



基于层析技术探究金环蛇蛇毒多克隆 抗体 $F(ab')_2$ 的制备工艺

李爽¹,王炜杰²,赵伟睿²,胡升²,王磊³,范泉水³,吕常江⁴,黄俊⁴,梅乐和^{1,2,5}

(1. 浙江大学化学工程与生物工程学院,杭州 310027;2. 浙大宁波理工学院生物与化学工程学院,宁波 315100;

3. 浙江健博生物科技股份有限公司,宁波 315602;4. 浙江科技大学生物与化学工程学院,杭州 310023;

5. 金华高等研究院,浙江金华 321019)

摘要: 为制备高纯度马源金环蛇毒多克隆抗体 $F(ab')_2$,以金环蛇毒高免马血浆为原料,采用 Protein G 亲和层析捕获马血浆中的 IgG,经胃蛋白酶酶解后制得 $F(ab')_2$,分别通过亲和层析、凝胶过滤层析和混合模式层析对 $F(ab')_2$ 进行精制纯化,并以间接 ELISA 法测定 $F(ab')_2$ 对金环蛇毒的中和活性。结果表明:Protein G 亲和层析捕获的 IgG 纯度为 83.6%,较传统的盐析纯化法有明显提高;在 3 种层析精制方法中,通过凝胶过滤层析精制的 $F(ab')_2$ 纯度最高,为 89.3%,远高于《中华人民共和国药典》标准(60%以上),且收率为 56.0%;间接 ELISA 法测定结果显示, $F(ab')_2$ 的效价高于 1:4096。该研究为马源抗毒素多克隆抗体 $F(ab')_2$ 的工业化制备提供了工艺参考。

关键词: 金环蛇;多克隆抗体;胃蛋白酶; $F(ab')_2$ 片段;层析纯化

中图分类号: R392-33;R392.7

文献标志码: A

文章编号: 1673-3851(2025)03-0276-07

引文格式: 李爽,王炜杰,赵伟睿,等. 基于层析技术探究金环蛇蛇毒多克隆抗体 $F(ab')_2$ 的制备工艺[J]. 浙江理工大学学报(自然科学),2025,53(2):276-282.

Reference Format: LI Shuang, WANG Weijie, ZHAO Weirui, et al. A study on the preparation technology of $F(ab')_2$ fragments from polyclonal antibodies against *Bungarus fasciatus* venoms by chromatography[J]. Journal of Zhejiang Sci-Tech University, 2025, 53(2): 276-282.

A study on the preparation technology of $F(ab')_2$ fragments from polyclonal antibodies against *Bungarus fasciatus* venoms by chromatography

LI Shuang¹, WANG Weijie², ZHAO Weirui², HU Sheng², WANG Lei³, FAN Quanshui³, LÜ Changjiang⁴, HUANG Jun⁴, MEI Lehe^{1,2,5}

(1. College of Chemical and Biological Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China;

2. School of Biological and Chemical Engineering, NingboTech University, Ningbo 315100, China;

3. Zhejiang Jianbo Biotechnology Co., Ltd., Ningbo 315602, China; 4. School of Biological and Chemical Engineering, Zhejiang University of Science and Technology, Hangzhou 310023,

China; 5. Jinhua Advanced Research Institute, Jinhua 321019, China)

Abstract: To prepare high-purity horse-derived $F(ab')_2$ fragments of polyclonal antibodies against *Bungarus fasciatus* venoms, IgG was captured from hyperimmunized horse plasma with *Bungarus fasciatus* venoms as the raw material by Protein G affinity chromatography, and then the prepared IgG was enzymatically cleaved by pepsin into $F(ab')_2$ fragments, which were purified by affinity chromatography, gel filtration chromatography, and mixed-mode chromatography, respectively. The neutralizing activity of the prepared $F(ab')_2$ against *Bungarus fasciatus* venoms was determined by indirect ELISA. The results

收稿日期: 2024-07-31 网络出版日期: 2024-09-30

基金项目: 宁波市“科技创新 2025”重大专项(2021Z078);国家自然科学基金项目(31971372, 32371542)

作者简介: 李爽(1999—),男,安徽宿州人,硕士研究生,主要从事抗体纯化方面的研究。

通信作者: 梅乐和, E-mail: meilh@zju.edu.cn

showed that IgG captured by Protein G affinity chromatography attained a purity of 83.6%, which was significantly higher than that of the traditional salting-out method. Among the three chromatographic refinement methods we tested, gel filtration chromatography refined F(ab')₂ had the highest purity of 89.3%, which was much higher than the standard of *Pharmacopoeia of the People's of Republic of China* (more than 60%), and the recovery was 56.0%. The titer of the F(ab')₂ was higher than 1:4096 by indirect ELISA. The study provides reference for the industrialized preparation of horse-derived antitoxin polyclonal antibody F(ab')₂.

