

酵素標幟抗體之開發及接合技術之改進研究

費昌勇 黃天祥 馬屏禾*

台灣省家畜衛生試驗所

分別以戊二醛及Nakane兩種酵素接合法將抗豬 IgG 抗體接合，以比較兩者之效果。結果顯示以戊二醛接合之抗體產品可以ConA - Sepharose 將未與酵素接合之游離抗體與已與酵素接合之抗體分開；而以Nakane法接合之產品則無法將二者分開，此乃後者酵素中之醣已被氧化而無法與ConA - Sepharose 結合之故。經處理後之最終產品以戊二醛法接合者及以Nakane法接合者其酵素與抗體之molarity比分為1.5及0.9，顯示前者之效果較佳。

目前吾人在進行酵素免疫測定 (ELISA) 之研究時，必須使用到山葵過氧化酶 (HRP) 酵素所標幟之二次抗體。根據 Lann'er 等⁽⁴⁾ 之研究發現，目前市售之酵素標幟抗體成品有 50% 之抗體未標幟酵素，且有約 80% 之游離酵素。由於抗體抗原之反應是模版式接合，因此未標幟酵素之抗體較標幟酵素之抗體，對抗原之競爭力較高。為求獲得更好之試驗結果，吾人試圖進行將未標幟酵素之抗體與已標幟酵素之抗體分開。目前本系已有能力將未標幟之酵素與抗體分開⁽¹⁾，但尚未能將已標幟酵素之抗體 (分子量 19 萬) 和未標幟酵素之抗體 (分子量 15 萬) 分開。就本系之業務而言，各種豬病 ELISA 之研製是一項未來之重點工作，因此擬自行進行研究以 ConA - Sepharose 分離已標幟抗體與未標幟抗體之技術。

目前酵素標幟抗體之方法有三種，有二種是戊二醛接合法⁽⁵⁾，另一種是 Wilson 及

Nakane⁽⁶⁾ 之接合法，吾人常用之酵素以山葵過氧化酵素最普遍。前一種方法是以 glut-aldehyde 之一端與酵素接合，其另一端與抗體分子接合；第二種方法是以氧化劑將酵素之糖氧化成醛，再與抗體之胺基形成 Schiff base，經還原後成共價鍵。此兩種方法之機轉完全不同，但前者之成品可再以 ConA - Sepharose 除去游離之抗體分子，後者則不能。本文係比較此兩種方法之異同。

材料與方法

(一) 抗血清之生產：

以本系自行發展之方法純化豬之 IgG⁽²⁾，再將 IgG 混以 Freund 完全及不完全佐劑免疫家兔，免疫時按期測定力價，待力價達 64 倍以上時放血，即得高免疫血清。

(二) 特異性抗體之獲取⁽²⁾：

由於高免疫血清抗體之蛋白質質量僅佔血清總

* 國立台北護理專科學校

蛋白量之1%以下，故吾人認為應該將此特異性抗體與其他蛋白質分開。方法係將純化之豬 IgG 與 Sepharose CL-4B 連接，將此1%以下之特異性抗體以親和性層析析出。

(三) 酵素抗體之標識 (6) :

取適當量之酵素，將之以氧化和還原之方法與抗體連接，使其與抗體以共價鍵緊密接合。再以 Sephacryl S-200，將游離之酵素與抗體部分分開。各取 50mg 之抗豬 IgG 及 25 mg 之 HRP 酵素分別進行下述兩種試驗。

(1) Two-step glutaraldehyde method (A 產品)

1. 10mg horseradish peroxidase (RZ 3.0) is dissolved in 0.2ml 0.1M PBS pH 6.8 containing 1.25% glutaraldehyde. Mixture is left overnight at room temperature.
2. The mixture is dialyzed against normal saline or passed down a Sephadex G25 column to remove free glutaraldehyde. Solution is made up to 1.0ml in normal saline.
3. The globulin solution of the anti-serum is dialyzed against PBS at +4°C and is adjusted to 5mg/ml in normal saline.
4. 1.0ml of the globulin solution is mixed with 1.0ml of the activated HRP solution and 0.1ml 1M carbonate bicarbonate buffer pH 9.5 is added and the mixture is allowed to stand at +4°C for 24 hours.
5. 0.1ml 0.2M lysine solution is added and mixture is kept at room temperature for 2 hours.
6. The mixture is dialyzed against PBS pH 7.2 overnight.
7. The enzyme-labelled globulin is precipitated by addition of an

equal volume of saturated ammonium sulphate solution. Precipitate is washed twice in half saturated ammonium sulphate, and is suspended in 1.0ml PBS.

