

抗体分离纯化技术研究进展*

甘丽晶¹综述, 刘晓波², 胡质毅¹审校(1. 广州中医药大学国家重点学科实验室, 广州 510405; 2. 广东药学院基础学院, 广州 510006)

【关键词】 抗体; 分离纯化

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2013.04.042 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2013)04-0461-04

抗体是一种特殊的蛋白质分子, 是机体免疫系统最为重要的效应分子, 由于其 Fab 片段能特异性结合抗原, Fc 片段具有与补体、免疫细胞(如巨噬细胞、NK 细胞)FcR(Fc 受体)的结合位点, 因此抗体具有中和毒素或病毒、介导细胞毒和促进吞噬等功能, 在抗感染、抗肿瘤、免疫调节与免疫监视等方面有相当重要的作用。现今, 抗体在同种异体免疫排斥、自身免疫反应抑制、肿瘤治疗、感染性疾病治疗以及作为检测诊断试剂等方面应用非常广泛^[1]。

迄今抗体制备技术的发展大致分为三个阶段: (1) 1890 年 Behring 和 Kitasato 发现白喉抗毒素(抗白喉毒素抗体), 开始了以抗原免疫动物来获得多克隆抗体(PAbs)即抗血清的途径; (2) 1975 年 Kohler 和 Milstein 创建杂交瘤技术制备单克隆抗体(McAb); (3) 1984 年 Morrison SL 以基因工程方法制备基因工程抗体(GEAb)。根据制备方法抗体可分为三大类型: 多克隆抗体, 单克隆抗体, 基因工程抗体, 目前噬菌体抗体以及用转基因小鼠制备的抗体和人源化抗体均属于基因工程抗体。但不论用何种方法所制备的抗体, 都必须在后期选择合适的分离纯化方法对抗体进行分离纯化, 以满足不同要求。

抗体的纯化有两个原则: (1) 在确定抗体的具体纯化方法之前, 先明确纯化后抗体的用途, 不同用途的抗体, 纯化要求也不同。(2) 从多克隆抗体、单克隆抗体到基因工程抗体及其他抗体类型, 制备方法的不同导致最终所含的杂蛋白也有很大的差异。另外重链类别、亚型、相对分子质量的不同也将使纯化的方法存在差别。最后, 在能达到纯度要求的情况下, 应尽可能使用较少的纯化步骤, 以提高产率、节约成本。根据不同的抗体类型, 下面将分别予以介绍。

1 多克隆抗体

多克隆抗体(简称多抗), 即抗血清是将一种天然抗原经不同途径免疫动物, 由于抗原性物质具有多个抗原决定簇, 可以刺激机体多个 B 细胞克隆产生抗体, 合成和分泌抗多种决定簇的抗体于动物血清中形成的抗体混合物。多抗可用于一般抗原检测及被动免疫治疗, 但由于成分复杂, 只在感染早期有效及有一定的毒性, 其应用受到一定的限制。常用的纯化方法有: 盐析法、辛酸-硫酸铵沉淀法、抗原吸附法、冷乙醇沉淀法、离子交换层析和蛋白质 A(Protein A)、蛋白质 G(Protein G)或 Protein A/G 分离纯化。

1.1 盐析法 盐析法是一种较为传统的纯化方法, 原理是: 抗体在水溶液中的溶解度由它的亲水基团与水形成的水化膜程

度及抗体分子所带电荷的情况所决定, 当溶液中存在高浓度的中性盐, 将会夺取抗体分子的水化层, 降低其溶解度; 同时高浓度的中性盐也改变了溶液离子强度, 中和抗体表面大量电荷, 进一步降低抗体溶解度。在两种因素的综合作用下, 抗体发生凝集而沉淀析出。盐析法使用的中性盐有多种: 硫酸铵、硫酸钠、硫酸镁、氯化钠及磷酸盐等。由于硫酸铵有溶解度高, 受温度影响小, 溶解于水时不产生热量, 对蛋白质有保护作用, 高浓度时可抑制微生物和蛋白酶的活性, 价格低廉等优点, 故最为常用。但是, 硫酸铵在碱性环境中不能作为沉淀剂进行盐析反应^[2]。盐析法可获得较纯的抗体粗制品, 要获得更高纯度 IgG, 还需采用其他方法做进一步纯化, 如可再用 DEAE-纤维素柱层析纯化, 该法技术含量高有经济意义, 且制得的 IgG 也有一定的经济价值。

