DOI:10.12441/spyswjs.20221220004 [文章编号] 1673-1689(2025)05-0137-09

高性能金黄色葡萄球菌蛋白A亲和层析介质的制备、性能与应用

郭子豪 闫朝清 夏海锋*

(江南大学粮食发酵与食品生物制造国家工程研究中心,江苏 无锡 214122)

摘要:【目的】金黄色葡萄球菌蛋白A(*Staphylococcus aureus* protein A,SPA)对免疫球蛋白G(immunoglobulin G,IgG)具有高度的特异性,已广泛应用于单克隆抗体的纯化。然而,商品介质价格高昂,限制了其进一步发展。为解决此问题,该研究试图获得高性能的国产SPA亲和层析介质,以替代进口层析介质。**【方法】**对重组菌诱导表达获得的SPA,经Ni^{2+}纯化后偶联至Rigose HF基质,以获得自制亲和层析介质。**【结果】**自制亲和层析介质静态饱和吸附量为115.5 mg/mL(以介质体积计),动态吸附量为58.6 mg/mL(以介质体积计);利用自制亲和层析介质分离纯化单克隆抗体样品,纯度在95%以上,回收率不低于90%,耐碱性、重复使用性能以及纯化单克隆抗体样品的效果等同或优于商品介质。**【结论】**该研究成功构建了SPA重组菌,通过优化偶联反应条件,确定了自制亲和层析介质的最佳制备条件,具有一定的研究意义和商业应用价值。

关键词:抗体;抗体纯化;金黄色葡萄球菌蛋白A;亲和层析介质;介质性能

Preparation, Performance, and Application of a High-performance Affinity Chromatography Medium Based on *Staphylococcus aureus* Protein A

*GUO Zihao YAN Chaoqing XIA Haifeng**

(National Engineering Research Center of Cereal Fermentation and Food Biomanufacturing, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: [**Objective**] *Staphylococcus aureus* protein A (SPA) is widely used for the purification of monoclonal antibodies due to its high specificity for immunoglobulin G (IgG). However, the high costs of commercial media have limited the further development of SPA. To address this issue, this paper aims to prepare a high-performance affinity chromatography medium based on SPA as the substitute of introduced affinity chromatography media. [**Method**] SPA expressed by the recombinant strain was purified *via* Ni^{2+} affinity chromatography and then coupled to the Rigose HF matrix to prepare an self-prepared affinity chromatography medium. [**Result**] The self-prepared medium had a static saturated adsorption capacity of 115.5 mg/mL (based on the volume of the medium) and a dynamic adsorption capacity of 58.6 mg/mL (based on the volume of the medium). When being used for the separation and purification of monoclonal antibody samples, the self-prepared affinity chromatography medium achieved the purity of over 95%, with a recovery rate of no less than 90%. The medium demonstrated comparable or superior alkali tolerance, reusability, and purification performance for monoclonal antibody samples to commercial media. [**Conclusion**] A recombinant strain expressing SPA is successfully constructed, and the optimal preparation conditions of the self-prepared affinity chromatography medium are determined by optimization of the coupling conditions. The self-prepared affinity chromatography medium demonstrates

通信作者:夏海锋(1979—),男,博士,副教授,硕士研究生导师,主要从事发酵工程、生化工程、生物分离工程以及学科交叉研究。E-mail:hfxia@jiangnan.edu.cn

收稿日期:2022-12-20 **修回日期:**2023-03-16

research significance and commercial application value to a certain extent.

Keywords: antibodies; antibody purification; *Staphylococcus aureus* protein A; affinity chromatography media; medium performance

单克隆抗体因其卓越的性能而受到人们的关注，并广泛应用于酶联免疫吸附试验、放射免疫分析等医学诊断技术中。利用单克隆抗体的导向作用，可直接杀伤靶细胞，因此可用于肿瘤的导向治疗[1]。随着上游技术的进步，单克隆抗体的产量已经得到了大幅提升，下游加工环节已成为限制单克隆抗体制造的一个重要“瓶颈”。在单克隆抗体下游加工中，层析分离占总处理时间的64.1%，占总成本的50%~80%[2-3]。目前，国内在单克隆抗体纯化介质领域的发展仍落后于国外，导致纯化成本居高不下。因此，开发1种高效的单克隆抗体纯化介质，以降低单克隆抗体纯化成本，是当前亟待解决的问题。

采用亲和层析法处理大量上游细胞培养收获物是单克隆抗体生产中的首选方法。由于其对单克隆抗体的高选择性，一步纯化后抗体的纯度超过90%[4]，SPA亲和层析在保持高回收率的同时，还能有效去除宿主细胞蛋白质（host cell protein，HCP）、病毒和DNA等杂质[5]。

SPA是金黄色葡萄球菌中存在的1种细胞表面蛋白质，相对分子质量为42 000[6]，具有与免疫球蛋白特异性结合的能力。因此，以SPA作为亲和配基制备亲和层析介质，可用于单克隆抗体的纯化。SPA由5个高度同源的免疫球蛋白结合结构域（A、B、C、D、E）和1个末端出现的IgG非结合结构域X组成，5个结合结构域在野生型SPA中以E—D—A—B—C顺序排列，分别含51、61、58、58、58个氨基酸[7]。

