

小鼠抗天花粉蛋白 IgE 型单抗的酶解及其 Fab 的制备^{*}

何贤辉 柯一保 孙 汛 蔡迎春 季永镛 聂慧玲

(中国科学院上海细胞生物研究所, 上海 200031)

摘要 研究了 Papain 及 Trypsin 裂解小鼠抗天花粉蛋白 IgE 单抗的条件及 Fab 的制备. Papain 和 Trypsin 两者都可产生 $F(ab')_2$, 分子量在 150~160 kD 左右; 经 Papain 裂解的主要产物中还有 Fab, 分子量 72 kD, 可通过凝胶过滤获得纯的 Fab. 而 Trypsin 裂解物经 DTT 还原、碘乙酰胺烷化虽然也可得到 $Fab'(t)$, 但不易纯化. 可见, 要制备 Fab 以采用 Papain 裂解为好, 而制备 $F(ab')_2$ 则可采用 Trypsin 裂解. 这二个酶的裂解速度是 Trypsin 大于 Papain.

关键词: IgE, 蛋白酶解, 木瓜蛋白酶, 胰蛋白酶, Fab

IgE 在正常个体中含量很少, 因此对其结构功能的研究大多采用单克隆抗体进行. Bennich 等^[1]以 Papain 及 Trypsin 对人 IgE 进行了裂解. 大鼠 IgE 的酶解也已被研究^[2]. 这些研究表明 IgE 酶解后可得到 $F(ab')_2$ 片段. 此外, Rousseaux-Prevost 等^[2]提示小鼠 IgE 裂解后有少量 Fab 片段产生. Perez-Montfort 及 Metzger^[3]以 Trypsin 对小鼠 IgE 进行了裂解, 主要产物为 $F(ab')_2$. Haba 等^[4]以 Papain、Pepsin 及 Trypsin 对小鼠 IgE 进行酶解, 获得 $F(ab')_2$ 及 Fab.

柯一保等^[5]利用 IgG 的 Fab 及天花粉蛋白 (Trichosanthin, TCS) 的裂解片段研究了 TCS 的抗原决定簇, 这种多抗制备的 Fab 只能了解 TCS 的抗原决定簇情况, 过敏原决定簇的结构则必须以多克隆 IgE 抗体或 IgE 型单抗来研究. 前文^[5]研究了化学修饰对 TCS 与 IgE 反应活性的影响, 为进一步了解 IgE 与 TCS 的相互作用部位, 以及 TCS 上过敏原决定簇的结构, 我们对一株小鼠抗 TCS 的 IgE 型单抗 (TE-1)^[6] 的酶解进行了研究, 得到了纯的 Fab, 以便进一步进行 Fab 结晶或 Fab 与 TCS 的共晶的研究.

1 材料与方 法

1.1 材料

DTT (Dithiothreitol) 为 Serva 产品; PMSF (Phenylmethylsulphonyl fluoride) 为 E. Merck 产品; Trypsin (Type VIII, TPCK-treated)、Papain (2×crystallized) 及 CNBr-activated Sepharose 4B 均为 Sigma 产品; Sephadex G-200 为 Pharmacia 进口分装; L-cystein 为上海生化所东风厂产品; 其余试剂均为分析纯级产品.

1.2 方法

1.2.1 TE-1 小鼠腹水: 由本所董杰、季永镛等提供.

* “863-103”国家高技术资金资助项目

收稿日期: 1994-08-16, 修回日期: 1994-10-03

1.2.2 TCS-Sepharose 4B 的制备:按溴化氰活化方法进行。TCS 由本组制备^[5], SDS-PAGE (sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) 上显示一条带。

1.2.3 IgE 的纯化:按文献[5,6]的方法进行。

1.2.4 酶解条件: Papain 裂解按 Haba 等^[4]方法进行。即在 37℃, 0.1 mol/L 磷酸钠缓冲液, pH7.0, 含 0.01mol/L L-cystein 和 0.002 mol/L EDTA, 酶与 IgE 的比为 1:100。以碘代乙酰胺终止反应(终浓度为 0.02 mol/L)。Trypsin 的裂解按文献[3]的方法在室温(22℃左右)进行, 缓冲液为 50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 含 10 mmol/L CaCl₂。酶与 IgE 比例为 1:50, 反应以 PMSF 终止(终浓度为 1mmol/L)。为了得到 Fab', 在裂解终止后加入 DTT 至 5 mmol/L, 室温放置 30 min 后加入碘代乙酰胺至 11 mmol/L, 反应 10 min 后透析除去未反应的小分子。

