

嗜硫类磁性聚合物微球高效分离抗体^{*}

吴慧丹 钱 浩^{**} 余智军 叶文虎

(华侨大学材料科学与工程学院 厦门 361021)

摘 要 用微悬浮聚合技术制备微米级顺磁性的聚合物微球,并通过水解反应在其表面生成丰富的羟基,进而通过二乙烯基砜活化,在其表面修饰 2-巯基嘧啶,实现磁性微球对人体免疫球蛋白 G(IgG)的特异性识别.进一步探讨了不同解吸附环境,如 pH 值、温度、离子种类、离子强度等条件,对这种特异性吸附行为的影响.采用此磁性分离技术后,分离抗体的纯度超过 92%,抗体活性高于 99%.通过连续分离工艺,IgG 的分离效率达到 86.8%.

关键词 顺磁性,嗜硫性,微悬浮,免疫球蛋白 G,分离,2-巯基嘧啶

随着抗体的各种奇特生理功能不断被发现,抗体愈发引起了人们的广泛关注和兴趣^[1,2].在人血清、淋巴、体液中最大量的抗体属于免疫球蛋白 G(IgG),随着生物技术和临床治疗的发展,对高纯度、高活性 IgG 的需求日益增长,极大的促进了其纯化工艺的发展^[3~6].尽管传统的沉淀法和离心过滤法已经在 IgG 的工业化分离中大量使用,但其分离纯度较低,而且对抗体的生物活性损伤较大,限制了其在许多领域广泛利用.而色谱技术仅适合于分析检测过程和小规模的分离纯化,因此,发展新的非色谱技术,显得非常迫切^[7~11].

目前,用顺磁性微球纯化抗体的研究引起人们的高度重视,此方法的关键技术主要体现在两方面,即适当的微球粒径和适宜的表面修饰^[12~15].微球的磁响应性能和分离效率都受到微球粒径的很大影响,因此,微米级磁性微球的制备与应用成为关注焦点^[16~19].恰当的表面改性是实现磁性微球选择性的关键,传统上往往采取生物配基,例如,蛋白 A、蛋白 G 和某些抗原等,它们可以对 IgG 表现出强烈的特异性^[20~22].但是,生物配基的缺点也日益突出,如易被微生物分解;难于实现消毒处理;易于泄露;对溶剂及其 pH 值过于敏感;成本高;苛刻的储存条件等.为此,一些具有稳定化学结构的非生物配基,如螯合金属离子、疏水嗜硫配基、羟基硅灰石、氨基酸、人工仿生配基等纷纷出现^[3,10,23,24].自 1985 年 Porath 首次使用

嗜硫配基以来,嗜硫配基以其较强的吸附能力,较高的特异性,良好的再生性和低成本等优点,得到重视^[25,26].然而,在传统的嗜硫色谱法中,吸附缓冲溶液的高盐浓度不利于保持抗体活性.近些年,出现的杂环嗜硫配基,可以在低盐浓度下,实现 IgG 的特异性识别与分离,为磁性微球的表面修饰,提供了新的选择^[27~29].

本研究力图发展一种适合于规模化分离抗体的新方法,在简便工艺过程中,实现 IgG 的高纯度、高活性纯化.我们采用一种新的杂环嗜硫性配基——2-巯基嘧啶修饰磁性微球表面,从而实现磁性微球对抗体的高特异性、高活性分离,并进一步研究了影响吸附和解吸附过程的因素.

1 实验部分

1.1 原料

醋酸乙烯酯(VAc)和二乙烯基苯(DVB),经减压蒸馏处理,在 4℃ 储存;2,2'-偶氮二异丁腈(AIBN)作引发剂,重结晶后使用;十六烷(HD, Alfa),二乙烯基砜(DVS, Alfa),2-巯基嘧啶(Alfa),聚乙烯醇(PVA124,99% 水解,聚合度 2400, Aldrich Chem Co), $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$,氨水($\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$,25% W/V),油酸(OA),直接使用.人体血清由从福建省泉州市血库提供,在室温下离心 15 min,转速 6000 r/min,血清中白蛋白和 IgG 的含量分别为 91.4 mg/mL 和 13.6 mg/

^{*} 2009-11-17 收稿,2010-03-19 修稿;国家自然科学基金(基金号 50603007)和福建省高等学校新世纪优秀人才支持计划(项目号 07FJRC02)资助项目; ^{**} 通讯联系人, E-mail: hquqh@yahoo.com.cn
doi: 10.3724/SP.J.1105.2010.09401

mL.

