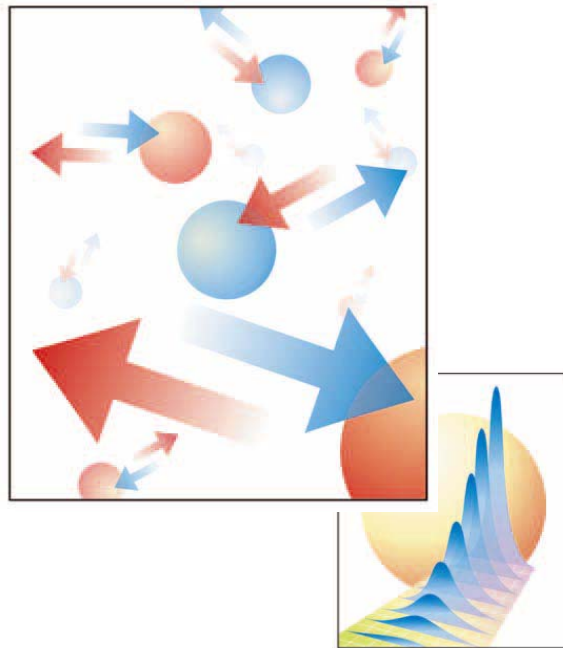


GE Healthcare



离子交换色谱及色谱聚焦 原理和方法

GE Healthcare 生命科学产品使用手册



抗体纯化手册
18-1037-46

重组蛋白手册
蛋白扩增与简单纯化
18-1142-75

蛋白纯化手册
18-1132-29

离子交换色谱及色谱聚焦
原理与方法
11-0004-21

亲和色谱层析
原理与方法
18-1022-29

疏水相互作用
原理与方法
18-1020-90

凝胶排阻层析
原理与方法
18-1022-18

扩张床吸附技术
原理与方法
18-1124-26

微载体细胞培养
原理与方法
18-1140-62

Percoll 方法学与应用
18-1115-69

Ficoll-Paque Plus
淋巴细胞的体外分离
18-1152-69

GST基因融合系统手册1
8-1157-58

二维电泳（固定的pH梯度）
原理与方法
80-6429-60

离子交换色谱及色谱聚焦 原理和方法

目 录

绪论.....	7
符号.....	8
通用缩写.....	9
第一章	
离子交换的原理.....	11
表面净电荷及pH.....	11
离子交换分离的步骤.....	12
分辨率.....	14
效率.....	15
选择性.....	17
离子交换填料的构成.....	21
填料.....	21
官能团.....	23
结合能力及再生.....	25
第二章	
离子交换的应用.....	26
简介.....	26
填料的选择.....	26
目的蛋白获取.....	26
中间纯化.....	27
精细纯化.....	27
快速填料选择及方法建立.....	30
自动填料选择, 方法建立及优化.....	30
手动填料选择, 方法建立及优化.....	31
离子交换分离操作中的注意事项.....	34
pH及离子强度.....	34
阴/阳离子交换剂.....	35
强/弱离子交换剂.....	36
缓冲液选择及准备.....	37

柱子及填料的准备	39
样品准备	39
样品处理	40
样品加载	40
洗脱	42
线性洗脱	42
分步洗脱	44
pH洗脱	46
流速	46
液流控制	47
冲洗及再平衡	48
去垢剂, 变性试剂及其他添加剂	48
结果分析及后续步骤	50
规模扩大	51
设备选择	52
关注离子交换填料	52
常见问题及解决方法	53
生物过程填料: 为生物过程而设计	58
客户定制填料	58
第三章	
离子交换填料	59
简介	59
MiniBeads: 毫克至微克级别蛋白最高分辨率的纯化及分析	60
纯化选项	61
纯化举例	62
执行分离过程	63
清洗	65
填料特性	66
化学稳定性	66
储存	66
MonoBeads: 毫克级别蛋白最高分辨率的纯化及分析	67