1.2 辛酸-硫酸铵法 辛酸-硫酸铵沉淀法是在硫酸铵沉淀法的基础上结合有机溶剂沉淀法发展而来的。辛酸沉淀法是在酸性条件下(pH4.5)往血清中加入一定量短链脂肪酸-辛酸, 使血浆蛋白中的清蛋白、 α 及 β -球蛋白成分沉淀, 取 IgG 成分为主的上清液, 再经硫酸铵沉淀。该法仅需两步沉淀分离, 过程简便, 成本低廉。陈丹等^[3]分别采用辛酸法, 硫酸铵法和辛酸-硫酸铵联合沉淀法纯化抗体。结果表明, 联合使用辛酸-硫酸铵较单纯的辛酸法或硫酸铵法效果好。目前, 多抗以亲和层析为主要的纯化方式。

1.3 亲和层析法(AC) 在生物分子中有些分子的特定结构部位能够同其他分子相互识别并结合, 如酶与底物的识别结合、受体与配体的识别结合、抗体与抗原的识别结合, 这种结合既是特异的, 又是可逆的, 改变条件可以使这种结合解除。生物分子间的这种结合能力称为亲和力。亲和层析就是根据这样的原理设计的蛋白质分离纯化方法。亲和层析的最大优点在于: 利用它从粗提液中经过一次简单的处理便可得到所需的高纯度活性物质。亲和层析法对设备要求不高、操作简便、适用范围广、特异性强、分离速度快、分离效果好、分离条件温和等优点。其不足在于亲和吸附剂通用性较差, 故要分离一种物质几乎都需要重新制备专用的吸附剂, 较好地控制洗脱条件, 避免生物活性物质的变性失活。

经典的亲和纯化流程如下见图 1。

由于配基的不同, 亲和层析可分为以抗原为配基的免疫亲和法, Protein A 和 Protein G 亲和法^[4], 蛋白质 A 类似物作为配基的亲和层析, 合成有机小分子化合物纯化法以及以金属离

* 基金项目: 教育部留学回国人员启动基金资助项目(编号: 44143006)。

子为配基的亲亲和层析法。

2 单克隆抗体

单克隆抗体(简称单抗)的概念是相对于多抗,它是由杂交瘤细胞经筛选的单个细胞分裂增殖而形成的细胞群所合成的、针对某一特定决定簇的抗体,其分泌的抗体来源于单个 B 细胞所衍生的克隆。单抗的问世具有划时代的意义,根本上解决了免疫学中“特异性”和“重复性”两大难题。目前,单抗已被广泛作为检测、诊断试剂和药物用于移植排斥反应、癌症、感染性疾病和炎症等。

单抗的纯化方法大致可分为沉淀法和层析法两大类。沉淀法除了上文介绍的硫酸铵法,辛酸-硫酸铵沉淀法之外,还可以采用:优球蛋白沉淀法、聚乙二醇(PEG)沉淀法^[5]、丙酮沉淀法、三氯醋酸沉淀法、低温有机溶剂沉淀法(辛酸法)等。沉淀法多作为初级的纯化,常常需要进一步处理才能满足实验或临床使用要求。层析法包括:亲和层析,离子交换层析,凝胶过滤层析,疏水层析,亲疏层析,疏水电荷诱导层析。层析法纯化的单抗具有活性损失小、纯度高、周期短等优点。