由于纯化完成后需使用NaOH溶液对亲和层析介质进行就地清洗（clean in place，CIP），而天然SPA耐碱性较弱，需要对其进行耐碱性改造；5个结合结构域中由于B结构域相对稳定，且与抗体的结合能力较强，因此对SPA的耐碱性改造多选择在B结构域进行。研究发现，通过使用其他氨基酸取代天冬酰胺残基，可以显著提升蛋白质结构域在碱性条件下的化学稳定性[8]；28、29位点上Asn-Gly序列对碱性条件最为敏感，G29A突变点可以有效增强蛋白质的耐碱性[9]；目标序列C端添加1个半胱氨酸残基，可提高其与抗体的结合能力，从而提高介质的载量。

抗体产品中可能存在未除尽或在纯化过程中引入的SPA、HCP等杂质，而这些杂质可能会对人体健康造成危害，严重时会危及生命。因此，各国监管部门都出台了相关法规对抗体产品中有害物质的残留量作出了规定。例如《中华人民共和国药典》（2015版）[10]中关于尼妥珠单克隆抗体的规定指出，外源DNA残留量标准为100 pg/剂，HCP残留量（质量分数）及SPA残留量（质量分数）不高于0.01%（100 ng/mg）[11]。因此，作者在自制亲和层析介质应用中测定了抗体样品经过亲和层析、阴离子交换层析、阳离子交换层析后的有害物质残留量。这一指标可以评估自制亲和层析介质的纯化性能，同时也有助于减轻后续纯化的压力。

作者通过基因工程的方法获得SPA重组菌，尝试利用其诱导表达获得的SPA制备亲和层析介质，测试比较其性能并进行了应用，具有一定的研究意义和应用价值。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

E. coli BL21（DE3）菌株：作者所在课题组保藏；硫酸卡那霉素：上海麦克林生化科技有限公司；异丙基硫代-*D*-半乳糖苷（IPTG）：上海阿拉丁生化科技股份有限公司；Ni-NTA介质、Rigose HF基质：东富龙千纯生物科技（上海）有限公司；SPA亲和层析介质MabSelect SuRe LX（商品介质）、阴离子交换层析介质Capto Q、阳离子交换层析介质Capto S ImpAct：美国GE Healthcare公司；人免疫球蛋白IgG：哈尔滨派斯菲科生物制药有限公司；外源DNA检测试剂盒：德国Sigma-Aldrich公司；SPA检测试剂盒、内毒素检测试剂盒：武汉艾迪抗生物科技有限公司；残留HCP检测试剂盒：上海优选生物科技有限公司；BCA（bicinchoninic acid assay）蛋白质质量浓度测定试剂盒：上海碧云天生物技术股份有限公司；其余试剂均为国产分析纯。

1.2 重组蛋白质的设计

对SPA的B结构域中4个氨基酸残基进行了

替换（N23T、N3A、N6D、G29A），并在目标序列C端添加了1个半胱氨酸残基，尝试提高介质耐碱性及载量；添加His标签便于蛋白质纯化。将设计好的序列交由通用生物系统（安徽）有限公司合成。

1.3 重组蛋白质的表达与纯化

测序正确的重组菌经活化后诱导表达获得SPA，采用Ni-NTA介质进行纯化，纯化步骤参照介质使用说明书，纯化后的蛋白质除盐后低温保存。

1.4 亲和层析介质的制备

以Rigose HF为基质，环氧活化后进行SPA的偶联。对SPA质量浓度、反应时间、反应温度和反应pH进行条件优化，具体如下：

1）分别称取1.0 g抽干的Rigose HF基质于5个25 mL三角烧瓶中，加入1 mL质量浓度分别为10.0、12.5、15.0、17.5、20.0 mg/mL的SPA溶液（pH 8.0），40 ℃恒温水浴振荡反应12 h，结束后使用纯水清洗干净，加入体积分数为20%的乙醇，于4 ℃保存。

2）分别称取1.0 g抽干的Rigose HF基质于4个25 mL三角烧瓶中，加入1 mL质量浓度为17.5 mg/mL的SPA溶液（pH 8.0），40 ℃恒温水浴振荡，分别反应4、8、12、16 h，结束后使用纯水清洗干净，加入体积分数为20%的乙醇，于4 ℃保存。

3）分别称取1.0 g抽干的Rigose HF基质于3个25 mL三角烧瓶中，加入1 mL质量浓度为17.5 mg/mL的SPA溶液（pH 8.0），分别于30、35、40 ℃恒温水浴振荡反应12 h，结束后使用纯水清洗干净，加入体积分数为20%的乙醇，于4 ℃保存。

4）分别称取1.0 g抽干的Rigose HF基质于3个25 mL三角烧瓶中，加入pH分别为8.0、9.0、10.0的1 mL质量浓度为17.5 mg/mL的SPA溶液，40 ℃恒温水浴振荡反应12 h，结束后使用纯水清洗干净，加入体积分数为20%的乙醇，于4 ℃保存。

