

Facile purification and stabilization of anti-*Salmonella pullorum* polyclonal immunoglobulin G

Xingli YOU^{1,2}, Yanli YANG¹, Zhiguo SU¹, Yuan ZHANG³, Songping ZHANG^{1*}

1. State Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China

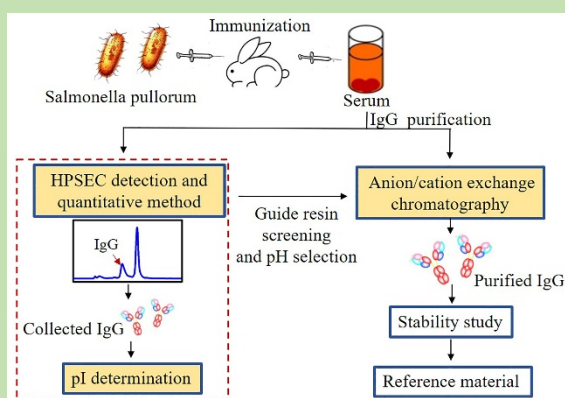
2. School of Chemical Engineering, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

3. China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China

Abstract: A single step separation protocol was developed for purification of anti-*Salmonella pullorum* polyclonal immunoglobulins G (IgG) from rabbit serum. According to the difference of isoelectric point (pI) between IgG and the major impurities, the types of ion exchange media were systematically screened by comparison of their purification results. In order to prevent the IgG from denaturation, different stabilizers were screened by differential scanning fluorimetry (DSF). The results showed that pI of the IgG was 6.04~7.08 determined by capillary iso-electric focusing. After cation exchange chromatography with packing materials of CM Sepharose Fast Flow (CM), the purity analyzed by SDS-PAGE was 63.5% and IgG recovery rate measured by high performance size-exclusion chromatography was 15.5%, respectively. In contrast, the purity of IgG was 99.3% and recovery rate was 67.5% after anion exchange chromatography with packing materials of Q Sepharose XL (Q-XL). 200 g/L sorbitol was found to possess the best protection effect. The two thermal denaturation temperatures of IgG were increased by 5.52 and 8.84 °C, respectively, and the stability at 70 °C was significantly improved. The results demonstrated that the one step anion exchange chromatography together with 200 g/L sorbitol protection provided a high purity, high recovery rate, and high stability of the IgG. The whole process is facile and efficient.

After cation exchange chromatography with packing materials of CM Sepharose Fast Flow (CM), the purity analyzed by SDS-PAGE was 63.5% and IgG recovery rate measured by high performance size-exclusion chromatography was 15.5%, respectively. In contrast, the purity of IgG was 99.3% and recovery rate was 67.5% after anion exchange chromatography with packing materials of Q Sepharose XL (Q-XL). 200 g/L sorbitol was found to possess the best protection effect. The two thermal denaturation temperatures of IgG were increased by 5.52 and 8.84 °C, respectively, and the stability at 70 °C was significantly improved. The results demonstrated that the one step anion exchange chromatography together with 200 g/L sorbitol protection provided a high purity, high recovery rate, and high stability of the IgG. The whole process is facile and efficient.

Key words: *Salmonella pullorum*; immunoglobulin G; reference material; purification; isoelectric point; ion exchange chromatography; stabilization



收稿: 2019-03-12, 修回: 2019-04-04, 网络发表: 2019-04-17, Received: 2019-03-12, Revised: 2019-04-04, Published online: 2019-04-17

基金项目: 国家重点研发计划资助项目(编号: 2016YFD0500800; 2016YFD0500809); 国家自然科学基金资助项目(编号: 21821005; 21808226)

作者简介: 尤星力(1993-), 女, 四川省绵阳市人, 硕士研究生, 研究方向: 蛋白质分离纯化; 张松平, 通讯联系人, E-mail: spzhang@ipe.ac.cn.

引用格式: 尤星力, 杨延丽, 苏志国, 等. 鸡白痢沙门氏菌兔抗血清多抗 IgG 的纯化与稳定. 过程工程学报, 2019, 19(6): 1204-1211.

You X L, Yang Y L, Su Z G, et al. Facile purification and stabilization of anti-*Salmonella pullorum* polyclonal immunoglobulin G (in Chinese). Chin. J. Process Eng., 2019, 19(6): 1204-1211, DOI: 10.12034/j.issn.1009-606X.219153.

鸡白痢沙门氏菌兔抗血清多抗 IgG 的纯化与稳定

尤星力^{1,2}, 杨延丽¹, 苏志国¹, 张媛³, 张松平^{1*}

1. 中国科学院过程工程研究所生化国家重点实验室, 北京 100190

2. 中国科学院大学化学工程学院, 北京 100049

3. 中国兽医药品监察所, 北京 100081

摘要:建立了离子交换层析介质一步纯化鸡白痢沙门氏菌兔抗血清获得多抗免疫球蛋白 G (IgG) 的方法, 利用 IgG 与杂蛋白等电点的差异, 指导阴阳离子交换层析介质筛选和操作条件优化; 针对多抗 IgG 易失活的难题, 采用差示扫描荧光法为纯化后的 IgG 筛选稳定剂。结果表明, 通过毛细管等电聚焦测得兔抗血清多抗 IgG 的等电点为 6.04~7.08, 阳离子交换介质 CM Sepharose Fast Flow 层析纯化的 IgG 最高电泳纯度为 63.5%, 高效液相尺寸排阻色谱测得 IgG 回收率为 15.5%; 阴离子交换层析纯化效果更佳, pH 5.5 条件下 Q Sepharose XL(Q-XL)介质层析获得的 IgG 最高纯度达 99.3%, 回收率达 67.5%; 200 g/L 山梨醇对 IgG 具有最佳稳定作用, IgG 的 2 个热变性温度分别提高了 5.52 和 8.84℃, 70℃ 时山梨醇的稳定作用更明显; 以 200 g/L 山梨醇为稳定剂、用阴离子交换层析介质 Q Sepharose XL 一步纯化所得 IgG 具有高纯度、高收率及高稳定性, 且制备工艺简单。

