

## 抗体的纯化

抗体的纯化方法很多,最为常用的为以下四种,基于工业化生产工艺开发的规模化纯化方法要比这些复杂得多,通常多个纯化策略联合使用,有兴趣的科研工作者可以查阅相关的文献。

**1.沉淀法:**利用抗体蛋白疏水性不同,提高盐离子浓度沉淀抗体蛋白。常用的沉淀方法有硫酸铵沉淀法、辛酸沉淀法、辛酸-硫酸铵沉淀法、优球蛋白沉淀法和聚乙二醇沉淀法;这类纯化方法的缺点是对某些亚型抗体有偏爱性。

**2.广谱亲和纯化:**这类纯化主要是利用金黄色葡萄球菌ProteinA/G蛋白可以特异性与抗体的Fc结合的原理纯化抗体。

**3.抗原特异性纯化:**将抗原多肽偶联到琼脂糖凝胶等固相载体上特异性纯化抗体,纯化方法与ProteinA/G纯化方法相同。

**4.离子交换法:**DEAE-Sephadex A-50(二乙氨基-乙基-葡萄糖凝胶A-50)为弱碱性阳离子交换剂。用NaOH将Cl<sup>-</sup>型转变为OH<sup>-</sup>型后,可吸附酸性蛋白。血清中的 $\gamma$ 球蛋白属于中性蛋白(等电点为pH6.85~7.5),其余均属酸性蛋白。pH7.2~7.4的环境中,酸性蛋白均被DEAE-Sephadex A-50吸附,只有 $\gamma$ 球蛋白不被吸附。因此,通过柱层析, $\gamma$ 球蛋白便可在洗脱中先流出,而其他蛋白则被吸附在柱上,从而便可分离获得纯化的IgG。更多详情登陆网站查询(<http://www.frdbio.com>)。