1.5 自制亲和层析介质的性能测试

1.5.1 静态吸附性能测试

将自制亲和层析介质置于砂芯漏斗中，使用大量去离子水冲洗干净，置于20 mmol/L PBS缓冲液（pH 7.4）中浸泡15 min，然后将介质放在砂芯漏斗上充分抽干。准确称取1.0 g抽干介质置于25 mL具塞三角瓶中，共5瓶，使用缓冲液将IgG标准蛋白质溶液分别稀释为0.25、0.50、1.00、2.00、3.00 mg/mL，各取5 mL加入具塞三角瓶中，然后放入25 ℃、180 r/min摇床中振荡反应5 h。反应结束后，将具塞三角瓶静置10 min，吸取上清液测定IgG质量浓度。通过计算反应前后上清液中IgG质量浓度差可得介质的静态吸附量。利用Langmuir方程评估介质对IgG的吸附性能，根据式（1）计算介质的静态饱和吸附量Q_m和解离常数K_d[12]。

$$\rho^* = \frac{Q^* K_d}{Q_m - Q^*} \quad (1)$$

式中：

Q^*——介质的吸附量，mg/mL；

Q_m——介质的静态饱和吸附量，mg/mL；

K_d——解离常数，mg/mL；

ρ^*——平衡时体系中IgG质量浓度，mg/mL。

根据Q^*和ρ^*进行非线性曲线拟合，绘制静态吸附曲线，可得自制亲和层析介质的吸附参数Q_m和K_d，并与商品介质进行对比测试。

1.5.2 动态吸附性能测试

用1 mL自制亲和层析介质装填层析柱，用平衡缓冲液（20 mmol/L PBS缓冲液，pH 7.4）冲洗10个柱体积，再用平衡缓冲液将IgG稀释为1 mg/mL进行上样，流量0.15 mL/min。当流穿液中IgG质量浓度超过初始IgG质量浓度的10%时立即停止上样，此时的IgG质量浓度（$Q_{10\%}$）即为每毫升自制亲和层析介质吸附IgG的动态吸附量[13]，并将其与商品介质进行对比测试。

1.5.3 耐碱性测试

对自制亲和层析介质的耐碱性与商品介质进行对比测试。将在200 mmol/L NaOH溶液中分别浸泡0、24、48、72 h后的自制亲和层析介质填充于5 mL空柱管中，使用平衡缓冲液（含150 mmol/L NaCl的20 mmol/L PB缓冲液，pH 7.2）平衡15个柱体积，流量1 mL/min；用平衡缓冲液将IgG稀释至质量浓度为1 mg/mL进行上样，流量0.83 mL/min，上样至波长280 nm下紫外吸光度（A_{280}）大于40时，使用平衡缓冲液冲洗，收集流穿液；待基线稳定后使用洗脱缓冲液（100 mmol/L柠檬酸，pH 3.6）洗脱，收集洗脱液；用平衡缓冲液再平衡3个柱体积，200 mmol/L NaOH溶液冲洗约3个柱体积进行再

生，检测流穿液、洗脱液中IgG质量浓度，计算自制亲和层析介质载量变化，并将其与商品介质进行对比测试。

1.5.4 重复使用性能测试

将自制亲和层析介质装填层析柱，以平衡10个柱体积、上样5个柱体积、洗脱6个柱体积、平衡3个柱体积、100 mmol/L NaOH溶液再生15个柱体积、平衡6个柱体积为1个模拟，循环使用，分别在20、40、60、80、100个循环后测定介质对IgG的动态吸附量，计算自制亲和层析介质载量变化，并与商品介质进行对比测试。

1.6 自制亲和层析介质的初步纯化应用

1.6.1 亲和层析捕获目的蛋白质

以CHO细胞表达的PD-L1单克隆抗体为样品，以10 000 r/min、4 ℃离心10 min取上清液，0.45 μm滤膜过滤。将自制亲和层析介质填充于空柱管（直径0.8 cm、柱高10 cm、柱体积5 mL）中，用平衡缓冲液（含150 mmol/L NaCl的20 mmol/L PB缓冲液，pH 7.4）平衡10个柱体积，经前处理的抗体样品进行上样，上样量20 mg/mL，流量1 mL/min。上样结束后继续用平衡缓冲液冲洗，收集流穿液；待A_{280}基线稳定后，使用洗脱缓冲液（50 mmol/L NaAC溶液，pH 3.6）洗脱，收集洗脱液；收集完成后立即使用中和缓冲液（1 mol/L Tris-HCl溶液，pH 9.5）中和至中性。商品介质在相同条件下进行操作，收集流穿液、洗脱液。

1.6.2 离子交换层析精纯抗体

将Capto Q层析介质填充于5 mL空柱管中，将亲和层析洗脱液上样于平衡缓冲液（25 mmol/L PB缓冲液，pH 7.5）平衡好的色谱柱，流量1 mL/min，收集流穿液；再次平衡后使用洗脱缓冲液（200 mmol/L PB缓冲液，pH 8.0）洗脱。

将Capto S ImpAct层析介质填充于5 mL空柱管中，将阴离子交换流穿液上样于平衡缓冲液（50 mmol/L NaAC溶液，pH 5.5）平衡好的色谱柱，流量1 mL/min，收集流穿液；再次平衡后使用洗脱缓冲液（含350 mmol/L NaCl的50 mmol/L NaAC溶液，pH 5.5）洗脱，收集洗脱液。

将所得洗脱液、流穿液及样品原液进行SDS-PAGE分析，经染色、脱色后观察条带，并采用凝胶排阻色谱（SEC-HPLC）进行纯度检测，测量IgG质量浓度，计算回收率。