关键词: 鸡白痢沙门氏菌; 免疫球蛋白 G; 标准物质; 纯化; 等电点; 离子交换层析; 稳定

中图分类号: Q816 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-606X(2019)06-1204-08

1 前言

我国是家禽养殖大国, 饲养量居世界首位, 禽病的防控至关重要。由鸡白痢沙门氏菌引起的鸡白痢是细菌性传染病^[1], 不仅严重影响雏鸡的成活率和成鸡的产蛋率, 带来巨大的经济损失, 更会污染肉蛋产品并引发食品安全问题。但目前鸡白痢尚无有效的疫苗, 只能参照我国农业行业标准 NY/T 536-2017《鸡伤寒和鸡白痢诊断技术》, 对鸡群进行鸡白痢抗体检测, 淘汰阳性鸡, 进行防控^[2]。由于缺乏检测的抗体标准物质, 检测结果的准确性往往难以判断。张媛等^[3]制备了鸡白痢阳性血清标准品, 可作为鸡白痢沙门氏菌抗原参考品进行鸡白痢沙门氏菌阳性血清诊断试剂的效价标定。但由于血清中存在大量非免疫球蛋白 G (IgG) 杂质, 且血清的成分和质量存在不确定性, 仍难以满足标准物质成分确定及溯源要求。多抗 IgG 易失活, 建立高效的分离纯化工艺, 同时避免多抗 IgG 失活, 是对生物分离工作者的挑战。

目前关于 IgG 的纯化已有大量报道^[4-7], 主要包括层析和沉淀两类^[8]。其中, Protein A 亲和层析具有高特异性, 已在抗体尤其是单抗的生产中广泛应用^[9]。但因其解吸条件较严格, 通常需在较低 pH 下进行, 而多抗 IgG 与单抗不同, 亚型组分较多且易失活, 需条件温和的分离方法。离子交换层析利用不同等电点的蛋白质在介质上吸附能力的差异实现分离, 作为一种经济有效的替代方法也通常用于抗体纯化^[10,11]。单抗因其等电点单一且性质稳定, 通过离子交换就能获得高纯度产品。但不同亚型的多抗 IgG 等电点不同, 且不同抗原产生的亚型稳定性也存在较大差异, 因此通过离子交换层析纯化

抗血清需对条件进行大量筛选和优化。目前兔血清中抗体的离子交换层析纯化主要采用两步纯化, 通常第一步以硫酸铵沉淀去除大量杂蛋白, 离子交换层析作为第二步^[12]。硫酸铵沉淀过程较长, 还需在沉淀后进行溶解, 导致部分多抗亚型蛋白质损失。有研究^[13]采用阴离子交换介质进行一步静态吸附纯化, 但抗体的纯度最高仅为 83%, 难以作为标准物质。

层析的分辨率远高于静态吸附, 可通过设计不同的吸附和梯度洗脱策略高效去除杂质, 确保产品的高纯度。但层析是复杂的液固动态吸附和解吸过程, 多抗 IgG 要经历不同的微环境变化, 很易失活。为此, 必须筛选离子交换介质和操作条件, 同时确保层析纯化后的多抗 IgG 稳定。本研究建立了一步离子交换层析工艺, 从鸡白痢沙门氏菌免疫的兔血清中分离纯化制备高纯度多抗 IgG, 使其纯度大于 98%, 以作为检测鸡白痢的标准物质。为防止纯化产物失活, 采用差示扫描荧光 (Differential Scanning Fluorimetry, DSF) 比较不同稳定剂对多抗 IgG 的保护作用, 快速筛选稳定剂。

2 实验

2.1 材料与试剂

鸡白痢沙门氏菌免疫兔血清(用标准型鸡白痢沙门氏菌全菌灭活抗原免疫家兔后, 采血提取血清所得^[13])和浓度 2.5×10^9 CFU/mL 的标准型鸡白痢沙门氏菌菌液抗原由中国兽医药品监察所提供。改良 Lowry 蛋白定量分析试剂盒(美国 Thermo Fisher Scientific 公司), 阴离子层析柱 Q Sepharose XL (Q-XL, 1.27 cm×1.0 cm I.D.) 和 DEAE-Sepharose Fast Flow (DEAE, 1.27 cm×1.0 cm I.D.)、

阳离子层析柱 CM Sepharose Fast Flow (CM, 1.27 cm×1.0 cm I.D.)和 SP Sepharose XL (SP-XL, 1.27 cm×1.0 cm I.D.)均为美国 GE Healthcare 公司产品, TSKgel G3000SW_{XL} 高效液相尺寸排阻色谱柱(HPSEC, 7.8 mm I.D.×30 cm, 填料孔径 25 nm, 粒径 5 μm)和 TSKgel UltraSW Aggregate 色谱柱(7.8 mm I.D.×30 cm, 填料孔径 30 nm, 粒径 3 μm)为日本东曹株式会社产品, Agilent AdvanceBio SEC 色谱柱(7.8 mm I.D.×30 cm, 填料孔径 30 nm, 粒径 2.7 μm, 美国安捷伦公司), Sypro Orange Protein Gel Stain 荧光染料(德国 Sigma-Aldrich 公司), Amicon Ultra 超滤管(美国 Millipore 公司), 高级 cIEF 启动试剂盒(美国 Beckman Coulter 公司), 其它试剂均为分析纯。

