

# 金属螯合亲和层析法纯化抗乙肝核心抗原单克隆抗体

祝骥<sup>1</sup>, 易喻<sup>1</sup>, 吴银飞<sup>2</sup>, 朱克寅<sup>3</sup>, 梅建凤<sup>1</sup>, 陈建澍<sup>1</sup>, 应国清<sup>1</sup>

1 浙江工业大学药学院, 杭州 310014  
2 艾博生物医药(杭州)有限公司, 杭州 310018  
3 杭州博林生物技术有限公司, 杭州 310018

**摘要:** 采用金属螯合亲和层析法, 纯化了小鼠腹水来源的抗乙肝核心抗原单克隆抗体, 对上样缓冲液的 pH 和离子强度、洗脱液种类和洗脱方式进行优化。结果表明, 采用降低 pH 分步洗脱时, 最佳上样缓冲液为 pH 8.0, 20 mmol/L PB + 0.5 mol/L NaCl, 抗体在 pH 5.0 被洗脱下来, 抗体回收率 80%, 纯度 85%。采用咪唑浓度梯度洗脱时, 最佳的上样缓冲液为 pH 8.0, 20 mmol/L PB + 5 mmol/L 咪唑, 抗体纯度大于 95%, 回收率 65%; 在上样缓冲液中不添加 NaCl 而添加少量的咪唑, 更有利于抗体分离。以上洗脱方式都能较好地保持 mAb 的生物学活性, 为该抗体的应用提供了必要的实验基础。

**关键词:** 金属螯合亲和层析, 单克隆抗体, 乙肝核心抗原, 小鼠腹水

## Purification of anti-HBcAg monoclonal antibodies using immobilized metal ion affinity chromatography

Ji Zhu<sup>1</sup>, Yu Yi<sup>1</sup>, Yinfei Wu<sup>2</sup>, Keyin Zhu<sup>3</sup>, Jianfeng Mei<sup>1</sup>, Jianshu Chen<sup>1</sup>, and Guoqing Ying<sup>1</sup>

1 College of Pharmaceutical Science, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China  
2 ABON Biopharm (Hangzhou) Co., Ltd, Hangzhou 310018, China  
3 BIOLINK Biopharm (Hangzhou) Co., Ltd, Hangzhou 310018, China

**Abstract:** Anti-HBcAg monoclonal antibodies from mouse ascites were purified by using immobilized metal ion affinity chromatography. We optimized the conditions of sample loading and elution. The results showed that when the pH stepwise elution was used, the best solution for sample loading was 20 mmol/L phosphate buffer containing 0.5 mol/L sodium chloride at pH 8.0 and the mAb was eluted at pH 5.0. The purity of obtained mAb was more than 85% and recovery reached 80%. When the adsorbed proteins were eluted by using gradient elution of an imidazole, the best solution for loading condition was 20 mmol/L phosphate buffer containing 5 mmol/L imidazole at pH 8.0. The purity and recovery of antibody were up to 95%.

**Keywords:** immobilized metal ion affinity chromatography, monoclonal antibody, Hepatitis B core antigen, mouse ascites

固相化金属螯合亲和层析法(IMAC)是近年来发展起来的一项新型分离技术, 其利用蛋白质表面的一些氨基酸例如组氨酸、色氨酸、赖氨酸等能与过渡金属离子( $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$ 等)发生特殊的相互

作用的原理, 从而对蛋白质加以分离<sup>[1]</sup>。由于它具有配基简单、吸附量大、分离条件温和、通用性强等特点, 逐渐成为分离纯化蛋白质等生物工程产品最有效的技术之一<sup>[2-3]</sup>。但由于其对抗体结合的特异性

不强, 目前很少有应用金属螯合亲和层析法纯化小鼠腹水中 mAb 的报道<sup>[4]</sup>。本研究利用本实验室研制的含有抗乙肝核心抗原单克隆抗体小鼠腹水, 采用固定化金属螯合亲和层析对单克隆抗体进行纯化, 并优化了各步实验条件, 建立了具有抗体纯度高、生物学活性好、易于放大的抗乙肝核心抗原的单克隆抗体的纯化方法, 为该抗体的进一步应用提供了必要的实验基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 含抗乙肝核心抗原单克隆抗体的小鼠腹水