1.6.3 纯化后有害残留物检测

亲和层析过程中介质配基脱落的SPA以及纯化过程尚未除尽的HCP、内毒素均采用酶联免疫吸附法（ELISA）[14]检测。酶标板孔底有纯化的固相抗体涂层，可与样品中残留物特异性结合，经过洗涤除去未结合的抗原和其他物质，再与辣根过氧化物酶（horseradish peroxidase，HRP）标记的抗体结合，形成抗体抗原酶标抗体复合物，多次洗涤后加底物3，3’，5，5’-四甲基联苯胺（tetramethylbenzidine，TMB）显色。TMB在HRP的催化下转化成蓝色，并在酸的作用下转化成最终的黄色，颜色的深浅与样品中残留物含量呈正相关。用酶标仪测定450 nm处的光密度（OD_{450}），通过标准曲线即可得出样品中HCP、内毒素的残留量。

残留的外源DNA采用荧光法检测。荧光染料双苯甲亚胺H 33258主要与双链脱氧核糖核酸小凹槽中的AT序列结合，可用于定量纳克级的DNA，在DNA存在的情况下，激发波长为360 nm时，该染料在460 nm处的荧光发射会显著增强。使用荧光计检测荧光强度，利用标准品的荧光强度绘制标准曲线，计算得出外源DNA残留量。

2 结果与讨论

2.1 重组菌的设计构建结果

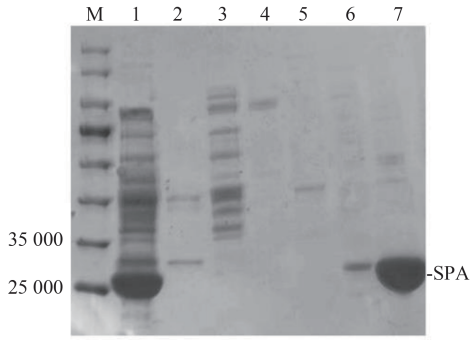
使用SnapGene软件分析测序结果，发现其与所设计的序列100%同源，表明重组菌构建成功。

2.2 重组蛋白质的表达与纯化结果

改造后的SPA理论相对分子质量为26 000，图1中泳道1显示在相对分子质量约25 000处有较粗条带，表明重组蛋白质可正确表达。IMAGIN LAB软件分析结果表明，泳道7蛋白质纯度高于90%，Ni-NTA介质纯化SPA的效果良好。

2.3 自制亲和层析介质偶联条件的优化结果

亲和层析介质是通过将亲和配基共价结合到基质上获得的，要将基质活化之后才能进行与配基的偶联，即采用化学手段将基质表面的化学基团变为活性基团[15]。图2（a）展示了基质活化的原理：在碱性环境下基质与环氧氯丙烷发生反应，基质表面接上环氧基。然后，借助环氧基与半胱氨酸携带的巯基共价结合，使SPA得以固定在基质上，偶联原理如图2（b）所示。



M—Marker；1—原液；2~6—洗杂液；7—洗脱液。

图1　Ni-NTA介质纯化SPA的SDS-PAGE结果

Fig. 1　SDS-PAGE results of SPA purified by Ni-NTA medium

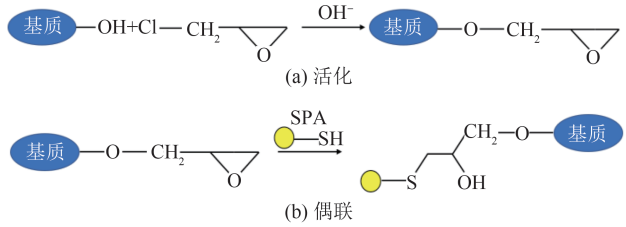


图2　基质活化和偶联示意图

Fig. 2　Schematic representation of substrate activation and coupling

制备亲和层析介质的过程中，配基的偶联是影响介质载量的关键因素[16]，偶联过程中环氧基与巯基的反应主要受反应体系的pH、温度、时间等因素的影响[17-18]。因此，从SPA质量浓度、反应时间、反应pH和反应温度4个方面，对偶联反应条件进行了优化，分别考察不同条件对自制亲和层析介质静态饱和吸附量的影响，从而确定最优偶联条件。

不同SPA质量浓度下自制亲和层析介质等温吸附曲线如图3(a)所示，SPA质量浓度对自制亲和层析介质静态吸附量的影响较大，但总体趋势相似；由表1可知，SPA质量浓度为17.5 mg/mL时，自制亲和层析介质的静态饱和吸附量最大，为89.95 mg/mL(以介质体积计)，因此选择17.5 mg/mL作为偶联反应SPA质量浓度。图3(b)为不同反应时间对自制亲和层析介质静态吸附量的影响，结合表1可以看出，随着反应时间的延长，自制亲和层析介质的静态饱和吸附量一直在增加，4~12 h时，介质的静态饱和吸附量增加幅度较大，而12~16 h增加幅度很小，因此反应时间选择12 h。从图