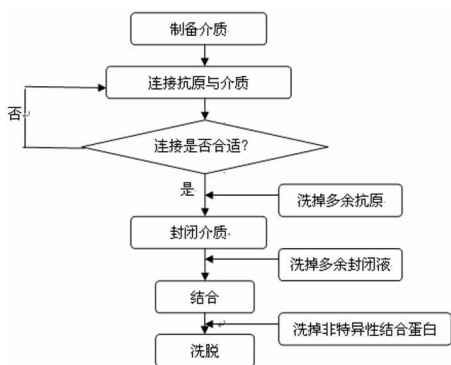


图 1 亲和纯化流程

2.1 亲和层析法(AC) 亲和层析法在多抗的纯化中已经提及,同样的,在单抗的分离纯化亦常作为首选方法。

2.1.1 Protein A/G 亲和层析法 Protein A 是金黄色葡萄球菌细胞壁上的一种蛋白质,天然 Protein A 由 5 个 IgG 结合域和其他未知功能的非 Fc 结合域组成,能特异地与人和哺乳动物抗体(主要是 IgG)的 Fc 区结合。因而,将 Protein A 与琼脂糖凝胶以一定的方式结合,可制备用于抗体纯化的亲和填料。近年来,基因重组蛋白 A 获得 rProtein A 亦作配基使用,其效果较 Protein A 高^[6]。

Protein G 是一种从链球菌中提取的细菌细胞壁蛋白,Protein G 不仅与免疫球蛋白的恒定区相结合,亦能与清蛋白、 $\alpha 2$ -巨球蛋白相结合,这使得用 Protein G 亲和色谱无法除去体系中的清蛋白和巨球蛋白。目前,采用基因修饰的方法表达出来的 rProtein G 可以克服上述缺点。

吴淑江等^[7]采用 HiTrap rProtein A FF 亲和层析柱纯化已预处理的含乙肝核心抗原(HBcAg)单抗的腹水,获得纯度大于 95% 的抗 HBcAg 单抗,回收率达 75%,且纯化后的单抗活性没有下降。

2.1.2 免疫亲和法(IAC) 该法以抗原(或抗体)作为配体与载体结合,组成固定相,用于分离样品中能特异结合的抗体(或抗原)。由于抗原与抗体的结合的特异性非常强,免疫亲和法是分离抗体非常有效的方法,且纯度很高。但抗原相当昂贵,

故不适用于工业规模大量生产。封琳等^[8]为从猪瘟病毒高免疫猪血清中纯化猪瘟病毒抗体,将猪瘟病毒接种于猪传代肾细胞 PK-15 培养,获得猪瘟病毒。并将猪瘟病毒抗原与环氧氯丙烷活化的 Sepharose-4B 偶联,制备成免疫亲和和层析柱纯化该病毒抗体,采用 SDS-PAGE 和 ELISA 进行抗体纯度和活性,结果表明纯化的猪瘟病毒抗体纯度高,活性强。

2.1.3 固定金属亲和和层析法(IMAC) IMAC 法的固定相基质上螯合了一些金属离子,如 Cu^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Fe^{3+} 等,可通过配位键螯合侧链含有 Lys、Met、Asp、Arg、Tyr、Glu 和 His 的多肽,而小肽序列中含有 His-X-X-X-His 的结构最易结合到金属离子亲和柱上,获得很好的纯化效果。利用金属螯合亲和层析分离蛋白质时,pH 在 6~8 就能被亲和柱吸附。洗脱可用降低 pH 值、增加离子强度、或在缓冲液中加入 5 mmol/L 乙二胺四乙酸(EDTA)等方法。Martins^[9]等设计了用固定金属亲和和层析纯化单抗一步法。他们准备多种包含固定金属螯合物的固定相以比较抗绿脓杆菌野生型酰胺酶的单克隆抗体的纯化状况。研究发现:提高配基浓度,较长的隔离臂及更高的 pH 条件可增大单抗的吸附量,提示进行 IMAC 方法纯化单抗时采用特制的固定相及正确选择吸附条件的可以达到一步纯化 IgG。

2.2 离子交换层析法(IEC) IEC 法是以具有离子交换性能的物质做固定相,利用其与流动相的离子进行可逆的交换,从而分离离子型化合物的一种方法。离子交换剂可用:DEAE-纤维素(阴离子交换剂),CM-纤维素(阳离子交换剂),或者 DEAE/CM-葡聚糖凝胶等。纤维素的高度亲水性与蛋白质有很好的相容性,但缺点也较明显:容量低、流速慢。近年,开发了珠状交联葡聚糖、琼脂糖、交联纤维素等,极大的改善了离子交换介质的性能,使得 IEC 仍得到广泛应用。詹莺等^[10]采用两步离子交换层析法结合硫酸铵盐析法分离纯化 WuT3 单抗,在通过小量试验优化纯化参数后,进行中量试验和中试放大,建立了一条生物反应器无血清培养杂交瘤细胞大规模分离纯化单抗的工艺路线。