由本实验室制备。

#### 1.1.2 His Trap HP 金属螯合预装柱(镍柱)

柱体积(5 mL), 层析柱尺寸(25 mm×16 mm I.D.), 平均粒径(34 μm), 配基密度(15 μmol Ni<sup>2+</sup>/mL 介质, 介质为 6%高度交联琼脂糖), pH 耐受范围(3~12), 推荐流速(5.0 mL/min), 最大流速(20 mL/min), 购自 GE Healthcare 公司(美国)。

#### 1.1.3 试剂

十二烷基硫酸钠(SDS)、过硫酸铵(AP)、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、丙烯酰胺、二硫苏糖醇(DTT)、四甲基乙二胺(TEMED)均购自 Bio-Rad 公司(美国); 考马斯亮蓝 G250: 购自 GE healthcare 公司(美国); 低分子量蛋白质标准(Protein Marker)购自上海生物工程技术有限公司; 其他化学试剂均为国产分析纯试剂; 所用纯水由 Q-plus 超纯水机制备(Millipore, USA)。

#### 1.1.4 仪器

ÄKTA purifier 蛋白纯化仪(检测波长为 280 nm, GE Healthcare 公司); JM-250 电泳仪(Bio-Rad 公司); Gel Doc 1000 凝胶成像系统(Bio-Rad 公司); WFI UV-2000 型紫外可见分光光度计(广州北锐精密仪器有限公司); DELTA 320 pH 计(Mettler 公司); RT-6000 酶标仪(Rayto 公司); 0.22 μm 孔径的圆盘过滤器、截留相对分子质量为 10 000 MWCO 的超滤管(Millipore 公司); 日立 CR22G 型低温冷冻离心机(Hitachi 公司)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 溶液 pH 对抗体吸附的影响

取适量腹水, 经预处理(10 000 r/min 离心 15 min, 取上清, 经过 0.22 μm 微孔滤膜过滤)后, 分别以 pH 值为 7.5、8.0、8.5 的 20 mmol/L PB + 0.5 mol/L NaCl 缓冲液为上样缓冲液, 用 His Trap HP 金属螯合柱进行纯化, 上样流速为 5.0 mL/min, 采用 20 mmol/L NaAC-HAC + 0.5 mol/L NaCl(pH 6.0、5.5、5.0、4.5、4.0)分步洗脱, 流速为 5.0 mL/min。收集洗脱峰, 超滤管脱盐浓缩。

### 1.2.2 溶液中 NaCl 浓度对抗体吸附的影响

取适量腹水, 经预处理后分别以 0 mol/L、0.5 mol/L、1.0 mol/L、1.5 mol/L、2.0 mol/L NaCl + pH 8.0, 20 mmol/L PB 缓冲液为上样缓冲液, 用 His Trap HP 金属螯合柱进行纯化, 上样流速 5.0 mL/min, 采用 20 mmol/L NaAC-HAC + 0.5 mol/L NaCl(pH 6.0、5.5、5.0、4.5、4.0)分步洗脱, 流速 5.0 mL/min。收集洗脱峰, 超滤管脱盐浓缩。

### 1.2.3 洗脱液种类和洗脱方式对抗体洗脱的影响

取适量腹水, 经预处理后, 1)以 pH 8.0, 20 mmol/L PB + 0.5 mol/L NaCl 缓冲液为上样缓冲液, 采用 pH 6.0、5.5、5.0、4.5、4.0 分步洗脱; 2)以 pH 8.0, 20 mmol/L PB + 0.5 mol/L NaCl + 5 mmol/L 咪唑为上样缓冲液, 采用 5~500 mmol/L 咪唑浓度梯度洗脱; 3)以 pH 8.0, 20 mmol/L PB + 5 mmol/L 咪唑为上样缓冲液, 采用 5~500 mmol/L 咪唑浓度梯度洗脱。以上均采用 His Trap HP 金属螯合柱进行纯化, 上样及洗脱流速均为 5.0 mL/min, 洗脱后收集洗脱峰, 超滤管脱盐浓缩。

### 1.2.4 SDS-PAGE 法鉴定单抗纯度

分离胶浓度 12%, 浓缩胶浓度 4%, 样品用 10 mol/L 二硫苏糖醇进行还原, 电泳后以考马斯亮蓝 R250 染色, 乙醇乙酸脱色, 直至背景脱净为止。然后经凝胶成像仪扫描并分析, 根据 IgG 区带占全部区带面积的百分比来鉴定纯度<sup>[5]</sup>。

