

表面等离子共振测定 CD45 – FITC 抗体与 蛋白 A 特异性结合常数*

张晖¹, 薛洪宝¹, 陈飞剑¹, 王杰¹, 王充², 李柏青²
(1. 蚌埠医学院化学教研室, 安徽 蚌埠 233030;
2. 感染与免疫安徽省重点实验室//蚌埠医学院, 安徽 蚌埠 233030)

摘要: 运用表面等离子共振 (SPR) 平台建立测定 CD45 – FITC 抗体与蛋白 A 特异性结合常数的方法。当偶联蛋白 A 的传感芯片上流过 CD45 – FITC 抗体溶液时, 双通道 SPR 仪实时监测 CD45 – FITC 抗体与蛋白 A 特异性结合过程, 获得了该反应不同温度下的结合速率常数 k_a 、解离速率常数 k_d 和结合平衡常数 K_a , 以及该反应的活化能 E_a 和焓变 ΔH 。结果表明该特异性结合比较适宜的条件是: 中性或微碱性、较高的离子强度和较高的温度。该方法操作步骤简单、快速、灵敏度高、消耗样品少, 是研究分析免疫球蛋白 IgG 抗体和蛋白 A 等生物分子相互作用比较理想的方法之一。

关键词: 表面等离子共振; CD45 – FITC 抗体; 蛋白 A; 特异性结合常数

中图分类号: O657.39 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529 – 6579 (2018) 04 – 0145 – 05

Determination of the specific binding constants of CD45 – FITC to protein A by SPR

ZHANG Hui¹, XUE Hongbao¹, CHEN Feijian¹, WANG Jie¹, WANG Chong², LI Baiqing²

(1. Department of Chemistry, Bengbu Medical College, Bengbu 233030, China;

2. Anhui Key Laboratory of Infection and Immunity//Bengbu Medical College, Bengbu 233030, China)

Abstract: A SPR method was established to determine the specific binding constants of CD45 – FITC to protein A. The specific binding of CD45 – FITC was monitored in real time on the SR7500DC Dual Channel System. The characteristic constants for this reaction they were association rate constant k_a , dissociation rate constant k_d , association equilibrium constant K_a , activation energy E_a and enthalpy change ΔH . The results indicated that the optimum reaction conditions were under neutral or alkaline medium, with a slightly higher ionic strength and temperature. This method has the characteristics of being fast, simple operation, high sensitivity and less sample, which can be suitable for the investigation of biomolecular interactions of immunoglobulin IgG with protein A.

Key words: surface plasmon resonance (SPR); CD45 – FITC; protein A; specificity binding constants

* 收稿日期: 2017 – 10 – 19

基金项目: 国家自然科学基金青年项目 (21601004); 安徽高校自然科学研究重点项目 (KJ2016A485); 安徽高校科研平台创新团队建设项目 (2016 – 40)

作者简介: 张晖 (1966 年生), 男; 研究方向: 生物分析技术; E-mail: zhanghuicstu688@163.com

通信作者: 李柏青 (1950 年生), 男; 研究方向: $\gamma\delta$ T 细胞在抗结核感染免疫中的作用机制; E-mail: baiqingli@bbmc.edu.cn

为了实时监测和分析蛋白质、多肽、核酸等生物分子间的相互作用,经常选择不需任何标记、灵敏、快速的表面等离子共振 (Surface plasmon resonance, SPR) 技术^[1-2]。它是实时测定预先固定在传感芯片上的配体与流过其表面的分析物反应的动力学参数、热力学参数等特异性结合参数的非常重要的有力手段^[3-5]。

蛋白 A 能够强烈地与多种哺乳动物的 IgG 免疫球蛋白发生特异性结合^[6],而且文献 [7] 表明:蛋白 A 与抗体的 Fc 端结合时使 Fab 端朝外,在一定程度上方便了抗体进一步结合抗原。蛋白 A 与不同免疫球蛋白 IgG 特异性结合程度不同^[8],由此,可以利用蛋白 A 分离和提纯免疫球蛋白 IgG。然而文献里有关能够直接反映蛋白 A 和免疫球蛋白特异性结合速度 (如结合速率常数 k_a 等) 和程度 (结合平衡常数 K_a 即亲和力等) 的参数十分匮乏。为了更有效地分离和提纯免疫球蛋白 IgG,避免盲目性,提高蛋白 A 分离和提纯免疫球蛋白 IgG 的效率,在工作前很有必要了解蛋白 A 与免疫球蛋白 IgG 特异性结合的有关参数。

