葡萄糖交联树脂

将 6g(1,4)-2-氨基-2-脱氧- β -D-葡萄糖交联树脂用蒸馏水充分溶胀后, 抽干, 加入 8mL 2mol/L NaOH 溶液, 边搅拌边滴加 2mL 环氧氯丙烷, 在 45℃ 下反应 4h 后, 抽滤, 分别用丙酮、蒸馏水淋洗树脂, 即得活化树脂。

1.3 偶联抗体

1.3.1 抗体标准曲线的测定 配制一系列不同浓度的抗体溶液, 用紫外光谱测定不同浓度时的吸光度, 以抗体浓度为横坐标, 吸光度为纵坐标得到标准曲线。

1.3.2 免疫吸附剂的制备 活化树脂中加入适量碳酸盐缓冲液(0.1mol/L, pH=9.6)和抗体, 0~4℃ 下反应 24h, 用磷酸盐缓冲液(0.2mol/L, pH=7.4)淋洗树脂, 即得免疫吸附剂, 收集淋洗液并定容, 用紫外光谱测定淋洗液的吸光度, 从标准曲线上得到其中抗体的浓度, 即可计算出抗体的偶联率。

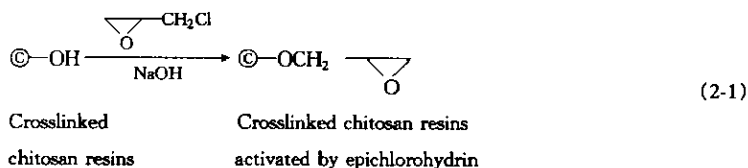
1.4 含 HBsAg 患者阳性血清的吸附实验

免疫吸附剂中加入一定量的乙型肝炎患者阳性血清, 37℃ 下振荡吸附 4h, 取上层清液用立可读 EIA(TMB-快速法)检测 HBsAg 试剂盒测定吸附前后的 O. D. (Optical density, 光密度)值, 判断结果并计算吸附率。判断方法为 $\frac{\text{样品 O.D. 值}}{\text{阴性对照 O.D. 值}} \geq 2.1$, 为阳性(+), 否则为阴性(-)。

2 结果与讨论

2.1 环氧氯丙烷活化(1,4)-2-氨基-2-脱氧- β -D-葡萄糖交联树脂

交联(1,4)-2-氨基-2-脱氧- β -D-葡萄糖树脂中含有大量的羟基, 在碱性环境中与环氧氯丙烷反应, 可在树脂中引入环氧基。活化过程如下式所示。



为得到环氧氯丙烷活化(1,4)-2-氨基-2-脱氧- β -D-葡萄糖交联树脂的最佳条件, 对几个主要影响因素作了系统研究。

图 1 所示为活化时间和活化温度对树脂上的环氧值(Epoxy value, EPV)的影响。

结果表明反应温度和反应时间对于树脂上环氧基的含量有很大影响。在反应初期, 活化反应随反应温度的升高而加快; 当反应进行到一定时间后, 树脂上的环氧值降低, 特别是反应温度较高时, 这种降低的趋势更为明显, 这可能是树脂上的环氧基发生开环反应所

致.反应温度为 25℃ 时,树脂上的环氧基的含量较低,不利于后面抗体的偶联;60℃ 时,可在较短的时间内获得较高的环氧值,但此后环氧值的下降幅度也很大,活化过程不易控制.因此,在 45℃ 进行活化反应,4h 时可获得高的环氧值.

图 2 为 NaOH 的浓度对树脂上环氧的影响.