### 1.2.5 蛋白浓度的测定

采用考马斯亮蓝法对蛋白质浓度进行定量<sup>[6]</sup>。

### 1.2.6 抗体活性的测定

用间接 ELISA 法测定纯化前后单抗的免疫活性。检测抗原包被酶标板, 根据不同纯化方法按

IgG 回收率将腹水稀释成不同浓度,使纯化后腹水中 IgG 浓度与纯化前相同。同时设 SP2/0 细胞诱生的阴性腹水为对照,比较不同纯化方法获得抗体的效价<sup>[7]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 溶液 pH 对抗体吸附的影响

分别在 pH 7.5、8.0、8.5 (20 mmol/L PB + 0.5 mol/L NaCl)条件下上样, 20 mmol/L NaAC-HAC + 0.5 mol/L NaCl(pH 6.0、5.5、5.0、4.5、4.0)分步洗脱。结果表明: 在 pH 7.5、8.0、8.5 条件下, 单克隆抗体均基本保留在层析介质上, 穿透峰中没有出现抗体带(图 2), 但不同 pH 对腹水中白蛋白吸附影响明显, 随着 pH 的升高, 白蛋白的吸附量明显增加。图 1 显示了上样缓冲液为 pH 8.0 时的层析图, 图 2 显示了不同 pH 对抗体吸附的影响, 从图 3 中可看出, 当上样缓冲液 pH 值为 8.0 时, 回收率和纯度较高, 因此应用金属螯合亲和层析分离 mAb 时, 上样缓冲液 pH 值为 8.0 较好。

### 2.2 溶液中 NaCl 浓度对抗体吸附的影响

分别在 0、0.5、1.0、1.5、2.0 mol/L NaCl(pH 8.0, 20 mmol/L PB 缓冲液)条件下上样, 20 mmol/L NaAC-HAC + 0.5 mol/L NaCl (pH 6.0、5.5、5.0、4.5、

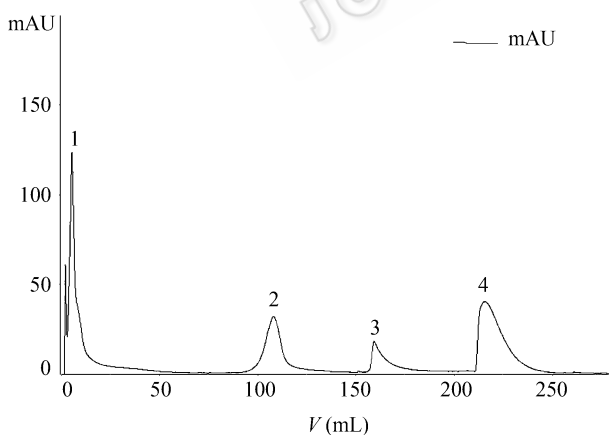


图 1 上样缓冲液含 0.5 mol/L NaCl, pH 为 8.0 时的层析图

Fig. 1 Chromatogram of mAb by using HisTrap HP (pH 8.0, 0.5 mol/L NaCl). 1: pass-through peak; 2: elution peak of impurities at pH 6.0; 3: elution peak of impurities at pH 5.5; 4: elution peak of mAb at pH 5.0.

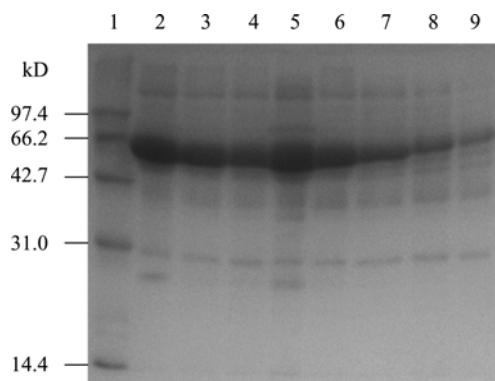


图 2 不同 pH 和 NaCl 浓度上样穿透峰的电泳图

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of mAb purified by using His Trap HP under different sample pH and NaCl concentration. 1: protein marker; 2: pass-through peak at pH 7.5; 3: pass-through peak at pH 8.0; 4: pass-through peak at pH 8.5; 5: pass-through peak at 0 mol/L NaCl; 6: pass-through peak at 0.5 mol/L NaCl; 7: pass-through peak at 1.0 mol/L NaCl; 8: pass-through peak at 1.5 mol/L NaCl; 9: pass-through peak at 2.0 mol/L NaCl.