1.2 嗜硫性磁性微球的制备

通过化学共沉淀法制备油酸改性的磁性纳米颗粒^[30],用微悬浮方法合成微米磁性聚合物微球^[31],油相是将混有 8 g VAc, 2 g DVB, 0.6 g HD 的混合溶液,加入 2.0 g Fe_3O_4 磁性粒子,在冰浴条件下,超声波分散.然后,加入 0.6 g 引发剂(AIBN),使其均匀分散.水相用 PVA124 配制 1.25 wt% 的水溶液 200 mL.利用高速剪切乳化机,将制得的油相溶液,逐渐加入水相,在 3000 r/min 的转速下剪切乳化 30 min,制得微悬浮溶液.然后在 60℃ 水浴中反应 24 h,转速 350 r/min.反应完后通过磁分离的方法,收集磁性微球,并用乙醇和水反复洗涤,除去未反应的单体及其他杂质.

1.3 磁性聚合物微球的表面修饰

所制备的嗜硫性微球,在碱性乙醇溶液中充分醇解,在表面产生丰富的羟基.2-巯基嘧啶 0.4486 g,加入到 1.6 mL 的二乙烯基砒中,在 NaOH 溶液($\text{pH} = 13$)的中活化 4 h,再加入醇解后的磁性聚合物微球 0.2 g,室温下反应 24 h.并在外磁场作用下用蒸馏水反复洗涤,并在室温下储存待用.

1.4 嗜硫性磁性微球的表征

用扫描电子显微镜(SEM, JSM-6700F, Japan)观察磁性微球的粒子大小及其表面形态;用粒度分析仪(MasterSizer 2000, Germany)分析样品的粒径大小;室温下用振动探针式磁强计(VSM Mpm XL-7, Quantum Design)测定样品磁强度;通过热重分析仪(Model TGA2050, TA Instruments)测量样品的磁含量;用元素分析仪(Vario ELIII Elementar)对样品进行元素分析;用红外光谱仪(Nicolet Nexus)测定样品的红外吸收.

1.5 从人体血清中特异性分离 IgG

首先,用 10 mL 磷酸盐缓冲溶液(25 mmol/L, $\text{pH} = 7.0$),洗涤 0.2 g 嗜硫性磁性微球,再加入 10 mL 磷酸盐缓冲溶液和 0.2 mL 新鲜的人体血清,均匀震荡 10 min,然后在外磁场作用下分离取上清液;用吸附缓冲溶液洗磁性微球 3 遍,除去物理吸附的蛋白;最后用不同盐的水溶液从嗜硫性磁性微球上脱附被吸附的 IgG,这些盐包括 Na_2CO_3 、 K_2SO_4 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 Na_2SO_4 、NaCl 和 KCl.

1.6 蛋白浓度分析及抗体活性的分析

根据 Bradford 法,用酶标仪(Bio-Rad, Munich, Germany)检测蛋白含量^[32],通过免疫浊度法测定 IgG 的生物活性(伊利康生物科技有限公司,浙江).

1.7 聚丙烯酰胺凝胶电泳法和色谱法

在还原条件下,进行 SDS-PAGE 凝胶电泳分析产品纯度^[33].样品首先在二硫苏糖醇、2-巯基乙醇、甘油、溴酚蓝和十二烷基硫酸钠溶液中煮沸 5 min,充分变性,然后在 100 V 电压下电泳 4 h.之后,凝胶用考马斯亮蓝 G-250 染色,再用醋酸/甲醇/水的混合液脱色.

利用高效液相色谱(Agilent 1100)和凝胶色谱柱(Shodex, KW-803)分析以上各步骤的上清液,用 50 mmol/L 的磷酸盐缓冲溶液($\text{pH} = 7.0$)作为流动相,检测波长为 280 nm,流速是 0.7 mL/min.