2.2 实验设备与分析仪器

PPS-100HD 蛋白纯化系统[中科森辉微球技术(苏州)有限公司], 1260 Infinity 高效液相色谱仪(HPLC, 美国安捷伦科技有限公司), 索福 Biofuge Stratos 全能台式高速冷冻离心机(美国 Thermo Fisher Scientific 公司), 165-8001 型 Mini-Protein 电泳仪(美国 Bio-Rad 公司), Fluor Chem E 型凝胶成像系统(美国 ProteinSimple 公司), ABI 7500Fast 实时荧光定量仪(RT-PCR, 美国 Applied Biosystems 公司), Multiskan GO 全波长酶标仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司), Milli-Q plus 型超纯水机(美国 Millipore 公司), CESI 8000 毛细管电泳仪(美国 SCIEX 公司), Optilab T-rEX 示差折射率测定仪(美国 Wyatt 公司), DAWN HELEOS II 多角度激光光散射(美国 Wyatt 公司)。

2.3 实验方法

2.3.1 多抗 IgG 的快速分析及定量

血清用 HPLC 及 3 种色谱柱进行分析, 条件如下: 流动相为磷酸缓冲盐溶液(pH 6.8, 50 mmol/L Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ 缓冲液, 0.1 mol/L Na₂SO₄), 检测波长 280 nm, 进样量 80 μL, 流速 0.5 mL/min, 时长 35 min, 根据分离度选择最佳的色谱柱。将血清原料液梯度稀释, 根据总蛋白浓度和电泳纯度计算目标蛋白 IgG 浓度, 用选定的 HPSEC 色谱柱进行 HPLC 检测, 建立峰面积与 IgG 浓度的标准曲线。为进一步测定 IgG 的分子量, 将 HPSEC 与多角度激光散射仪(MALLS)和示差检测器(RI)在线连接进行检测, 根据多角度激光信号和示差信号, 通过 Astra v-6.1 软件计算蛋白的相对分子量。

2.3.2 等电点及蛋白浓度测定

收集 HPSEC 中目标蛋白峰, 将样品溶剂用 30 kDa 超滤管置换为 H₂O 并调整浓度为 2 mg/mL, 根据 cIEF 试剂盒操作说明, 加入各试剂混合后, 用 CESI 8000 毛

细管电泳仪进行毛细管等电聚焦(cIEF), 于 25 kV 聚焦 15 min, 30 kV 迁移 30 min, 采集紫外光 280 nm 处的吸收信号, 根据 Marker 的等电点(pI)和出峰时间作标准曲线, 计算样品等电点。总蛋白质浓度用改良 Lowry 蛋白定量试剂盒测定。

2.3.3 阳离子交换层析纯化血清中 IgG

分别配制 pH 为 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 的 10 mmol/L 柠檬酸缓冲液作为上样和淋洗液, 加入 NaCl 使终浓度为 1 mol/L, 作为洗脱缓冲液。将 3 mL 血清用超滤离心管置换于 pH 5.5、浓度 10 mmol/L 的柠檬酸缓冲液中, 定容至 27.5 mL, 分装于 5 个离心管中, 用 2 mol/L Tris 或柠檬酸调节 pH 分别为 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5。分别取 2 mL, 以 0.5 mL/min 流速进样到用相应 pH 上样缓冲液平衡好的 CM 或 SP-XL 阳离子交换层析柱(1 mL)中, 未结合组分用上样缓冲液充分淋洗, 用相应 pH 的洗脱液线性洗脱(0~100%洗脱缓冲液)25 min, 收集洗脱峰。

2.3.4 阴离子交换层析纯化血清中 IgG

分别配制 pH 为 5.5, 5.8, 6.1, 6.5, 7.0 的磷酸缓冲液作为上样和淋洗液, 加入 NaCl 使终浓度为 1 mol/L, 用作洗脱缓冲液。取血清 5 mL 置于 pH 6.5、浓度 20 mmol/L 的磷酸缓冲液中, 定容到 8 mL, 分装于 5 个离心管中, 调节 pH 分别为 5.5, 5.8, 6.1, 6.5, 7.0。取 0.5 mL, 以 0.5 mL/min 流速进样到用相应 pH 上样缓冲液平衡后的 DEAE 或 Q-XL 阴离子交换层析柱(1 mL)中, 未结合组分用上样缓冲液充分淋洗, 收集穿透峰, 用相应 pH 洗脱缓冲液进行 100%梯度洗脱。

2.3.5 IgG 纯度测定

血清原料液及纯化的各样品中 IgG 纯度由非还原型十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和 HPSEC 分别测定, SDS-PAGE 中浓缩胶浓度均为 5%, 分离胶浓度为 10%, 蛋白上样量均为 5 μg, 用考马斯亮蓝 G-250 染色, 根据电泳条带灰度计算纯度, 根据 HPSEC 中 IgG 抗体的吸收峰面积占所有吸收峰总面积的百分数计算 IgG 纯度。

2.3.6 活性测定

通过微量凝集反应测定纯化前后抗体的效价。将血清原料液及纯化样品分别在 U 底 96 孔板中用含 0.5 vol% 石炭酸的生理盐水 1:1(体积比)稀释, 每孔 80 μL, 每孔加入 80 μL 标准型鸡沙门氏菌抗原, 将反应板置于湿盒中 51℃ 过夜反应, 观察结果。在阴、阳性对照均成立的条件下, 孔底若不见抗原沉积, 则为阳性反应, 与抗原发生阳性反应的血清最高稀释倍数为抗体的效价。

