

鸡血清IgG 纯化方法研究

舒文祥, 余为一*, 王静 (安徽农业大学动物科技学院, 安徽合肥 230036)

摘要 [目的] 为了获得高纯度鸡免疫球蛋白(Ig), 并保持其生物学活性。[方法] 比较几种纯化鸡血清免疫球蛋白(IgG)的方法。用饱和硫酸铵 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀法或乙醇沉淀法提取鸡血清IgG, 经透析除盐, 将初提物过sephadex G 200 柱进一步分离IgG, 经免疫电泳和SDS PAGE 电泳进行纯度鉴定。[结果] 结果表明: 在该试验条件下, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 盐析和乙醇沉淀法获得的鸡IgG 经sephadex G 200 柱分离获得高纯度的鸡IgG。[结论] 该研究为找到较好的纯化鸡血清IgG 方法提供了试验依据。

关键词 鸡; IgG; 纯化; SDS PAGE

中图分类号 S852.4 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)25-07835-01

Study on the Purification of IgG from Chicken Serum

SHU Wen Xiang et al (College of Animal Science, Anhui Agricultural University, Hefei, Anhui 230036)

Abstract The objective of the study is to obtain highly purified chicken IgG and maintain its biological activity. Some methods about purification of serum IgG from chicken were appraised. Firstly, chicken serum was extracted by saturated ammonium sulfate precipitation or ethanol precipitation. After dialysis for desalination, the original extracts are purified by sephadex G 200 column chromatography. The purified chicken IgG was identified by SDS-PAGE. The study has found a fairly good method in obtaining purified chicken serum IgG and provided the basis for further experiment.

Key words Chicken; IgG; Purification; SDS PAGE

提取IgG的传统方法是用硫酸铵盐析得到粗制的Ig, 然后再经分子筛层析、离子交换层析或亲和层析等方法的进一步分离纯化IgG^[1]。为获得高纯度的Ig, 并保持其生物学活性, 笔者采用硫酸铵盐析与乙醇沉淀2种方法粗提鸡血清IgG, 然后用Sephadex G 200 凝胶进一步分离纯化鸡血清IgG。

1 材料与方 法

1.1 材料 鸡血清采自健康成年鸡。Sephadex G 200 购自上海生工生物工程有限公司。

1.2 饱和硫酸铵沉淀法 按文献[2-3]方法取鸡血清加等量PB(0.1 mol/L, pH值7.4)液, 室温下边搅拌边加入双倍体积血清量的饱和硫酸铵, 4℃静置30 min, 3 000 r/min离心30 min; 沉淀用PB溶解至原体积, 然后边搅拌边加半量饱和硫酸铵, 4℃静置30 min, 3 000 r/min离心30 min, 再重复上述操作1次。沉淀用PB溶解, 装入透析袋, 于4℃下透析48 h除盐, 其间换液至少7次。

1.3 乙醇沉淀法提取免疫球蛋白 按徐宜为^[4]的方法, 取鸡血清10 ml, 加10 ml蒸馏水, 调pH值至7.7, 并冷却至0℃, 缓慢加入50%乙醇, 使其终浓度为20%, 置4℃冰箱中继续搅拌12 h, 1 500 r/min离心30 min, 沉淀用PBS溶解并透析(4℃)48 h。

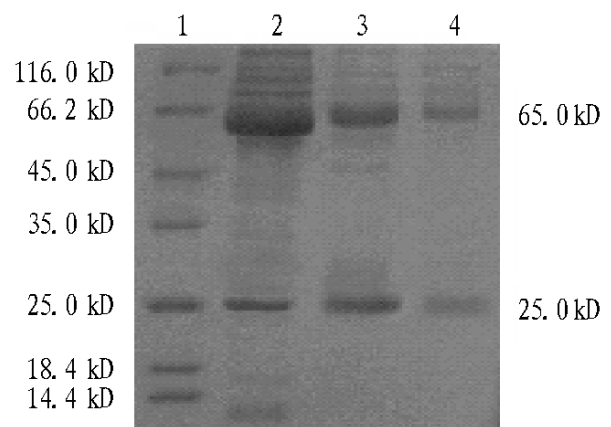
1.4 Sephadex G 200 凝胶层析 处理后的凝胶按李建武^[5]的方法装柱、用200 ml 0.01 mol/L pH值7.4的PBS平衡24 h, 流速10 ml/min、最后上样和洗脱, 流速为8~10 ml/min。同时收集洗脱液, 用20%磺基水杨酸, 检测各份样品。收集物保存于-20℃冰箱。