2 结果与讨论

2.1 嗜硫性磁性微球的制备

用微悬浮聚合法制备的 P(VAc-co-DVB) 磁性微球,如图 1 所示,表现出良好的分散性.磁性微球保持良好分散性,对其分离过程的影响较大,如果微球团聚,大量配基被包埋,从而导致吸附效率大幅度降低.并且,团聚过程会使磁球解吸附行为困难,导致分离效率下降.所制备的磁球,粒径分布在 0.6 ~ 20 μm 范围以内,饱和磁化率达到 16.7 emu/g,且无剩磁,磁含量为 24%.在 NdFeB 永久磁体的磁场下,5 ~ 8 s 即可实现磁球的完全分离.

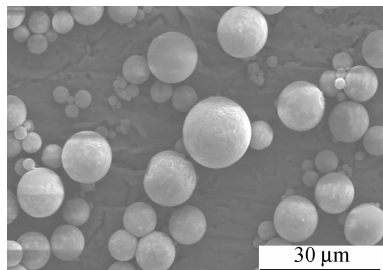
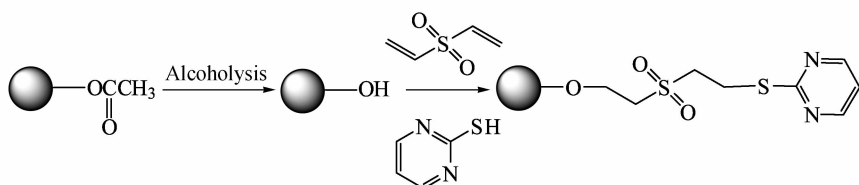


Fig. 1 SEM photos of the magnetic beads

磁性微球对抗体的特异性吸附,关键在于其表面修饰.我们采用 2-巯基嘧啶实现对其表面功能化作用,具体过程如示意式 1 所示.

在常用的嗜硫配基修饰过程中,无论是磁性微球和二乙烯基砒还是 2-巯基嘧啶的反应,都是异相反应,反应效率较低.因此,本体系中,首先完



Scheme 1 Surface modification of the magnetic beads with 2-mercapto-pyrimidine and divinyl sulfone

成二乙烯基砜和 2-巯基嘧啶的加成反应, 然后加入磁性微球, 最终完成表面修饰过程, 这样可以减少固相反应的次数, 提高配基的接枝率. 其反应过程的红外谱图如图 2 所示.

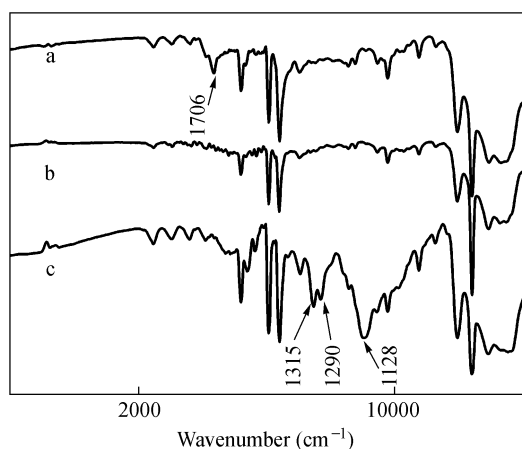


Fig. 2 FTIR spectra of magnetic beads

a) P(VAc-co-DVB) magnetic beads; b) P(VAc-co-DVB) magnetic beads after alcoholysis; c) Thiophilic magnetic beads modified with divinyl sulfone and 2-mercapto-pyrimidine

图 2(b) 在 1706 cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$) 的吸收峰比图 2(a) 明显降低, 说明经过醇解后大量的酯键转化成了羟基, 然后嗜硫配基跟磁性微球表面的羟基反应. 图 2(c) 中, 1128 cm^{-1} 吸收峰是二乙烯基砜的砜基的对称伸缩振动, 在 1290 cm^{-1} 和 1315 cm^{-1} 吸收峰是砜基的不对称伸缩振动, 表明砜基已经接枝到磁性微球表面. 从元素分析法测得的氮含量, 估算出嗜硫配基的含量为 0.13 mmol/g .