纯化选项	68
纯化举例	69
执行分离过程	71
清洗	72
填料特性	73
化学稳定性	73
储存	73
SOURCE: 高通量, 高分辨率且可轻松实现规模扩大的纯化	74
纯化选项	75
纯化举例	76
执行分离过程	80
清洗	82
填料特性	82
化学稳定性	83
储存	83
高效Sephacrose: 高分辨率纯化.....	84
纯化选项	84
纯化举例	86
规模放大	86
执行分离过程	89
清洗	91
填料特性	92
化学稳定性	92
储存	92
快速Sephacrose: 较好分辨率且可轻松实现规模扩大的纯化.....	93
纯化选项	94
纯化举例	97
执行分离过程	100
清洗	102
填料特性	103
化学稳定性	104
储存	104

Sepharose XL: 使用于选定的需要非常高的结合能力来增加产率的蛋白, 且可轻松实现规模扩大	105
纯化选项	105
纯化举例	107
执行分离过程	109
清洗	111
填料特性	111
化学稳定性	112
储存	112
Sepharose Big Beads: 大规模从初步的, 粘性的样品中分离蛋白	113
纯化选项	114
执行分离过程	115
清洗	116
填料特性	116
化学稳定性	117
储存	117
第四章	
纯化策略中的离子交换(CIPP)	119
CIPP应用	120
纯化技术的选择及联合应用	120
离子交换作为初步获取步骤	123
离子交换作为中间纯化步骤	125
离子交换作为最后精细纯化步骤	127
精细纯化步骤中可供选择的技术	128
第五章	
色谱聚焦: 原理与方法	129
简介	129
填料选择	132
缓冲液选择	133
纯化选项	134
缓冲液选项	134

纯化样品	134
装柱	136
pH梯度及缓冲液的选择	137
缓冲液准备	140
样品准备	141
执行分离过程	141
优化	143
问题及解决方法	144
去除Polybuffer	148
清洗	148
填料特性	149
化学稳定性	150
储存	150
色谱聚焦与CIPP	150
附录1	151
样品准备	151
样品稳定性	151
样品净化	152
特殊样品的准备步骤	153
蛋白质沉淀的再溶解	156
脂蛋白的去除	159
酚红的去除	159
低分子量污染物的去除	159
附录2	160
非挥发性及挥发性缓冲液系统	160
适用于阴离子交换层析的非挥发性缓冲液	160
适用于阳离子交换层析的非挥发性缓冲液	161
挥发性缓冲液系统	161
附录3	162
装柱及准备	162
分离柱的选择	164
分离柱装制及柱效	164

附录4	167
纯化设备的选择	167
附录5.....	168
从线性流速(cm/hour)转化为体积流速(ml/min), 及相反过程	168
附录6.....	169
数据转换: 蛋白, 柱压	169
柱压	169
附录7	170
氨基酸列表	170
附录8	172
纯化过程中的分析试验.....	172
附录9.....	174
生物样品的储存	174
附录10	175
柱的清洗	175
去除普通污染物	175
去除蛋白质沉淀, 脂类, 疏水结合的蛋白及脂蛋白.....	175
附加阅读.....	175
参考文献	179
订货信息	180
离子交换	180
色谱聚焦	183
产品目录	184

绪论

生物分子根据它们自身特殊性质的不同，可以通过色谱的方法纯化，如图1所示。离子交换色谱法（IEX）就是根据生物分子表面净电荷的不同而将其分离。

性质	方法
电荷	离子交换色谱（IEX） 色谱聚焦（CF）
大小	凝胶过滤（GF），也叫分子大小排阻。
疏水性	疏水相互作用色谱（HIC），反相色谱（RPC）
生物识别（配体特异性）	亲和色谱（AC）

