

海藻糖对单克隆抗体热稳定性保护作用的研究*

计 融 江 涛 李业鹏 崔生辉 李燕俊 韩春卉 李玉伟 刘红蕾 张 靖 赵 熙

(卫生部食品卫生监督检验所,北京 100021)

摘 要:为研究海藻糖在保护单克隆抗体热稳定性方面的作用,将海藻糖化单克隆抗体置于室温、37℃、56℃条件下存放,采用倍比稀释法对抗体活性进行检测,同时还比较不同浓度的海藻糖对单克隆抗体热稳定性的影响。实验结果表明:海藻糖的浓度为0.250 mol/L,且在室温存放的条件下,抗体可以存放一年而具有活性。因此,海藻糖可以作为一种天然保藏剂,有效地提高单克隆抗体的热稳定性,相对延长其在室温条件下的存放时间。

关键词:海藻糖 抗体,单克隆

中图分类号:Q539⁺.3;R392.11

文献标识码:A

文章编号:1004-8456(2001)02-0010-03

自然界存在着一类称为隐生生命(cryptobiotic hidden life)的生物即脱水的动植物。这类生物在极端干燥的条件下可将体内99%的水脱去而不死亡,原因在于它们的细胞中含有大量的海藻糖,有的含量可高达细胞干重的35%。海藻糖(Trehalose, α -D-flucopyranoside)是一种广泛存在于低等植物、藻类、真菌、酵母、昆虫及无脊椎动物体内的一种非还原性双糖,结构稳定,化学惰性,无毒性。富含海藻糖的生物在干燥时脱水,以极低或停止的新陈代谢形式处在一种保存状态,表现为无生命活动,当环境允许再水化时,它们在几小时内即可复活,而不损坏其组织中的脂类、蛋白质、糖类、核酸等生命物质。研究表明,存在于细胞中的海藻糖含量依据外界环境的变化而不同。当细胞处于干燥、高温、高渗透压等环境时,细胞内海藻糖含量迅速上升。因此,可以认为海藻糖在细胞中是一种典型的应激代谢产物,是细胞抵御干燥伤害的物质基础,在干燥时,海藻糖起着保护生物组织、细胞与生命物质不受破坏的作用。^[1]

目前生物大分子已在医药、临床检测和食品毒素检测等方面得到广泛的应用,但是这些试剂一般是以液体状态保存于冰箱中,不适于在无冷链的环境下运输或在无冷藏冷冻条件的基层单位储存和使用。其主要原因是生物大分子在常温下会很快失活。近年来出现的建立在海藻糖基础上的天然保藏剂,为单克隆抗体等生物大分子物质的热稳定性保护提供了新的方法。本研究采用海藻糖作为单克隆抗体的稳定介质,研究海藻糖对单克隆抗体热稳定

性的保护作用。

1 材料与方法

1.1 仪器和材料

ε 960 酶标仪 METERTECH INC

真空冷冻干燥机 Bathold Hermle GmbH

单克隆抗体细胞株 河₁毒素单克隆抗体(TTX-McAb)由本室自行制备。

河₁毒素(TTX) 海洋海业公司奥森制药制品,纯度为99.9%以上。

辣根过氧化物酶(HRP) 华美生物工程公司。

牛血清白蛋白(BSA) 华美生物工程公司。

海藻糖 上海试剂二厂。

高碘酸钠、硼氢化钠、甲醛、硫酸铵、辛酸,均为分析纯。

醋酸缓冲液 pH 4.4。

磷酸盐缓冲生理盐水(PBS) pH 7.0。

碳酸盐缓冲液 pH 9.5。

Balb/c 小鼠 购自中国医学科学院肿瘤医院。

1.2 实验方法

1.2.1 牛血清蛋白-甲醛-河₁毒素连接物(BSA-HCHO-TTX)的制备^[2] 在小烧杯中依次加入30.0 mg BSA, 6.0 mL 1 mol/L 乙酸缓冲液, 4.0 mL TTX (1.0 mg/mL), 逐滴加入180 μL 37%甲醛,混匀,37℃磁力搅拌状态下反应72 h。然后用1 L 0.050 mol/L PBS 缓冲液(pH 7.0)4℃透析72 h,冻干,得到牛血清蛋白-甲醛-河₁毒素连接物。