2.2 嗜硫性磁性微球特异性吸附 IgG

用体积排阻色谱法 (SEC) 测定磁性微球特异性吸附 IgG 的过程. 根据人体血清的标准色谱图 (由 Shodex Co 提供), 白蛋白和 IgG 的保留时间分别为 12.1 min 和 13.1 min . 由图 3 可以发现, 吸附液中, IgG 的吸收峰明显减弱, 而解吸附液中只在 12.1 min 处出现一个单峰, 表明, 解吸附产品中只有 IgG, 没有其他杂蛋白. 由此可见, 所制

备的嗜硫性磁性微球对 IgG 产生明显的特异性分离作用. 进一步通过 SDS-PAGE 凝胶电泳法来印证这一特异性分离过程, 如图 4 所示. 在解吸附溶液的谱带中只有 IgG 的重链和轻链, 基本上没有白蛋白. 根据蛋白谱带的灰度来计算其产品的纯度, 所分离的 IgG 的纯度达到 92%.

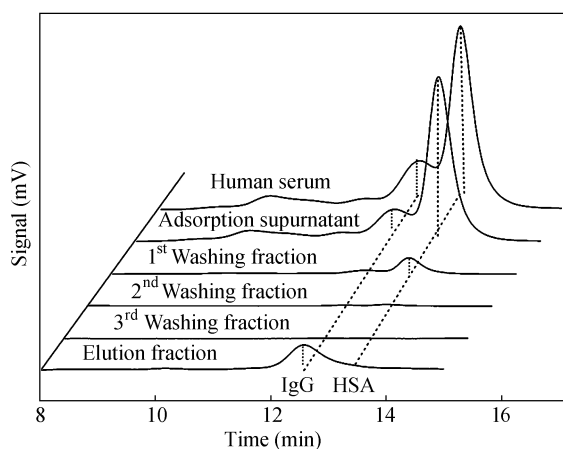


Fig. 3 Isolation process of IgG from human serum

The serum (0.2 mL) was isolated by 0.2 g magnetic beads; Adsorption buffer solution: 25 mmol/L PBS solution ($\text{pH} = 7.0$); Washing buffer solution: 25 mmol/L PBS solution ($\text{pH} = 7.0$); Elution buffer solution: 1 mol/L NaCl aqueous solution

在高浓度盐溶液下, 嗜硫配基和 IgG 之间的相互作用一般被认为是电子供受体 (EDA) 相互作用^[25,26]. 然而, 在本体系中, 经 2-巯基嘧啶修饰的磁性微球在生理条件下 (25 mmol/L PBS), 就能实现对 IgG 的特异性吸附. 目前, 对于嗜硫配基与抗体的相互作用, 主要集中在疏水作用和 EDA 效应, 为了进一步阐明其作用机理, 通过温度的变化研究其吸附机理. 对于疏水作用, 焓变 (ΔH) 对吉布斯自由能 (ΔG) 影响不大, 主要影响吉布斯自由能的是熵变 (ΔS), 因此, 温度对 ΔG 影响也很大. 反之, 在 EDA 效应中, 起主要作用的是焓变, 温度对吸附的影响不明显^[34]. 从表 1 的实验结果可以看出, 在 0°C 、 15°C 或 25°C 吸附温度下, 分离出的 IgG 量变化不是很明显, 因此, 2-巯基嘧啶和

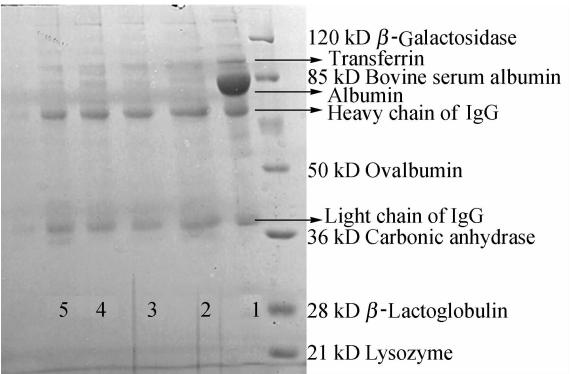


Fig. 4 SDS-PAGE electrophoresis for the isolation of IgG from human serum with magnetic affinity polymer beads
1) Human serum; 2) Elution by 1 mol/L Na_2CO_3 aqueous solution; 3) Elution by 1 mol/L Na_2SO_4 aqueous solution; 4) Elution by 1 mol/L KCl aqueous solution; 5) Elution by 1 mol/L NaCl aqueous solution

IgG 的特异性吸附作用主要为电子供受体(EDA)相互作用.