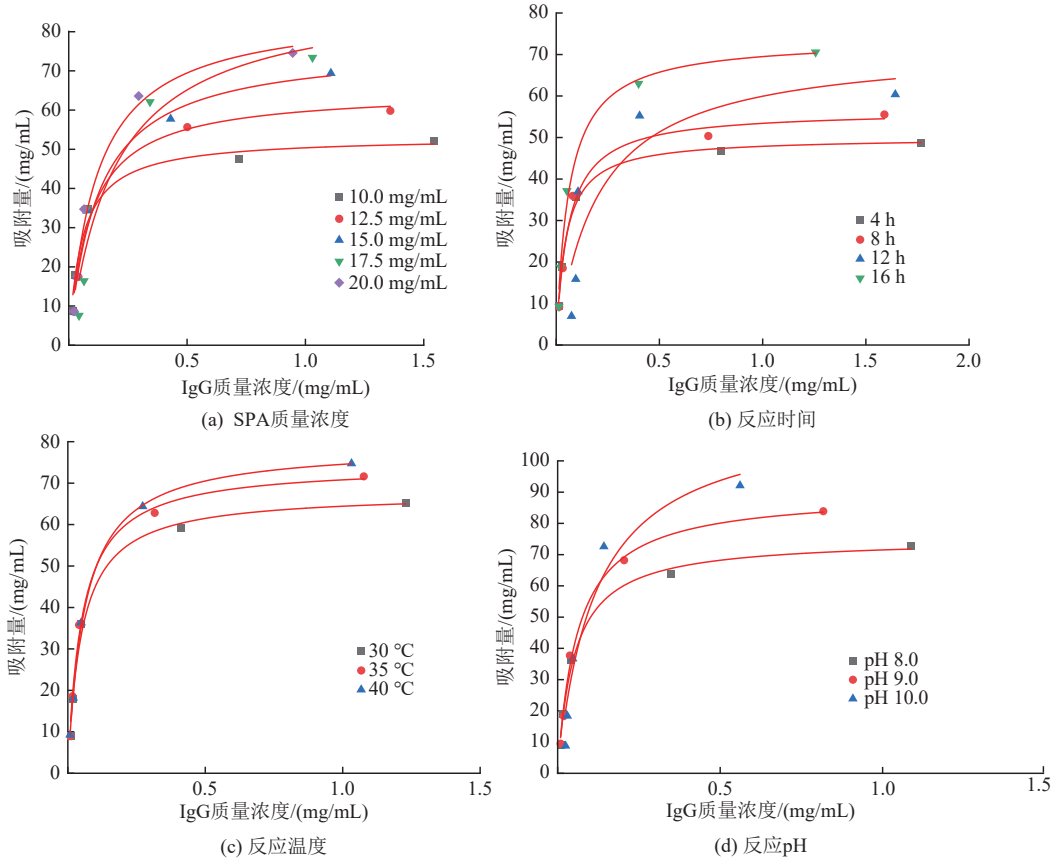


图3　偶联条件对自制亲和层析介质静态吸附量的影响

Fig. 3　Effects of coupling conditions on the static adsorption capacity of the self-prepared affinity chromatography medium

3(c)和表 1 中可以看出,30~40 ℃时随着反应温度的增加,自制亲和层析介质的静态饱和吸附量也逐渐增加;反应温度为 40 ℃时,自制亲和层析介质的静态饱和吸附量最大,为 79.05 mg/mL(以介质体积计);反应温度继续提高,蛋白质活性降低,因此选择 40 ℃作为偶联反应温度。图 3(d)和表 1 展示了不同反应 pH 对自制亲和层析介质静态吸附量的影响,不同偶联 pH 对自制亲和层析介质静态吸附量的影响比较明显;反应 pH 为 10.0 时,自制亲和层析介质的静态饱和吸附量最大,为 115.54 mg/mL(以介质体积计);继续提高反应 pH,反应体系产生沉淀,因此选择 pH 10.0 作为偶联反应 pH。

2.4　自制亲和层析介质的性能研究

2.4.1　吸附性能研究

根据图 4(a)中测试数据的曲线拟合结果可知,在最优制备条件下,自制亲和层析介质静态饱和吸附量为 115.5 mg/mL(以介质体积计),高于商品介质的 98.6 mg/mL(以介质体积计);介质的穿透曲线如图 4(b)所示,经过计算可知,自制亲和层析介质的 $Q_{10\%}$ 动态吸附量为 58.6 mg/mL(以介质体积计),高于商品介质 $Q_{10\%}$ 动态吸附量 55.2 mg/mL(以介质体积计)。

2.4.2　耐碱性研究

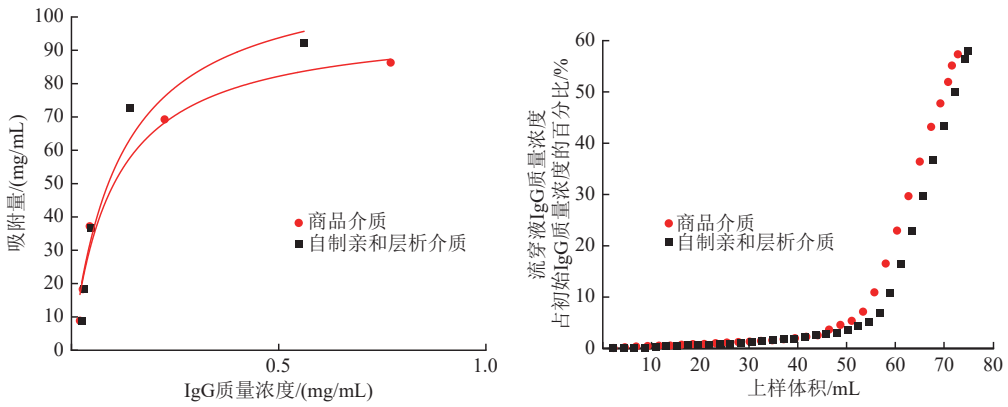
每次 SPA 亲和层析纯化结束后,都需要对介质进行 CIP,因此介质需要具备较高的耐碱性。研究中测试了 2 种介质在 200 mmol/L NaOH 中分别浸泡 0、24、48、72 h 后对 IgG 的载量变化,NaOH 浸泡后的载量下降率反映了介质对碱性环境的耐受性。由表 2 及图 5 可见,自制亲和层析介质在 200 mmol/L NaOH 溶液中浸泡 24 h 后,载量降为 55.1 mg/mL,约为初始载量的 94%,商品介质降为 52.6 mg/mL,约为初始载量的 95%;浸泡 72 h 后,自制亲和层析介质载量降为 47.2 mg/mL,约为初始载量的 81%,商品介质也降为初始载量的 81%,2 种介质几乎一致。由此可见,自制亲和层析介质耐碱性较强,与商品介质相仿。