Key words: *Bungarus fasciatus*; polyclonal antibody; pepsin; F(ab')₂ fragments; chromatographic purification

0 引 言

金环蛇(*Bungarus fasciatus*)属眼镜蛇科环蛇属,是以神经毒素为主、兼有心脏毒素的剧毒蛇类,主要分布在中国南部地区,常于清晨或夜间出没于山沟或草丛中,严重威胁居民和野外作业人员的安全^[1]。抗蛇毒血清是治疗蛇毒咬伤的特效药,但目前中国尚无商业化的抗金环蛇毒血清,临床上使用抗银环蛇毒血清来治疗金环蛇咬伤^[2]。该法起到了一定的治疗效果,但相比金环蛇毒本身免疫制备的抗血清,异种蛇毒免疫制备的抗血清对金环蛇毒的中和效价低。此外,采用该法后,注入人体的抗血清蛋白总量也随之升高,易导致体内发生血清不良反应,给金环蛇咬伤患者的有效救治带来极大隐患。

由于蛇毒成分复杂,目前蛇毒抗血清只能通过免疫马后,从马血浆中获取多克隆抗体进行制备。为了有效降低动物源抗体 IgG 导致的人体过敏反应,通常利用胃蛋白酶将 IgG 酶解成 F(ab')₂ 片段,从而去除导致人体补体反应的 pFc' 片段^[3]。目前,全球大多数蛇毒抗血清都为此类 F(ab')₂ 产品。在《中华人民共和国药典》(2020 版第 3 部,以下简称《中国药典》)中,人用马源蛇毒抗血清均通过加温、硫酸铵盐析与明矾吸附等步骤纯化。该纯化方法与层析纯化技术相比更粗糙,且质量不易控制,因而中国生产的抗血清成品中有效抗体 F(ab')₂ 纯度不高,导致中国现有抗蛇毒血清疗效欠佳、过敏反应率高等问题。《中国药典》中,纯度是评价 F(ab')₂ 质量的最关键指标,要求 60% 即为合格,远低于世界卫生组织(World health organization, WHO) 90% 以上的质量指标要求^[4]。因此,改进蛇毒抗体 F(ab')₂ 生产方式,开发高纯度的金环蛇毒抗体制备工艺,对于中国金环蛇咬伤的有效和安全救治至关重要^[5]。

随着层析技术理论和应用的不断发展,亲和层

析、离子交换层析、疏水层析、凝胶过滤层析和混合模式层析等技术被广泛应用于各种抗体相关产品的纯化和制备,展现了良好的效果和应用潜力^[6-10]。本文采用 Protein G 亲和层析捕获马血浆中的 IgG;通过优化胃蛋白酶酶解 IgG 的条件制备 F(ab')₂;并分别通过亲和层析、凝胶过滤层析和混合模式层析对酶解液中的 F(ab')₂ 组分进行精制纯化;以间接 ELISA 法测定制备的 F(ab')₂ 的效价,为制备高纯度和高品质的抗金环蛇毒 F(ab')₂ 抗体奠定理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

金环蛇毒和金环蛇毒免疫马血浆(由金环蛇毒免疫马匹并制备的高免马抗血浆,以下简称马血浆)购自浙江健博生物科技股份有限公司,胃蛋白酶(1:15000)、硫酸铵和正辛酸购自上海麦克林生化科技股份有限公司,Bradford 蛋白含量检测试剂盒、Protein A Sefinose™ 填料、Protein L Resin 4FF 填料、Protein G Sefinose™ 填料、脱脂奶粉和 TMB 荧光底物购自生工生物工程(上海)股份有限公司,Superdex 200 prep grade 填料和 Capto adhere 填料购自美国 GE Healthcare 公司,辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗马 IgG 购自北京索莱宝科技有限公司,其他试剂均为市售分析纯。

1.2 方 法

1.2.1 马血浆 IgG 的提取

1.2.1.1 马血浆预处理

室温下,取 10 mL 马血浆,4 ℃、7000 r/min 离心 20 min,取上清备用。

1.2.1.2 Protein G 亲和层析法

用 20 mmol/L pH 值 7.2 的 PBS 缓冲液平衡 Protein G Sefinose™ 柱后上样,持续用 PBS 缓冲液清洗柱子;洗脱液为 1.0 mol/L pH 值 2.7 的 Gly-HCl 缓冲液,收集洗脱液并加入 1.0 mol/L pH 值

8.5的 Tris-HCl 缓冲液中中和,洗脱液经 50 kD MWCO 超滤管浓缩置换至 PBS 缓冲液中。

1.2.1.3 饱和硫酸铵法

马血浆用 20 mmol/L pH 值 7.2 的 PBS 缓冲液 2 倍稀释,逐滴加入等体积的饱和硫酸铵溶液,使稀释血浆的硫酸铵饱和度达到 50%,充分混匀并静置 2 h 后,4 °C、7000 r/min 离心 20 min,弃上清;加入 PBS 缓冲液溶解沉淀,逐滴加入沉淀溶解液 1/2 体积的饱和硫酸铵溶液,使溶解液的硫酸铵饱和度达到 33%,充分混匀并静置 2 h 后,4 °C、7000 r/min 离心 20 min,弃上清;用 PBS 缓冲液溶解沉淀,得到马 IgG 溶液。