Table 1 The efficiency of the isolation by the thiophilic magnetic beads

Temperature (°C)	0	15	25
Isolated IgG (mg)	1.61	1.59	1.58

The 0.2 g magnetic polymer beads were used to isolate 0.4 mL human serum.

然而,磁性微球能在低盐浓度下对抗体产生特异性吸附作用,这不同于传统的嗜硫色谱.这要归因于 2-巯基嘧啶的杂环结构,依靠硫原子和嘧啶环之间的共轭作用,硫醚键提供电子能力大为加强,有利于蛋白上的电子受体接受电子,而砷基上的硫原子依然能从 IgG 的给电子体上吸附电子,因而,不需要高浓度盐离子的配合,即可实现 EDA 作用.因此,所制备的嗜硫性磁性微球能在生理条件下,即可实现对 IgG 的特异性吸附.

2.3 IgG 解吸附过程

分别通过解吸附环境的 pH 值、盐种类和盐离子强度考察了 IgG 的脱附过程.传统的嗜硫色谱法可以用碱性溶液脱附被吸附的 IgG^[35],但在我们的实验中,当 pH 值达到 13.1 时,没有蛋白脱附,反而导致部分蛋白降解,如图 5,表明 pH 值太高不适于释放出被吸附的 IgG.

考虑到 EDA 相互作用机理,在碱性环境中,被吸附蛋白的熵变不足以实现其解吸附.而 EDA 作用的主要推动力来自于焓变,如果阻断嗜硫配基和 IgG 的相互作用,可能更有利于被吸附蛋白

的脱附,因此,可以采用一系列高浓度盐溶液,干扰嗜硫性磁球与 IgG 的相互作用,从而实现被吸附 IgG 的脱附过程.在图 5 中可以发现,不同盐的解吸附上清液中,都在 12.1 min 处出现一个单峰,说明分离出高纯度的 IgG.

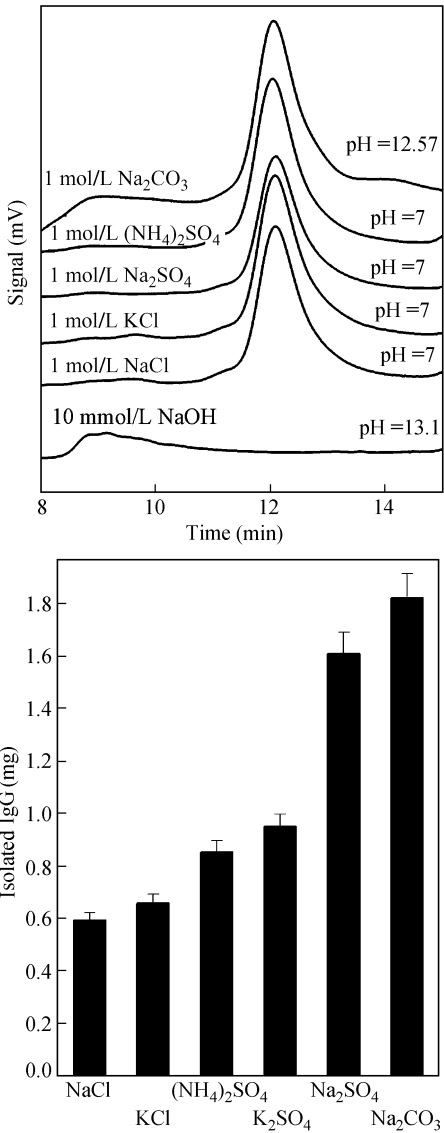


Fig. 5 Effect of pH and salts on the desorption of IgG from magnetic beads

不同盐的解吸附效率也不同,在相同的吸附环境下,1 mol/L 不同盐溶液(K_2SO_4 是饱和溶液)的分离效率分别达到 14.5% (NaCl), 16.2% (KCl), 20.9% ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), 23.3% (K_2SO_4), 39.5% (Na_2SO_4) 和 44.6% (Na_2CO_3). 分离效率主要是指,所分离出的抗体质量占所加入血清中抗体总质量的百分数.为了保持抗体的生物活性,用 NaCl 水溶液作为脱附环境,来研究其浓度对解吸附的影响,如图 6,表明当 NaCl 浓度为 0.4

mol/L 时, IgG 分离效率达到 37.7%. 表明, 不仅是盐种类, 还有盐浓度, 都对分离过程产生重要的影响.

