

# 抗体分离纯化技术

韦 新 桂

北京韦氏博慧色谱科技有限公司

[www.wsac.cn](http://www.wsac.cn)

# 一、抗体的种类和特性

	Molecular types	Significant contaminants	Quantity
<b>Source: native</b>			
Human serum	Polyclonal IgG, IgM, IgA, IgD, IgE	albumin, transferrin, $\alpha_2$ -macroglobulin, other serum proteins	IgG 8–16 mg/ml IgM 0.5–2 mg/ml IgA 1–4 mg/ml IgE 10–400 ng/ml IgD up to 0.4 mg/ml
Hybridoma: cell culture supernatant with 10% foetal calf serum	Monoclonal	Phenol red, water, albumin, transferrin, bovine IgG, $\alpha_2$ -macroglobulin, other serum proteins, viruses	Up to 1 mg/ml
Hybridoma: cell culture supernatant serum free	Monoclonal	Albumin, transferrin (often added as supplements)	Up to 0.05 mg/ml
Ascites fluid	Monoclonal	Lipids, albumin, transferrin, lipoproteins, endogenous IgG, other host proteins	1–15 mg/ml
Egg yolk	IgY	Lipids, lipoproteins and vitellin	IgY 3–4 mg/ml
<b>Source: recombinant</b>			
Extracellular protein expressed into supernatant	Tagged antibodies, antibody fusion proteins, Fab or F(ab') <sub>2</sub> fragments	Proteins from the host, e.g. <i>E. coli</i> . General low level of contamination	Depends upon expression system
Intracellular protein expression		Proteins from the host, e.g. <i>E. coli</i> , phage	Depends upon expression system

Immunoglobulin	Heavy chain	Light chain	Sedimentation coefficient	Mol. Wt (M <sub>r</sub> )	M <sub>r</sub> heavy chain	Carbohydrate content (%)	A <sub>280nm</sub>	pI
IgG <sub>1</sub>	λ <sub>1</sub>	κ, λ	7S	146 000	50 000	2-3	13.8	5.0-9.5
IgG <sub>2</sub>	λ <sub>1</sub>	κ, λ	7S	146 000	50 000	2-3		5.0-8.5
IgG <sub>3</sub>	λ <sub>1</sub>	κ, λ	7S	170 000	60 000	2-3		8.2-9.0
IgG <sub>4</sub>	λ <sub>1</sub>	κ, λ	7S	146 000	50 000	2-3		5.0-6.0
IgM	μ	κ, λ	19S	900 000	68 000	12	12.5	5.1-7.8
IgA <sub>1</sub>	α <sub>1</sub>	κ, λ	7S	160 000	56 000	7-11	13.4	5.2-6.6
IgA <sub>2</sub>	α <sub>2</sub>	κ, λ	7S	160 000	52 000	7-11		5.2-6.6
IgA <sub>3</sub>	α <sub>1</sub> , α <sub>2</sub>	κ, λ	11S	370 000	52-56 000	11		4.7-6.2
IgD	δ	κ, λ	7S	184 000	68 000	12	17.0	-
IgE	ε	κ, λ	8S	190 000	72 000	12	15.3	-

Table 1a. Physico-chemical properties of human immunoglobulins.

Immunoglobulin	Heavy chain	Light chain	Sedimentation coefficient	Mol. Wt (M <sub>r</sub> )	M <sub>r</sub> heavy chain	Carbohydrate content (%)	pI
IgG <sub>1</sub>	λ <sub>1</sub>	κ, λ	7S	150 000	50 000	2-3	7.0-8.5
IgG <sub>2a</sub>	λ <sub>2a</sub>	κ, λ	7S	150 000	50 000	2-3	6.5-7.5
IgG <sub>2b</sub>	λ <sub>2b</sub>	κ, λ	7S	150 000	50 000	2-3	5.5-7.0
IgG <sub>3</sub>	λ <sub>3</sub>	κ, λ	7S	150 000	50 000	2-3	-
IgM	μ	κ, λ	19S	900 000	80 000	12	4.5-7.0
IgA	α	κ, λ	7S	170 000	70 000	7-11	4.0-7.0
IgD	δ	κ, λ	7S	180 000	68 000	12-14	-
IgE	ε	κ, λ	8S	190 000	80 000	12	-

Table 1b. Physico-chemical properties of mouse immunoglobulins.