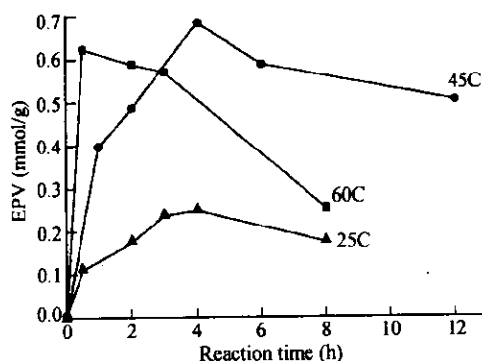


Fig. 1 The effect of reaction time on epoxy value at different temperature

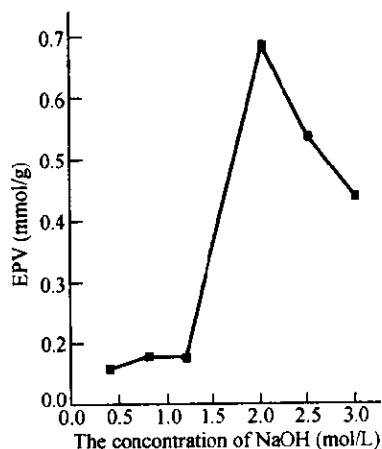


Fig. 2 The effect of the concentration of NaOH on epoxy value

Reaction time: 4h; reaction temperature: 45°C

从中可以看出,随着 NaOH 浓度的增加,活化树脂中环氧基的量增加;当 NaOH 浓度超过 2mol/L 后,环氧值减小.这是因为 NaOH 的浓度过高,可能会使生成的环氧基发生开环,导致环氧基的减少.因此,适宜的 NaOH 浓度为 2mol/L.

图 3 为环氧氯丙烷对树脂上环氧值的影响.

结果表明树脂上的环氧基的含量随着体系中加入的环氧氯丙烷量的增加而增加,当加入量达到一定时,再增加环氧氯丙烷,树脂上的环氧值也不会继续提高,这可能是因为参与活化反应的主要是树脂表面的羟基.因此适宜的环氧氯丙烷用量为 0.33mL/g 树脂.

2.2 抗体偶联

环氧氯丙烷活化后,在树脂表面引入活泼的环氧基,可与抗体中的氨基反应,通过共价键将抗体偶联在吸附剂表面,得到免疫吸附剂.抗体的偶联过程如下:

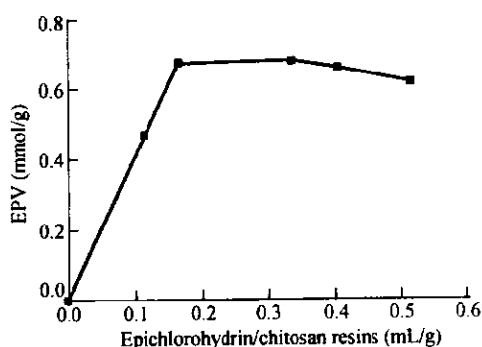


Fig. 3 The effect of epichlorohydrin on epoxy value
NaOH (2mol/L); 8mL; reaction time: 4h; reaction temperature: 45°C

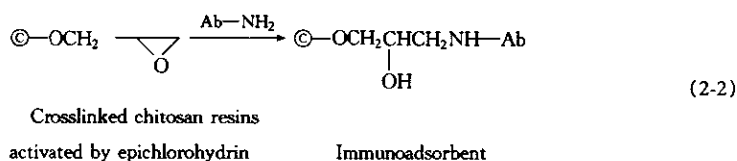


图 4 为抗体的标准曲线.

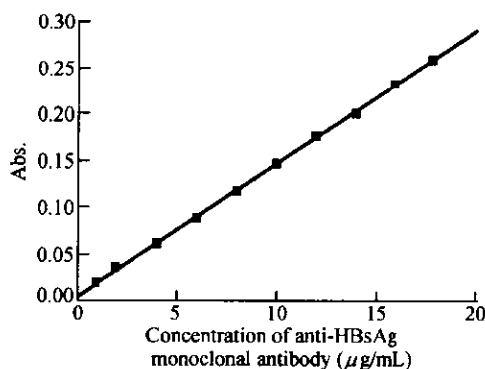


Fig. 4 The standard curve of anti-HBsAg monoclonal antibody in PBS (0.2mol/L, pH = 7.4)

测定淋洗液的吸光度,从标准曲线上得到其中抗体的浓度,即可计算出抗体的偶联率.表 1 为环氧氯丙烷活化(1,4)-2-氨基-2-脱氧-β-D-葡萄糖树脂与抗体偶联反应的结果.