2.3.7 IgG 抗体稳定剂筛选和加速稳定性实验

采用差示扫描荧光(DSF)技术快速高通量筛选抗体

稳定剂^[14]。将 54 μL 含不同稳定剂的 IgG 样品加入检测孔板中,加入 6 μL Sypro Orange 荧光染料,荧光染料终稀释度为 1:500(体积比),蛋白终浓度为 0.5 mg/mL。每个样品设置 2 个平行孔,用光学封板膜封板后,低速离心 2 min 去除气泡,用 RT-PCR 仪检测,扫描温度范围为 25~95 $^{\circ}\text{C}$,升温速率 1 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$,报告基团选择 ROX,激发和发射波长分别为 570~590 和 610 nm,猝灭基团选择 None。于升温过程中采集荧光信号数据,求其一阶导数并用 Origin 软件绘图,得到 IgG 的热变性温度。对筛选的稳定剂在 70 $^{\circ}\text{C}$ 下进行加速稳定性实验,用 HPSEC 检测加热不同时间后剩余的 IgG 含量,并与未加稳定剂的对照组对比。

3 结果与讨论

3.1 多抗 IgG 的快速分析及鉴定

抗体研究最常用的定量方法是采用酶联免疫吸附测定(Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA)法作标准曲线^[8,13],但其操作过程复杂,且准确度和结果重复性较差,不适用于快速准确测定 IgG 纯度和含量。通过蛋白电泳图各条带灰度值对蛋白浓度进行定量同样存在准确性和重复性差的缺点,高效液相色谱法则具有快速准确定量的突出优势^[15]。为建立合适的色谱检测条件,分别选用分离范围适合抗体分析的 3 种 HPSEC 分析柱对原料液进行分析检测,其中 TSKgel G3000SW_{XL} 是目前广泛用于抗体检测的色谱柱^[16],填料孔径为 25 nm,粒径 5 μm ; UltraSW Aggregate 孔径略大,为 30 nm,具有更大的分离范围上限,可对抗体中的三聚体及多聚体进行有效分析; Agilent AdvanceBio SEC 也常用于抗体药物分析,填料粒径仅为 2.7 μm ,分辨率更高。综合考虑填料粒径、孔径、分离范围,3 种分析柱均可能分离兔血清中多抗 IgG 与其它杂蛋白。

3 种 HPSEC 色谱柱对血清检测的结果如图 1 所示。与 UltraSW Aggregate (分离度 1.10) 和 TSKgel G3000SW_{XL} (分离度 1.13) 相比,Agilent AdvanceBio SEC 色谱柱的分离效果最佳,2 个主要吸收峰分离度达 2.19。结合 HPSEC-MALLS 检测结果,可以确定 Agilent AdvanceBio SEC 色谱柱上约 15.68 min 处的吸收峰为 IgG 特征峰,根据 MALLS 信号计算得其分子量为 154 kDa (图 1),与文献^[16]报道基本一致。根据 Agilent AdvanceBio SEC 色谱峰面积百分比,计算得原料液中 IgG 纯度为 26%,与电泳纯度检测结果较一致。收集 HPSEC 中的 IgG 特征峰进行电泳检测,结果如图 2(a) 所示,为单一 IgG 条带,进一步确定该色谱柱能对血清中 IgG 进行有效分离。因此,选用 Agilent AdvanceBio

SEC 建立 IgG 的 HPSEC 定量检测方法:根据蛋白浓度和 IgG 电泳纯度计算原料液中 IgG 浓度,再对原料液进行梯度稀释,分别用 HPSEC 检测。建立的 IgG 浓度 y (mg/mL) 与 HPSEC 峰面积 x 的关系为 $y=8\times 10^{-5}x+0.0109$, $R^2=0.9996$,二者具有良好的线性关系,可用于 IgG 蛋白定量。

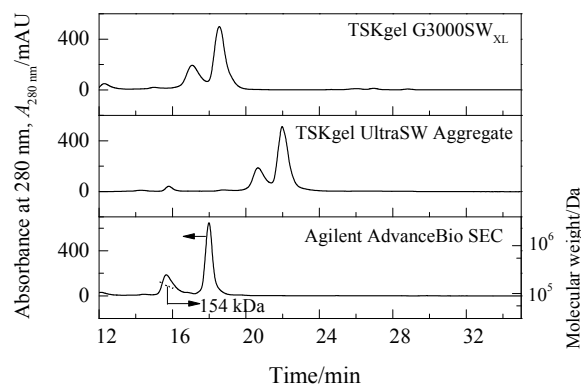


图1 3种 HPSEC 色谱柱检测的血清的 HPSEC 图谱
Fig.1 HPSEC assay of serum using TSKgel G3000SW_{XL}, TSKgel UltraSW Aggregate and Agilent AdvanceBio SEC column

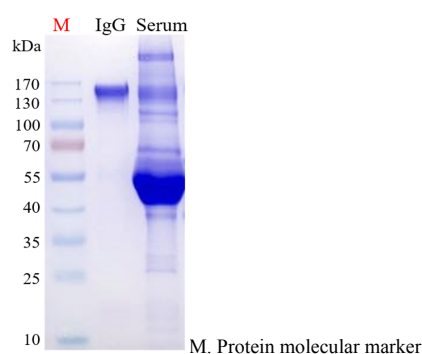
鸡白痢免疫家兔可引发多个 B 细胞应答,因此产生的 IgG 抗体也具有多种亚型,等电点并不单一;另一方面,不同抗原免疫产生的兔血清中,抗体的亚型也会存在差异,导致等电点不完全相同。根据文献^[8]报道,乙肝核心抗原免疫产生的兔血清中 IgG 等电点约为 7.8,而主要杂蛋白白蛋白的等电点约为 4.7,二者存在较大差异,因此通过硫酸铵沉淀结合混合模式离子交换层析精制两步工艺, IgG 纯度可达 98%。但多抗的等电点并不单一,目前尚未见文献报道鸡白痢沙门氏菌兔血清抗体的等电点,或以等电点为核心对离子交换层析进行优化。为对兔血清 IgG 进行离子交换层析,建立一步纯化方法,收集 HPSEC 中 IgG 蛋白峰,得到多抗纯品,用 cIEF 测定其等电点,结果如图 2(b)所示。从图可以看出,多抗 IgG 的等电点范围较宽,为 6.04~7.08,这可能是由于所用抗原为鸡白痢沙门氏菌,免疫产生的抗体亚型较复杂;另一方面,由于其等电点与白蛋白等电点(4.7)差别较小,用离子交换层析纯化的难度也更大,需对层析介质和层析条件进行系统筛选和优化。