1.2.1.4 正辛酸-硫酸铵法

马血浆用 0.10 mol/L pH 值 4.8 的醋酸盐缓冲液 2 倍稀释,并逐滴加入正辛酸(体积百分数为 1.65%),充分混匀 40 min,4 °C、7000 r/min 离心 20 min,弃去沉淀;上清加入 10% 上清体积的 20 mmol/L pH 值 7.2 的 PBS 缓冲液,用 0.01 mol/L NaOH 溶液调节 pH 值至 7.2,逐滴加入等体积饱和硫酸铵溶液,充分混匀并静置 2 h 后,4 °C、7000 r/min 离心 20 min,弃上清;用 PBS 缓冲液溶解沉淀,得到马 IgG 溶液。

1.2.2 IgG 酶解条件优化

室温下,向胃蛋白酶中加入 30 mmol/L 醋酸钠溶液(pH 值 3.0),配制成酶活浓度为 6 IU/mL 的酶液;将酶液对 Protein G 捕获的 IgG(质量浓度为 0.5 mg/mL),在温度 17~42 °C、pH 值 2.0~5.0、加酶量 0.6~6.0 IU/mg IgG 和酶解反应时间 0.5~4.0 h 的条件下,优化酶解反应来制备 F(ab')₂;酶解结束加入 1.0 mol/L NaOH 调节反应液 pH 值,至中性后终止反应;酶解产物用 8% 的非还原 SDS-PAGE 电泳鉴定。

1.2.3 酶解后 F(ab')₂ 的纯化

经胃蛋白酶酶解后,获得的产物中含有大量的小分子碎片杂质,通过 3 种层析技术清除碎片杂质,以获得纯度较高的 F(ab')₂ 产品。

a) 亲和层析法。酶解液经过 10 kD MWCO 超滤管浓缩置换到 10 mmol/L pH 值 7.2 的 PBS 缓冲液中;用同种缓冲液分别平衡 Protein A SefinoseTM 柱、Protein L Resin 4FF 柱和 Protein G SefinoseTM 柱;洗脱液均为 0.10 mol/L pH 值 2.7 的 Gly-HCl 缓冲液;洗脱峰加入 1.0 mol/L pH 值 8.5 的 Tris-HCl 缓冲液中中和,收集各组分峰用 10% 的非还原 SDS-PAGE 电泳鉴定。

b) 凝胶过滤层析法。酶解液经过 10 kD MWCO 超滤管浓缩置换到 10 mmol/L pH 值 7.2 的 PBS 缓冲液中,用同种缓冲液平衡 Superdex 200 prep grade 柱;持续用同种缓冲液冲洗层析柱,收集各组分峰用 10% 的非还原 SDS-PAGE 电泳鉴定,根据鉴定结果优化柱高和流速。

c) 混合模式层析法。酶解液经过 10 kD MWCO 超滤管浓缩置换到 20 mmol/L pH 值 9.0 的 Tris-HCl 缓冲液中;用同种缓冲液平衡 Capto adhere 层析柱;洗脱缓冲液为含 1.0 mol/L NaCl 的 20 mmol/L pH 值 9.0 的 Tris-HCl 缓冲液,流速为 0.5 mL/min,用 30 个柱体积的梯度洗脱(洗脱缓冲液体积百分数变化为 0~100%),收集各组分峰用 10% 的非还原 SDS-PAGE 电泳鉴定。

1.2.4 间接 ELISA 法的建立

参考李欣昱等^[11]的方法。以 3 个包被质量浓度(2、4 μg/mL 和 8 μg/mL)的金环蛇毒包被酶标板,每孔加入 100 μL 包被液(0.10 mol/L pH 值 9.5 的碳酸盐缓冲液),4 °C 过夜,150 μL PBST 缓冲液(20 mmol/L pH 值 7.2 的 PBS 缓冲液,0.05% Tween-20)洗板 3 次;每孔加入 150 μL 封闭液(20 mmol/L pH 值 7.2 的 PBS 缓冲液,0.05% Tween-20,2% 脱脂奶粉),37 °C 孵育 1.0、1.5 h 和 2.0 h, PBST 缓冲液洗板 3 次;每孔分别加入 100 μL 1:16~1:8192 倍比稀释的自制 F(ab')₂ 抗体,37 °C 孵育 1.5 h, PBST 缓冲液洗板 3 次;每孔加入 100 μL 的 3 个稀释度的羊抗马 IgG-HRP(1:500、1:1000、1:2000),37 °C 孵育 1.5 h, PBST 缓冲液洗板 3 次;每孔加入 100 μL TMB 显色液,黑暗中反应 20 min,再加入 50 μL 2.5 mol/L 硫酸溶液终止反应,测定 OD_{450 nm} 值。试验孔/对照孔 OD 值 ≥ 2 作为阳性,反之为阴性,根据检测结果确定最佳间接 ELISA 法实验条件。

1.2.5 F(ab')₂ 纯度检测及收率计算

用质量分数 10% 的非还原 SDS-PAGE 凝胶电泳分析(上样量 10 μL,电压 110 V,电泳 55 min)结合 Quantity One 软件测定纯度,Bradford 法测量蛋白质量浓度,并计算收率。