1.2.2 单克隆抗体的制备

将能分泌河₁毒素单克隆抗体的杂交瘤细胞

* 中国预防医学科学院科研基金资助课题

株,注入 Blab/c 小鼠腹腔,使其产生腹水,用饱和硫酸铵 - 辛酸法对腹水进行纯化,保存于 - 40 °C 冰箱。

1.2.3 单克隆抗体辣根过氧化物酶标记物 (TTX-Ab- HRP) 的制备 将 10 mg HRP 溶于 2.5 mL 双蒸水中,将 0.5 mL 新鲜配制的 0.1 mol/L 高碘酸钠加到 HRP 溶液中,室温搅拌 20 min,上述溶液在 pH 4.4 的 0.01 mol/L 乙酸缓冲液中透析过夜。用 0.2 mol/L (pH 9.5) 碳酸盐缓冲液调到 pH 9.0~9.5 之后,立即加入饱和硫酸铵 - 辛酸纯化的抗体上清液 (TTX-Ab) 1.8 mL,反应混合物在室温下搅拌 2 h,加入 0.5 mL 新鲜配制的 4 mg/mL 硼氢化钠溶液,混合物置 4 °C 反应 2 h。然后将标记物置于 0.01 mol/L 碳酸盐缓冲液中透析过夜,再加入等量饱和的硫酸铵溶液,4 °C 放置 1 h,10000 r/m,4 °C 离心 30 min,将沉淀溶于 0.01 mol/L PBS 中透析过夜,最后将反应物分装冻存。

1.2.4 海藻糖化试样的制备 将河 毒素抗体 (TTX-Ab- HRP) 与不同浓度的海藻糖溶液等体积混合,分别配制成海藻糖浓度为 0.050、0.125、0.250、0.500 mol/L 的海藻糖化单克隆抗体,分装成 360 份,分别在真空冷冻、37 °C、56 °C 的条件下进行干燥。干燥后的试样再分成 3 等份置于室温、37 °C、56 °C 条件下存放,各部分均于第 1、7、14、21、30、60、90、180、270、360 天进行河 毒素抗体活性的检测。同时将河 毒素抗体与抗体稀释液等体积混合,按上述方法进行干燥、存放,作为试样对照。

1.2.5 河 毒素抗体有效稀释浓度测定 以牛血清蛋白 - 甲醛 - 河 毒素连接物为包被抗原,包被酶标微孔板。将制备好的试样及对照用抗体稀释液稀释,用直接 ELISA 方法测定抗体有效稀释浓度的变化。设定最小稀释浓度为 1 :1000,抗体活性的判定以 A 值大于 0.5 的试样最大稀释度为各个试样的有效稀释浓度。

2 结果与讨论

2.1 干燥温度对海藻糖化抗体活性的影响

干燥温度对抗体的活性影响极大。由图 1 可见,真空冷冻干燥后其抗体有效稀释浓度仍然保持其初始有效稀释浓度,在干燥过程中不发生变化,而在 37 °C 和 56 °C 条件下干燥,干燥温度越高,对单克隆抗体的影响越大,抗体的活性下降越快。

2.2 不同浓度的海藻糖及不同的存放温度对抗体热稳定性的影响 (表 2,表 3)

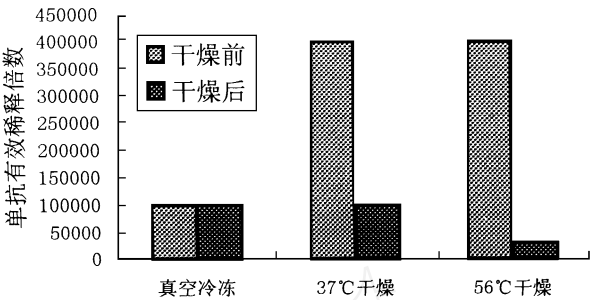


图 1 干燥温度对海藻糖化单克隆抗体活性的影响

表 2 37 °C 干燥的海藻糖化单克隆抗体在不同存放温度下的存放时间 d

海藻糖浓度 mol/L	存放温度		
	室温	37 °C	56 °C
0.000	1	1	1
0.050	60	30	14
0.125	180	180	30
0.250	360	270	30

表 3 56 °C 干燥的海藻糖化单克隆抗体在不同存放温度下的存放时间 d

海藻糖浓度 mol/L	存放温度		
	室温	37 °C	56 °C
0.000	1	1	1
0.050	7	1	1
0.125	14	21	1
0.250	30	21	1

由表 2、3 可见,0.250 mol/L 的海藻糖对抗体活性的保护作用较大,可明显延长抗体的存放时间。室温与 37 °C 两种存放条件对抗体活性有一定的影响,56 °C 存放则会大大缩短抗体的存放时间。