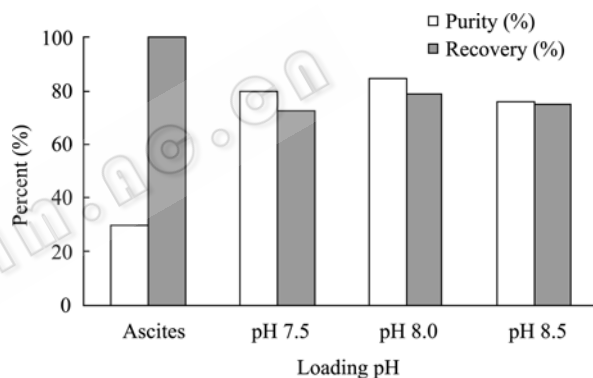


图 3 溶液 pH 对抗体吸附的影响

Fig. 3 Effect of different loading pH on the antibody absorption.

4.0)分步洗脱。结果表明: 在 0、0.5、1.0、1.5、2.0 mol/L NaCl 条件下, 穿透峰中没有出现抗体带, 说明单克隆抗体均能与层析介质结合。但不同 NaCl 浓度对腹水中杂蛋白的吸附有一定影响, 特别对白蛋白的影响最大。随着 NaCl 浓度的增加, 白蛋白在层析介质上的吸附越多, 穿透越少(图 2)。但随着 NaCl 浓度的不断升高, 白蛋白吸附的增加, 在 pH 6.0 洗脱时随着大量白蛋白的洗脱, 会有微量抗体夹带着被洗脱下来, 从而影响抗体回收率。图 1 显示了上样缓冲液中 NaCl 浓度为 0.5 mol/L 时 mAb 在金属螯合亲和柱上层析图, 图 4 显示了上样缓冲液中不同 NaCl 浓度对 mAb 回收率和纯度的影响, 从图 4 可以看出当上样缓冲液中 NaCl 浓度为 0.5 mol/L 时, mAb 的

回收率和纯度较高, 因此本实验认为 0.5 mol/L NaCl 为最佳上样离子强度。

## 2.3 洗脱液种类和洗脱方式对抗体洗脱的影响

### 2.3.1 降低 pH 的洗脱方式

在上述优化上样条件( pH 8.0, 20 mmol/L PB + 0.5 mol/L NaCl)下上样, 采用 20 mmol/L NaAC-HAC + 0.5 mol/L NaCl(pH 6.0、5.5、5.0、4.5、4.0)的分步洗脱。结果表明: 采用 pH 分步洗脱时, 则可将单克隆抗体与杂蛋白较好地分离, 杂蛋白在 pH 5.5 和 pH 6.0 的时候被洗脱下来, 而抗体则在 pH 5.0 被洗脱下来(图 5), 洗脱峰为单一峰, 而且峰形较好, 洗脱较完全, 纯度也较高(图 6)。

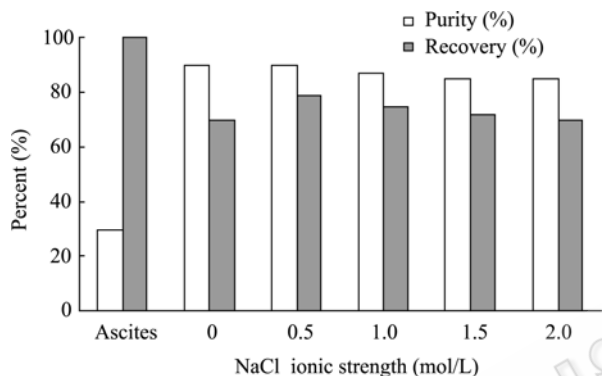


图 4 溶液中 NaCl 浓度对抗体吸附的影响

Fig. 4 Effect of different NaCl concentration on the antibody absorption.

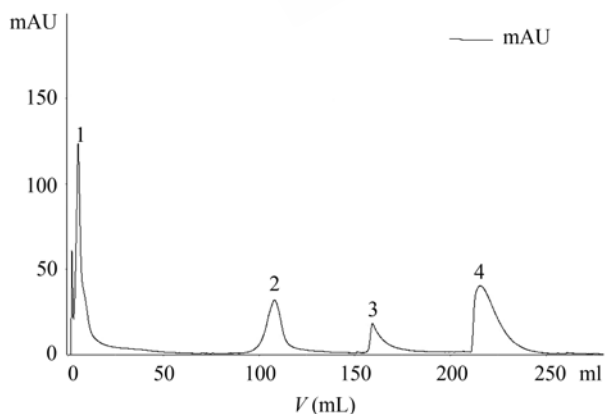


图 5 pH 分步洗脱时的层析图

Fig. 5 Chromatogram of mAb by using His Trap HP and pH stepwise elution. 1: pass-through peak; 2: elution peak of impurities at pH 6.0; 3: elution peak of impurities at pH 5.5; 4: elution peak of mAb at pH 5.0.