表 1　不同偶联条件下自制亲和层析介质的静态饱和吸附量和解离常数

Table 1　Static saturated adsorption capacities and dissociation constants of the self-prepared affinity chromatography media under different coupling conditions

因素	水平	静态饱和吸附量/(mg/mL)	解离常数/(mg/mL)
SPA 质量浓度/(mg/mL)	10.0	53.17	0.055
	12.5	64.97	0.089
	15.0	76.35	0.122
	17.5	89.95	0.190
	20.0	85.60	0.116
反应时间/h	4	50.03	0.045
	8	56.49	0.058
	12	72.07	0.202
	16	73.71	0.061
反应温度/℃	30	67.66	0.050
	35	74.38	0.051
	40	79.05	0.061
反应 pH	8.0	75.16	0.051
	9.0	89.82	0.061
	10.0	115.54	0.116

注:静态饱和吸附量和解离常数单位均以介质体积计。



(a) 静态吸附　　(b) 动态吸附

图 4　介质静态饱和吸附测试和动态吸附性能

Fig. 4　Static saturated adsorption test and dynamic adsorption performance of media

表2　200 mmol/L NaOH溶液浸泡对介质载量的影响

Table 2　Effect of 200 mmol/L NaOH solution immersion on the loading capacity of media

时间/h	载量/（mg/mL）	
	自制亲和层析介质	商品介质
0	58.6	55.2
24	55.1	52.6
48	52.8	50.0
72	47.2	44.5

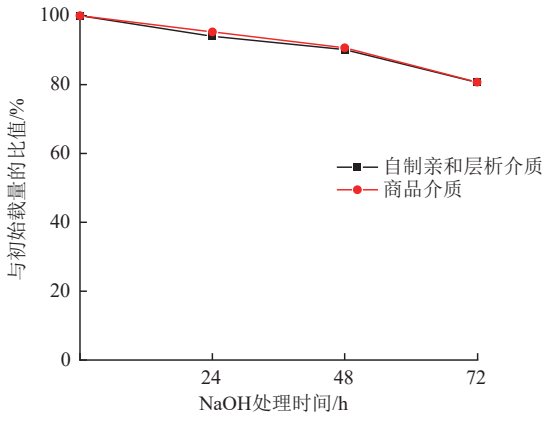


图5　介质耐碱性测试及比较

Fig. 5　Test and comparison on alkali tolerance of media

2.4.3　重复使用性能研究

由图6可知，随着介质使用次数的增加，介质的动态吸附量会逐渐下降，经过40个模拟循环使用后，自制亲和层析介质的载量降为初始载量的94%，商品介质降为95%；在经过100个模拟循环使用后，自制亲和层析介质的吸附量降为88%，商品介质降为89%。总体来看，自制亲和层析介质的使用稳定性较好，使用寿命较长，重复使用性能与商品介质非常接近。

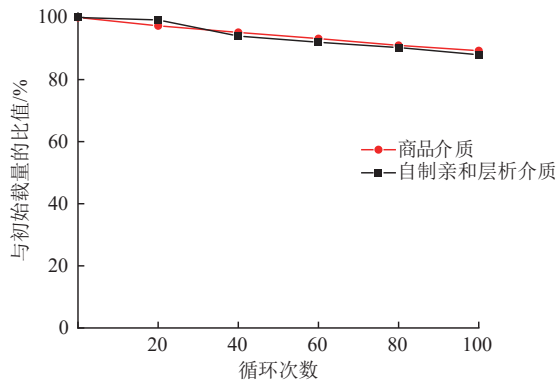


图6　介质重复使用性能

Fig. 6　Reusability of media

2.5　自制亲和层析介质的纯化应用

2.5.1　亲和层析捕获目标抗体

自制亲和层析介质和商品介质纯化同一批次单克隆抗体样品，结果如图7所示。样品中绝大部分杂质如HCP、DNA、病毒等未与介质结合，在流穿过层析柱后能得到有效去除，且IgG能得到有效捕获并洗脱下来；洗脱峰峰形较好，对称度较高。整体来看，自制亲和层析介质与商品介质峰形基本一致，说明自制亲和层析介质捕获目的蛋白质性能与商品介质较接近。另外，试验中发现洗脱液在pH 3.0时容易发生蛋白质聚集，因此选择pH 3.6作为洗脱条件，有效避免了抗体样品的聚集。