### 沉淀法纯化抗体

#### SOP28 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>沉淀法纯化抗体

**1.饱和硫酸铵配制:**无菌去离子水加入足量硫酸铵,加热到65℃以上,在磁力搅拌器上搅拌溶解至底部仍有未溶解的硫酸铵,待冷却后,取上清滤纸过滤。

**2.样品(血清或腹水),**12,000rpm离心30min(4℃),除去细胞碎片,保留上清液并测量体积。

**3.边搅拌边缓慢加入等体积的饱和硫酸铵溶液到上清液中,**溶液放在磁力搅拌器上室温搅6h或搅拌过夜(4℃),使抗体蛋白充分沉淀。

**4.上述溶液12,000rpm离心30min(4℃),**沉淀用原样品体积的PBS溶液重悬,重悬后12,000rpm离心10min(4℃),上清转移到一个新离心管。

**5.边搅拌边慢慢加入1/2体积的饱和硫酸铵溶液到上清液中(此时硫酸铵浓度为33%饱和),**溶液放在磁力搅拌器上搅拌6h或搅拌过夜(4℃),使蛋白质充分沉淀。

**6.上述溶液12,000rpm离心30min(4℃),**沉淀用原样品体积的PBS溶液重悬,重悬后12,000rpm离心10min(4℃)。

**7.沉淀溶解后放入透析袋对PBS溶液透析24~48h(4℃),**每隔3~6h换透析缓冲液一次,以彻底除去硫酸铵。

**硫酸铵是否透析干净的判断标准:**可取透析袋内少许溶液,加入等体积的0.02M BaCl<sub>2</sub>溶液,如果没有沉淀表明硫酸根离子除尽。

\*硫酸铵沉淀法的优点是适合抗体大规模纯化或者浓缩。缺点事某些抗体经硫酸铵沉淀后抗体的活性会有所降低或丧失,抗体纯度不高。

#### SOP29 辛酸-硫酸铵沉淀法纯化腹水中的抗体

**1.腹水用双层滤纸过滤,**除去杂质、脂肪及细胞碎片。4℃,12,000rpm,离心15min,收集上清,弃沉淀。精确定量腹水体积。

**2.腹水中加入2~4倍体积的醋酸盐缓冲液(0.06M,pH4.8)磁力搅拌混匀,**用2M HCl调pH至4.5~4.8。

**3.磁力搅拌下缓慢加入正辛酸,33 $\mu$ l/ml腹水,**加完后室温磁力搅拌30min,后置4℃静置2h以上。

**4.4℃,12,000rpm、离心5min,**收集上清,双层滤纸过滤,收集滤液。

**5.量取滤液体积,加入1/10体积的0.1M PBS(pH7.4),**用2M NaOH(记录NaOH体积)调pH至7.4。

**6.将上清冰浴预冷,加硫酸铵固体至0.277g/ml,**边加边搅拌,并于30min内加完,置4℃过夜。

**7.12,000rpm,离心15min,**弃上清;用1/10腹水体积0.01M PBS溶解沉淀,对0.01M PBS(pH7.4)透析一天,离心去掉不溶杂质,用纯水进行透析,优球蛋白析出后离心收集澄清抗体溶液分装置于-20℃冻存。

\*辛酸-硫酸铵方法一般用于纯化单克隆抗体。

\*辛酸-硫酸铵沉淀主要缺点是只适合于提纯IgG1和IgG2b,不能用于IgM和IgA的纯化;其优点是操作简单方便,抗体回收率和产率均高,抗体活性损失小。

### 优球蛋白沉淀法

优球蛋白沉淀法适用于IgG3和IgM型单抗的提取,用该法纯化的抗体活性几乎保持不变,对IgG3单抗的回收率高于90%,对IgM单抗的回收率为40%~90%。

### 聚乙二醇(PEG)沉淀法

PEG沉淀法原理PEG具有强极性,产生极强的亲水性,夺取水分子导致抗体分子析出;该方法常用于IgM的纯化,PEG沉淀可使IgM达到较高的纯度(大于90%)和回收率(大于80%)。

## Protein A /Protein G/Protein L亲和纯化抗体

Protein A具有和IgG的Fc片段结合的活性。Protein A能与大部分哺乳动物的IgG反应,不同属种的抗体对Protein A的亲和力不同;据此可将Protein A作为配基结合在琼脂糖凝胶上用于分离IgG亚类,一步纯化所得抗体的纯度大于99%;洗脱液的抗体浓度大于10 g/L;适用于所有人源的(非IgG3)抗体和Fc融合蛋白。

Protein G不仅与免疫球蛋白的恒定区相结合,且与白蛋白、 $\alpha$ 2-巨球蛋白相结合,这使得用Protein G亲和色谱提纯抗体,无法除去体系中存在白蛋白和巨球蛋白。目前这

一问题已经通过基因修饰的方法表达Protein G得以解决。

Protein L与蛋白A和蛋白G结合到(抗体)的Fc区不同的是,蛋白L通过轻链相互作用结合抗体。因为重链的任何部分都不会参与结合相互作用,蛋白L结合的抗体类大于蛋白A或G蛋白,Protein结合所有抗体亚型,可包括IgG、IgM、IgA、IgE和IgD。Protein L蛋白结合仅限于那些含有 $\kappa$ 轻链的抗体,Protein L结合人的 $\kappa$ I, III, IV和小鼠的 $\kappa$ I轻链亚型;Protein L还可以结合单链抗体和Fab片段。

物种	亚类	Protein A 结合	Protein G 结合	Protein L 结合
人	IgG(常规)	++++	++++	++++
	IgG1	++++	++++	++++
	IgG2	++++	++++	++++
	IgG3	-	++++	++++
	IgG4	++++	++++	++++
	IgM	-	-	++++
	IgA	-	-	++++
	IgE	-	-	++++
	IgD	-	-	++++
	Fab	++	++	++++
	$\kappa$ 轻链	-	-	++++
	L轻链	-	-	-
	ScFv	++	-	++++
鸡蛋黄	IgY	-	-	-
鸡	IgG	-	+	++
牛	IgG	++	++++	-
狗	IgG	++++	++++	+
山羊	IgG	+/-	++	-
豚鼠	IgG1	+++	++	++
	IgG2	+++	++	++
仓鼠	IgG	+	++	+++
马	IgG	+	++	++++
考拉	IgG	-	+	+
骆驼		-	+	+
猴(恒河)	IgG	++++	++++	++++
小鼠	IgG1	+	++++	++++
	IgG2a	++++	++++	++++
	IgG2b	+++	+++	++++
	IgG3	++	+++	++++
	IgM	可变	-	++++
猪	IgG	++	++++	+/-
兔	IgG	++++	+++	+
大鼠	IgG1	-	+	++++
	IgG2a	-	++++	++++
	IgG2b	-	++	++++
	IgG2c	+	++	++++
绵羊	IgG	+/-	++	-
猫	IgG	++++	-	N/A