本实验首先将免疫球蛋白 CD45 - FITC 抗体与固定在生物传感芯片表面上的蛋白 A 进行特异性结合,依据 SPR 仪实时监测的 CD45 - FITC 抗体和蛋白 A 结合所获得的数据,获得该特异性结合的动力学信息: k_a 、解离速率常数 k_d , 并对 CD45 - FITC 抗体和蛋白 A 的亲和力作出评价。为蛋白 A 分离和提纯免疫球蛋白 IgG 工作提供参考和必要的实验数据。该方法具有快速、灵敏度高、消耗样品少等优点,是研究分析蛋白 A 和免疫球蛋白 IgG 抗体等生物分子相互作用比较理想的方法之一^[9-10]。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

SR 7500DC 型双通道 SPR 仪,蛋白 A 检测芯片 (Planar protein A sensor chip), 购于美国 Reichert 公司。pHS - 3C 酸度计 (上海科学仪器有限公司); 0.22 μm 水相混合纤维素酯膜 (海宁市正兴特种过滤设备制造有限公司)。

FITC 偶联小鼠抗人 CD45 单克隆抗体 (CD45 - FITC 抗体), 天津协科生物科技有限公司产品; PBST - 叠氮钠 (0.1%, V/V) 溶液 (pH 7.36); 氢氧化钠、盐酸、NaCl、SDS、甘氨酸等试剂均为分析纯。超纯水 (电阻率 $\geq 18.2 \text{ M}\Omega$) 由杭州永洁达净化科技有限公司建造的实验室纯水和超纯水系统提供。

1.2 运行缓冲溶液和分析物 CD45 - FITC 抗体溶液的制备

1.2.1 不同 pH 运行缓冲溶液和分析物 CD45 - FITC 抗体溶液的制备 不同 pH 值 (7.10、7.33、7.62、7.90 和 8.48) 的 PBST - 叠氮钠 (0.1%, V/V) 溶液用 NaOH 或 HCl 溶液调节,分别用作运行缓冲溶液;然后使用上述缓冲溶液分别配制对应的某一浓度 CD45 - FITC 抗体溶液,备用。

1.2.2 不同离子强度运行缓冲溶液和分析物 CD45 - FITC 抗体溶液的制备 配制不同离子强度 (含 NaCl 分别为 0、25、50、75、100 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)、pH 7.90 的 PBST - 叠氮钠 (0.1%, V/V) 溶液,分别作为运行缓冲溶液;然后使用上述缓冲溶液再分别配制对应的某一浓度 CD45 - FITC 抗体溶液,备用。

1.2.3 不同浓度分析物 CD45 - FITC 抗体溶液的制备 分析物 CD45 - FITC 抗体用含 75 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl、pH 7.90 的 PBST - 叠氮钠 (0.1%, V/V) 按 1.00×10^{-7} , 5.00×10^{-8} , ..., $3.91 \times 10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度梯度稀释,备用。使用前,所有流过传感芯片的溶液都要用 0.22 μm 滤膜过滤并脱气。

1.3 SPR 平台实时监测蛋白 A 与 CD45 - FITC 抗体特异性反应的方法

SR 7500DC 型双通道 SPR 仪平台用于实时监测蛋白 A 与 CD45 - FITC 抗体的特异性反应。将洁净表面偶联蛋白 A 的蛋白 A 传感芯片插入 SPR 仪指定位置上,在芯片上放置用 Triton X - 100 清洗后干燥的流通池,固定。选择“1.2”某一 PBST - 叠氮钠 (0.1%, V/V) 溶液作为运行缓冲溶液,在一定温度下设置流速为 25 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$, 等待基线稳定后,以右通道为参比通道,左通道流过“1.2”对应的 CD45 - FITC 抗体溶液,并设置反应时间。反应完毕,注入 $w = 0.5\%$ SDS - 50 mmol/L 甘氨酸 (pH 2.00) 缓冲溶液使蛋白 A 传感芯片再生 (即洗去芯片上和蛋白 A 特异性结合的 CD45 - FITC 抗体),接着蛋白 A 传感芯片继续流过上述运行缓冲溶液。待基线稳定后进行下一次循环操作。