1.2.5 其他方法: SDS-PAGE 按 Laemmli 的方法^[7]进行。非还原胶的聚丙烯酰胺浓度为 7.5%, 还原胶的浓度为 12.5%, 电泳结束后以 0.25% 考马斯亮蓝 R250 染色或银染。凝胶过滤在 Sephadex G-200 柱(2×94 cm)上进行, 以 PBS 进行洗脱。蛋白浓度以 280 nm 与 260 nm 的紫外分光光度法测定, 按经验公式: $1.45 \times A_{280\text{ nm}} - 0.74 \times A_{260\text{ nm}}$ 计算蛋白质浓度。

2 结 果

2.1 木瓜蛋白酶裂解 IgE 的研究

2.1.1 酶解时间的选择: Fig. 1a 为 IgE 经木瓜蛋白酶不同时间处理后的 SDS-PAGE 情况。4h 左右主要产物为分子量约 150~160 kD 及 92 kD 两种, 尚有较多的 IgE 未被降解; 24 h 后 92 kD 的蛋白条带几乎消失, 出现分子量 72 kD 左右的一条蛋白区带; 48 h 后水解已完全, 继续延长时间情况不变。进一步的分析(见下面)表明, 150~160 kD 左右的条带即 F(ab')₂, 72 kD 的条带为 Fab。还原条件下的电泳(Fig. 1b)显示, 轻链在整个水解过程中基本不变, 分子量保持 27 kD; 分子量 80 kD 的重链(ε 链)在 8 h 左右部分裂解为 53.5 kD 的片段, 24 h 后又产生一种分子量更小(约 37.5 kD)的片段。

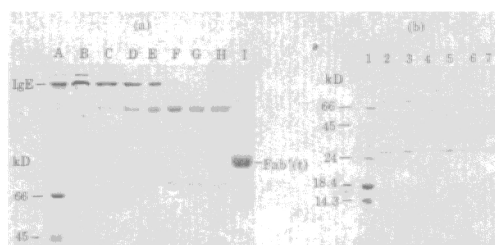


Fig. 1 SDS-PAGE showing the time course of digestion of IgE(TE-1) with papain
a: unreduced; b: reduced (with β -mercaptoethanol).

Lanes A and 1, M, marker; lane B, IgE; lanes C—H and 2—7, IgE digested for periods of 2, 4, 8, 24, 48, and 75 h, respectively; lane 1, Fab'(t). The numerals on the left are molecular weight values for the standards.

2.1.2 Fab 的纯化: IgE 被木瓜蛋白酶完全裂解后, 经浓缩上 Sephadex G-200 柱, 以 PBS 洗脱, 结果见 Fig. 2。非还原的 SDS-PAGE (Fig. 3a) 显示峰 I 主要为分子量约 150~160 kD 的片段, 峰 II 为分子量 72 kD 的片段, 这两部分均可被 TCS-Sepharose 4B 吸附, 因此都具有与抗原

反应活性。还原条件下的电泳(Fig. 3b)分析显示这两个峰的片段都含有完整的轻链(27 kD),而峰 I 则含被降解的重链片段,分子量为 53.5 kD;峰 II 含有分子量为 37.5 kD 的重链片段。可见,峰 I 为 $F(ab')_2$,而峰 II 为 Fab。峰 III 为小分子物质,因为裂解物经充分透析后上柱即无此峰出现(数据未给出)。从还原条件下测得的轻链(27 kD)和重链片段(53.5 kD 及 37.5 kD)的分子量计算, $F(ab')_2$ 与 Fab 的分子量分别为 161 kD 和 64.5 kD。

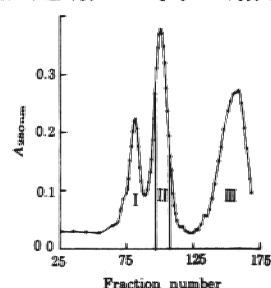


Fig. 2 Gel filtration pattern obtained with a 72 h papain digest of IgE (TE-1) on Sephadex G-200 column (2×94 cm). Each fraction contained 1.9 ml

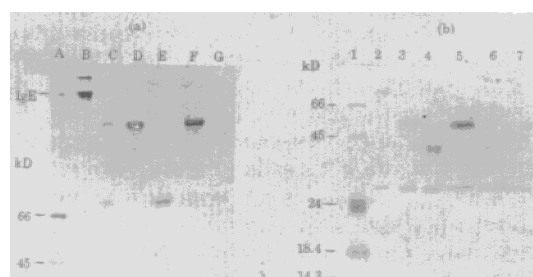


Fig. 3 Results of SDS-PAGE with silver-staining

(a) unreduced; (b) reduced proteins

Lanes A and 1, molecular weight standards; B, IgE; C, unfractionated papain digest; D and 2, peak I of Fig. 2; E and 3, peak I (Fab) of Fig. 2; F and 5, affinity purified protein of peak I on TCS-Sepharose 4B; G and 6, TCS-Sepharose 4B column purified peak I (Fab) of Fig. 2; 7, $Fab'(t)$ from trypsin digest