### 2.3.2 加入竞争性物质(咪唑)的洗脱方式

以 pH 8.0, 20 mmol/L PB + 0.5 mol/L NaCl + 5 mmol/L 咪唑为上样缓冲液, 采用 5~500 mmol/L 咪唑浓度梯度洗脱, 结果表明: 单克隆抗体与杂蛋白能够被较好的分离, 抗体纯度可达 80%, 回收率达 75%。层析结果如图 7, 电泳结果见图 8。

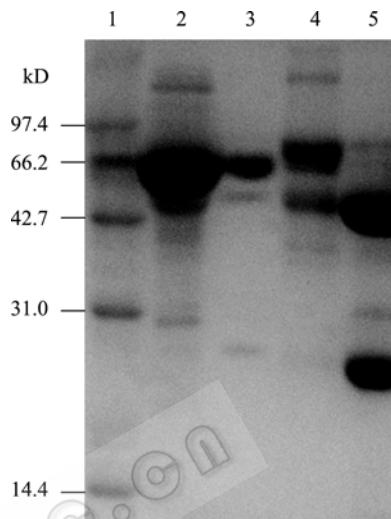


图 6 pH 分步洗脱时收集各峰的电泳图

Fig. 6 SDS-PAGE analysis of mAb purified by using His Trap HP and pH stepwise elution. 1: protein marker; 2: pass-through peak at pH 8.0; 3: elution peak two at pH 6.0; 4: elution peak three at pH 5.5; 5: elution peak four containing mAb at pH 5.0.

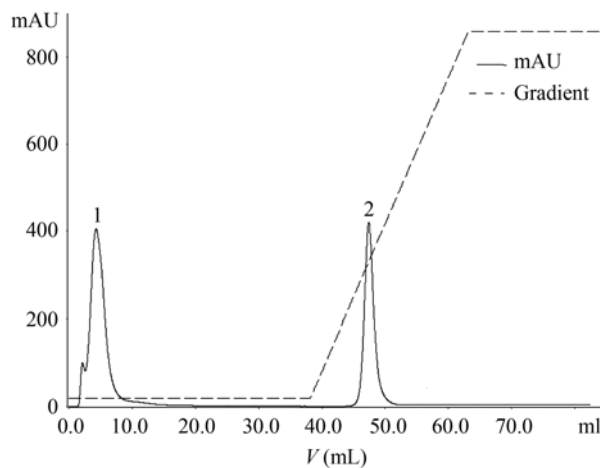


图 7 5~500 mmol/L 咪唑浓度梯度洗脱时的层析图(洗脱液中含 0.5 mol/L NaCl)

Fig. 7 Chromatogram of mAb by using His Trap HP and imidazole concentration gradient elution of 5~500 mmol/L containing 0.5 mol/L NaCl. 1: pass-through peak by using imidazole concentration of 5 mmol/L; 2: elution peak by using imidazole concentration gradient elution of 5~500 mmol/L.

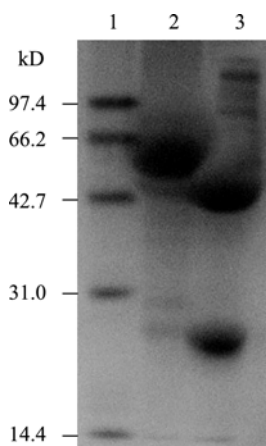


图 8 5~500 mmol/L 咪唑浓度梯度洗脱时收集峰的电泳图 (洗脱液中含 0.5 mol/L NaCl)

Fig. 8 SDS-PAGE analysis of mAb purified by using His Trap HP and imidazole concentration gradient elution of 5~500 mmol/L containing 0.5 mol/L NaCl. 1: protein marker; 2: pass-through peak by using imidazole concentration of 5 mmol/L; 3: elution peak by using imidazole concentration gradient elution of 5~500 mmol/L.