通过上述方法,CD45 - FITC 抗体与蛋白 A 特异性结合进程被实时监测,测定数据由 Integrated SPR Autolink 记录下来,并以响应折射率 (Refractive index unit, RU) 表示,该数据与蛋白 A 结合的 CD45 - FITC 抗体的数量呈正相关。再用 SPR 仪制造商提供的 Clamp XP 软件进行数据处理,分析和拟合各参数值,得到 CD45 - FITC 抗体与蛋白 A 特异性结合的 k_a 、 k_d , 再进一步计算出 K_a 。

2 结果和讨论

2.1 CD45 - FITC 抗体与蛋白 A 特异性结合条件的选择

2.1.1 酸度 (pH) 对 CD45 - FITC 抗体与蛋白 A 特异性结合的影响 用“1.2.1”的 PBST - 叠氮钠 (0.1%, V/V) 溶液作为运行缓冲溶液和对应的分析物 CD45 - FITC 溶液进行试验。由传感图可知, 在所试验的分析物溶液 pH 范围内, CD45 - FITC 抗体与蛋白 A 特异性结合能力随 pH 值升高而增强, 但 pH > 7.90 时, 两者的结合能力增加不明显。故选用 pH 7.90 作为 CD45 - FITC 抗体与蛋白 A 特异性结合的酸度条件。

2.1.2 离子强度对 CD45 - FITC 抗体和蛋白 A 特异性结合的影响 选用“1.2.2”的 PBST - 叠氮钠 (0.1%, V/V) 溶液 (pH 7.90) 作为运行缓冲溶液, 注入对应的分析物 CD45 - FITC 抗体溶液进样分析, 得到传感图 1。由图 1 可知, NaCl 浓度越高, 响应值越高。运行缓冲溶液里含有高浓度的盐增强了 CD45 - FITC 抗体和蛋白 A 的结合程度, 同时, 也增加了分析物溶液中其它非分离提纯蛋白质和蛋白 A 的结合能力^[11], 即竞争反应也加强。所以, 综合考虑, 本实验选择含 NaCl 浓度为 75 mmol · L⁻¹、pH 7.90 的 PBST - 叠氮钠 (0.1%, V/V) 溶液作为 CD45 - FITC 抗体和蛋白 A 特异性结合的反应介质, 且该溶液作为运行缓冲溶液。

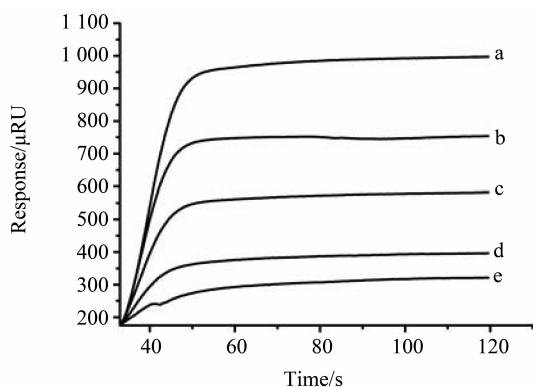


图 1 $c(\text{NaCl})$ 对 CD45 - FITC 抗体和蛋白 A 特异性结合影响的传感图

Fig. 1 SPR sensorgrams of effect of concentrations of

NaCl on CD45 - FITC interaction with protein A

$c(\text{NaCl})/(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$: 100 (a); 75 (b); 50 (c); 25 (d); 0 (e)

2.2 方法重现性实验

以含 75 mmol · L⁻¹ NaCl 的 PBST - 叠氮钠

(0.1%, V/V) 溶液 (pH 7.90) 为运行缓冲溶液, “1.2.3” 某一 CD45 - FITC 抗体溶液为分析物, 连续分析五次。结果表明, 特异性结合响应最大值的相对标准偏差 RSD 为 5.14%, 表明这种实验方法能够测定 CD45 - FITC 抗体与蛋白 A 特异性结合的 k_a 和 k_d 。