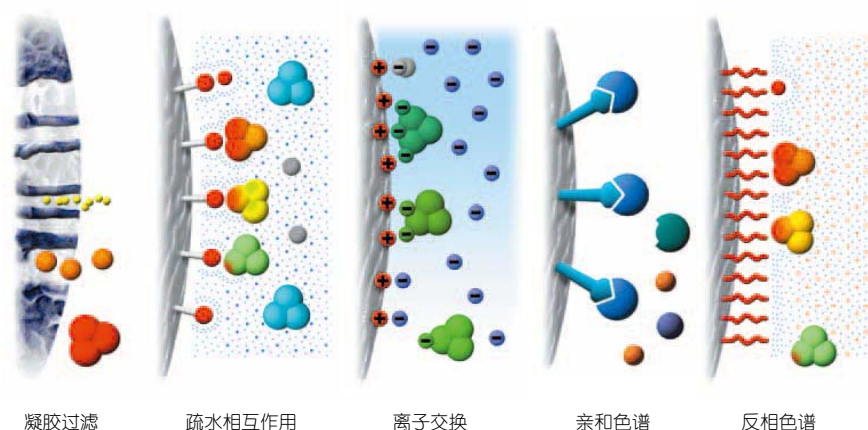


Fig 1. 色谱纯化的分离原理

离子交换色谱法从二十世纪六十年代起应用到生物分子的分离领域，一直在分离纯化生物分子方面起着重要作用。现在离子交换色谱法作为最广泛应用的方法之一，应用于蛋白质，多肽，核酸以及其它带电荷生物分子的分离纯化中，以高载量提供了高分辨率及组分离。该方法可以分离只有微小电荷差别的不同分子，例如只有一个带电氨基酸差别的两个蛋白质。这些特征使得离子交换色谱法可以很好的应用于整个纯化方法的样品获得，中度纯化及精细纯化步骤，既适用于少量样品的纯化分析也可以用于纯化千克级别的样品。

本手册描述了关于这项技术的理论及应用两个方面的原理，可用的填料及怎样选择，应用实例以及普通应用的详细步骤。这些从我们超过40年实践经验中总结出来的规律和经验，必定可以为初学者和行家们应用最新的色谱填料得到最好的结果提供很大帮助。

最后一章介绍了色谱聚焦，也是一种通过生物分子电荷的不同而将其分离的色谱技术，只不过它是识别分子的等电点不同。这种方法分辨率很高，等电点相差0.02pH单位的蛋白可以在实验室规模应用上被分开。

GE Healthcare 提供多种预填充的柱子以及即用型色谱填料，并有一系列手册保证任何规模任何实验室应用任何色谱方法分离纯化样品都是简单有效的。

符号



这个符号表示一般建议，可以在特定情况下改进程序或者提供建议



这个符号指示该建议必须强制执行或者是特别注意的地方给予警示。



这个符号标示了疑难建议帮助分析解决可能遇到的困难。



化学药品，缓冲液，设备。



实验方法。

通用缩写

色谱层析中的缩写:

IEX: 离子交换色谱层析 (文献中也可见IEC)
GF: 凝胶过滤层析 (有时也称为SEC, 大小排阻层析)
AC: 亲和色谱层析
RPC: 反相色谱层析
HIC: 疏水相互作用色谱层析
CF: 色谱聚焦
CIPP: 蛋白获取, 中度纯化及精细纯化
CV: 柱体积
pKa: 酸发生50%解离时的pH值
pI: 等电点, 蛋白表面静电荷为零时的pH值
MPa: 百万帕斯卡
Psi: 磅/平方英寸
SDS: 十二烷基硫酸钠
A280nm, A214nm: 特定波长的紫外吸收
Mr: 相对分子量
N: 用每米的理论板数表征的柱效
Rs: 分辨率, 样品峰之间分离的程度

产品名称中的缩写:

HMW: 高分子量
LMW: 低分子量
Tricorn PE: 聚醚醚酮制成的柱子
Tricorn GL: 玻璃制成的柱子
HR: 高分辨率
PC: precision column, 精密分析柱