2 结果与讨论

2.1 马血浆 IgG 的提取

传统从血浆中提取 IgG 的方法有饱和硫酸铵沉淀法和正辛酸—硫酸铵沉淀法,但这些方法存在提取的产品纯度低、蛋白质聚集和盐析时间长等缺

点^[12-13]。基于免疫球蛋白结合蛋白为配基的亲合层析抗体纯化技术具有产品纯度高和活性好等优点,因此本文选择 Protein G 亲和层析来替代传统的饱和硫酸铵沉淀法和正辛酸—硫酸铵沉淀法从马血浆中提取 IgG。Protein G 亲和层析提取马血浆 IgG 的非还原性电泳图如图 1 所示。图 1 显示:Protein G 亲和层析法提取的样品在相对分子质量 150~180 kD 处有明显 IgG 条带,且样品杂蛋白相对较少,IgG 纯度为 83.6%;饱和硫酸铵沉淀法提取的样品中 180 kD 以上和 135 kD 以下都有较多的杂蛋白条带,IgG 纯度为 72.7%;正辛酸-硫酸铵沉淀法提取的样品中,120 kD 左右处的杂蛋白含量较高,同时位于 63~100 kD 处杂蛋白条带也较为清晰,IgG 纯度为 65.2%;Protein G 亲和层析法提取 IgG 具有更高的纯度,较传统盐析法能更为有效地去除来自马血浆中的杂质。

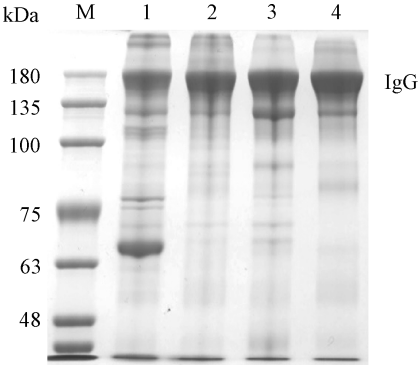


图 1 Protein G 亲和层析提取马血浆 IgG 的非还原性电泳图

注:M 为蛋白质 marker;1 为马血浆上样;2 为饱和硫酸铵法;
3 为正辛酸-硫酸铵法;4 为 Protein G 亲和层析法。

2.2 IgG 酶解条件优化

本文用胃蛋白酶对 Protein G 亲和层析法捕获的 IgG 进行酶解来制备 F(ab')₂。为提高该方法的制备效率,从酶解温度、酶解 pH 值、加酶量和酶解时间对酶解条件进行优化,结果如图 2 所示。从图 2(a)中可以看出:温度对酶的活性影响较大。随着温度的升高,IgG 条带逐渐消失,其含量逐渐减少;同时 F(ab')₂ 含量(135 kD 左右)逐步上升;37 ℃以上时 IgG 被完全酶解。图 2(b)表明:酶解 pH 值对酶解效果也有重要影响。当 pH 值为 2.0、2.5 时,由于体系酸性过强导致 IgG 降解,使得 IgG 和 F(ab')₂ 含量都很低;pH 值在 3.0 时,F(ab')₂ 的产量明显升高;当 pH 值升高到 3.5 以上,胃蛋白酶活性下降,F(ab')₂ 的产率显著降低。图 2(c)显示:当酶加入量超过 3.0 IU/mg IgG 后,继续增加酶量不仅对酶解效果没有显著影响,还会造成酶的浪费。