2.3 凝胶过滤层析法(GFC) GFC 又称分子筛过滤,排阻层析。凝胶具有立体网状结构,可将分子按大小进行分离。凝胶过滤法的突出优点:层析用的凝胶属于惰性载体,不带电荷,吸附力弱,操作条件较温和;温度适用范围广;不需有机溶剂;能较好地保持分离成分的理化性质。但是 GFC 法样品处理量小,因其原理是空间排阻效应,分子质量接近的蛋白质分子的分离效果较差,常需与其他方法联合使用。凝胶过滤的一般过程:先用适宜溶剂浸泡凝胶颗粒,使之充分吸液膨胀;再装柱,加样;最后以同样溶剂洗脱,小分子物质较慢洗脱,大分子则较快分离出来。可采用的凝胶种类:葡聚糖凝胶,聚丙烯酰胺凝胶,琼脂糖凝胶及聚丙烯酰胺和琼脂糖交联物等。最常用的是葡聚糖凝胶有两大类:Sephadex、Sephacryl。马泓冰等^[11]将含单抗 2F5 的腹水经离心、过滤及缓冲溶液交换预处理后,先经 IMAC 纯化,去除大部分杂蛋白,再经凝胶过滤层析法精细纯化,并探讨了上样的流速和洗脱液的种类对抗单 2F5 纯度的影响。发现纯化的单抗 2F5 在体外对外周血 T 细胞具有明显的促增殖作用;而且其促增殖作用的活性优于 Protein G 亲和层析法纯化所获得单抗。并且这种两步串联层析纯化方法的操作简便,所得单抗的纯度高、生物学活性好。

2.4 疏水层析法(HIC) 八种常见氨基酸的侧链是非极性

的,属疏水性氨基酸。其中大多数疏水性氨基酸残基包埋在分子内部,与周围的水性环境隔离。包埋在内部的疏水性基团与临近的疏水基团常发生作用。HIC 根据蛋白质分子表面疏水性残基的数量和类型不同分离蛋白质。常用的疏水层析柱材料有 Alkyl Superose 和 Phenyl Superose。HIC 介质的重要特点是疏水性弱,与蛋白质的作用比较温和,能更好地保持生物大分子的自然结构和生物活性。此外,其“高盐吸附、低盐洗脱”的特点使得 HIC 能直接与其他分离技术如盐析、离子交换层析联合使用。广泛使用的商品化制备型 HIC 介质配基仍是烷基和芳基。但 HIC 存在着:操作复杂,没有通用的程序可依循,柱再生较为困难以及剧烈的洗脱条件影响抗体等不良因素,使得较少采用 HIC 法进行抗体纯化^[12]。

2.5 亲疏层析法(TAC) 层析固定相基质含有砷基和硫醚基团的侧臂,能与蛋白质上的色氨酸和(或)苯丙氨酸残基结合,钾盐、铵盐等能促进这种结合的分析技术。1985 年 Porath 首次应用亲疏色谱从血清中分离出抗体。TAC 主要在疏水作用的基础上增加了硫元素的相互作用。利用层析介质与含硫蛋白质和非硫蛋白质的亲疏性差异,对蛋白质加以分离。一般情况,TAC 在高盐环境下对抗体及其他某些蛋白质产生特异性吸附,再在低盐条件下洗脱,可获得高纯度及高回收率的蛋白质产品。刘玄和宋宏新^[13]详细介绍了近年不同吸附介质的亲疏层析法,并比较了疏水层析,protein A 亲和层析,离子交换层析等,肯定亲疏层析在抗体纯化方面的巨大潜力。A. Lihme 等^[14]用二乙烯砷活化琼脂糖和 β -巯基乙醇反应得到的基质分离人血清蛋白。在高浓度硫酸铵条件下,几乎束缚所有的血清蛋白,洗脱过程则用逐步降低洗脱缓冲液的盐浓度完成。这种亲疏吸附层析一步法具有分辨力强和蛋白质回收率高的优点。