## rProteinA Sepharose纯化条件

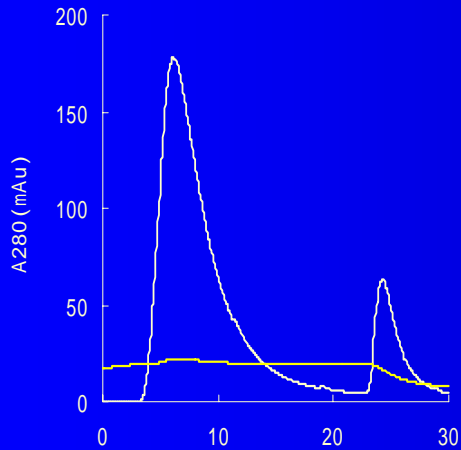
抗体类型	作用强弱	抗体类型	作用强弱
人抗体IgG <sub>1</sub> , IgG <sub>2</sub>	++++	大鼠IgG3	+
人抗体IgG3 , IgG4	+	马抗体	++
小鼠IgG1	+	猴抗体	++++
小鼠IgG2a	++++	猪抗体	++++
小鼠IgG2b	+++	狗抗体	++
小鼠IgG3	++	牛抗体	++
兔抗体	++++	山羊抗体	+

## 吸附和洗脱条件

抗体种类	作用强弱	吸附pH	洗脱pH
人IgG <sub>1</sub>	++++	6.0-7.0	3.5-4.5
人IgG <sub>2</sub>	++++	6.0-7.0	3.5-4.5
人IgG <sub>3</sub>	+	8.0-9.0	7.0
人IgG <sub>4</sub>	+	7.0-8.0	3.0-6.0
小鼠IgG <sub>1</sub>	+	8.0-9.0	4.5-6.0
小鼠IgG <sub>2a</sub>	++++	7.0-8.0	3.5-5.5
小鼠IgG <sub>2b</sub>	+++	7.0	3.0-4.0
大鼠IgG <sub>3</sub>	+	7.0	3.5-5.5

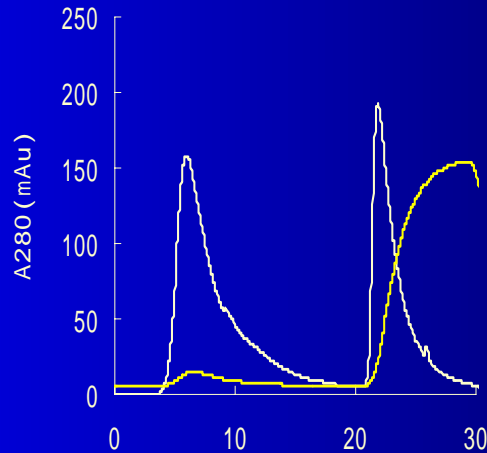
## 二、抗体分离纯化的方法

### 1.亲和色谱纯化抗体



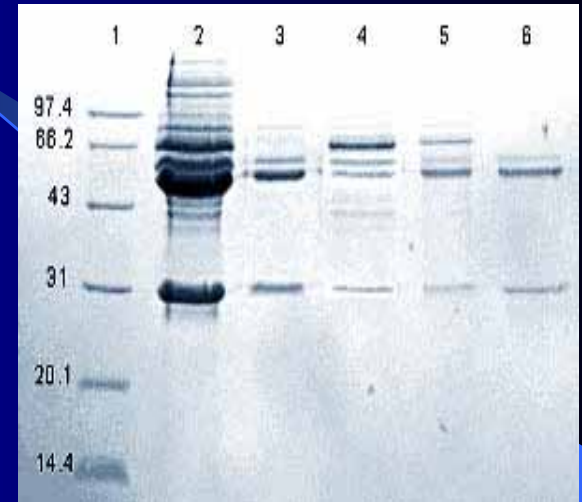
#### 重组蛋白A琼脂糖凝胶FF纯化腹水中抗体

样品：同上，上样2ml,蛋白量4.6mg  
填料：rProtein A sepharose 1ml  
BufferA:20mM PBS, pH7.4  
BufferB:0.1M 柠檬酸, pH4.0  
结果：穿透8.5ml,蛋白量3.9mg  
洗脱4ml,蛋白量0.6mg



#### 蓝色琼脂糖凝胶FF纯化腹水中抗体

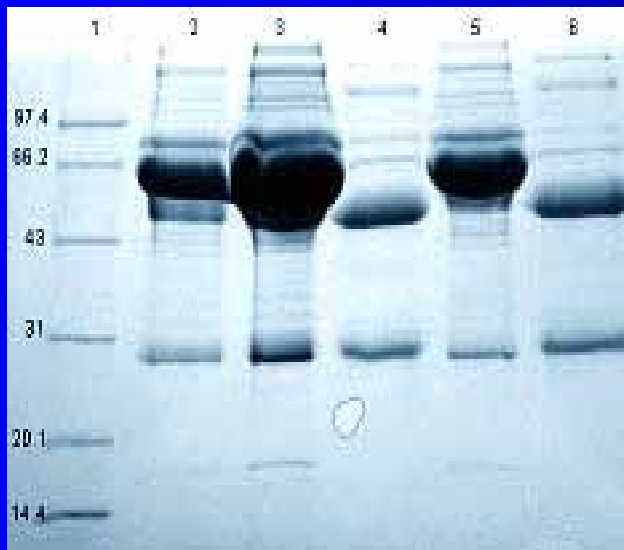
样品：腹水1.5ml,蛋白量4.6mg  
填料：Blue sepharose FF, 1ml  
BufferA:50mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH7.0  
BufferB:50mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.5M KCl, pH7.0  
结果：穿透6.2ml,蛋白量2.4mg  
洗脱3.7ml,蛋白量1.9mg