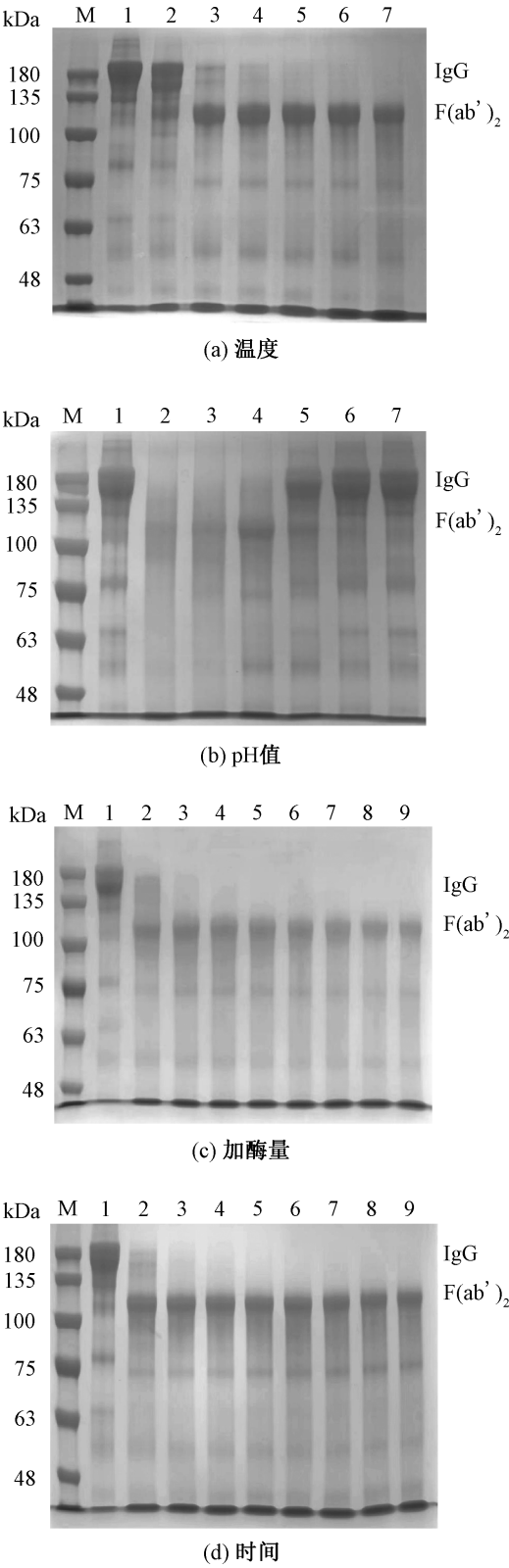


图 2 胃蛋白酶酶解 IgG 条件优化的非还原性电泳图

注:图 2(a)中,M 为蛋白质 marker;1 为 IgG 上样;2—7 为 pH 值 3.0、加酶量 3.0 IU/mg IgG 和酶解 2.5 h 条件下的温度,依次为 17、22、27、32、37 ℃和 42 ℃;图 2(b)中,M 为蛋白质 marker;1 为 IgG 上样;2—7 为 37 ℃、加酶量 3.0 IU/mg IgG 和酶解 2.5 h 条件下的 pH 值,依次为 2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、5.0;图 2(c)中,M 为蛋白质 marker;1 为 IgG 上样;2—9 为 37 ℃、pH 值 3.0 和酶解 2.5 h 条件下每毫克 IgG 的加酶量,依次为 0.6、1.2、1.8、2.4、3.0、3.6、4.8 IU/mg 和 6.0 IU/mg;图 2(d)中,M 为蛋白质 marker;1 为 IgG 上样;2—9 为 37 ℃、pH 值 3.0 和加酶量 3.0 IU/mg IgG 条件下的酶解时间,依次为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5 h 和 4.0 h。

由图 2(d)可知,在 37 °C、pH 值 3.0 和酶加入量为 3.0 IU/mg IgG 的条件下,2.5 h 后 IgG 被完全酶解转化为 $F(ab')_2$ 片段。图 2 还显示:在 60 kD 左右都出现了较为明显的蛋白条带,血清中某些 IgG 亚类在酶解后会产生单价 Fab 片段^[14],因此,推测 60 kD 的蛋白条带为 Fab 片段。

2.3 酶解后 $F(ab')_2$ 的纯化

对 $F(ab')_2$ 片段进行有效精制也是制备高纯度 $F(ab')_2$ 蛇毒抗体的关键步骤,本文分别采用亲和层析、凝胶过滤层析和混合模式层析 3 种柱层析模式对酶解后的 $F(ab')_2$ 进行精制纯化。

2.3.1 亲和层析法

Protein A 层析介质可以有效吸附抗体的 pFc' 片段,理论上可以通过流穿模式去除 pFc' 片段,实现对酶解液中 $F(ab')_2$ 的纯化。结果如图 3 所示,酶解液经 Protein A 层析介质后基本全部流穿,说明 Protein A 没有与 pFc' 片段结合,最终导致纯化失败,这可能是因为与 Protein A 结合的 pFc' 片段被降解,导致碎片化的 pFc' 片段无法被 Protein A 有效吸附。Protein L 层析介质可以和一些哺乳动物 $F(ab')_2$ 上的 kappa 轻链特异性结合,因此理论上可以通过结合/洗脱模式对酶解液中的 $F(ab')_2$ 组分进行纯化,而 $F(ab')_2$ 组分并不能与 Protein L 层析介质有效结合,且与其他的片段杂质一起存在于流穿液中(见图 3),这可能是因为马血浆中含 kappa 轻链的 IgG 占比较小^[15-16],由其酶解获得的 $F(ab')_2$ 无法与 Protein L 介质有效结合。

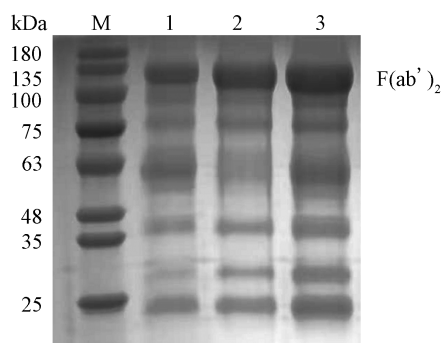


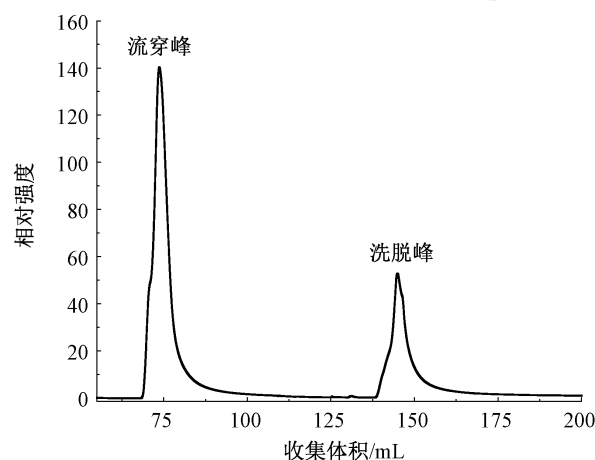
图 3 Protein A Sefinose™、Protein L Resin 4FF 层析分离结果的非还原性电泳图

注:M 为蛋白质 marker;1 为酶解液上样;