2.6 疏水电荷诱导层析法(HCIC) Burton 和 Harding^[15]于 1998 年提出的不同于 HIC 法的 HCIC 是近几年来发展起来的一类新技术。HCIC 与蛋白质的作用除了疏水作用,还有电荷间的相互作用。HCIC 的原理是其具有 pH 依赖行为的双模式、可离子化的配基(例如吡啶)所决定的。在 pH6-9 范围内,配基不带电,表现疏水特性,从而与疏水性蛋白结合。当流动相的 pH 下降到某一值,配基和蛋白都带正电荷,发生相同电荷的排斥作用,导致蛋白被洗脱下来。HCIC 与 HIC 及 TAC 不同在于 pH 对 HCIC 的影响要大于离子强度的影响,HCIC 对初始料液的离子强度(或电导)没有特别要求,即在离子强度很低的情况下,蛋白仍然有较高的吸附量。HCIC 主要用于抗体的分离纯化,优点如下:价格低(仅为 Protein A 的 25%)、效率高(一步纯化纯度达到 95%以上)、化学稳定性强(可用 1.0 mol/L NaOH 清洗)、适用范围广(可用于 IgG、IgA、IgE、IgM 和抗体片段的分离)等,是取代传统昂贵的 Protein A 吸附剂的选择。Boschetti^[16]研究发现以 4-巯基乙基吡啶(4-MEP)作为配体的疏水电荷诱导层析是一个从各种原料的分离抗体的有效方法。抗体没有经过预处理(浓缩),在生理条件下即被吸附。当 pH 值降低时,配体和抗体带相同电荷,发生解吸。同时,抗体的捕获与样品的 pH 值,电导率,结合能力和表达水平是一致的,且抗体的最终纯度是原料依赖性,纯度高达 98%。目前,4-MEP 已商品化,在许多实验室和抗体生产商采用^[17]。

2.7 羟基磷灰石(HAT)吸附层析 HAT 是一种无机盐,具

有一定的晶体结构和形状磷酸钙晶体,基本分子结构为 $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ 。HAT 早在 1956 年就用于蛋白的分离纯化。该层析法以羟基磷灰石为吸附剂作固定相,在晶体中的 Ca^{2+} 离子与蛋白的羧基吸附的同时 PO_4^{3-} 与氨基也发生吸附。另外,酸性蛋白采用磷酸盐缓冲液洗脱,碱性蛋白则采用 NaCl、KCl 或 CaCl_2 等溶液。HAT 吸附层析的实验装置简单,操作简便,对分子量较小的物质分离效果较好,可纯化 IgM 类抗体,保持抗体活性,对单抗的纯化已达到工业规模。

2.8 灌注层析 灌注层析是美国 PerSeptive Biosystems 公司于 1989 年开发的层析分离技术。其关键是以 POROS 命名的固定相粒子的特殊结构,POROS 的基质是聚苯乙烯-二乙烯苯,含有两种大小不同的孔道,层析介质包括离子交换、疏水作用、亲和吸附和反相介质等。与传统法相比,灌注层析具有:分离速度快,效率高;可在室温条件下操作;一步浓缩和分离,提高产品质量和回收率等优势。

2.9 其他方法

2.9.1 层析聚焦 层析聚焦一般是在其他层析方法如:IEC、GFC、HIC 没有达到纯化要求时再采用的纯化方法,其原理是根据蛋白质分子间等电点的差别而进行的分离纯化。较早即有报道用聚焦层析法分离纯化人巯基蛋白酶抑制肽 C-hCPIc,获得高纯度,高活性的 C-hCPIc。

2.9.2 免疫磁珠法 童军等^[18]比较了国产免疫磁珠与溴化氢(HBr)活化的 Sepharose 4B 两种介质提纯羊抗人 IgG。结果显示,HBr 活化的 Sepharose 4B 的提纯效率优于免疫磁珠。但免疫磁珠成本低廉,技术简单。并且在相同蛋白含量条件下,由免疫磁珠提取的抗体效价与由 HBr 活化的 Sepharose 4B 提取的抗体相当。

2.9.3 十二烷基肌氨酸钠溶解法 凌媛等^[19]采用十二烷基肌氨酸钠溶解包涵体,对目的蛋白(抗 TNF- α 的单链抗体)进行可溶性纯化,蛋白纯度达到 90%。纯化后的蛋白经酶联免疫吸附试验(ELISA)和蛋白印迹法证明该单链抗体维持了亲本抗体与 TNF- α 特异性结合的能力,且具有细胞毒中和活性。