2.3 海藻糖化与真空冷冻干燥对抗体活性保护作用的对比

与传统的真空冷冻干燥方式相比,海藻糖对抗体的热稳定性更具有保护作用。由表 4 可见,不加海藻糖时,经真空冷冻干燥的抗体其存放时间只有 14 天,而在添加海藻糖后,其抗体活性保存时间大大延长。

3 讨论

3.1 对于海藻糖稳定生物分子的机理,目前主要有两种假说:一种称为“水替代”假说,它认为海藻糖能与其他多元醇一起同生物分子形成氢键,代替维持空间结构所必须的水分子。^[3] 另一种称为“玻璃态”

表4 海藻糖化与真空冷冻干燥
对抗体活性保存天数的对比

干燥条件	海藻糖浓度 mol/L	存放温度	
		室温	37 °C
真空冷冻干燥	0.000	14	14
	0.000	1	1
37 °C干燥	0.050	60	30
	0.125	180	180
	0.250	360	270

假说,这一假说认为通过海藻糖玻璃化转变趋势,导致无定型连续相的形成,在结构上与玻璃态的冰相似,在这种结构中分子运动和分子变性反应非常微弱,因此起到保护细胞结构,使生物组织不受伤害的作用。^[4]

3.2 海藻糖可以作为单克隆抗体的保存剂,明显提高单克隆抗体的热稳定性,相对延长在较高温度下的保存时间。本实验中使用3种不同浓度(0.050、0.125、0.250 mol/L)的海藻糖对抗体进行保护,结果显示0.125 mol/L和0.250 mol/L的海藻糖对抗体具有较好的保护作用。

3.3 真空冷冻、37 °C和56 °C3种不同的干燥条件对抗体活性的影响差别很大,真空冷冻干燥具有较好的效果,因为它可以保证抗体的有效稀释浓度在整个干燥过程中不发生变化;37 °C干燥对抗体的有效稀释浓度有较大的影响;56 °C干燥则对抗体的有效稀释浓度有极大影响。因此在使用生物大分子海藻糖化保护时,必须选择较低的干燥温度,以尽可能保

持生物大分子的活性。

3.4 存放温度对用海藻糖保护的抗体有效稀释浓度也有影响,实验中共设3种不同的保存温度(室温、37 °C、56 °C),结果表明,在室温和37 °C下保存对用海藻糖保护的抗体有效稀释浓度的影响差别不大,而在56 °C条件下保存则对抗体的有效稀释浓度有很大的影响。

3.5 一般情况下多采用真空冷冻干燥作为抗体的保护方法,而且要与低温冷藏联合使用才能保证其作用。而在加入海藻糖后,则不需真空冷冻干燥、也不需要低温冷藏就可保证较长的存放时间。

综上所述,海藻糖作为一种天然保存剂,可以在很大程度上提高单克隆抗体的热稳定性,延长在室温下的保藏期,在食品卫生检测用生物大分子的活性保护方面具有重要意义。

参考文献:

- [1] 戴秀玉,程萃,周坚,等.海藻糖的生理功能、分子生物学研究及应用前景[J].微生物学通报.1995,22(2):102—103.
- [2] 王健伟,王德斌,罗雪云,等.抗河豚毒素单克隆抗体的制备及其特性的初步研究[J].卫生研究.1996,25(5):308—311.
- [3] Otting G,Liepinsh E,Wuthrich K. Protein hydration in aqueous solution[J]. Science,1991,254:974.
- [4] Frank F,Hatley,RHM, et al. Materials Science and the production of shelf-stable biologicals[J]. Biopharm. 1991,4:38.

Study on the thermal stabilization of monoclonal antibody by trehalose/Ji Rong ,Jiang Tao ,Li Yepeng ,et al. //Chinese Journal of Food Hygiene. - 2001,13(2):10~12

Abstract: The trehalose's protective effects on the thermal stability of monoclonal antibody were studied. The results showed that thehalose can serve as a natural protection to increase the thermal stability of monoclonal antibody. Comparing the protection efficiency of the three different trehalose's concentration and different store temperature ,the conclusion from the study is that the monoclonal antibody of tetrodotxin can keep one year at 0.250 mol/L trehalose and at room temperature.

Author's address: Ji Rong , Institute of Food Safety Control and Inspection ,Ministry of Health ,Beijing 100021 PRC

Key Words: Trehalose Antibodies ,Monoclonal