1.5 SDS-PAGE 电泳检测纯化蛋白纯度 将不同方法提取的鸡血清IgG样品, 按萨姆布鲁克^[6]的方法进行制胶、电泳和染色等。

2 结果与分析

2.1 饱和硫酸铵沉淀法与乙醇沉淀法提取鸡血清IgG 结果比较 分别用饱和硫酸铵沉淀法和乙醇沉淀法粗提鸡血清

IgG, 结果如图1所示。图1表明, 2种方法提取鸡血清IgG在SDS-PAGE电泳图谱中, 显示有多条带, 虽然纯度均不高, 但是2种方法能不同程度的纯化IgG, 因为其中65和25 kD的蛋白条带仍比较明显。相比之下, 饱和硫酸铵沉淀法比乙醇沉淀法所获得的免疫球蛋白浓度较高。



注: 1 为Marker; 2 为全鸡血清; 3 为经硫酸铵盐析后的鸡血清; 4 为经乙醇盐析后的鸡血清。下同。

2.2 Sephadex G 200 凝胶层析鸡血清IgG 粗提物的结果 经饱和硫酸铵沉淀法纯化后的鸡血清IgG提取物, 再进行Sephadex G 200 凝胶层析。SDS-PAGE电泳图谱的结果表明(图2), IgG纯度在经层析后的样品比只经饱和硫酸铵沉淀法的样品中更高。

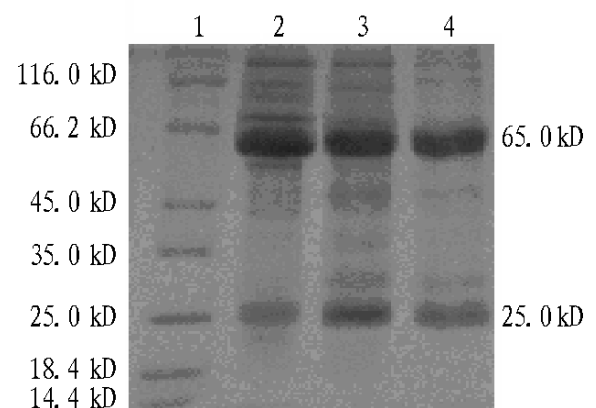


图2 鸡血清IgG 纯化产物的SDS-PAGE电泳结果

3 讨论

硫酸铵盐是盐析法分级分离蛋白质最常用的一种中性盐。它在水中的溶解度受温度影响小, 用其处理的蛋白质一

(下转第7837页)

基金项目 国家自然科学基金项目(30270974); 安徽省“十五”科技攻关项目(01013003)。

作者简介 舒文祥(1980-), 男, 安徽安庆人, 硕士研究生, 研究方向: 兽医微生物与免疫学。* 通讯作者。

收稿日期 2007-05-08

(上接第7835页)

般不会引起失活^[7]。乙醇沉淀法提取IgG也是实验室常用的免疫球蛋白提取方法,可以去除大量的非免疫球蛋白组分。鸡血清经2种方法处理后,基本去掉了除球蛋白以外的其他血清蛋白成分,然后过分子筛,根据分子量大小逐级分离纯化,获得的IgG纯度较高,经SDS-PAGE电泳显示有2条带,即重链和轻链,经免疫电泳显示只出现一条带。而只用硫酸铵沉淀法或乙醇沉淀法所获得的产物经SDS-PAGE电泳显示有多条带。但由于乙醇沉淀法提取免疫球蛋白耗时较长,且乙醇易挥发,浓度不易控制,故该试验主要采用硫酸铵盐析法提取血清免疫球蛋白。

另外,从SDS-PAGE电泳条带可看出,鸡血清IgG的重链分子量大约为65 kD,较哺乳动物IgG重链要大(一般哺乳动物IgG重链为52 kD左右,而鸡IgG重链为65~70 kD)。

参考文献

- [1] 钟旗,玛依拉. 鸡IgG快速分离纯化和纯度鉴定[J]. 中国兽医杂志, 2000,26(8):20-21.
- [2] 张婕,唐吉克孜·艾沙,钟旗,等. 用辛酸—硫酸铵法快速提纯鸡IgG[J]. 新疆农业科学,1999(3),134-135.
- [3] 赖平安,于同泉. 不同方法提取鸡血清IgG及纯度鉴定[J]. 北京农学院学报,1995:10(1):126-128.
- [4] 徐宜为. 免疫检测技术[M]. 2版. 北京:科学出版社,1997.
- [5] 李建武. 生物化学实验原理和方法[M]. 北京:北京大学出版社,1994.
- [6] J. 萨姆布鲁克, E.F. 弗里奇, T. 曼尼阿蒂斯. 分子克隆实验指南[M]. 2版. 北京:科学出版社,1996.
- [7] 沈倍奋,陈志南,刘民培,等. 重组抗体[M]. 北京:科学出版社,2005.