2.9.4 组合法 在能达到纯度要求的情况下,应尽可能减少纯化步骤,避免操作导致回收率的下降。但实际过程中,往往需要多种层析技术联合使用,才能达到对产品的纯度要求。王明永等^[20]在研究甘露聚糖结合凝集素(MBL)时,联合应用甘露聚糖 Sepharose 4B 层析柱和抗人 MBL-CRD 单克隆抗体-Sepharose 4B 层析柱,3 次上柱亲和层析分离,分别用 EDTA、D-甘露糖、Gly-HCl(pH 2.4)溶液洗脱结合蛋白。所获纯化 MBL 为 Mr28000 和 Mr32000 肽链构成的功能性寡聚体,其纯度较高,可与配体甘露聚糖结合并有效凝集酵母菌,还能与 U937 细胞胶凝素受体结合。

2.9.5 形成抗体环复合物 先用硫酸铵溶液从腹水中沉淀目标抗体[大鼠抗 2,4-二硝基苯 IgG (IgGDNP)],再用人工合成的含多个二硝基苯(DNP)的多价半抗原与 IgGDNP 结合形成 IgGDNP 环状复合物,最后选择性沉淀目标抗体的二聚体,三聚体及更高级寡聚物,再生游离抗体。这个程序可从混合抗体分离目标抗体,同样可分离在血清或其他生物性液体中的蛋白及球蛋白。与传统纯化方法相比,该法的优点在于:选择拥有两个 Fab 结合位点的抗体,可形成环状复合物;不必进行层析分离。该法的不足是半抗原必须由二价和(或)三价类似物

构成。

2.9.6 Protein L 亲和层析法纯化 IgA 可用于肿瘤和抗病毒治疗的二聚体 IgA 和分泌型 IgA 与现有的 IgG 抗体为基础的药物相比,其细胞的杀伤能力更强。然而,共同表达 4 种不同的多肽以及不能使用传统的 Protein A 或 Protein G 亲和层析柱纯化 IgA 这两个限制因素阻碍了 IgA 治疗应用的发展。Protein L 是来源于细菌的免疫球蛋白(Ig)结合蛋白,能与人的 κ 型轻链的 $V_{\kappa I}$ 、 $V_{\kappa III}$ 和 $V_{\kappa IV}$ 亚型,小鼠 κ 型轻链的 $V_{\kappa I}$ 亚型结合,是 Protein A 或 Protein G 的一个潜在替代品。

3 基因工程抗体

目前,单克隆抗体广泛应用于疾病的预防、诊断和治疗。但绝大多数的单抗是鼠源性抗体,在重复给药的情况下,人体会产生“人抗鼠抗体”,出现人抗鼠抗体反应,导致临床疗效减弱甚至消失。此外,单抗还有许多不足,如单抗全分子体积过大,与靶抗原的亲合力不够等^[22]。为了解决这些问题,较好的办法是研制基因工程抗体,去除或降低抗体的鼠源性成分或减少抗体的分子大小,保留或增强抗体的特异性、亲合力或生物学活性,以更好地应用于临床。

基因工程抗体主要包括人源化抗体、小分子抗体、抗体融合蛋白及某些特殊类型抗体等。另外,构建噬菌体抗体库、核糖体展示文库等可使不经抗原免疫而获得特异性抗体。

基因工程抗体的分离纯化可根据抗体特性选用上述的方法。

宋丽敏等^[22]用一段 45 个核苷酸的片段连接抗对硫磷抗体重链和轻链可变区基因片段 VH 和 VL,获得了抗对硫磷单链抗体(scFv)基因,再构建抗对硫磷 scFv 基因原核表达载体,并采用 Ni-NTA 金属亲和层析法对可溶性表达产物进行纯化,得到目的蛋白纯度为 74.18%,最后用 ELISA 法检测该单链抗体,抗体特异性符合要求。

综上所述,抗体不仅在生命科学的基础研究中发挥重要作用,而且在疾病的预防、临床诊断和治疗领域应用愈加广泛,这必将对抗体制备和纯化方法的要求更为精细、高效,因此完善目前常规的分离纯化方法,研制开发新型的分离纯化技术有重要的意义,必将推动生命科学的发展。