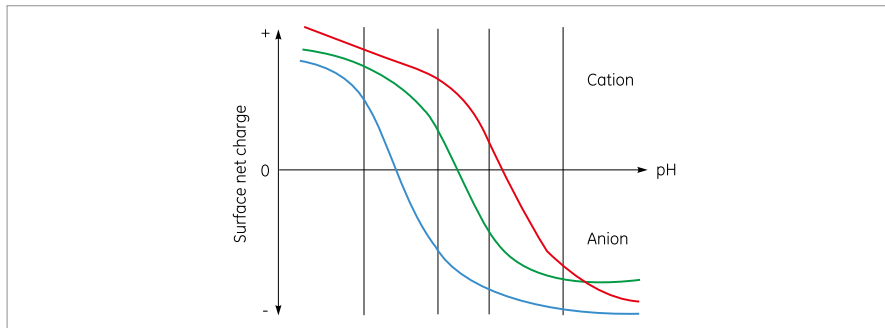
第一章 离子交换的原理

本章将概括性的介绍所有离子交换分离过程中理论上的原理。对这些原理的充分理解将使您充分认识到离子交换层析强大的分离纯化能力。有关离子交换应用方面的介绍包括在第二章中。

表面净电荷及pH值

离子交换对分子的分离是基于它们表面净电荷的差异。分子的电荷性质差异较大，它们所带的总电荷，电荷密度以及表面电荷分布的差异会导致它们与加载电荷后的离子交换层析填料的结合能力不同。由于结构及所处的化学微环境不同，分子内形成表面净电荷的带电基团具有不同的pKa值。

所有带有可离子化基团的分子可以用滴定方法来测定，且它们的表面净电荷具有高度的pH依赖性。以蛋白质为例，它由许多包含有弱酸弱碱基团的不同氨基酸组成，它们的表面净电荷会随着周围环境pH值的改变而逐渐改变，也就是说蛋白质分子为两性分子。每种蛋白具有独特的净电荷与pH相关性，可从滴定曲线中看出。该曲线反映了蛋白总的净电荷如何随着环境pH值的改变而变化。图2展示了几种理论上的蛋白质滴定曲线。(这些曲线可通过等点聚焦与电泳相结合的方法获得，但随着现代快速方法学解决方案的发展，真实的滴定曲线已很少用到。)



对于某一特定蛋白而言，其表面净电荷与pH之间的相对关系是独特的，离子交换层析正是利用了这一特点。在离子交换层析分离过程中，通过控制带电分子与带相反电荷的离子交换填料之间的可逆相互作用来实现特定分子的结合与洗脱，从而达到分离的效果。处于与等电点相同pH值环境中的蛋白质表面净电荷为零，不会与带电的填料发生相互作用。然而当所处环境pH值高于其等电点时，蛋白质会同带有正电荷的填料，也就是阴离子交换剂相结合；而当所处环境pH值低于其等电点时，蛋白质会同带有负电荷的填料，也就是阳离子交换剂相结合。除了离子交换相互作用外，其他类型的相互作用也会存在，但这些相互作用效果都十分小，且主要是范德华力及非极性相互作用所造成。


离子交换纯化过程的步骤：

离子交换层析填料由球形的颗粒组成，表面由带有正电荷或负电荷的离子基团所取代。填料通常是多孔的，从而可具有更多的内表面积。将填料装入柱中从而形成分离柱床。随后用缓冲液对柱床进行平衡，从而使缓冲液进入填料的孔道以及颗粒之间的空间。关于装柱的更多细节，参见附录3。

图3展示的是分离的过程，如下。

平衡缓冲液要选择适当的pH值和离子强度，以保证加载样品时目的蛋白能够结合在填料上而杂质尽量不结合。结合的蛋白将会被有效的富集在离子交换柱上，而不具有正确表面净电荷的蛋白则在加载后以与缓冲液，洗脱相同的速度穿过分离柱，这取决于所要加载的样品总体积。

注意：样品所处的条件对于获得最有效的高分辨率，基团的分离以及获得最大的负载能力十分重要。理想状态的样品应该一直处于与起始条件相同的环境下。（见附录1，样品准备，特别是缓冲液交换及脱盐一章，详见第156页）