以 pH 8.0, 20 mmol/L PB+5 mmol/L 咪唑为上样缓冲液, 采用 5~500 mmol/L 咪唑浓度梯度洗脱。结果表明: 穿透峰中抗体量比 pH 8.0, 20 mmol/L PB + 0.5 mol/L NaCl+5 mmol/L 咪唑有所增加, 但洗脱后抗体纯度高, 可达 95%, 但回收率只有 65%。层析结果如图 9, 电泳结果见图 10。

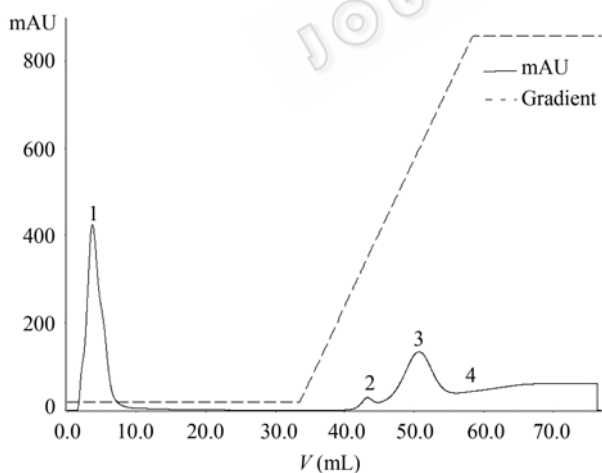


图 9 5~500 mmol/L 咪唑浓度梯度洗脱时的层析图 (洗脱液不含 NaCl)

Fig. 9 Chromatogram of mAb by using His Trap HP and imidazole concentration gradient elution of 5~500 mmol/L. 1: pass-through peak by using imidazole concentration of 5 mmol/L; 2-4: elution peak by using imidazole concentration gradient elution of 5~500 mmol/L.

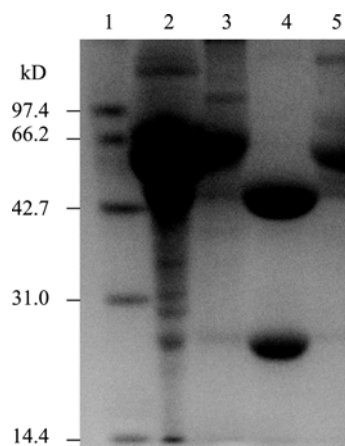


图 10 5~500 mmol/L 咪唑浓度梯度洗脱时收集峰的电泳图 (洗脱液不含 NaCl)

Fig. 10 SDS-PAGE analysis of mAb purified by using His Trap HP and imidazole concentration gradient elution of 5~500 mmol/L. 1: protein marker; 2: pass-through peak by using imidazole concentration of 5 mmol/L; 3: elution peak 2 of Fig. 9; 4: elution peak 3 of Fig. 10; 5: elution peak 4 of Fig. 9.

### 3 讨论

目前纯化 mAb 的方法很多, 如离子交换<sup>[8]</sup>、疏水层析<sup>[9]</sup>及亲和层析<sup>[10]</sup>等, 这些方法各有其优缺点, 固相化金属螯合亲和层析法(IMAC)是近年来发展起来的一项新型分离技术, 具有配基简单、不易泄漏、吸附量大、分离条件温和及通用性强等优点, 已成为分离纯化蛋白质等生物工程产品最有效的技术之一<sup>[11-12]</sup>。特别是在纯化 mAb 的过程中, 由于洗脱条件的温和, 可较好地保持 mAb 的生物学活性, 因而越来越受到人们的重视。

在 IMAC 法中, 影响蛋白质与金属离子螯合力大小的因素主要有两方面: 1)蛋白质表面可结合位点的多少, 如分子表面上组氨酸、色氨酸等可结合基团的含量。2)这些可结合位点的空间分布是否有利于与金属位点的结合<sup>[13]</sup>。因为蛋白质是大分子物质, 与金属离子相比它的分子体积要大得多, 因此蛋白质吸附时, 一个蛋白质分子并不是仅结合一个金属离子, 而是可以结合几个金属位点。正因为如此, 蛋白质的空间结构也成为其吸附过程中一个非常重要的因素<sup>[14]</sup>。本实验中纯化的目标抗体即抗乙肝核心抗原单克隆抗体的分子量大约为 150 kD, 其中重链分子量约为 50 kD, 轻链分子量约为 25 kD。