2.3 CD45 - FITC 抗体与蛋白 A 特异性结合 k_a 和 k_d 的测定

分别设置仪器的温度为 20 °C 和 35 °C, 将“1.2.3” 浓度不同的 CD45 - FITC 抗体溶液进样后的传感图, 见图 2 和图 3。由图 2 和图 3 可知: 20 °C 或 35 °C 时, CD45 - FITC 抗体与传感芯片上的蛋白 A 发生特异性结合并趋于平衡。依据从低到高的浓度梯度, 特异性结合响应曲线由低到高排列, 并且增加的幅度和斜率依次递增。20 °C 时, 在 $3.91 \times 10^{-10} \sim 1.56 \times 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CD45 - FITC 抗体浓度范围内, 浓度升高时响应却基本上不发生变化, 说明浓度较低时, 与蛋白 A 发生特异性结合的 CD45 - FITC 的量基本上不随 CD45 - FITC 抗体浓度变化而改变, 这是因为响应的变化与结合在传感芯片金属表面的生物大分子质量的变化成正比^[12]。

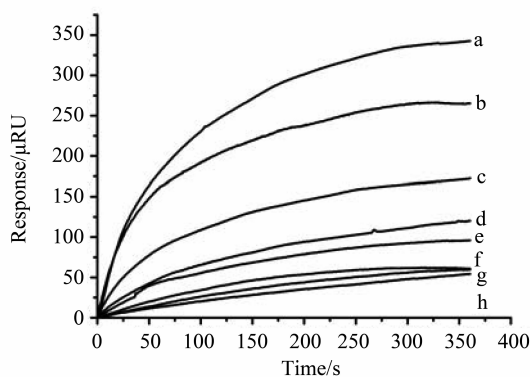


图 2 20 °C 时, 不同 $c(\text{CD45 - FITC})$ 抗体与蛋白 A 特异性结合传感图

Fig. 2 SPR sensorgrams of effect of concentrations of CD45

- FITC on CD45 - FITC interaction with protein A at 20 °C

$c(\text{CD45 - FITC})/(\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$: 1.00×10^{-7} (a); $5.00 \times$

10^{-8} (b); 2.50×10^{-8} (c); 1.25×10^{-8} (d); 3.13×10^{-9}

(e); 1.56×10^{-9} (f); 7.81×10^{-10} (g); 3.91×10^{-10} (h)

在 $1.56 \times 10^{-9} \sim 1.00 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度范围时, 响应随时间增加, 并且响应峰随浓度升高而相应增大, 表明 CD45 - FITC 浓度越高, 与蛋白 A 特异性结合的量就越大。

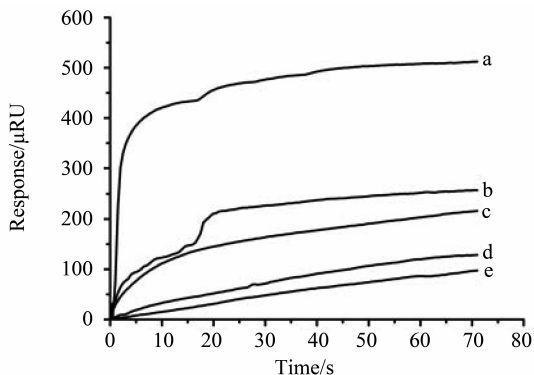


图3 35 °C时,不同 c (CD45-FITC)与蛋白A特异性结合传感图

Fig. 3 SPR sensorgrams of effect of concentrations of CD45-FITC on CD45-FITC interaction with protein A at 35 °C
 c (CD45-FITC) / (mol · L⁻¹): 1.00 × 10⁻⁷ (a); 2.50 × 10⁻⁸ (b); 1.25 × 10⁻⁸ (c); 6.25 × 10⁻⁹ (d); 3.13 × 10⁻⁹ (e)

将图2和图3中的数据通过Clamp XP软件处理,得到20 °C和35 °C时CD45-FITC与蛋白A特异性结合的动力学常数: k_a 和 k_d ,由此计算出对应的 K_a ,见表1。

表1 20 °C和35 °C时蛋白A与CD45-FITC特异性结合常数¹⁾

Table 1 Specificity binding constants of the binding of CD45-FITC to protein A at 20 °C and 35 °C

温度/°C	k_a / (L · mol ⁻¹ · s ⁻¹)	k_d / s ⁻¹	K_a / (L · mol ⁻¹)
20	1.86 × 10 ⁵	3.52 × 10 ⁻³	5.30 × 10 ⁷
35	1.33 × 10 ⁶	1.92 × 10 ⁻²	6.94 × 10 ⁷