3.2 不同 pH 下阳离子交换层析介质纯化 IgG

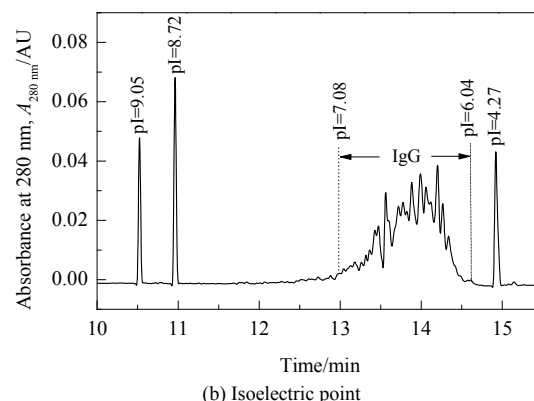
用阳离子交换层析从血清原料液中纯化 IgG。考虑到 IgG 的等电点略低于 7.0,因此选取 pH 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 和 6.5 条件下上样,使等电点较低的白蛋白等杂质穿透,而 IgG 可选择性吸附,从而通过提高盐浓度进行洗脱。选用 CM 和 SP-XL 两种阳离子交换层析介质,将收

集的洗脱液分别进行 SDS-PAGE 和 HPSEC 分析, 根据洗脱液 HPSEC 谱的 IgG 峰面积, 计算洗脱液中 IgG 含量, 比较洗脱液与上样血清中 IgG 总量, 得到不同 pH、

不同介质上经一步阳离子层析后 IgG 的收率, 根据电泳图灰度确定各条件下的纯度。

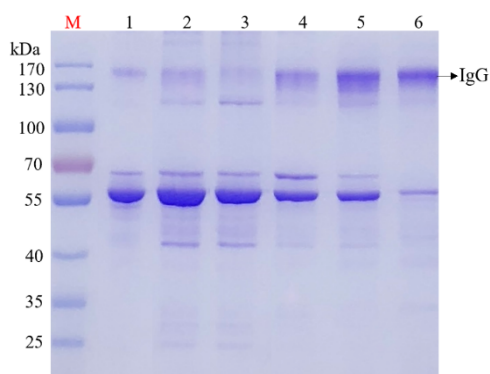


(a) Electrophoretogram



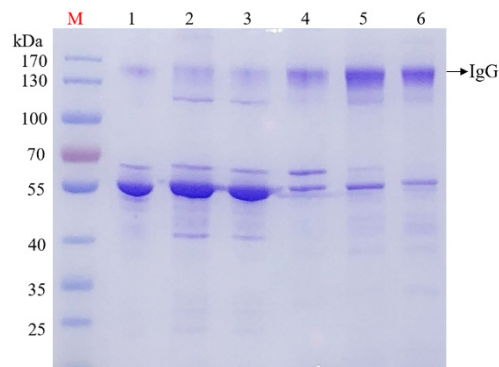
(b) Isoelectric point

图 2 IgG 的电泳图及等电点
Fig.2 Electrophoretogram and isoelectric point of IgG



(a) CM

M. Protein molecular marker



(b) SP-XL

1. Serum 2~6. Elution peak at pH 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5

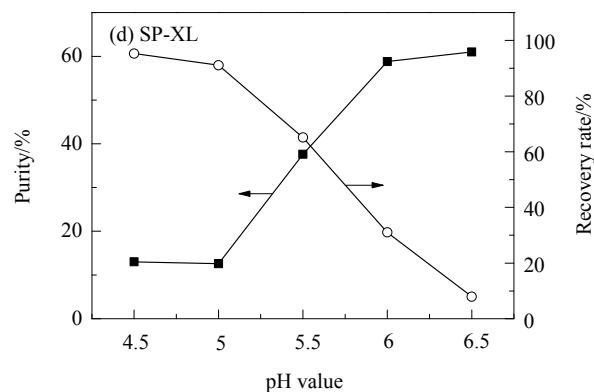
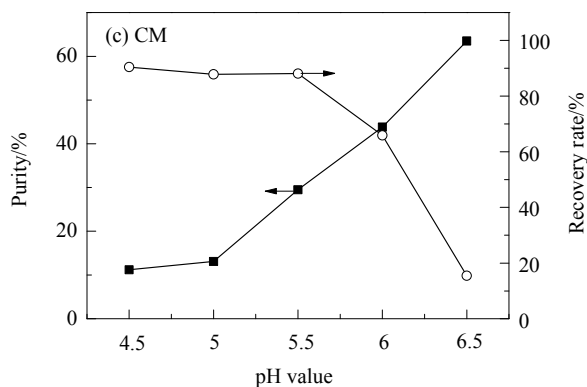


图 3 兔血清经阳离子层析介质 CM 和 SP-XL 在不同 pH 下纯化的洗脱液的非还原型 SDS-PAGE 电泳图及 IgG 纯度和收率
Fig.3 Non-reducing SDS-PAGE electrophoretogram of purification products from cationexchange chromatography with CM and SP-XL, IgG purity and recovery rate at different pH values

CM 和 SP-XL 介质层析纯化 IgG 洗脱液电泳图分别如图 3(a), 3(b)所示, 相应 pH 下 IgG 的回收率和纯度分别见图 3(c), 3(d)。可以看出, 在两种阳离子交换层析中, pH 为 4.5 和 5.0 时, 杂蛋白结合能力强, 与原料