腹水中最主要的杂蛋白包括白蛋白和转铁蛋白, 其分子量分别为 69 kD 和 80 kD。本实验发现随着上样缓冲液 pH 和离子强度的升高, 蛋白质的总的吸附量增加, 其中白蛋白吸附量增加最为明显。可能随着 pH 和离子强度的增加, 对白蛋白氨基酸残基空间结构影响更大, 可结合位点暴露更多, 从而导致它更容易被吸附。在降低 pH 的分步洗脱过程中, pH 6.0 洗脱下来的主要是白蛋白, pH 5.5 洗脱下来的主要是转铁蛋白, 抗体在 pH 5.0 被洗脱下来。这可能与不同蛋白上与金属离子结合的氨基酸的含量有关系, 白蛋白可能由于可结合的氨基酸含量少, 所以结合力弱, 在洗脱时在较高的 pH 下被洗脱下来, 转铁蛋白可能可结合的氨基酸含量比白蛋白多一些, 结合力强一些, 所以洗脱所需 pH 低一些, 而抗体可能可结合的氨基酸含量较多, 所以结合力强, 洗脱所需的 pH 更低。但随着 pH 和离子强度的升高, 白蛋白吸附的增加, 在 pH 6.0 洗脱时随着大量白蛋白的洗脱, 会有微量抗体夹带着被洗脱下来, 从而影响抗体回收率。从纯度和回收率综合考虑, 实验选择 pH 8.0, 20 mmol/L PB + 0.5 mol/L NaCl 为最佳上样条件。

根据价键理论, 蛋白质与金属的螯合是通过蛋白质表面氨基酸上的给电子原子(如 N 原子等)的孤对电子与金属离子上的空杂化轨道结合形成的。由于  $H^+$  也可提供空杂化轨道, 因此, 可与金属离子同时竞争蛋白质表面上的孤对电子, 即采用降低 pH 值进行洗脱时, 目的蛋白质即可较容易地洗脱下来<sup>[15-16]</sup>。而竞争性物质(含有 N 原子等电子给予体的小分子物质咪唑), 由于可改变蛋白质与金属离子之间的亲和力, 也可将蛋白质洗脱下来。本实验探讨了 pH(6.0、5.5、5.0、4.5、4.0)分步洗脱、咪唑浓度梯度洗脱等对 mAb 纯化的影响。结果显示, 在上述洗脱条件下, mAb 均可被洗脱下来, 而其中以 pH 分步洗脱时, 目的 mAb 的回收率最高, 可达 80%, 纯度达 85%。在实验中也尝试了采用连续 pH 梯度(pH 8.0~4.0)洗脱的方式, 但不能把抗体和其他蛋白分离开。采用 pH 8.0, 20 mmol/L PB + 0.5 mol/L NaCl + 5 mmol/L 咪唑为上样缓冲液, 以 5~500 mmol/L 咪唑浓度梯度洗脱时, mAb 纯度 80%, 回收率 75%。当以 pH 8.0, 20 mmol/L PB+5 mmol/L

咪唑为上样缓冲液, 采用 5~500 mmol/L 咪唑浓度梯度洗脱时的抗体纯度最高, 可达 95%, 但上样时有少量抗体穿透, 回收率降低为 65%。实验也尝试了在上样缓冲液中不添加咪唑, 但加 0.5 mol/L NaCl, 以 0~500 mmol/L 咪唑浓度梯度洗脱, 结果发现 mAb 也不能与其他蛋白分离开。所以, 在上样缓冲液中添加少量的咪唑更有利于抗体分离。以上洗脱方式都能较好地保持 mAb 的生物学活性。

综上所述, 固相化金属螯合亲和层析法(IMAC)能有效地分离纯化单克隆抗体, 分离纯化时, 采用降低 pH 分步洗脱时, 最佳上样缓冲液为 pH 8.0, 20 mmol/L PB + 0.5 mol/L NaCl, 抗体在 pH 5.0 被洗脱下来, 抗体回收率 80%, 纯度 85%。采用咪唑浓度梯度洗脱时, 最佳的上样缓冲液为 pH 8.0, 20 mmol/L PB + 5 mmol/L 咪唑, 抗体纯度大于 95%, 回收率 65%, 在上样缓冲液中不添加 NaCl 而添加少量的咪唑, 更有利于抗体分离。