 注意：样品所处的条件对于获得最有效的高分辨率，基团的分离以及获得最大的负载能力十分重要。理想状态的样品应该一直处于与起始条件相同的环境下。（见附录1，样品准备，特别是缓冲液交换及脱盐一章，详见第156页）

当所有的样品都已加载至离子交换柱，并且不结合蛋白通过冲洗穿过分离柱后（如紫外信号重新返回基线），您可改变条件来洗脱结合的蛋白。通常情况下，可通过增加缓冲液的离子强度（盐浓度），或者有时候会改变pH值来进行洗脱。随着离子强度的增大，盐离子（典型的是钠离子和氯离子）会同结合的组分竞争填料表面的电荷，此时一种或多种结合的组分会被洗脱下来，并移出分离柱。在选定pH条件下，具有最低净电荷值的蛋白质会首先随着离子强度的增加而被洗脱下来。与此相似，在选定pH条件下，具有最高净电荷值的蛋白质会保留时间最长，最后被洗脱下来。蛋白所带的净电荷越多，洗脱时所需要的离子强度就越高。通过使用不同的梯度来改变离子强度，蛋白质可以以纯化浓缩后的形式被洗脱下来。

在洗脱过程末尾，非常高离子强度的冲洗步骤会移除掉几乎所有紧密结合的蛋白。在下一个运行过程对更多蛋白样品进行分离前，应使用初始缓冲液对分离柱进行再平衡。

另外，还可选择条件使污染分子最大程度的结合在柱子上，目的蛋白穿透分离柱，从而达到去除污染的目的。

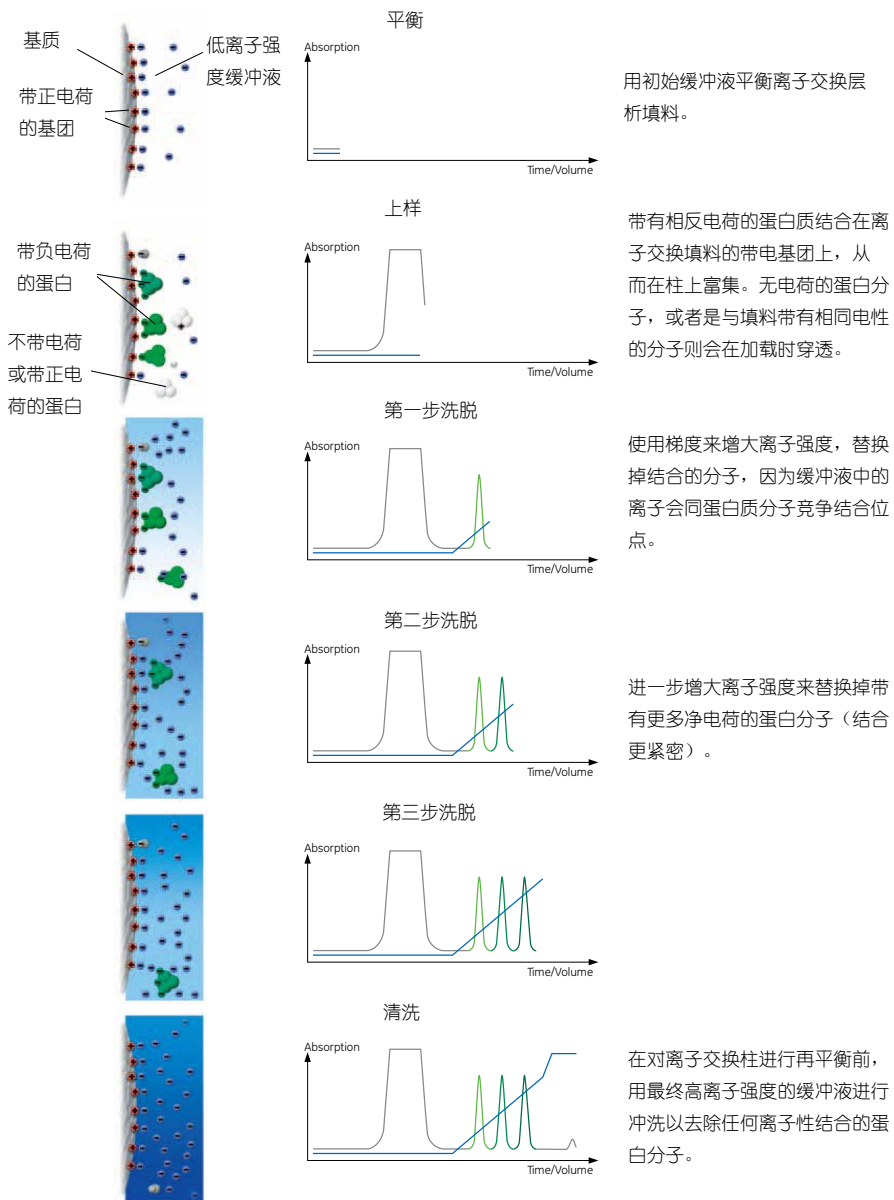
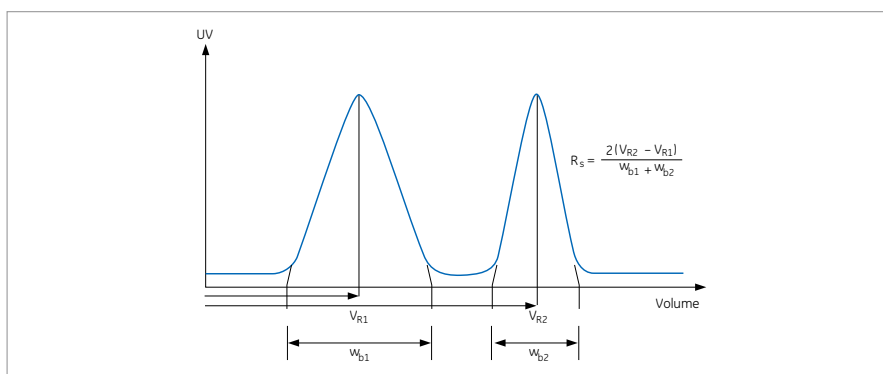