#### SDS-PAGE图

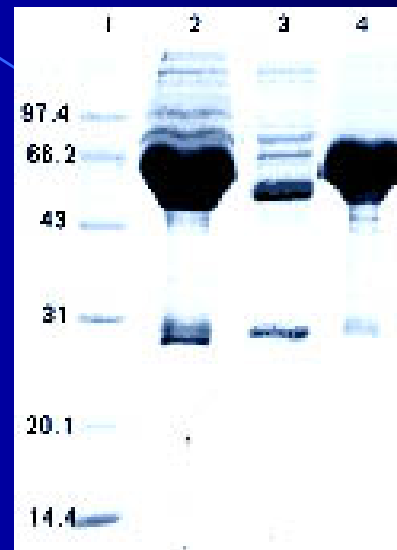
- 1.marker
2. 腹水上样
- 3.腹水blue柱穿透
4. 腹水blue柱洗脱
- 5.腹水PrA柱穿透
6. 腹水PrA柱洗脱

## 2.亲和纯化血浆中的抗体



重组蛋白A琼脂糖凝胶FF柱纯化的SDS-PAGE图

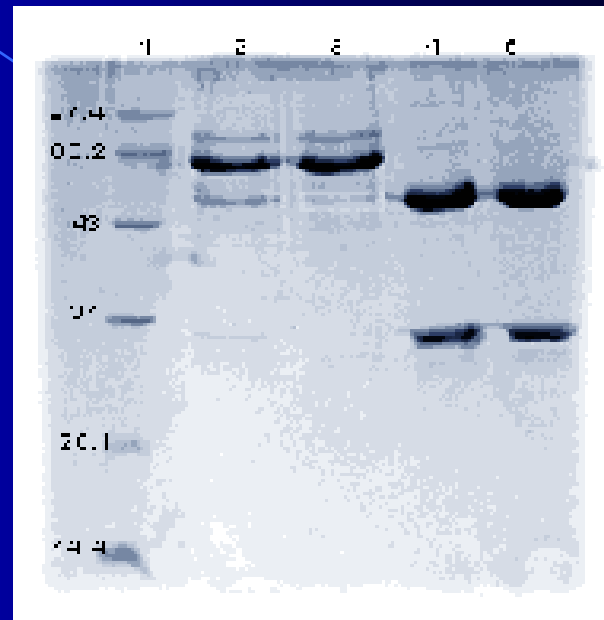
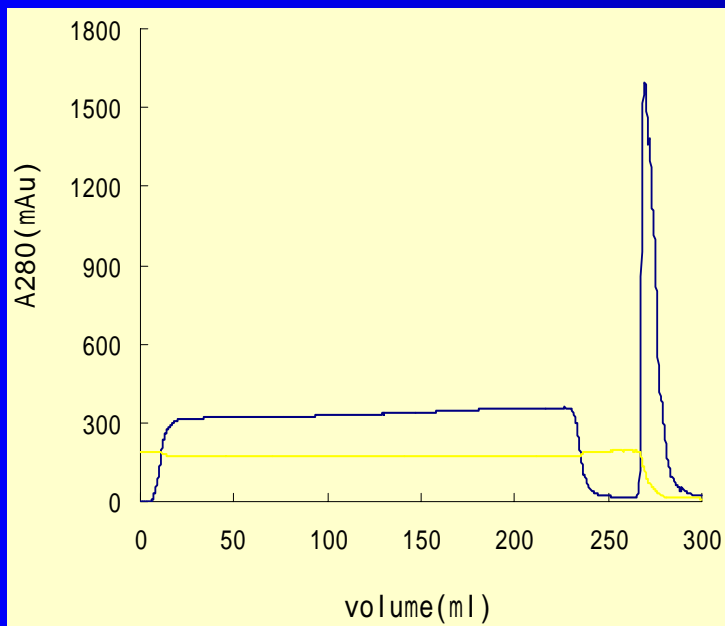
1.marker 2. 血浆上样 3.和5.穿透  
4.和.6 洗脱