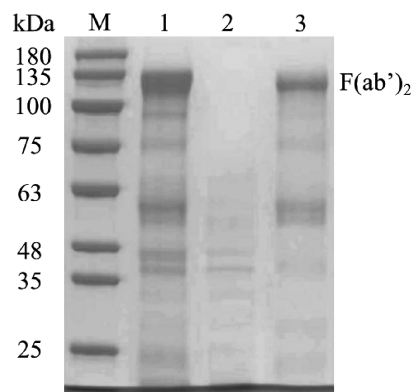
2 为 Protein A 流穿液;3 为 Protein L 流穿液。

Protein G 层析介质可以同时结合抗体中 $F(ab')_2$ 和 pFc' 片段,由 Protein A 层析结果表明,pFc' 片段已被降解,因此可能会失去与 Protein G 的结合能力。通过结合/洗脱模式对 $F(ab')_2$ 进行纯化,结果见图 4。图 4 显示:层析中出现了明显的流穿峰和洗脱峰,这说明 Protein G 确实可以去除

一部分杂蛋白,使得 $F(ab')_2$ 片段得以纯化,纯度为 55.4%(见表 1);洗脱峰除了有 60 kD 的蛋白条带(Fab 片段),仍然有一些小分子杂蛋白,推测这些小分子杂蛋白为 pFc' 片段碎片,它们仍可被 Protein G 柱吸附,最终影响洗脱产品中 $F(ab')_2$ 纯度。



(a) Protein G Sefinose™ 层析分离谱图($A_{280\text{nm}}$)



(b) Protein G Sefinose™ 层析分离结果的非还原性电泳图

图 4 Protein G Sefinose™ 亲和层析

注:图 4(b)中,M 为蛋白质 marker;1 为酶解液上样;

2 为流穿液;3 为洗脱液。

2.3.2 凝胶过滤层析法

由于酶解液中 $F(ab')_2$ 与杂质蛋白分子量差异较大,且 $F(ab')_2$ 为 120 kD, Fab 为 60 kD,其他小分子杂质为 10 kD,因此考虑使用 Superdex 200 prep grade 凝胶过滤层析柱对其进行纯化。本文通过降低流速(流速 0.1 mL/min)和延长柱长(总高 90 cm)的方式成功提高了分辨率,结果见图 5 所示。图 5 表明:峰 1 和峰 2 能有效分离,在虚线处对峰 1 和峰 2 进行切峰,峰 1 组分中基本不含杂质条带,120 kD 处的 $F(ab')_2$ 含量较高(纯度为 89.3%);同时峰 2 组分中含有约 60 kD 左右的 Fab 条带。

2.3.3 混合模式层析法

Capto adhere 混合模式层析填料能与 IgG 产生疏水作用、静电作用和氢键作用等,在抗体相关产品纯化过程中具有良好的应用价值。Karkov 等^[17]发现, Capto adhere 介质更偏向于结合 IgG 中 Fab 片段的互

补决定区,因此本文采用 Capto adhere 介质来对 F(ab')₂ 进行纯化,结果如图 6 所示。由图 6 可知:在梯度洗脱过程中,紫外检测结果出现多峰分布,每个峰部中均含有 F(ab')₂ 和较多的杂蛋白条带。这可能是因为来自不同 IgG 的 F(ab')₂ 的等电点和疏水能力存在差异^[18]。因此,层析图中出现了多个含 F(ab')₂ 成分的峰部,说明其无法被 Capto adhere 柱有效纯化。