2.2 Trypsin 对 IgE 的酶解作用

IgE 经 Trypsin 处理不同时间后的电泳结果见 Fig. 4, 可见 70 min 后 IgE 已被完全降解, 进一步延长时无明显的变化。其主要产物为分子量与 IgG 相近的大片段即 $F(ab')_2$ (150~160 kD), 有一些分子量较小的片段。裂解产物经 DTT 还原、取代乙酸胺胺化自由巯基后即成为 $Fab'(t)$ (Fig. 4a, Lane 11)。Fig. 4b 中可见轻链在所选裂解时间无明显的降解, 重链被裂解为分子量约 53.5 kD 的片段。裂解液经还原胺化后上 Sephadex G-200 柱, 主峰的 SDS-PAGE 结果见 Fig. 1a (Lane 1), 其分子量为 36 kD, 与 Papain 裂解后的中间产物相同。从轻链和重链的分子量计算, $Fab'(t)$ 的分子量为 80.5 kD。

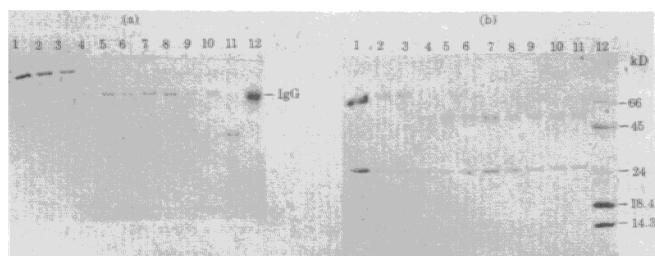


Fig. 4 SDS-PAGE showing the results of mouse IgE after trypsin digesting

a: unreduced; b: reduced (with β -mercaptoethanol). Lane 1, IgE; lanes 2—10, IgE digested for periods of 5, 10, 20 min, 2, 4, 8, 12, 24 and 27 h, respectively; lane 11, Fab'(t); lane 12, molecular weight standards with their M_r values on the right

3 讨 论

我们以 Papain 及 Trypsin 对小鼠抗 TCS IgE 单抗进行了裂解研究, 摸索了两种酶裂解 IgE 的条件, 并纯化了 Fab. Papain 裂解 IgE 产生 $F(ab')_2$ 及 Fab 两种主要产物, 经凝胶过滤纯化可得到电泳纯的 Fab, 同时可以获得 $F(ab')_2$; 经凝胶过滤纯化得到的 $F(ab')_2$ 及 Fab 均能与 TCS-Sepharose 4B 结合, 这说明它们都能识别 TCS 上的过敏原决定簇, 具有良好的免疫活性. Trypsin 降解 IgE 后主要产物为 $F(ab')_2$, 经还原烷化后可得到 Fab', 但不易纯化; 曾尝试各种纯化方法如离子交换层析、羟基磷灰石层析和亲和层析等进行分离, 但都不能除去分子量较小的两条杂带. 这两条杂带在非还原条件 SDS-PAGE 上可以分开, 推测可能与 Fab' 以较强的非共价键结合. Fab'(t) 也能与 TCS-Sepharose 4B 结合, 可见其亦有良好的免疫活性. 比较两种酶的裂解速度, 可以发现 Trypsin 比 Papain 快, 说明 IgE 对 Trypsin 较敏感而对 Papain 则稍差.

我们的结果显示, Papain 裂解分两步进行, 最先出现的是 $F(ab')_2$, 同时出现分子量 93 kD 的片段, 经进一步降解后 92 kD 片段消失, 出现一个新的产物即 Fab(分子量 72 kD), 最终产物主要为 $F(ab')_2$ 及 Fab 两种. 这与 Haba 等^[4]的结果有所不同. 他们的结果表明, Papain 裂解小鼠 IgE 在 4~6 h 即已完全, 主要产物有三个即 130 kD($F(ab')_2$)、93 kD 及 62 kD(Fab), 他们推测 92 kD 的产物(亦有与抗原反应活性)为 Fab' 带一重链片段的 C 端. 但我们的结果显示, 92 kD 的片段是一中间产物, 可能是 Fab', 因为其分子量与 Trypsin 裂解产物经还原烷化后得到的 Fab'(t) 相同. 推测 IgE 被 Papain 裂解为 $F(ab')_2$ 后, 一部分被反应液中所含的半胱氨酸还原为 Fab', 后者进一步被降解为 Fab; 而未还原的 $F(ab')_2$ 中 Papain 的酶切位点没有暴露, 所以不能被 Papain 降解.