相对来讲, 单次分离的效率偏低, 在吸附液和

洗涤液中还存在大量未分离的蛋白, 我们采取重复分离的方法, 对残余蛋白进行充分分离, 在进行 3 次分离后, 我们在实验室中, 在 10 mL 血清中, 可以分离出 118 mg IgG, 分离效率达到 86.8%.

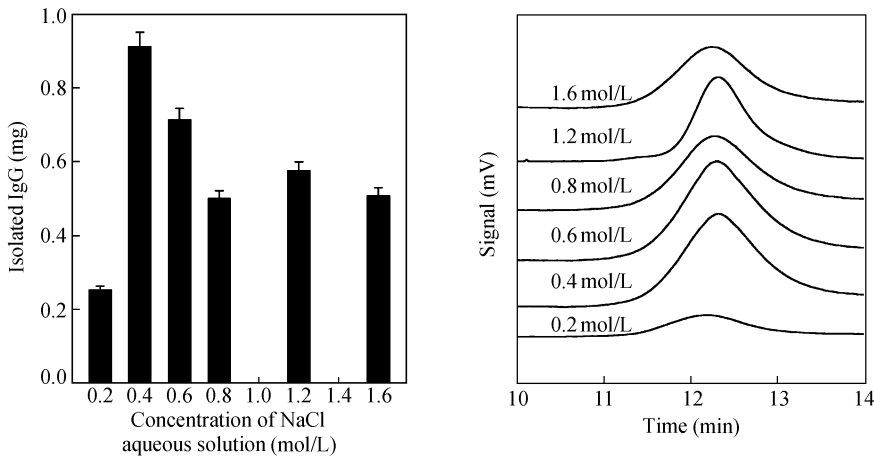


Fig. 6 Effect of NaCl concentration on the recovery of the bound IgG
The SEC curves of the isolated products were also shown.

IgG 的生理活性, 可通过下列公式计算:

bioactivity =

$$\frac{\text{the mass of bioactive IgG}}{\text{the whole mass of isolated IgG}} \times 100\%$$

抗体能跟某些抗原结合造成轻微的沉淀, 如山羊抗原-人体 IgG, 这些微沉淀, 可以通过光散射法测定, 因此, 通过溶液浊度的变化, 来分析蛋白质中活性抗体的含量^[36]. 本体系中, 所分离的抗体, 其活性达到 99%, 意味着在分离过程中抗体的生理活性几乎没有损失.

2.4 分离过程

作为一种潜在的非色谱技术, 磁性微球分离 IgG 技术在许多领域表现出其突出的优势. 首先, 简化了繁琐的血清预处理过程(过滤, 凝血, 离心等); 其次, 磁性分离的过程仅使用摇床和磁分离技术, 设备、操作都简单; 另外, 由于色谱柱的限制, 使色谱技术无法实现大批量的分离过程, 而磁性微球技术, 完全避免这个问题, 有望实现抗体的规模化分离; 最后, 磁性微球的快速分离过程和良好的可重复使用性都极大的提高其分离效率.

如图 7 所示, 20 min 左右足以完成从人体血

清中特异性吸附和分离抗体. 磁球技术能实现快速的分离过程, 关键在于磁性微球较高的磁响应性和恰当的粒径, 如果磁性微球粒径较大, 达到吸附平衡所需的时间超过 10 h^[13].

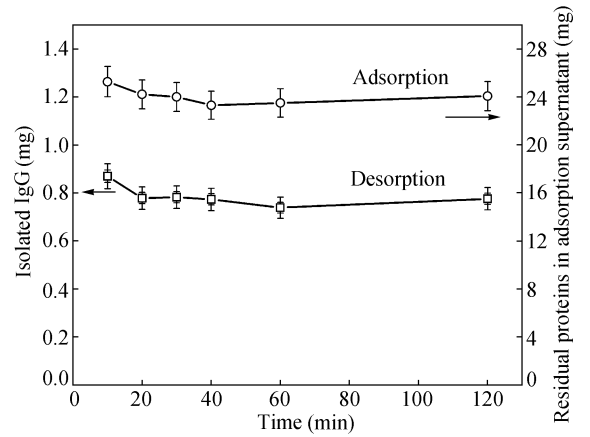


Fig. 7 Rapid process of the adsorption (○) and desorption (□)
Adsorption buffer: 25 mmol/L PBS solution (pH 7.0);
Washing buffer: 25 mmol/L PBS solution (pH 7.0); Elution buffer: 0.4 mol/L NaCl aqueous solution