电泳结果显示（见图8），样品原液（泳道1）和亲和层析流穿液（泳道2）中阴影部分较多，而亲和层析洗脱液（泳道3）基本只有2条较粗的条带，

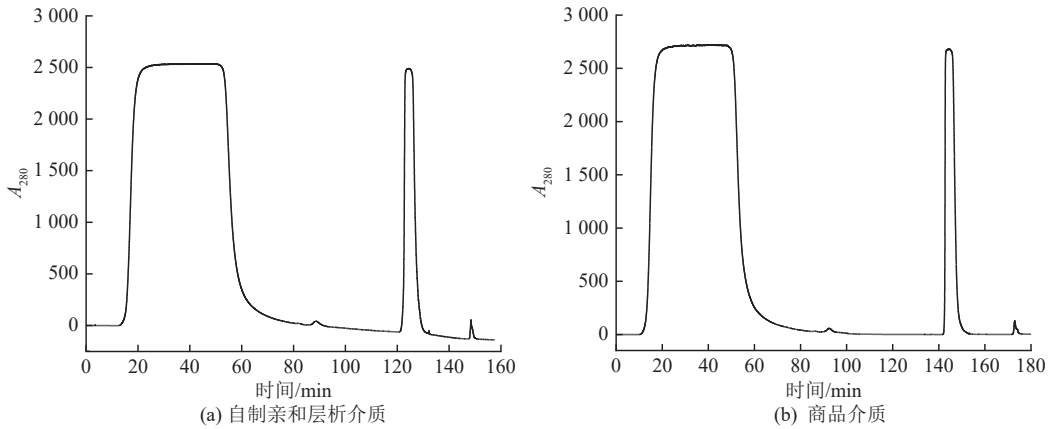


图7　介质亲和层析结果

Fig. 7　Affinity chromatography results of media

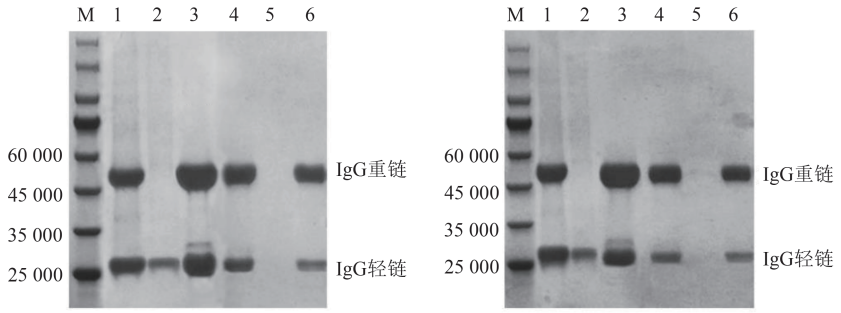
IgG 重链相对分子质量约为 50 000，IgG 轻链相对分子质量约为 27 000，说明亲和层析过程中大部分杂蛋白质未与介质结合，以流穿的形式去除，洗脱液中抗体纯度高于 90%，纯化效果良好，自制亲和层析介质和商品介质纯化结果相近。

BCA 法测定 IgG 质量浓度，计算回收率，结果如表 3 所示，自制亲和层析介质纯化回收率为 94.20%，略低于商品介质的 97.70%，纯度差距不大，表明自制亲和层析介质纯化性能较好。

2.5.2　精纯抗体

亲和层析洗脱液使用 Capto Q 层析介质纯化，纯化条件一致，图 8 中泳道 4 阴离子交换流穿液中只有清晰的 2 条带，没有可见杂带，表明上一步残余的杂蛋白质已与介质结合而得到去除；将上一步流穿液继续使用 Capto S ImpAct 层析介质进一步纯化，泳道 5 阳离子交换流穿液中没有可见条带，表明此时样品已经达到很高的纯度，泳道 6 阳离子交换洗脱液中只有 2 条较粗条带，进一步说明样品中几乎没有杂质，可以认为此时 IgG 纯度大于 99%。SEC-HPLC 法获得的样品纯度，印证了这一点。从层析图及电泳图整体来看，纯化 IgG 样品时自制亲和层析介质与商品介质的性能几乎没有差别。

经 2 种介质纯化，然后使用同样的离子交换层析技术，对最终样品中几种有害物质的残留量进行比较，结果见表 3。利用自制亲和层析介质纯化单克隆抗体样品时，纯度在 95% 以上，回收率不低于 90%。SPA 脱落量、内毒素和外源 DNA 残留量相近，而 HCP 残留量这一指标表明自制亲和层析介质的纯化效果好于商品介质，表明自制亲和层析介质纯化性能优越，在某些方面甚至超过商品介质。



(a) 自制亲和层析介质纯化结果　(b) 商品介质纯化结果

M—Marker；1—样品原液；2—亲和层析流穿液；3—亲和层析洗脱液；4—阴离子交换流穿液；5—阳离子交换流穿液；6—阳离子交换洗脱液。

图 8　介质纯化抗体电泳结果

Fig. 8　Electrophoresis results of antibody purification by media

表 3　介质纯化单克隆抗体样品结果

Table 3　Results of monoclonal antibody samples purification by media

介质	层析过程	纯度/%	回收率/%	SPA 脱落量/（ng/mg）	HCP 残留量/（ng/mg）	内毒素残留量/（ng/mg）	外源 DNA 残留量/（ng/mg）
自制亲和层析介质	亲和层析	95.02	94.20	4.47	122.50	2.40	24.70
	阴离子交换层析	98.02	96.80	0.58	45.20	0.28	0.92
	阳离子交换层析	>99.00	95.40	0.25	8.10	0.08	—
商品介质	亲和层析	95.91	97.70	3.30	143.60	1.30	30.20
	阴离子交换层析	97.95	96.10	0.43	62.30	0.15	0.99
	阳离子交换层析	>99.00	94.80	0.12	10.30	0.03	—