1) k_a : association rate constant; k_d : dissociation rate constant; K_a : association equilibrium constant; $K_a = k_a/k_d$

K_a 用来定量描述蛋白A与CD45-FITC分子间的亲和力。通常, K_a 越大表示配体和分析物结合的愈牢固。本实验的 K_a 值表明蛋白A与CD45-FITC分子为中等强度结合。

20 °C时,CD45-FITC与蛋白A结合的动力学常数: k_a 、 k_d 与 K_a 值和文献[13]中的 k_a 、 k_d 与 K_a 值接近,存在差别可能是因为试验时溶液的pH值、离子强度等反应条件不同产生的。

2.4 CD45-FITC抗体与蛋白A特异性结合的活化能(E_a)和焓变(ΔH)的测定

将“1.2.3”不同浓度的CD45-FITC抗体溶液分别在15、20、25、30和35 °C下进样分析,获

得上述各温度下的 k_a 、 k_d 和 K_a ,应用作图法能够得到CD45-FITC抗体与蛋白A反应的 E_a 和 ΔH 。

2.4.1 CD45-FITC抗体与蛋白A特异性结合 E_a 的测定

分别以上述温度下的 $\lg k_a$ 对 $1/T$ 作图,见图4。该回归直线的方程为:

$$\lg k_a = (-5.5763 \pm 0.7407) \frac{1}{T} + (24.2327 \pm 2.4878)$$

相关系数 $r=0.9659$ 。说明CD45-FITC抗体与蛋白A的特异性结合遵循Arrhenius方程^{[14]742-754}。根据Arrhenius方程,直线的斜率 $-E_a/2.303R = (-5.5763 \pm 0.7407)$,其中 R 表示气体常数,其值为 $8.3145 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$,所以, $E_a = (106.60 \pm 14.18) \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。

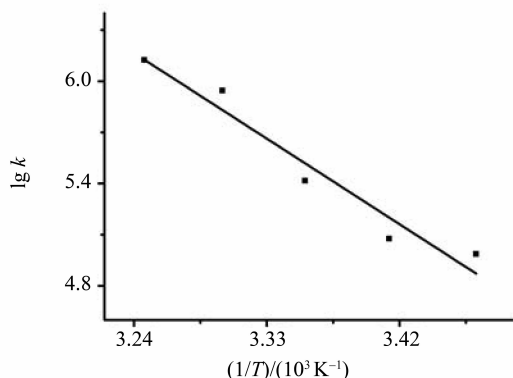


图4 CD45-FITC抗体与蛋白A特异性结合的速率常数和温度关系

Fig. 4 The relationship between temperature and association rate constants of the interaction of CD45-FITC antibody with protein A

2.4.2 CD45-FITC抗体与蛋白A特异性结合 ΔH 的测定

分别再以上述温度的 $\lg K_a$ 对 $1/T$ 作图,如图5。回归直线的方程如下:

$$\lg K_a = (-0.6513 \pm 0.07716) \frac{1}{T} + (9.9545 \pm 0.2592)$$

相关系数 $r=0.9727$ 。表明该反应较好地遵循Van't Hoff方程^{[14]417-420},根据Van't Hoff方程,直线的斜率 $-\Delta H/2.303R = (-0.6513 \pm 0.07716)$,可计算出 $\Delta H = (12.47 \pm 1.48) \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。

由 ΔH 的数值可知,该特异性结合是吸热反应,即升高温度, K_a 值增大,也就是平衡转化率随温度的升高而增加。根据图4,温度升高, k_a 也增加。由上述实验结果可得出CD45-FITC抗体与蛋白A在中性或微碱性、较高离子强度和较高温度

的条件下比较容易发生特异性结合。

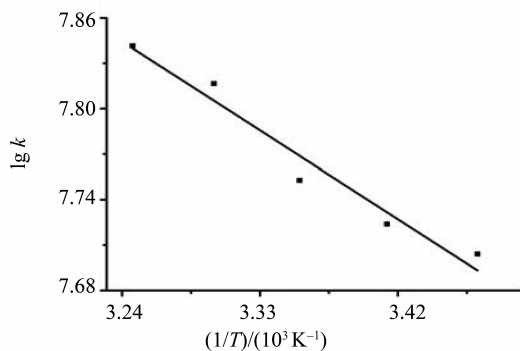


图 5 CD45 - FITC 抗体与

蛋白 A 特异性结合的平衡常数和温度关系

Fig. 5 The relationship between temperature and association equilibrium constants of the interaction of CD45 - FITC antibody with protein A