我们在非还原条件下测得的裂解产物分子量比从还原条件下两条肽链相加所得的分子量要高, 非还原条件测得 Fab 分子量为 72 kD, 从还原条件下轻链和重链片段分子量计算所得仍为 64.5 kD. Fab'(t) 直接测得分子量为 92 kD, 而从两肽链相加所得为 80.5 kD. Haba 等^[4]在非还原和还原条件下测定的分子量也有较大差别. Perez-Montfort 等^[10]认为造成这种差别的原因可能是: (1) 糖蛋白(IgE 是含糖量较高的糖蛋白)在不同浓度下这两种电泳条件可能产生不一致; (2) 某些不可重复的因素, 因而不同作者的分子量有所不同. 我们发现, 各作者在非还原条件直接测得的分子量都有差别, 如 Perez-Montfort 等^[10]测得 $F(ab')_2$ 分子量为 115 kD,

Haba 等^[4]测定的为 130 kD,而我们的结果是 150~160 kD.在还原条件下我们测得的轻链(27 kD)和两个重链片段的分子量(53.5 kD 及 37.5 kD)与文献^[4,5]基本相同.可见,还原条件下测定的分子量比较准确,非还原条件下则会产生一定误差.

Trypsin 裂解似亦经两步进行,但中间产物积累很少,电泳上仅看到弱带,稳定产物为 F(ab')₂,其分子量与 Papain 的 F(ab')₂ 相同,重链片段的分子量均为 53.5 kD.推测二者的裂解位点在 ϵ -链上相近的部位.

这二个酶降解 IgE 后都无明显的 Fc 样片段产生,Haba 等^[4]的结果也显示了这一点.这与 IgG 的酶解不同;IgG 酶解后一般都有 Fc 片段产生.推测 IgE 的重链即 ϵ -链的 C₄ 及 C₃ 两个结构域(组成 Fc 的结构域)易被酶降解成小分子片段.人的 IgE 经 Papain 裂解后产生明显的 Fc 片段^[1],且只产生 Fab,而无 F(ab')₂ 片段产生.大鼠的 IgE 酶解^[8]与小鼠 IgE 的情况类似,但 Fab 的产率很低.

参 考 文 献

- 1 Bennich H, Johansson S G O. *Adv Immunol*, 1971, **13**: 1
- 2 Rousseaux-Prevost R, et al. *Int Arch Allerg Appl Immunol*, 1983, **70**: 268
- 3 Perez-Montfort R, Metzger H. *Mol Immunol*, 1982, **19**: 1113—1125
- 4 Haba S, Nisonoff A. *J Immunol Methods*, 1991, **138**: 15—23
- 5 何贤辉,等. *生物化学与生物物理学报*, 1994, **26**: 657—662
- 6 顾华,等. *实验生物学报*, 1986, **19**: 109—119
- 7 Laemmli U K. *Nature*, 1970, **227**: 680—685
- 8 Rousseaux-Prevost R, et al. *Mol Immunol*, 1987, **24**: 187
- 9 Ke Y-B, et al. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 1988, **10**: 131—139

Proteolysis of Mouse Anti-TCS IgE Monoclonal Antibody and Preparation of its Fab

He, Xian-Hui Ke, Yi-Bao Sun, Xun Cai, Ying-Chun
Ji, Yong-Yong Nie, Hui-Ling

(Shanghai Institute of Cell Biology, Academia Sinica, Shanghai 200031)

Abstract The proteolysis of mouse IgE with papain and trypsin were investigated. F(ab')₂ could be produced by these two enzymes and its molecular weight was about 150-160 kD; Fab was also presented in the papain digestion as a main product with the molecular weight of 72 kD, which may be purified by gel filtration. Fab' could be obtained from the trypsin digestion after being reduced with DTT and alkylated with iodoacetamide, but it was difficult to get relatively pure Fab' (t). The molecular weights of heavy chain fragments in F(ab')₂ and Fab were 53.5 kD and 37.5 kD respectively. Both of them also contained intact light chains (27 kD). In conclusion, papain is the enzyme of choice for preparing Fab, while trypsin may be used for the preparation of F(ab')₂. Rate of digestion of papain was slower than that of trypsin.

Key words: IgE, Proteolytic digestion, Papain, Trypsin, Fab