8. The conjugate is dialyzed against PBS extensively (or passed down a Sephadex G25 column).
9. Conjugate is centrifuged at 10,000G for 30 minutes and sediment is discarded. Bovine serum albumin is added to 1%.
10. Conjugate is filtrated through a millipore filter (0.22µm). It can be stored at -20°C or at +4°C if an equal amount of glycerol is added.

(2) Periodate method (Wilson & Nakane) (B 產品)

Suitable for peroxidase.

1. Dissolve 4mg horse-radish peroxidase (RZ 3.0) in 1.0ml H₂O. Add 0.2ml freshly made 0.1M NaIO₄. Stir for 20 minutes at room temperature.
2. Dialyze against 1mM sodium acetate buffer pH4.4 overnight at +4°C.
3. Add 20ul 0.2M carbonate buffer pH 9.5 and at once add 8mg immunoglobulin dissolved in 1.0ml 0.01M carbonate buffer pH 9.5. Stir 2 hours at room temperature.
4. Add 0.1ml fresh sodium borohydride solution (4mg/ml in H₂O). Allow to stand 2 hours at +4°C.
5. Dialyzed against PBS, then repeated steps 9 and 10 in method (1).

四) 已標識與未標識抗體之分離 (4) :

將已去除游離酵素之抗體通過 ConA Sepharose, 使已標識之抗體得以吸附其上, 而與未標識之抗體分開, 再尋求適當之緩衝液予以析出前者。

結果與討論

抗豬 IgG 抗體之精製 :

將抗豬 IgG 高免血清與接有豬 IgG 之 Sepharose CL-4B 反應以 affinity chromatography 之方法取得精製之抗體, 再以不容性色層分析去除 IgM, IgA 等抗體分子, 即得分子量約 15 萬之純 IgG 抗體分子, 該抗體經 immunoelectrophoresis 測試後無誤 (圖 1)。

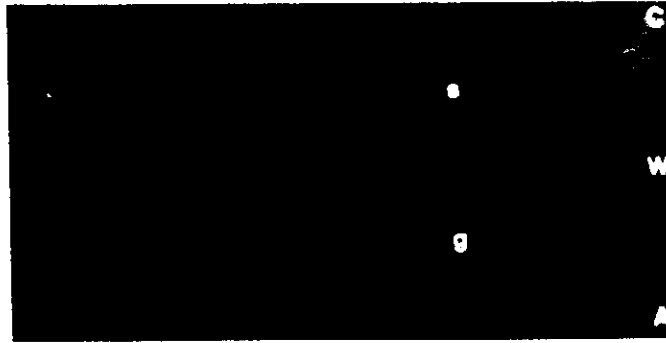


圖 1 經純化之豬 IgG (G) 與吾人自製之抗豬 IgG 抗體 (C), 與豬之全血清 (S) 及進口之抗豬全血清 (W) 及進口抗豬 IgG 抗血清 (A) 之免疫電泳分析圖。

標識抗體與游離酵素之分離 :

將標識後之抗體原液以 Sephacryl S-200 做色層分析, 得圖 2, 3。將圖 2 之主峯回收, 以 100 mM NaCl, 1% butanol, 50 mM NaH₂PO₄, pH 7.0 之溶液透析

, 然後通入 ConA-Sepharose column, 未被析出之成分再以加有 10 mM alpha-methyl-D-mannoside 之上述溶液進行層析, 可得抗體與酵素之結合體, 此即本文之 A 產品, 另圖 3 之主峯以同法回收後即本文之 B 產品。