注：纯度由 SEC-HPLC 得出；回收率表示每步的回收率；“—”表示未检出。

3　结论

该研究成功构建了 SPA 重组菌，通过优化偶联反应条件，最终确定了自制亲和层析介质最佳偶联条件为：SPA 质量浓度 17.5 mg/mL、反应时间 12 h、反应温度 40 ℃和反应 pH 10.0。自制亲和层析介质理论静态饱和吸附量为 115.5 mg/mL（以介质体积计），动态吸附量为 58.6 mg/mL（以介质体

积计）。自制亲和层析介质耐碱性和重复使用性能与商品介质相似，用于纯化单克隆抗体样品时，纯度在95%以上，回收率不低于90%，有害物质残留量与商品介质差距不大，整体性能等同甚至优于商品介质，该研究具有一定的研究意义和商业应用价值。

参考文献

[1] 徐梦蔚，宋武琦，付治美，等. 实验室水平单克隆抗体制备方法及相应纯化策略的研究进展[J]. 中国生物制品学杂志，2022，35(2)：228-232.
XU M W，SONG W Q，FU Z M，et al. Progress in research on methods for preparation of monoclonal antibody at laboratory level and relevant purification strategy[J]. Chinese Journal of Biologicals，2022，35(2)：228-232. (in Chinese)

[2] AMRITKAR V，ADAT S，TEJWANI V，et al. Engineering staphylococcal protein A for high-throughput affinity purification of monoclonal antibodies[J]. Biotechnology Advances，2020，44：107632.

[3] FARID S S. Process economics of industrial monoclonal antibody manufacture[J]. Journal of Chromatography B，2007，848(1)：8-18.

[4] CHAHAR D S，RAVINDRAN S，PISAL S S. Monoclonal antibody purification and its progression to commercial scale [J]. Biologicals，2020，63：1-13.

[5] RATHORE A S，PATHAK M，MA G，et al. Re-use of protein A resin：fouling and economics[J]. BioPharm International，2015，28(3)：28-33.

[6] LOEFDAHL S，GUSS B，UHLEN M，et al. Gene for staphylococcal protein A[J]. PNAS，1983，80(3)：697-701.

[7] COLBERT D A，ANILIONIS A. Cloned genes encoding recombinant protein A：US5151350[P]. 1992-09-29.

[8] GÜLICH S，LINHULT M，NYGREN P，et al. Stability towards alkaline conditions can be engineered into a protein ligand[J]. Journal of Biotechnology，2000，80(2)：169-178.

[9] KOSKY A A，RAZZAQ U O，TREUHEIT M J，et al. The effects of alpha-helix on the stability of Asn residues：deamidation rates in peptides of varying helicity[J]. Protein Science，1999，8(11)：2519-2523.

[10] 中国药典委员会. 中华人民共和国药典：2015版：三部[M]. 北京：中国医药科学出版社，2015：363-366.

[11] 陈继军，南建军，乔玉玲，等. 重组抗CD52单克隆抗体亲和层析纯化工艺的优化[J]. 中国生物制品学杂志，2019，32(4)：439-444.
CHEN J J，NAN J J，QIAO Y L，et al. Optimization of affinity chromatography process for purification of recombinant anti-CD52 monoclonal antibody[J]. Chinese Journal of Biologicals，2019，32(4)：439-444. (in Chinese)

[12] ZHAO W W，SHI Q H，SUN Y. Dual-ligand affinity systems with octapeptide ligands for affinity chromatography of hIgG and monoclonal antibody[J]. Journal of Chromatography A，2014，1369：64-72.

[13] GRIFFITH C M，MORRIS J，ROBICHAUD M，et al. Fluidization characteristics of and protein adsorption on fluoride-modified porous zirconium oxide particles[J]. Journal of Chromatography A，1997，776(2)：179-195.

[14] 毕华，范文红，史新昌，等. 融合蛋白Protein A残留检测方法的建立[J]. 药物分析杂志，2014，34(2)：297-300.
BI H，FAN W H，SHI X C，et al. Development of a method for determination of residual protein A of a kind of Fc fusion protein[J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis，2014，34(2)：297-300. (in Chinese)

[15] 王桂珍. 亲和层析技术的研究及应用[D]. 广州：暨南大学，2011.

[16] 易秋分，张翠英，蒋永吉，等. 谷胱甘肽亲和层析介质的制备条件及其层析特性研究[J]. 天津科技大学学报，2015，30(5)：7-14.
YI Q F，ZHANG C Y，JIANG Y J，et al. The preparation of GSH affinity chromatographic adsorbent and the research of its chromatographic characteristics[J]. Journal of Tianjin University of Science & Technology，2015，30(5)：7-14. (in Chinese)

[17] 冯利利，杜夜星，张强，等. 链球菌蛋白G免疫球蛋白结合域C3区串联体的表达、筛选与初步应用[J]. 高校化学工程学报，2018，32(4)：885-892.
FENG L L，DU Y X，ZHANG Q，et al. Expression，screening and preliminary application of the concatenation C3 region of the streptococcal protein G immunoglobulin binding domain[J]. Journal of Chemical Engineering of Chinese Universities，2018，32(4)：885-892. (in Chinese)

[18] 王玉君，王姝婧，杜夜星，等. 断裂内含肽介导的蛋白纯化系统的构建[J]. 食品与生物技术学报，2019，38(10)：135-143.
WANG Y J，WANG S J，DU Y X，et al. Construction of a protein purification system mediated by split intein[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2019，38(10)：135-143. (in Chinese)

（责任编辑：许艳超）