参考文献

[1] 王廷华,李官成,Xin-Fu Zhou. 抗体理论与技术[M]. 北京:科学出版社,2005:1-4.
 [2] 李慧,吴恩应,张彦鹏,等. 人血清 IgG 分离纯化方法探讨[J]. 广西大学学报,2008,33(6):109-112.
 [3] 陈丹,孙广瑞,柳增善. 辛酸-硫酸铵联合沉淀法在单克隆抗体纯化中的应用[J]. 安徽农业科学杂志,2007,35(26):8105-8108.
 [4] 王京,汪立,范慧,等. CMTM12 v17/CKLFSF12 v17 多克隆抗体的制备、亲和纯化与鉴定[J]. 中国免疫学杂志,2006,22(12):1132-1136.
 [5] 唐佳佳,李小兵,刘国文,等. 单克隆抗体纯化的研究进展[J]. 中国畜牧兽医,2011,38(2):76-80.
 [6] 苗景,孙文改. 抗体生产纯化技术[J]. 中国生物工程杂

志,2008,28(10):141-152.
 [7] 吴淑江,祝骥,李敏,等. 蛋白 A 亲和层析法纯化抗乙肝核心抗原单克隆抗体[J]. 药物生物技术,2010,17(1):67-72.
 [8] 封琳,王桂珍,李阳,等. 免疫亲和层析法快速纯化猪瘟病毒抗体[J]. 中国生物制品学杂志,2011,24(10):1233-1235.
 [9] Martins S, Karmali A, Serralheiro ML. Chromatographic behaviour of monoclonal antibodies against wild-type amidase from *Pseudomonas aeruginosa* on immobilized metal chelates[J]. Biomed Chromatogr, 2011, 25(12): 1327-1337.
 [10] 詹骞,邹昌勇,杜厚明,等. WuT3 无血清培养上清中单克隆抗体纯化工艺的建立[J]. 中国生物制品学杂志,2007,20(8):593-599.
 [11] 马泓冰,孙中文,徐颖,等. 两步串联层析法纯化鼠抗人 CD28 单克隆抗体 2F5 [J]. 细胞与分子免疫学杂志,2007,23(2):152-154.
 [12] 侯越,罗奋华,吴应积. 抗体分离纯化技术的研究进展[J]. 生物技术通报,2008,(3):60-62.
 [13] 刘玄,宋宏新. 嗜疏色谱纯化抗体技术的研究进展[J]. 色谱,2006,24(1):88-92.
 [14] A. Lihme, P. M. H. Heegaard, 赵永芳. 亲疏吸附层析法分离血清蛋白[J]. 微生物学免疫学进展,1992,(3):41-43.
 [15] Burton SC, Harding DRK. Hydrophobic charge induction chromatography: salt independent protein adsorption and facile elution with aqueous buffers[J]. J Chromatogr A, 1998,814(1-2):71-81.
 [16] Boschetti E. Antibody separation by hydrophobic charge induction chromatography[J]. Trends Biotechnol, 2002, 20(8):333-337.
 [17] 程华,闰静辉. 疏水电荷诱导层析用于抗体纯化的研究进展[J]. 国际免疫学杂志,2008,31(1):74-77.
 [18] 童军,李勇,陈亚光,等. 国产免疫磁珠与溴化氢活化 Sepharose 4B 亲和层析分离羊抗人 IgG 的比较[J]. 中国生物制品学杂志,2006,19(1):89-90.
 [19] 凌媛,徐静,许雨锋,等. 抗 TNF- α 单链抗体的表达及其纯化[J]. 微生物学免疫学进展,2009,37(3):24-28.
 [20] 王明永,张丽芸,张雅妮,等. 联合应用配体和单克隆抗体亲和层析纯化人血浆天然 MBL 蛋白 [J]. 免疫学杂志,2008,24(3):119-126.
 [21] 邝贞结. 基因工程重组抗体技术的研究进[J]. 广东畜牧兽医科技,2010,35(5):3-6.
 [22] 宋丽敏,张维,林敏,等. 抗对硫磷基因工程抗体 ScFv 的制备及其初步鉴定[J]. 核农学报,2008,22(6):856-859.

(收稿日期:2012-09-01 修回日期:2012-11-29)