蓝色琼脂糖凝胶FF纯化SDS-PAGE图

1.marker 2. 血浆上样 3.blue柱穿透  
4. blue柱洗脱

### 3.疏水色谱纯化细胞培养样品中的抗体



#### 苯基琼脂糖凝胶FF纯化抗体

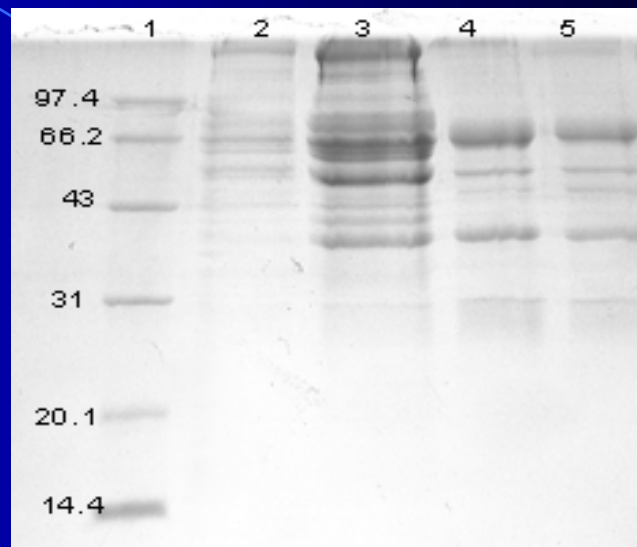
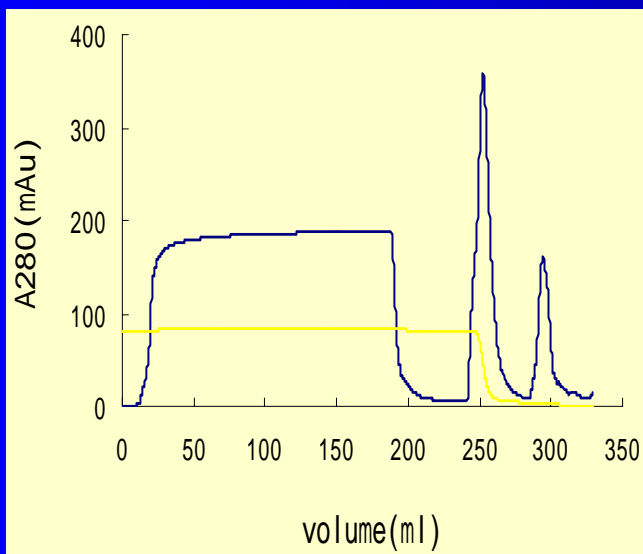
填料：Phenyl sepharose FF 5ml  
Buffer A: 50mM PBS , 0.6M 硫酸铵 , pH7.0  
Buffer B: 50mM PBS , pH7.0  
结果：洗脱蛋白量4.5mg/ml × 20ml=90mg

#### 苯基琼脂糖凝胶FF纯化SDS-PAGE图

1.marker 2. 培养液上清 3.苯基柱 穿透 4.和5. 苯基柱洗脱



## 4.疏水色谱纯化蛋黄中的抗体



### 吡啶琼脂糖凝胶分离抗体

填料：吡啶琼脂糖凝胶 FF 20ml  
Buffer A: 20mM PBS, 0.8M  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , pH7.5  
Buffer B: 20mM PBS, pH7.5  
Buffer C: 20mM PBS, pH7.5, 30% 异丙醇

### 吡啶琼脂糖纯化SDS-PAGE图

1.marker 2. 粗提物 3.吡啶柱穿透 4.和  
5.吡啶柱洗脱

## 5.其他纯化抗体的方法

1.离子交换法

2.类似亲和法

3.金属螯合色谱法

4.辛酸沉淀法

5.羟基磷灰石法

6.免疫亲和法

### 三、各种纯化的方法对比

方法名称	优点	缺点
蛋白A和蛋白G	特异性好，快捷，方便。	有失活可能，价格高，不适合所有抗体。时间长，载量小。
疏水色谱法	适用范围广，成本低，配合硫酸铵沉淀效果更好，载量高。	
去杂质法	回收率高，活性好，时间短。	最好配合沉淀的方法。
类似亲和法	成本低，效果好，载量高	价格还是比较贵
沉淀法	简单，低成本	时间长，纯度低，回收率低
离子交换法	简单，低成本	效果一般，麻烦，纯度不高
羟基磷灰石法	成本低，效果好，能分离各种亚型	

亲和适合IgG纯化，效果不错，疏水和去杂质的方法成本低，价格便宜，效率高，载量大是很适合的纯化抗体的方法，而操作简单，具体使用什么方法完全取决于对抗体的种类，纯度要求，自己已有条件等因素。

**谢谢！**