液相比, 层析后 IgG 纯度无明显提升; 随 pH 值增大, 以白蛋白为主的杂蛋白结合量显著降低, 可获得较高纯度的 IgG。但由于 pH 与 IgG 的等电点接近, 导致部分 IgG 不能完全吸附, 因此洗脱液中的 IgG 收率大幅度降

低。pH=6.5 时,经 CM 和 SP-XL 纯化后 IgG 的纯度分别为 63.5%和 61.0%,IgG 回收率仅有 15.5%和 7.9%。因此难以实现 IgG 的高纯度和高收率制备。

3.3 不同 pH 下阴离子交换层析介质纯化 IgG

根据 IgG 的等电点范围,用阴离子交换层析对血清中的 IgG 进行纯化。选取 DEAE 和 Q-XL 两种不同强度的介质,考察了 pH (5.5, 5.8, 6.0, 6.5, 7.0)对分离纯化的影响。毛细管电泳测定 IgG 纯品的等电点范围为 6.04~7.08,因此 pH<7.0 时,目标蛋白应主要存在于穿透峰中。收集层析穿透液分别进行 SDS-PAGE 和 HPSEC 分析,从电泳图[图 4(a),4(b)]可以看出,不同 pH 下,DEAE 和 Q-XL 层析杂蛋白的去除或富集规律一致,随 pH 降低,IgG 纯度逐渐提高,且 IgG 条带变深。从

图 4(c),4(d)可知,pH 5.5 条件下,穿透液中 IgG 纯度最高,分别达 90.4%和 99.3%,IgG 回收率也最高,分别为 53.8%和 67.5%;随 pH 提高,IgG 收率和纯度均呈下降趋势,一方面是由于此时 IgG 带负电荷增多,部分 IgG 可能会结合在层析介质上,导致收率降低;另一方面,从电泳结果可以看出,随 pH 升高,分子量约为 55 和 40 kDa 的杂蛋白增多,使 IgG 纯度降低。综合比较纯度和收率,Q-XL 纯化效果更好,在 pH=5.5 时,经一步层析 IgG 纯度达 99.3%,收率为 67.5%。Wongchuphan 等^[13]用 STREAMLINE™ Q XL 从兔血清中纯化乙肝核心抗原多抗 IgG,在最优的 pH(8.0)条件下,IgG 纯度和收率仅分别为 62%和 70%。

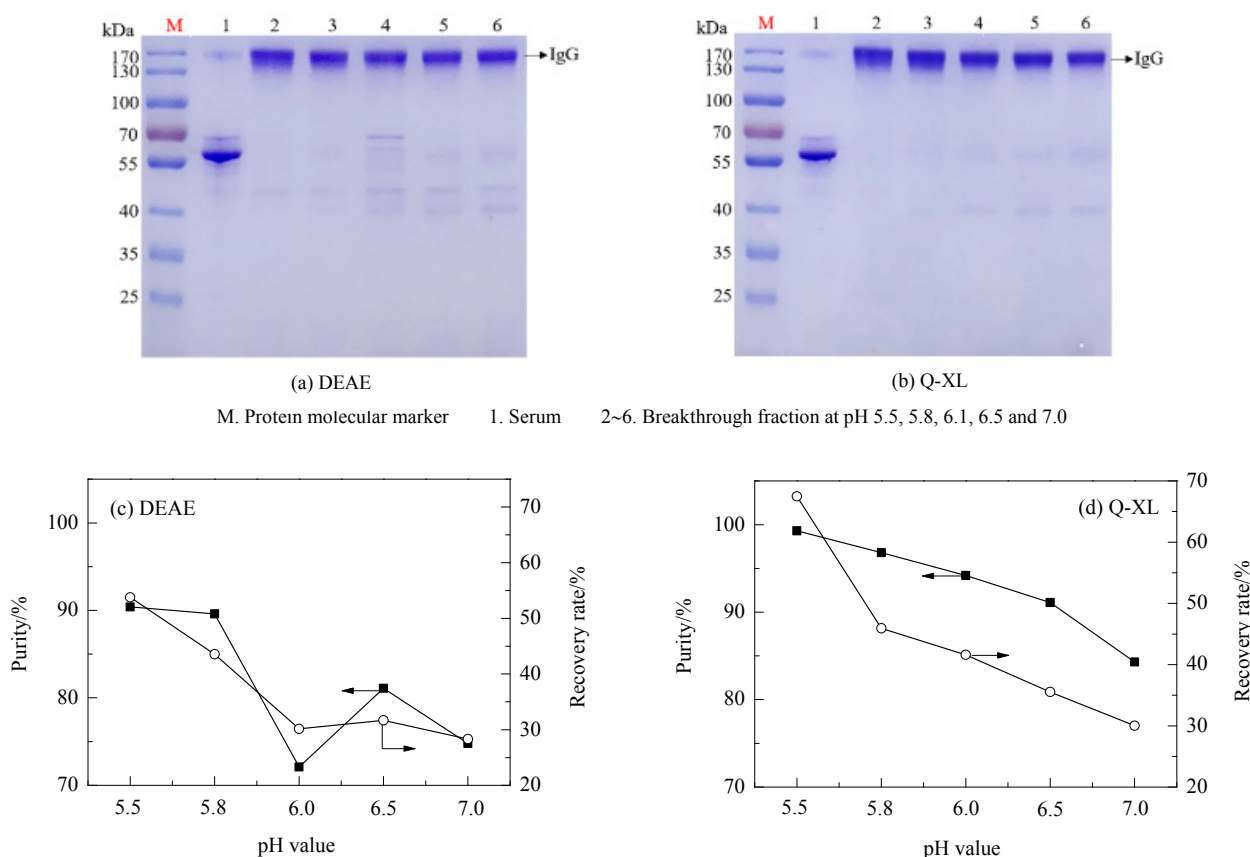


图4 兔血清经阴离子层析介质 DEAE 和 Q-XL 在不同 pH 下纯化的穿透液的非还原型 SDS-PAGE 电泳图及 IgG 纯度和收率
Fig.4 Non-reducing SDS-PAGE electrophoretogram of purification products from anionexchange chromatography with DEAE and Q-XL, IgG purity and recovery rate at different pH values