3 结 论

本实验运用 SPR 平台实时监测 CD45 - FITC 抗体与蛋白 A 特异性结合的过程, 获得了该反应不同温度下的 k_a 、 k_d 和 K_a , 再经过作图法得到该反应的 E_a 和 ΔH 。由此推出该特异性结合的比较适宜的条件: 中性或微碱性、较高的离子强度和较高的温度。期望能够为蛋白 A 分离和提纯免疫球蛋白 IgG 工作提供参考和必要的实验数据。该方法具有操作步骤简单、快速、灵敏度高、消耗样品少等优点, 是研究分析蛋白 A 和免疫球蛋白 IgG 抗体等生物分子相互作用比较理想的方法之一。

参考文献:

- [1] ZENG S, BAILLARGEAT D, HO H P, et al. Nanomaterials enhanced surface plasmon resonance for biological and chemical sensing applications[J]. Chemical Society Reviews, 2014, 43(10):3426 - 3452.
- [2] HOA X D, KIRK A G, TABRIZIAN M. Towards integrated and sensitive surface plasmon resonance biosensors: a review of recent progress[J]. Biosensors & Bioelectronics, 2007, 23(2):151 - 160.
- [3] SZUNERITS S, MAALLOULI N, WIJAYA E, et al. Recent advances in the development of graphene-based surface plasmon resonance (SPR) interfaces[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2013, 405(5):1435 - 1443.
- [4] LIU Xia, SONG Daqian, TIAN Yuan, et al. Characterization of drug-binding levels to serum albumin using a wavelength modulation surface plasmon resonance sensor[J]. Sensor Actuat B-Chem, 2006, 117(1):188 - 195.
- [5] FISCHER T, BEYERMANN M, KOCH K W. Biochemical application of different surface plasmon resonance biosensor chips to monitor the interaction of the Cam-Binding sites of nitric oxide synthase I and calmodulin[J]. Biochem Biophys Res Co, 2001, 285(2):463 - 469.
- [6] KRONVALL G, SEAL U S, FINSTAD J, et al. Phylogenetic insight into evolution of mammalian Fc fragment of gamma G globulin using staphylococcal protein A[J]. Journal of Immunology, 1970, 104(1):140 - 147.
- [7] WANG Z, JIN G. Feasibility of protein A for the oriented immobilization of immunoglobulin on silicon surface for a biosensor with imaging ellipsometry[J]. J Biochem Biophys Meth, 2003, 57(3):203 - 211.
- [8] GOUDSWAARD J, JA V D D, NOORDZIJ A, et al. Protein A reactivity of various mammalian immunoglobulins[J]. Scandinavian Journal of Immunology, 1978, 8(1):21 - 28.
- [9] CAMPBELL C T, KIM G. SPR microscopy and its applications to high-throughput analyses of biomolecular binding events and their kinetics[J]. Biomaterials, 2007, 28(15):2380 - 2392.
- [10] GUO X W. Surface plasmon resonance based biosensor technique: a review[J]. J Biophotonics, 2012, 5(7):483 - 501.
- [11] BEYZAVI K, WOOD H C. Purification of mouse IgG1 on protein A and the measurement of contaminating protein A[M] // Separations for biotechnology 2. Netherlands: Springer, 1990:452 - 461.
- [12] HOMOLA J. Present and future of surface plasmon resonance biosensors[J]. Anal Bioanal Chem, 2003, 377(3):528 - 539.
- [13] 李伟, 李鑫, 胡建东, 等. 应用 CurveExpert 求解生物分子相互作用的化学模型参数[J]. 计算机与应用化学, 2010, 27(2):267 - 270.
- [14] LI W, LI X, HU J D, et al. Evaluation of chemical modeling parameters for biomolecular interaction with CurveExpert software[J]. Computers and Applied Chemistry, 2010, 27(2):267 - 270.
- [14] 傅献彩, 沈文霞, 姚天扬. 物理化学[M]. 4 版. 北京: 高等教育出版社, 1990.
- [14] FU Xiancai, SHEN Wenxia, YAO Tianyang. Physical Chemistry [M]. 4th ed. Beijing: Higher Education Press, 1990.