磁性微球出色的可重复使用性, 如表 2 所示,

Table 2 Reusability of the thiophilic magnetic beads								
Repeated use cycles	1	2	3	4	6	7	8	9
Isolated IgG (mg)	0.9	0.88	0.87	0.86	0.87	0.85	0.86	0.84
Relative deviation (%)	0	-2.22	-3.33	-4.44	-3.33	-5.56	-4.44	-6.67

The 0.2 g magnetic polymer beads were used to isolate 0.2 mL human serum.

用 NaCl 溶液脱附后,磁性微球可以直接使用,不需要任何其他处理. 磁性微球重复使用 9 次,其相对偏差只有 7%,由于嗜硫配基是通过共价连接到磁球表面,这种稳定的结构使得磁性微球具有良好的可重复使用性,这是许多生物配基很难达到的.

3 结论

用 2-巯基嘧啶对磁性微球进行表面修饰,可以实现其特异性吸附人体免疫球蛋白 G (IgG),所分离出抗体,保持较高的纯度和生物活性. 这种

特异性吸附行为对温度不敏感,表明 2-巯基嘧啶和 IgG 之间的特异性吸附作用主要依赖于 EDA 效应. 在 IgG 的分离过程,解吸附环境的 pH 值、盐浓度、盐种类对分离过程都产生较大的影响,用 NaCl 水溶液作为脱附液时,浓度为 0.4 mol/L 时, IgG 分离效率最高为 37.7%,生理活性不低于 99%. 利用这种磁性微球技术纯化抗体时,工艺条件简单,分离条件温和,抗体纯度较高,在规模化分离抗体方面表现出较大的潜力. 因此,进一步优化嗜硫性配基的结构和接枝密度,对提高分离效率有重要的影响.

REFERENCES

1 Kaneko Y, Nimmerjahn F, Ravetch J V. *Science*, 2006, 313: 670 ~ 673

2 Buchacher A, Iberer G. *Biotechnol J*, 2006, 1: 148 ~ 163

3 Roquea A C A, Silva C S O, Taipa M Â J. *Chromatogr A*, 2007, 1160: 44 ~ 55

4 Hage D S, *Handbook of Affinity Chromatography*, 2nd ed. In: Phillips T M, ed. *Affinity Chromatography in Antibody and Antigen Purification*, New York: CRC Press, 2006. 367 ~ 389

5 Li Zhanyong (李湛勇), Liang Shuren (梁树人). *Acta Polymerica Sinica* (高分子学报), 1998, (4): 449 ~ 453

6 Hwang J H, Kim H S, Kim J M, Chang S M, Kim I H, Kim W S. *Ind Eng Chem Res*, 2007, 46: 4289 ~ 4294

7 Bayramoglu G, Oktem H A, Arica M Y. *Biochem Eng J*, 2007, 34: 147 ~ 155

8 Li G, Stewart R, Conlan B, Gilbert A, Roeth P, Nair H. *Vox Sang*, 2002, 83: 332 ~ 338

9 Hou W, Watters J W, McLeod H L. *J Chromatogr B*, 2004, 804: 263 ~ 267

10 Lova D, O'Leary R, Pujar N S. *J Chromatogr B*, 2007, 848: 48 ~ 63

11 Berensmeier S. *Appl Microbiol Biot*, 2006, 73: 495 ~ 504

12 Özkara S, Akgöl S, Çanak Y, Denizli A. *Biotechnol Prog*, 2004, 20: 1169 ~ 1175