**SOP30 Protein A /Protein G/ Protein L亲和纯化抗体**

- 血清预处理: 0.22孔径滤器过滤血清, 与等体积PBS(pH7.4)混合, 调至pH7.8, 此时亲和挂柱效果较好。
- 平衡亲和柱:用10倍体积的PBS(pH7.4)清洗柱子, 同时将柱子下端与核酸蛋白检测仪进液口连接固定。
- 上样: PBS平衡柱体时, 调节核酸蛋白检测仪数值稳定在0左右, 将样品加入上样柱床, 核酸蛋白检测仪上数值慢慢升高, 收集液体 (此液体简称流穿液, 流穿液中可能还会有未被柱子捕获的抗体, 所以暂时收集以再次过柱纯化使用),
- 上样完毕后, 用PBS (pH7.2) 洗杂蛋白, 当核酸蛋白检测仪的数值下降到平衡数值, 不再下降时, 停止收集流穿液。
- 抗体洗脱: 当核酸蛋白检测仪的数值保持较低数值并稳定时, 待柱床液面快流干时, 轻轻在柱床上加入洗脱液 (0.1M Gly-HCl, pH2.7), 尽量不要冲起柱床; 当核酸蛋白检测仪上数值迅速升高时, 迅速顺次分管承接洗脱的液体, 并迅速用中和液 (0.5M Tris-Cl, pH8.0) 中和, 承接时宜多管顺次接取, 并记录顺序。
- 洗脱完毕后, 当数值变低并不再变动时, 用至少5倍柱床体积的PBS以 2 ~ 4 ml/min流速清洗平衡柱子。
- 柱床用保存液 (含20%乙醇的PBS) 保存, 并封闭柱子上下两端, 4 °C保存。
- 抗体对PBS(pH7.2)透析3次, 每次4h以上。
- 测抗体浓度, 并通过SDS-PAGE分析抗体纯度。

货号	产品名称	规格	产品描述
IGP0011	Frdbio® rProtein A beads	5ml/25ml/100ml	结合能力: >40mg Human IgG/ml填料
IGP0012	Frdbio® rProtein G beads	5ml/25ml/100ml	结合能力: >30mg Human IgG/ml填料
IGP0013	Frdbio® rProtein A/G beads	5ml/25ml/100ml	结合能力: >30mg Human IgG/ml填料
IGP0014	Frdbio® rProtein L beads	5ml/25ml/200ml	结合能力: >15mg Human IgG/ml填料

更多信息, 请垂询您的区域服务专员 ☎ 027-87877773; ✉ tech@friendbio.com

## 抗原配体特异性纯化抗体

### 抗原(蛋白/多肽)特异性亲和柱制备

**SOP31 含氨基配体特异性亲和柱的制备**

- 称取0.3 g溴化氰活化的琼脂糖凝胶 (CNBr-activated Sepharose 4B) 干粉加入1mM盐酸中, 常温搅拌至少30min或者4 °C过夜使其充分溶胀, 0.3g可以获得1ml溶胀胶。也可直接取1ml NHS活化的琼脂糖凝胶。
- 将凝胶转移入亲和层析柱中, 用约30ml 1mM的HCl抽滤凝胶3次。抽滤去除内部空气气泡。
- 用5~10倍体积的超纯水清洗凝胶一遍, (留1~2倍体积超纯水将凝胶重悬起来)。
- 将含氨基待偶联蛋白/多肽用偶联缓冲液 (0.5M NaCl, 0.1M NaHCO<sub>3</sub>, pH8.3) 调整成2mg/ml浓度。
- 将重悬的凝胶与待偶联蛋白/多肽-偶联缓冲液迅速混合, 室温 (25 °C) 反应2h以上, 期间不断摇动, 使其充分偶联反应。
- 偶联结束, 取上清液检测是否还有游离未偶联的配体 (蛋白或抗体), 检测方法: 用分光光度计直接检测计算, 如果溶液中配体含量 > 0.2mg/mL, 说明偶联饱和; 否则重复第4~第5步。  
一般1ml凝胶可以偶联10mg抗体蛋白配体。
- 确认偶联完全后, 取 15ml封闭缓冲液(1M 乙醇胺, 0.5M NaCl, pH8.3或0.1M Tris-Cl, pH8.5)室温(25 °C)封闭2h或4 °C过夜。
- 交替使用20ml的偶联缓冲液和20ml的乙酸盐缓冲液 (0.5M NaCl, 0.1M HAc-NaAc, pH4) 洗凝胶柱4次。
- 亲和柱制备好后, 用PBS平衡后即可用于抗体纯化。
- 如若暂不使用, 用20%的乙醇(含20%乙醇, 0.02% NaN<sub>3</sub>的PBS)保存。

