



生物化学实验

免疫学实验技术

6.4 抗体的纯化

北京大学 王青松 胡晓倩

概述

- 免疫学检测中，抗体的质量直接影响检测方法的特异性和灵敏度。
- 抗体制备过程中，抗体往往与许多杂蛋白混杂在一起，因此需要根据实验目的和要求，对抗体进行纯化处理，除去容易干扰实验结果的成分。

抗体的纯化原则

- 普通酶免疫测定，盐析沉淀即可。
- 标记抗体，要求抗体纯度尽可能高，需亲和层析纯化。
- 抗体用于人体治疗，要无毒素、热源及其它抗原。

抗体的用途

- 多抗：来源于动物血清
- 单抗：来源于小鼠腹水和细胞培养上清
- 基因工程抗体：来源于细菌培养上清或细菌裂解液

抗体的来源

抗体纯化的流程



硫酸铵沉淀

纯度 > 80%



亲和层析

纯度 > 95%



精细纯化

纯度 > 99%

凝胶过滤、
离子交换、
疏水作用层
析等

抗体的预处理

- 含有不同来源抗体的动物血清、腹水等，都包含了大量宿主蛋白质（如白蛋白、免疫球蛋白、转铁蛋白等）、脂质及细胞碎片。
- 在抗体纯化之前，一般均需对含有抗体的免疫血清、腹水等进行预处理，目的是为了除去细胞碎片、脂质及较大的蛋白质聚合物等。

抗体的样品预处理方法

过滤法

- 用0.45 μ m孔径的滤膜过滤，可除去脂质颗粒、纤维蛋白及一些固体颗粒。

离心法

- 低温高速离心（12000g，15 min，4℃），可除去细胞残渣及小颗粒物质。对于血清、腹水及细菌培养上清均适合。

二氧化硅吸附法

- 适于含有大量脂质的腹水、血清。

- **实际操作中可将其中两种方法联合使用。**
 - 免疫血清：先离心后过滤。
 - 腹水：高速离心后，取上清液用二氧化硅吸附处理。

抗体的纯化方法

- 抗体是免疫球蛋白，根据免疫球蛋白的性质（溶解度、等电点、疏水性、电荷及亲和力等），利用生物化学各种提取纯化蛋白质的方法进行抗体纯化。



硫酸铵沉淀

- 硫酸铵沉淀法是利用蛋白质在不同浓度的盐溶液中相对溶解度不同，血清 γ 球蛋白在一定浓度盐溶液中易于沉淀，而白蛋白则不易沉淀，通过离心后，可将血清 γ 球蛋白分离出来。
- 硫酸铵沉淀法具体原理详见：2.5 生物大分子的沉淀分离
- **注意：**盐析法得到的 γ 球蛋白虽大多属于IgG，但还有5%其他区带蛋白，如 γ 区的杂蛋白。

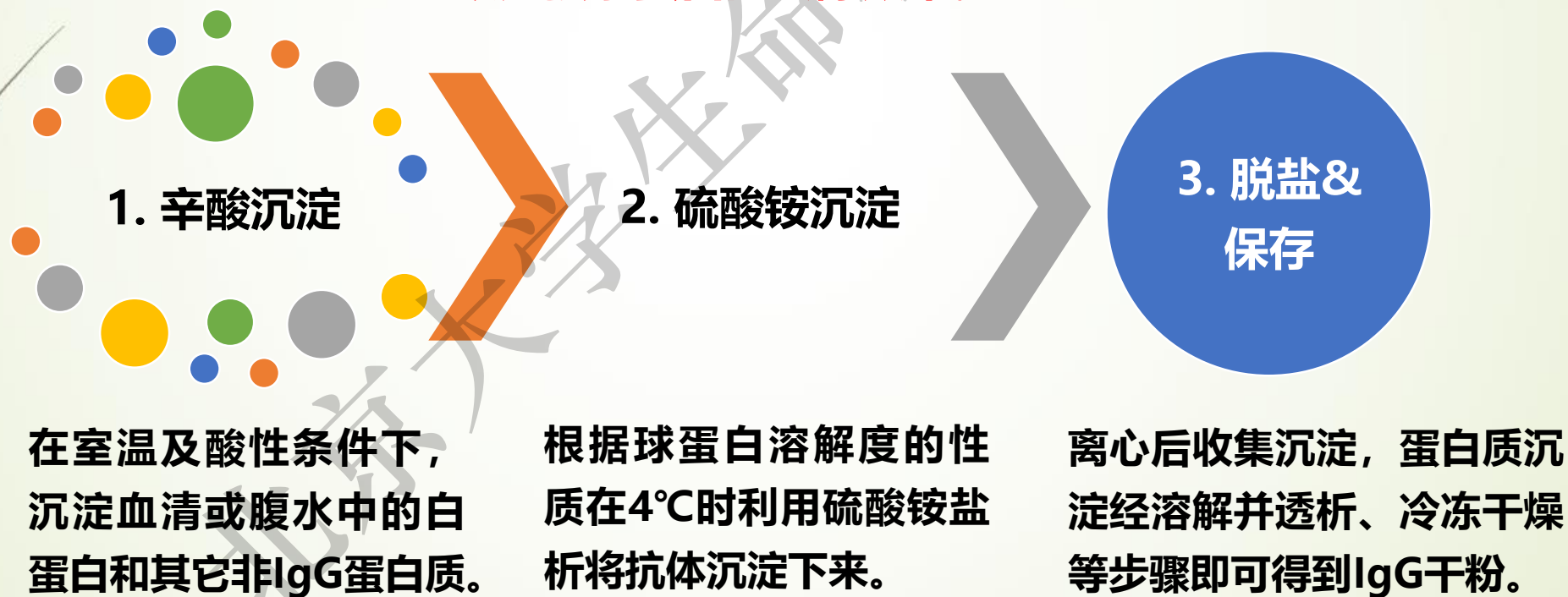
**硫酸铵沉淀法作为抗体纯化的第一步粗提取，无法得到高纯度的抗体。
但是它可浓缩并除去大部分的杂蛋白。**