3.4 Q-XL 一步纯化所得 IgG 的活性鉴定

通过凝集实验对纯化前血清样品中的抗体滴度及 Q-XL 阴离子交换层析纯化所得 IgG 进行活性测定,通过下式计算活性收率 $R(\%)$:

$$R=(T_aV_a/T_bV_b)\times 100\%$$

式中, T_a , V_a 分别为纯化后 IgG 的效价和体积, T_b , V_b 分别为纯化前 IgG 的效价和体积。

纯化前后 IgG 蛋白的纯度和活性收率见表 1,可以看出,纯化得到的 IgG 蛋白具有很好的抗体活性,根据凝集实验测定的滴度,计算得纯化后的总活性收率为 62.5%;根据 HPSEC 检测的纯化前后 IgG 含量计算得

IgG 蛋白收率为 67.5%。这一方面证明 HPSEC 作为一种有效的 IgG 含量检测方法,与活性检测结果高度一致;另一方面也表明通过一步离子交换层析工艺得到的 IgG 不仅纯度可达 99%以上,而且活性保持很好,满足标准品制备要求。

表 1 纯化前后 IgG 蛋白的纯度和收率
Table 1 Purity and recovery rate of IgG protein before and after purification

Item	Serum	Q-XL purified at pH 5.5
Concentration/(mg/mL)	4.34	0.59
Volume/mL	0.5	2.5
Titer	1:2048	1:256
Titer activity recovery rate/%	100	62.5
HPSEC IgG recovery rate/%	100	67.5
Purity in HPSEC/%	26.3	99.0
Purity in SDS-PAGE/%	14.5	99.3

3.5 IgG 稳定剂筛选和加速稳定性

作为标准物质的 IgG 除高纯度外,还必须在长期储存过程中具有高稳定性,而 IgG 在纯化和储存过程中易发生聚集或裂解^[17,18],添加稳定剂可有效避免其降解。为快速筛选有效的稳定剂,采用 DSF 技术考察不同稳定剂对 IgG 热变性温度的影响。根据图 5(a)的 DSF 检测结果,在 pH 7.0、浓度 10 mmol/L 的磷酸缓冲液中,IgG 呈现 2 个变性温度,分别为 60.28 和 73.50℃。添加不同种类和浓度的稳定剂对变性温度的影响结果如表 2 所示。添加 200 g/L 山梨醇、200 g/L 葡萄糖、200 g/L 蔗糖和 0.1 mol/L 甘氨酸均可提高 IgG 的变性温度,其中 200 g/L 山梨醇效果最佳,使 2 个变性温度分别提高了

5.52 和 8.84℃。

进一步研究山梨醇对 IgG 的稳定效果,于 70℃下进行加速降解实验,通过 HPSEC 监测不加稳定剂(对照组)和加入 200 g/L 山梨醇时 IgG 含量随加热时间的变化,结果如图 5(b)所示。加入 200 g/L 山梨醇后 IgG 稳定性显著提高,加热 240 min 后 IgG 含量仍达 86.2%,而对照组仅剩余 38.0%。可以确认 200 g/L 山梨醇具有良好稳定效果,能在纯化和制剂开发过程中稳定 IgG 蛋白。

表 2 稳定剂对 IgG 热稳定性的影响
Table 2 Effect of stabilizer on thermal stability of IgG

Stabilizer	Concentration /(g/L)	Thermal denaturation temperature/℃	
		1	2
PB	0	60.28	73.50
Sorbitol	100	62.99	80.58
	200	65.80	82.34
Glucose	100	60.88	78.82
	200	65.45	79.87
Sucrose	100	62.64	78.47
	200	65.80	79.52
Glycine	0.05 mol/L	—	77.41
	0.1 mol/L	—	78.11
Glycerol	100	61.93	76.71
	200	62.29	77.06
PEG 2000	10	62.64	77.41
	30	63.69	75.30
Arginine	0.05 mol/L	—	73.89
	0.1 mol/L	—	73.19
PEG 400	50	—	73.19
	100	—	72.84

Note: —. No peak was detected.

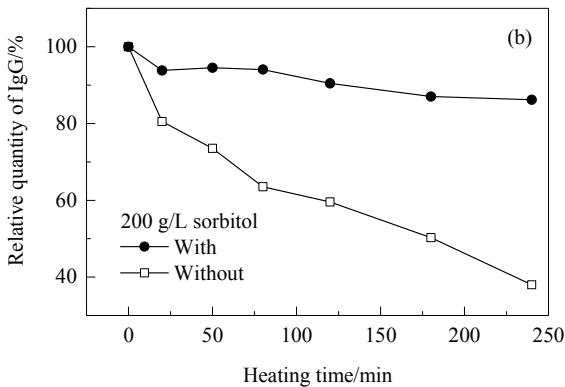
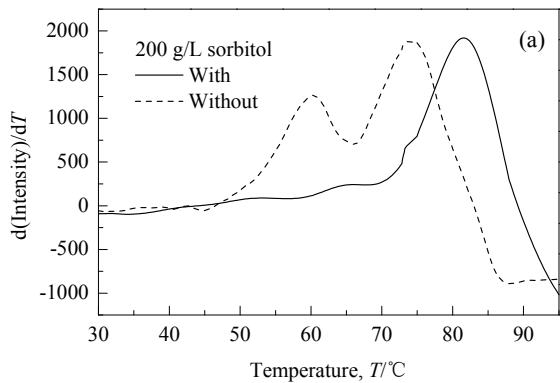