## REFERENCES

- [1] Jiang W, Graham B, Spiccia L, *et al.* Protein selectivity with immobilized metal ion tacn sorbents: chromatographic studies with human serum proteins and several other globular proteins. *Anal Biochem*, 1998, **255**(1): 47-58.
- [2] Grigoriy SC. Twenty-five years of immobilized metal ion affinity chromatography: past, present and future. *J Biochem Biophys Methods*, 2001, **49**(1): 313-334.
- [3] Sun XD, LI HQ, Sui HY, *et al.* Study on protein separation using immobilized metal ion affinity chromatography. *Chin J Biotech*, 2000, **16**(4): 495-499. 孙旭东, 李红旗, 隋洪艳, 等. 金属螯合亲和层析分离蛋白质的研究. *生物工程学报*, 2000, **16**(4): 495-499.
- [4] Daniela TB, Olivier P, Mustapha B. Immobilized metal-ion affinity chromatography of human antibodies and their proteolytic fragments. *J Chromatogr B*, 2004, **808**(1): 57-62.
- [5] Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. Beijing: Science Press, 2002: 1713-1722. 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 DW. *分子克隆实验指南*. 3 版. 北京: 科学出版社, 2002: 1713-1722.
- [6] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, **72**(1/2): 248-254.
- [7] Shen GX, Zhou RL. *Experimental Techniques of Modern Immunology*. 2nd ed. Wuhan: Hubei Science &

Technology Press, 2002: 154–163.

沈关心, 周汝麟. 现代免疫学实验技术. 2 版. 武汉: 湖北科学技术出版社, 2002: 154–163.

- [8] Andreas S, Andr'e K. Cation exchange chromatography in antibody purification: pH screening for optimized binding and HCP removal. *J Chromatogr B*, 2007, **848**(1): 151–158.
- [9] Raja G, Lu W. Purification of humanized monoclonal antibody by hydrophobic interaction membrane chromatography. *J Chromatogr A*, 2006, **1107**(1/2): 104–109.
- [10] Daisuke E, Ryosuke Y, Kouhei T, *et al.* Effective elution of antibodies by arginine and arginine derivatives in affinity column chromatography. *Anal Biochem*, 2005, **345**(2): 250–257.
- [11] Galina T, Blanka H, Miroslav B, *et al.* Nickel and copper complexes of a chelating methacrylate sorbent in the purification of chitinases and specific immunoglobulin G by immobilized metal ion affinity chromatography. *J Chromatogr A*, 2003, **983**(1/2): 125–132.
- [12] Kyriaki G, Penelope CI, Theodore KC. One-step purification and refolding of recombinant photoprotein aequorin by immobilized metal-ion affinity chromatography. *Protein Expr Purif*, 2003, **27**(2): 384–390.
- [13] Azevedo AM, Rosa PA, Ferreira IF. Integrated process for the purification of antibodies combining aqueous two-phase extraction, hydrophobic interaction chromatography and size-exclusion chromatography. *J Chromatogr A*, 2008, **1213**(10): 154–161.
- [14] Kucerova Z, Majercakova P. Immobilized-metal-ion affinity chromatography as a tool for the qualitative study of pepsinogen phosphorylation. *J Biochem Biophys Methods*, 2001, **49**(1): 523–531.
- [15] Schmit L, Ludwig M, Gaub HE, *et al.* A metal-chelating microscopy tip as a new toolbox for single-molecule experiments by atomic force microscopy. *Biophys J*, 2000, **78**(6): 3275–3285.
- [16] Ueda EK, Gout PW, Morgant L. Ni(II) based immobilized metal ion affinity chromatography of recombinant human prolactin from periplasmic *Escherichia coli* extracts. *J Chromatogr A*, 2001, **922**(12): 165–175.

## 科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介

### 中国主要热带作物基因组染色体图谱

黄东益 王英 主编

978-7-03-025194-7 ¥65.00 2009年9月出版

本书主要分五部分, 分别是热带园艺植物(包括热带果树、热带观赏植物、热带蔬菜)、热带香辛与饮料作物、热带特种经济作物、热带能源植物以及热带药用植物, 介绍了我国 41 科 59 属 144 种热带作物基因组染色体图谱。同时, 在附录部分介绍了 DNA 提取方法、甘蔗染色体荧光原位杂交和荧光原位 PCR 技术体系及热带作物染色体分带技术。这些染色体基础科学数据和实验方法不仅对热带作物杂交育种、细胞分类、起源进化研究具有重要理论意义和应用价值, 而且对我国重要热带作物基因组研究、遗传图谱和物理图谱的构建等都具有重要指导意义。

本书可作为从事热带作物遗传育种学、细胞工程、植物细胞生物学、基因组学等学科的广大科学工作者及农、林、生物院校教师和研究生的参考用书。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书(免邮费)

邮购地址: 北京东黄城根北街 16 号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编: 100717

联系人: 李韶文(010-64000849) 周文宇(010-64031535)

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>