Table 1 Coupling efficiency for anti-HBsAg monoclonal antibody

Immuno-adsorbent	Activated group	Concentration of antibody	Coupling temperature (°C)	Coupling time (h)	Coupling efficiency (%)
<i>I</i> ₁	Epoxy	0.5mg/mL	37	13	70.0
<i>I</i> ₂	Epoxy	0.8mg/mL	0~4	48	17.4
<i>I</i> ₃	Epoxy	1.2mg/mL	0~4	24	17.6

从表中可以反映出,环氧氯丙烷活化的(1,4)-2-氨基-2-脱氧-β-D-葡萄糖树脂在 0~4℃ 和 37℃ 下都可以与抗体发生偶联反应,偶联率分别为 17% 左右和 70%.

2.3 含 HBsAg 患者血清的吸附实验

表 2 所列为环氧氯丙烷活化(1,4)-2-氨基-2-脱氧-β-D-葡萄糖树脂制得的免疫吸附剂对含 HBsAg 阳性血清的吸附实验结果.

Table 2 The adsorption of immunoabsorbents in serum

	Optical density	Result	Adsorption efficiency (%)
Negative contrast sample	0.540		
Serum containing HBsAg	1.253	(+)	
Carrier of immunoabsorbent	1.191	(+)	5.0
<i>I</i> ₁	1.059	(+)	7.0
<i>I</i> ₂	0.980	(-)	22
<i>I</i> ₃	0.698	(-)	44

表 2 的结果表明, (1, 4)-2-氨基-2-脱氧- β -D-葡萄糖交联树脂即免疫吸附剂载体对乙型肝炎患者血清中的 HBsAg 的吸附率仅为 5.0%, 表明该树脂对 HBsAg 无非特异性吸附, 因此, (1, 4)-2-氨基-2-脱氧- β -D-葡萄糖交联树脂适用于作吸附 HBsAg 的免疫吸附剂的载体. 免疫吸附剂 I_1 对 HBsAg 的吸附率仅为 7.0%, 血清仍为阳性, 这是因为 I_1 的偶联温度较高(见表 1), 偶联在载体上的抗体严重失活, 不具备吸附表面抗原的能力; 免疫吸附剂 I_2 和 I_3 均能有效地吸附 HBsAg, 吸附率分别为 22% 和 44%, 使阳性血清转为阴性, 说明在 0~4℃ 条件下偶联的抗体能保持比较高的活性.

以上实验结果表明, 采用环氧氯丙烷活化(1, 4)-2-氨基-2-脱氧- β -D-葡萄糖交联树脂制得的免疫吸附剂, 可以有效地吸附乙型肝炎患者血清中的 HBsAg, 使血清由阳性转为阴性, 为免疫吸附剂治疗乙型肝炎奠定了实验基础.

REFERENCES

- 1 Klinkmann H, Behm E. *Biomater Art Cells Art Org*, 1987, 15(1): 41~58
- 2 Terman D S, Buffaloe G, et al. *Lancet* II, 1979, 824~827
- 3 Wang Baoen(王宝恩). *The new progress in liver diseases-basis and clinic* (肝脏病学新进展——基础与临床). Beijing: Beijing Press (北京出版社), 1996. 33~54
- 4 Li Zhanyong(李湛勇), Shi Linqi(史林启), Chen Yongan(陈永安), et al. *Symposium on Polymers Preprints '97* (全国高分子学术论文报告会论文集), Hefei, 1997. e28~29

THE PREPARATION OF MONOCLONAL ANTIBODY IMMUNOADSORBENT AND THE ADSORPTION FOR HEPATITIS B SURFACE ANTIGEN

LI Zhanyong, SHI Linqi, Song Zhengji

(*The State Key Laboratory of Functional Polymer Materials for Adsorption and Separation*
Institute of Polymer Chemistry, Nankai University, Tianjin 300071)

LIANG Shuren

(*Tianjin Infectious Disease Hospital, Tianjin 300192*)

Abstract The resins of (1, 4)-2-amino-2-deoxy- β -D-glucanresins (chitosan) were activated by epichlorohydrin. The effect factors of activation were studied in detail and the reaction conditions were optimized. Then the anti-HBsAg monoclonal antibody were coupled to the activated carrier to obtain the immunoadsorbent. The adsorption properties of the immunoadsorbent were studied in serum containing HBsAg and the adsorption efficiency reached 44%.

Key words Immunoadsorbent, (1, 4)-2-Amino-2-deoxy- β -D-glucanresins (chitosan), Epichlorohydrin, Monoclonal antibody, Hepatitis B surface antigen