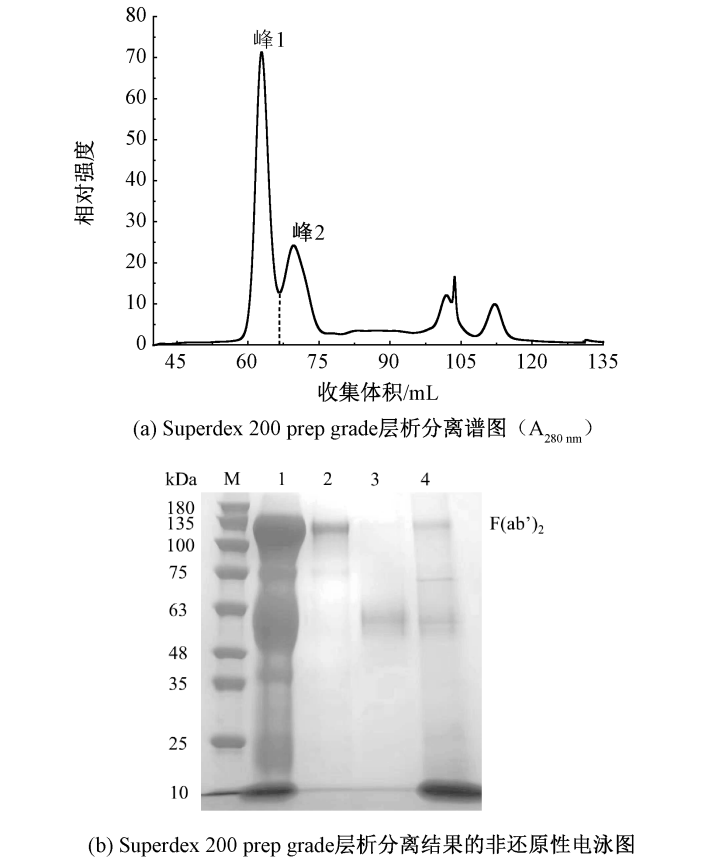


图 5 Superdex 200 prep grade 凝胶过滤层析

注:图 5(b)中,M 为蛋白质 marker;1 为酶解液上样;2 为峰 1 组分;3 为峰 2 组分;4 为杂质峰合并。

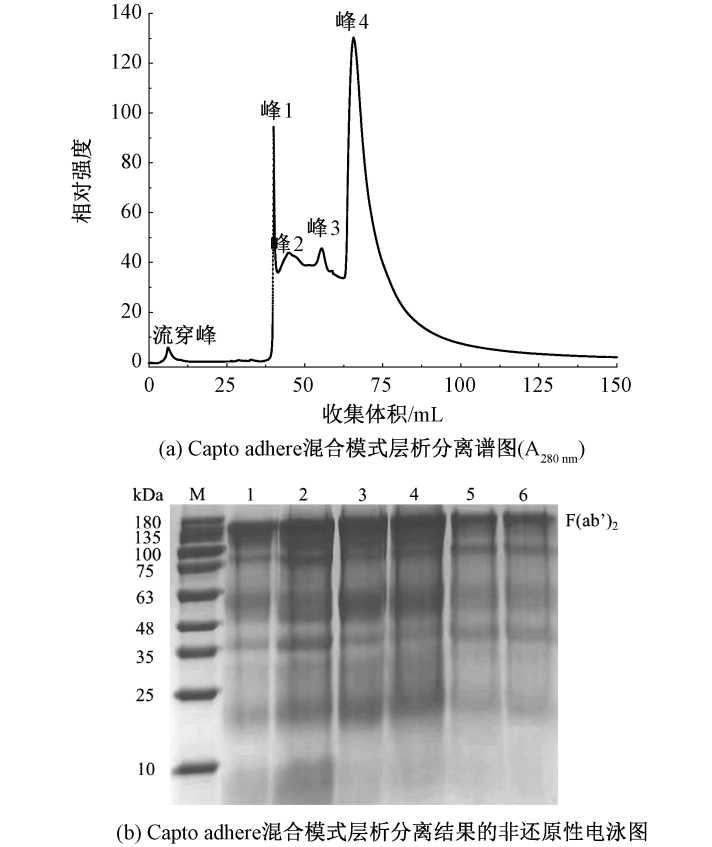


图 6 Capto adhere 混合模式层析

注:图 6(b)中,M 为蛋白质 marker;1 为酶解液上样;2 为流穿峰;3—6 为洗脱峰。

通过 Protein G 亲和层析和凝胶过滤层析的方式,可以实现对酶解液中的 F(ab')₂ 片段的相对纯化。Protein G 亲和层析的收率比凝胶过滤层析高,但其纯度较低(见表 1);凝胶过滤层析可使抗体 F(ab')₂ 纯度达 89.3%,远高于《中国药典》标准(60%以上)甚至接近世界卫生组织标准(90%以上)。因此,最终确定通过凝胶过滤层析精制 F(ab')₂ 的工艺。

表 1 不同层析柱纯化 F(ab') ₂ 的结果				
检测样品	蛋白质质量浓度/(mg·mL ⁻¹)	制备体积/mL	纯度/%	收率/%
马 IgG 酶解液	1.292	2.0	43.7	100.0
Protein G 柱制备的 F(ab') ₂	0.178	5.6	55.4	72.9
凝胶过滤柱制备的 F(ab') ₂	0.097	7.3	89.3	56.0

2.4 间接 ELISA 法测定抗体 F(ab')₂ 滴度

为了测定自制抗金环蛇毒多克隆抗体 F(ab')₂ 效价,对包被抗原质量浓度、封闭时间与酶标二抗稀释度进行优化。确定最优条件为包被抗原质量浓度 4 μg/mL,封闭时间 1.5 h,酶标二抗稀释度为 1:1000。用上述条件进行检测,结果见图 7 所示。图 7 表明:阴性马血清对照 OD_{450 nm} 值为 0.066;当抗体稀释到 1:4096 时,OD_{450 nm} 值为 0.125。因此自制抗金环蛇毒多克隆抗体 F(ab')₂ 效价高于 1:4096,表明成功地制备了高纯度的抗金环蛇毒多

克隆抗体 F(ab')₂。

3 结 论

为探究高纯度马源金环蛇蛇毒多克隆抗体 F(ab')₂ 的制备工艺,本文依据抗体 F(ab')₂ 的亲性和 IgG 酶解液中蛋白分子量的差异和 F(ab')₂ 的带电和疏水性质,分别采用了不同层析方式对 IgG 酶解液中的 F(ab')₂ 进行精制。建立了 Protein G 亲和层析捕获马血浆 IgG;胃蛋白酶酶解 IgG 制备 F(ab')₂ 片段;凝胶过滤层析精制 F(ab')₂ 的工艺路