13 Dawes C C, Jewess P J, Murray D A. *Anal Biochem*, 2005, 338: 186 ~ 191

14 Qian H, Lin Z Y, Xu H M, Chen M Q. *Biotechnol Prog*, 2009, 25: 376 ~ 383

15 Sato R, Takeyama H, Tanaka T, Matsunaga T. *Appl Biochem Biotech*, 2007, 91: 109 ~ 116

16 Mirkin C A, Letsinger R L, Mucic R C, Storhoff J J. *Nature*, 1996, 382: 607 ~ 608

17 Cao Y W C, Jin R, Mirkin C A. *Science*, 2002, 297: 1536 ~ 1540

18 Bucak S, Jones D A, Laibinis P E, Hatton T A. *Biotechnol Prog*, 2003, 19: 477 ~ 484

19 Qian H, Li C J, Zhang Y X, Lin Z Y. *J Immunol Methods*, 2009, 343: 119 ~ 129

20 Hobera S, Nordb K, Linhult M. *J Chromatogr B*, 2007, 848: 40 ~ 47

21 Sugiura T, Imagawa H, Kondo T. *J Chromatogr B*, 2000, 742: 327 ~ 334

22 Gräslund S, Eklund M, Falk R, Uhlén M, Nygren P, Ståhl S. *J Biotechnol*, 2002, 99: 41 ~ 50

23 Denizli A, Alkan M, Garipcan B, Özkara S, Kin E P. *J Chromatogr B*, 2003, 795: 93 ~ 103

24 Verdoliva A, Pannone F, Rossi M, Catello S, Manfredi V. *J Immunol Methods*, 2002, 271: 77 ~ 88

25 Hutchenst T W, Porath J. *Biochem*, 1987, 26: 7199 ~ 7204

26 Porath J, Belew M. *Trends Biotechnol*, 1987, 5: 225 ~ 229

27 Scholz G H, Vieweg S, Leistner S, Seissler J, Scherbaum W A, Huse K. *J Immunol Methods*, 1998, 219: 109 ~ 118

28 Boschetti E. *J Biochem Biophys Methods*, 2001, 49: 361 ~ 389

29 Qian Hao (钱浩), Li Chunjiao (李春蛟), Zhang YingXue (张莹雪), Lin Zhiyong (林志勇). *Chinese Journal of Materials Research* (材料研究学报), 2009, 23(1): 93 ~ 97

30 Zheng W, Gao F, Gu H. *J Magn Magn Mater*, 2005, 288: 403 ~ 410

31 Qian H, Chen M Q, Lin Z Y. *Colloid Surface B: Biointerfaces*, 2008, 67: 224 ~ 229

32 Bradford M M. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248 ~ 254

33 Laemmli U K. *Nature*, 1970, 227: 680 ~ 685

34 Altintas E B, Tüzmen N, Candan N, Denizli A. *J Chromatogr B*, 2007, 853: 105 ~ 113

35 Scholz G H, Wippich P, Leistner S, Huse K. *J Chromatogr B*, 1998, 709: 189 ~ 196

36 Coffinier Y, Vijayalakshmi M A. J Chromatogr B, 2004, 808:51 ~ 56

AN EFFECTIVE MAGNETIC SEPARATION TECHNIQUE FOR ANTIBODY BASED ON THIOPHILIC PARAMAGNETIC POLYMER BEADS

WU Huidan, QIAN Hao, YU Zhijun, YE Wenhui

(College of Material Science and Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021)

Abstract A rapid non-chromatographic technique, based on the thiophilic magnetic beads, was exploited to purify antibodies with high purity and bioactivity. After these paramagnetic beads were synthesized with vinyl acetate and divinylbenzene by microsuspension polymerization, an effective surface modification with divinyl sulfone and 2-mercapto-pyrimidine was carried out to endow these beads with the ability to specifically capture immunoglobulin G (IgG) from human serum. The essential mechanism between the thiophilic ligands and IgG was also investigated. It was found that the specific interaction between 2-mercapto-pyrimidine and IgG mainly depended on electron donor acceptor effect, and this responding specific adsorption to IgG could be performed in a salt-independent manner. We also investigated the relevant factors influencing the isolation, such as pH value, temperature, ion kinds and ion strength. The purity of the isolated antibody exceeded 92%, with bioactivity almost fully maintained (>99%). Although the maximum yield of the isolation process was only 37.7% at NaCl concentration 0.4 mol/L, the recovery of IgG can reach 86.8% by successive extractions. The easy operation, conventional equipments and rapid process make this technique potential in large-scale purification of antibody.

Keywords Paramagnetic, Thiophilic, Microsuspension, Immunoglobulin G, Isolation, 2-Mercapto-pyrimidine