图 5 纯化后的 IgG 稳定性
Fig.5 Stability of purified IgG

4 结 论

对鸡白痢沙门氏菌兔抗血清多抗免疫球蛋白 G (IgG)进行等电点分析,用高效液相尺寸排阻色谱柱 (HPSEC)进行定量检测,考察了离子交换层析介质及 pH 对 IgG 纯度及收率的影响,并采用差示扫描荧光技术为

纯化获得的高纯度 IgG 筛选稳定剂,得到以下结论:

- (1) IgG 等电点范围为 6.04~7.08。
- (2) 阴离子交换层析介质 Q-XL 一步纯化得到高纯度鸡白痢沙门氏菌兔抗血清多抗 IgG 标准物质的最佳 pH 为 5.5, IgG 最高纯度达 99.3%,回收率达 67.5%,总活性收率为 62.5%。

(3) 200 g/L 山梨醇可显著提高 IgG 纯品的高热稳定性, 两个热变性温度分别提高 5.52 和 8.84 °C。

参考文献

- [1] Wong C L, Sieo C C, Tan W S, et al. Evaluation of a lytic bacteriophage, Φ st1, for biocontrol of *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* in chickens [J]. International Journal of Food Microbiology, 2014, 172: 92–101.
- [2] 中华人民共和国农业部. 鸡伤寒和鸡白痢诊断技术: NY/T 536–2017 [S]. 北京: 中国农业出版社, 2017: 1–3. Ministry of Agriculture of the People's Republic of China. Diagnostic techniques for fowl typhoid and pullorum disease: NY/T 536–2017 [S]. Beijing: China Agriculture Press, 2017: 1–3.
- [3] 张媛, 魏财文, 李建, 等. 鸡白痢沙门氏菌阳性血清国家标准品制备用菌株的筛选 [J]. 中国兽药杂志, 2018, 42(3): 38–44. Zhang Y, Wei C W, Li J, et al. Selection of strains for preparation of the national salmonella pullorum standard positive sera [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2018, 42(3): 38–44.
- [4] Low D, O'Leary R, Pujar N S. Future of antibody purification [J]. Journal of Chromatography B, 2007, 848(1): 48–63.
- [5] Newcombe A R, Cresswell C, Davies S, et al. Optimised affinity purification of polyclonal antibodies from hyper immunised ovine serum using a synthetic Protein A adsorbent, MAbsorbent A2P [J]. Journal of Chromatography B, 2005, 814(2): 209–215.
- [6] Yang H O, Gurgel P V, Carbonell R G. Purification of human immunoglobulin G via Fc-specific small peptide ligand affinity chromatography [J]. Journal of Chromatography A, 2009, 1216(6): 910–918.
- [7] Tishchenko G A, Bleha M, Skvor J, et al. Effect of salt concentration gradient on separation of different types of specific immunoglobulins by ion-exchange chromatography on DEAE cellulose [J]. Journal of Chromatography B, 1998, 706(1): 157–166.
- [8] Mariam S H S, Ooi C W, Tan W S, et al. Purification of rabbit polyclonal immunoglobulin G with ammonium sulphate precipitation and mixed-mode chromatography [J]. Separation and Purification Technology, 2015, 144: 133–138.
- [9] Hober S, Nord K, Linholt M. Protein A chromatography for antibody purification [J]. Journal of Chromatography B, 2007, 848(1): 40–47.
- [10] Pessela B C C, Munilla R, Betancor L, et al. Ion exchange using poorly activated supports, an easy way for purification of large proteins [J]. Journal of Chromatography A, 2004, 1034(1/2): 155–159.
- [11] Goheen S C, Hilsenbeck J L. High-performance ion-exchange chromatography and adsorption of plasma proteins [J]. Journal of Chromatography A, 1998, 816(1): 89–96.
- [12] Wang Y, Zhang P Y, Liu S J, et al. Purification of IgG from sera of rabbit and guinea pig by flow-through mode ion-exchange chromatography using DEAE Sepharose Fast Flow column [J]. Chromatographia, 2011, 74(3/4): 209–214.
- [13] Wongchuphan R, Tey B T, Tan W S, et al. Purification of rabbit polyclonal immunoglobulin G using anion exchangers [J]. Process Biochemistry, 2011, 46(1): 101–107.
- [14] 张伦, 罗坚, 周月芳, 等. 差示扫描荧光法快速筛选高浓度人免疫球蛋白液体制剂处方 [J]. 中国生物制品学杂志, 2016, 29(9): 973–977. Zhang L, Luo J, Zhou Y F, et al. Rapid screening of high concentration human immunoglobulin liquid formulations by differential scanning fluorimetry [J]. Chinese Journal of Biologicals, 2016, 29(9): 973–977.
- [15] Yang Y L, Li H, Li Z J, et al. Size-exclusion HPLC provides a simple, rapid, and versatile alternative method for quality control of vaccines by characterizing the assembly of antigens [J]. Vaccine, 2015, 33(9): 1143–1150.
- [16] Wang H L, Levi M S, Del Grosso A V, et al. An improved size exclusion—HPLC method for molecular size distribution analysis of immunoglobulin G using sodium perchlorate in the eluent [J]. Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis, 2017, 138: 330–343.
- [17] Lowe D, Dudgeon K, Rouet R, et al. Aggregation, stability, and formulation of human antibody therapeutics [J]. Advances in Protein Chemistry and Structural Biology, 2011, 84: 41–61.
- [18] Kayser V, Chennamsetty N, Voynov V, et al. Glycosylation influences on the aggregation propensity of therapeutic monoclonal antibodies [J]. Biotechnology Journal, 2011, 6(1): 38–44.