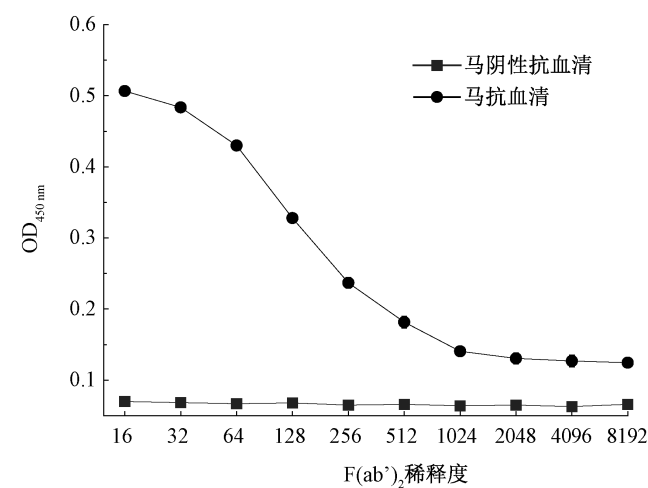


图 7 间接 ELISA 法测定 F(ab')₂ 产品效价

线,并得到以下主要结论:

a)相比饱和硫酸铵法和正辛酸-硫酸铵法, Protein G 亲和层析法捕获的马 IgG 的纯度最高,为 83.6%。

b)胃蛋白酶酶解马 IgG 的最优酶解条件为:温度 37℃、pH 值 3.0 和酶加入量为 3.0 IU/mg IgG,该条件下 2.5 h 后 IgG 基本完全转化为 F(ab')₂ 片段。

c)凝胶过滤层析精制 F(ab')₂ 获得的纯度最高,为 89.3%,收率为 56.0%;间接 ELISA 法测定制备的 F(ab')₂ 效价高于 1:4096,具有良好的中和活性。

本文成功制备了高纯度的马源金环蛇蛇毒多克隆抗体 F(ab')₂,为工业化制备人用抗毒素免疫球蛋白 F(ab')₂ 奠定了研究基础。

参考文献:

[1] 蓝海,陈远聪. 中国毒蛇及蛇伤救治[M]. 上海:上海科学技术出版社,2008: 85-86.

[2] 中国蛇伤救治专家共识专家组. 2018 年中国蛇伤救治专家共识[J]. 蛇志, 2018, 30(4): 561-567.

[3] Cocchio C, Johnson J, Clifton S. Review of North American pit viper antivenoms [J]. American Journal of Health-System Pharmacy, 2020, 77(3): 175-187.

[4] Chippaux J P. Guidelines for the production, control and

regulation of snake antivenom immunoglobulins[J]. Biologie Aujourd'hui, 2010, 204(1): 87-91.

[5] 郑颖,余方芳,范泉水,等. 抗金环蛇毒血清生产工艺的研究[J]. 蛇志, 2007, 19(3): 180-183.

[6] Chen S W, Zhang W. Current trends and challenges in the downstream purification of bispecific antibodies[J]. Antibody Therapeutics, 2021, 4(2): 73-88.

[7] Matsuda Y. Current approaches for the purification of antibody-drug conjugates[J]. Journal of Separation Science, 2022, 45(1): 27-37.

[8] Li Y F. Immunoglobulin-binding protein-based affinity chromatography in bispecific antibody purification: functions beyond product capture [J]. Protein Expression and Purification, 2021, 188: 105976.

[9] 刘家玮,唐长伟,夏一然,等. 色谱技术在抗体分离纯化中的应用进展[J]. 色谱, 2024, 42(6): 533-543.

[10] Tang S, Tao J L Li Y. Challenges and solutions for the downstream purification of therapeutic proteins[J]. Antibody Therapeutics, 2023, 7(1): 1-12.

[11] 李欣昱,谭凌云,孙千姿,等. 新型布尼亚病毒抗体间接 ELISA 检测方法的建立[J]. 免疫学杂志, 2023, 39(6): 539-545.

[12] Rojas G, Jiménez J M, Gutiérrez J M. Caprylic acid fractionation of hyperimmune horse plasma: description of a simple procedure for antivenom production[J]. Toxicon, 1994, 32(3): 351-363.

[13] Rathore A S, Kumar R, Tiwari O S. Recent advancements in snake antivenom production[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 240: 124478.

[14] 邱泊宁,王翀,赵永坤,等. 层析技术制备马抗中东呼吸综合征冠状病毒 F(ab')₂[J]. 中国生物制品学杂志, 2017, 30(4): 417-423, 428.

[15] Rodrigo G, Gruvegård M, Van Alstine J. Antibody fragments and their purification by protein L affinity chromatography[J]. Antibodies, 2015, 4(3): 259-277.

[16] Janeway C, Travers P, Walport M, et al. Immunobiology[M]. 5th ed. New York: Garland Science, 2001: 126-135.

[17] Karkov H S, Woo J, Krogh B O, et al. Evaluation of selectivity in homologous multimodal chromatographic systems using in silico designed antibody fragment libraries[J]. Journal of Chromatography A, 2015, 1426: 102-109.

[18] 梁凌宇,包正琦,段丽娟,等. 层析法纯化马破伤风免疫球蛋白 F(ab')₂ 的质量研究[J]. 微生物学免疫学进展, 2023, 51(1): 31-35.

(责任编辑:张会巍)