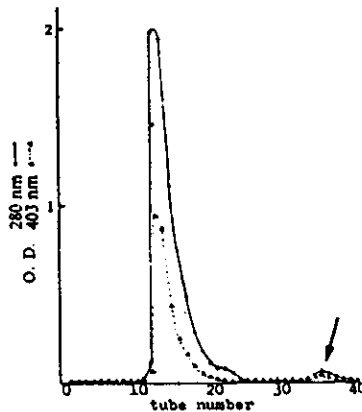


圖 2 以 glutaldehyde 接合之酵素與抗體混合物, 經 S-200 層析後之圖形, 箭頭顯示游離之酵素。

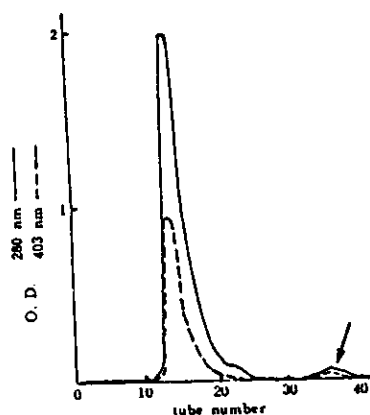


圖3 以Nakane法接合之酵素與抗體混合物，經S-200層析後之圖形，箭頭顯示游離之酵素。

表1 兩種產品之處理前後比較

產 品	色 層 分 析	抗 體 回 收 率	酵 素 回 收 率	酵 素 / 抗 體 比 *
A	S - 200	90 %	38 %	0.8
	ConA 1	43 %	2 %	0.1
	ConA 2	38 %	31 %	1.5
B	S - 200	93 %	43 %	0.9
	ConA 1	73 %	35 %	0.9
	ConA 2	3 %	—**	—

* molaritgy ratio

** 低至無法測定。

由表1得知以glutaldehyde標識之抗體經ConA - Sepharose處理後之最終產品可以提高酵素與抗體之分子比，但消耗甚多量之酵素；以Nakane法標識之最終產品雖然酵素與抗體之分子比略低，但產量較高；以ConA - Sepharose進一步處理經glutaldehyde接合之抗體分子之原因是基於抗體抗原接合原理—Lock and Key。若抗體分子含有酵素，則其對抗原之競爭力必遜於未接有任何物質之游離抗體而影響試驗成績。然而，以此兩種產品經長期使用於ELISA後，深覺抗原之製備

猶重於試驗材料之差異。

參考文獻

1. 費昌勇、張惟若、楊揚輝、邱仕炎。1986。經福馬林固定之牛脾臟細胞內之免疫球蛋白之免疫酶染色法。台灣省家畜衛生試驗所研究報告。22:5~12。
2. 費昌勇、黃天祥、林敬覆、曹素華。1986。以試管沉降法純化免疫球蛋白抗原。台灣省家畜衛生試驗所研究報告。22:63~72。

3. Avrameas, S., and B. Guibert 1971 Biologically active waterinsoluble protein polymers. Their use for isolation of specific interaction proteins. *Biochemistry* 53:603-629.
- 4 Lanner, M., R. Berguist, J. Carlsson, G. Huldt 1978. Purification of Enzyme-labelled conjugation by affinity chromatography. p.237-241, in "Affinity Chromatography" ed. Hoffmann-Ostenhof et al. Pergamon Press. Oxford.
5. Voller, A., D.E. Bidwell, and A. Bartlett 1979. The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). p.39-40. Nuffield laboratories of Comparative Medicine. The Zoological Society of London.

THE DEVELOPMENT OF ENZYME CONJUGATION AND ITS TECHNIC IMPROVEMENT

Fei, C.Y., T.S. Huang, P.H. Mar*

Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health.

Rabbit anti-swine IgG antibody was conjugated with horse raddish peroxidase by the glutaldehyde and Nakane methods to evaluate the effect of the two conjugation methods.

Results showed the product of the glutaldehyde method could be further purified by ConA-sepharose to separate the free antibody and the conjugated antibody. The product of the Nakane method could not be further purified by the ConA-sepharose because the sugar of the enzyme was oxygenated in the conjugation process. The molarity ratio of enzyme/antibody of the glutaldehyde and Nakane methods were 1.5 and 0.9 respectively.

* National Taipei College of Nursing