**SOP32 含巯基抗原/多肽特异性亲和柱的制备**

- 1.取适量Sulfolink Beads去掉保护剂，用3倍柱床体积的偶联缓冲液（50mM Tris,5mM EDTA-Na,pH8.5）洗涤柱子3次。
- 2.将含巯基抗原/多肽用偶联缓冲液调整成2mg/ml，加入Sulfolink Beads，室温(25℃)摇晃孵育2h。
- 3.去除步骤2柱床中的缓冲液，收集检测；用3倍柱床体

- 积的偶联缓冲液清洗柱床。
- 4.加入等体积的封闭液（50mM Tris-HCl,5mM EDTA-Na,50mM L-半胱氨酸，pH8.5），室温(25℃)孵育2h。
- 5.柱子用3倍体积的PBS(pH7.4)洗涤3次，可立即使用；如暂不用，可以保存在20%的乙醇（含20%乙醇，0.02% NaN<sub>3</sub>的PBS）中。

货号	产品名称	规格	产品描述
IGP0041	Frdbio® CNBr-activated Sepharose 4B	15g	与蛋白/多肽-NH <sub>2</sub> 偶联,最高10mg蛋白/ml凝胶
IGP0042	Frdbio® NHS-activated Beads 4FF	25ml/100ml/500ml	与蛋白/多肽-NH <sub>2</sub> 偶联,最高10mg蛋白/ml凝胶
IGP0050	Frdbio® Sulfolink Beads 4FF	25ml/100ml/500ml	与蛋白/多肽-SH偶联,最高10mg蛋白/ml凝胶

更多信息，请垂询您的区域服务专员 ☎ 027-87877773; ✉ tech@friendbio.com

**抗原(蛋白/多肽)特异性亲和纯化抗体**

其纯化方法与Protein A /Protein G/ Protein L亲和纯化方法相同。

**抗体亲和纯化的问题及解决**

**1.亲和层析柱反压升高**

样品(血清/腹水/细胞培养上清)上样前,先过滤处理,除去黏稠和大颗粒物；样品在保存过程中加入甘油也可以时反压增高，降低纯化流速。

**2.洗脱液中没有抗体**

检测样品中的蛋白含量及上样量，上样时pH值是否正确，层析柱的选择是否正确（参照前文抗体对Protein A/G/L的结合谱）；洗脱液是否正确，是否能将抗体有效洗脱。

**3.洗脱抗体中很多杂带**

上样后洗涤不充分，或者洗涤液不合适，严格按照产品相关说明配置洗涤液。

**4.纯化的抗体发生沉淀**

有些纯化的抗体在置换成PBS缓冲液的过程中容易发生沉淀，主要原因是抗体在低pH环境下洗脱造成损伤引起的抗体聚集沉淀，对于这个问题福因德科技采用高pH缓冲液洗脱解决这一棘手问题。

**IgY抗体的纯化**

**SOP33 水稀释法提纯IgY抗体**

- 1.将鸡蛋敲个小洞，将注射器插入蛋黄中吸取蛋黄。
  - 2.将蛋黄1:9用超纯水稀释，用稀盐酸调pH到5.2。
  - 3.4℃过夜，待其自然分层，吸取上清。
  - 4.向上清中加入-20℃预冷冰乙酸，使其终浓度为60%，4℃搅拌20min。10,000rpm离心30min，弃上清。
  - 5.向沉淀中加入0.16%NaCl溶液。
  - 6.三层滤纸过滤，收集过滤液。
  - 7.滤液中加入-20℃预冷的冰乙醇，使其终浓度达到30%，10,000rpm离心25min，弃上清。
  - 8.PBS溶解沉淀，即得到IgY抗体溶液。
  - 9.进行SDS-PAGE分析纯度和定量。
- IgY抗体纯化的方法还有很多，稍后我们会推出关于IgY抗体制备纯化专题。

服务编号	服务名称	服务描述
APS0010	抗体纯化服务	根据抗体性质和客户要求选择沉淀法纯化、普通亲和纯化或特异性亲和纯化。

服务咨询：027-87877773; tech@friendbio.com 更多信息，请垂询您的区域销售和区域技术支持