硫酸铵沉淀的实验流程



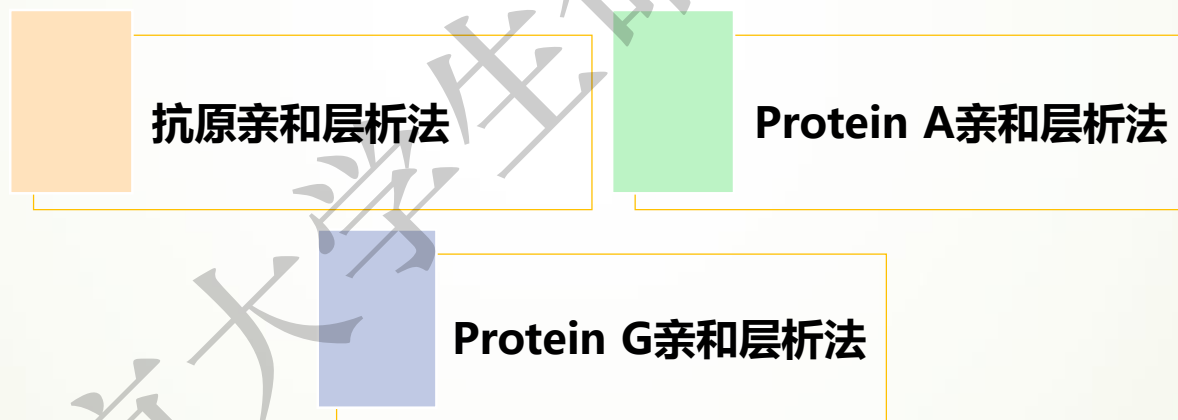
辛酸-硫酸铵沉淀

辛酸-硫酸铵沉淀法是在硫酸铵沉淀法的基础上添加辛酸以加强杂蛋白的去除效果。



亲和层析

- 亲和层析是利用**抗体与配基（抗原或某种蛋白质配基）结合的特异性**对抗体进行纯化。具有操作简便、纯度高、且活性不丧失等优点。但亲和介质成本高，广泛使用受到一定限制。



- **抗原亲和层析的配基为抗原，往往珍贵且数量有限，一般使用 Protein A、Protein G 为配基的亲和层析法。**

Protein A亲和层析法

- Protein A是金黄色葡萄球菌的表面蛋白，相对分子质量为42 kDa，有6个不同的IgG结合位点，其中5个位点与Fc片段有很强的特异性亲和力，且各个位点与抗体的结合都是独立的。1个Protein A分子至少可以与2个IgG分子结合。
- Protein A还可结合IgM、IgD、IgA。
- Protein A与IgG的结合具有pH依赖性，在pH值中性或碱性条件下与多种哺乳类动物IgG分子特异结合，在酸性条件下可以解离。

Protein A对IgG有高亲和力和特异性，适合纯化IgG类抗体。

Protein G亲和层析法

- Protein G是G群链球菌的细胞表面蛋白，天然Protein G有3个IgG结合域，同时也具有白蛋白和细胞表面结合域，与白蛋白有微弱的结合。重组Protein G除去了与白蛋白及细胞表面结合的位点，减少了交叉反应和非特异性结合。
- 与Protein A一样，Protein G与IgG的Fc区域特异性结合，适合纯化IgG类抗体。
- 相比Protein A，Protein G具有更宽范围的IgG结合能力，对大多数哺乳动物的IgG亲和力更强。Protein G还可以和某些抗体的F(ab)和F(ab')₂片段结合。
- 与Protein A不同，Protein G不结合人的IgM、IgD、IgA。

Protein G可用于纯化不能与Protein A很好结合的哺乳动物单抗和多抗IgG。

Protein A和Protein G 亲和层析实验流程



亲和层析法的原理及实验流程，详见：4.4 亲和层析