图3 阴离子交换分离过程的原理。

分辨率

离子交换层析的分辨率由三方面组成：洗脱下来的不同峰的分度程度（填料的选择性），分离柱产生窄而对称峰的能力（柱效），当然还有能应用的样品的量。这些因素会被应用中的一些问题所影响，如填料特性，结合及洗脱的条件，分离柱的装制及流速等，详见第二章，离子交换层析的应用。

分辨率 R_s 的定义为：两个样品峰尖之间的距离与两个峰宽度平均值的比值。 R_s 值可通过色谱图来确定，如图4。



洗脱体积及峰的宽度采用相同的单位来度量以获取无量纲的分辨率值。 R_s 会给出一个峰分离程度的度量，并可据此决定是否有必要进一步优化色谱层析过程。当分辨率值为1时（图5），假定峰是对称的且大小基本相同，则98%的样品峰可获得98%的纯度。基线分离的分辨率要求 $R_s \geq 1.5$ ，在此值时样品峰的纯度为100%。

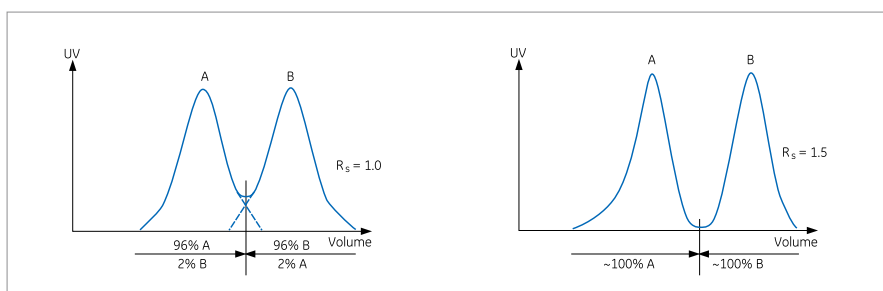


图5. 不同分辨率的分离结果。

一个单独的，高分辨率的样品峰并不一定是一种纯的物质，有可是在选定洗脱条件下无法获得分离的一系列组分。

柱效

柱效（从装好的柱床上洗脱出窄而对称的样品峰的能力）同分离柱的峰变宽现象有关，通常也称为理论板数（见附录3，柱效的确定）。峰变宽现象产生的主要原因之一是溶液中分子，如蛋白质多肽和寡核苷酸的纵向扩散。峰变宽可通过减少扩散距离来减小。在任何情况下，完美填充的分离柱对于分辨率十分重要。如果分离柱填充的不均衡，压得太紧或太松，或者含有气泡，则会导致分离柱中不正常通道的产生（柱中缓冲液的不均衡通过）及峰变宽现象，从而降低了分辨率。图6展示了高分辨率柱效所必须的一些参数。显然柱材颗粒的大小是决定分辨率的一个重要因素。通常，在正确的洗脱条件以及优质填充的分离柱中，最小体积的颗粒会产生最窄的样品峰。

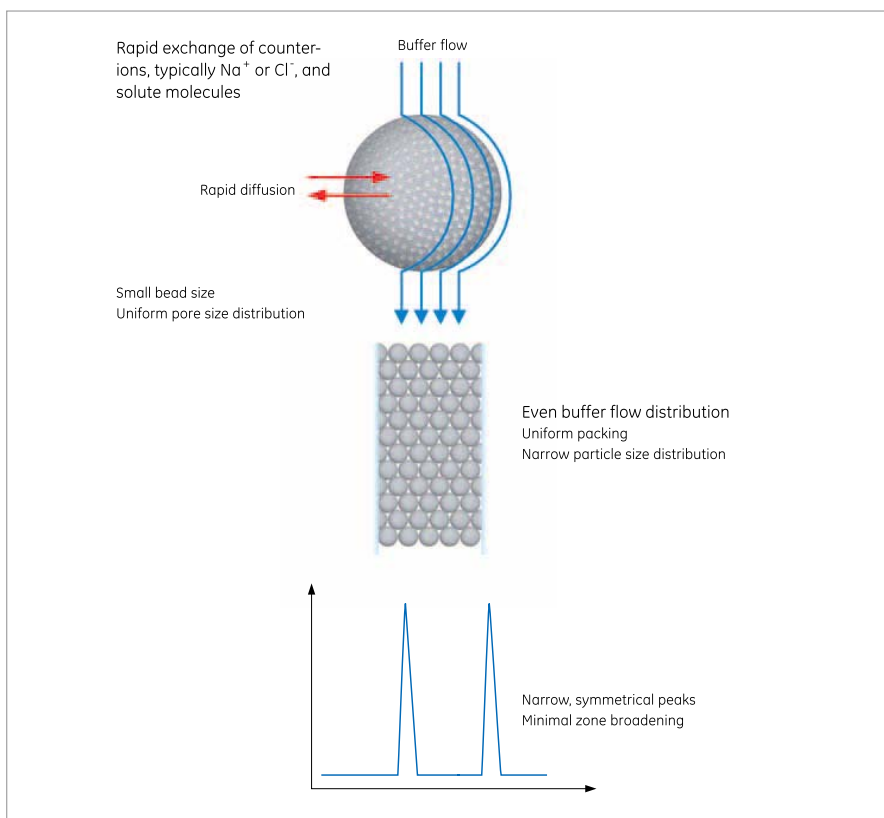


图6. 影响分离柱柱效的因素。

图7通过在近乎相同的条件下比较几种不同离子交换填料的分离效果，展示了填料颗粒直径大小对于柱效的影响。注意，填料选择性的不同也会影响最终的分辨率。

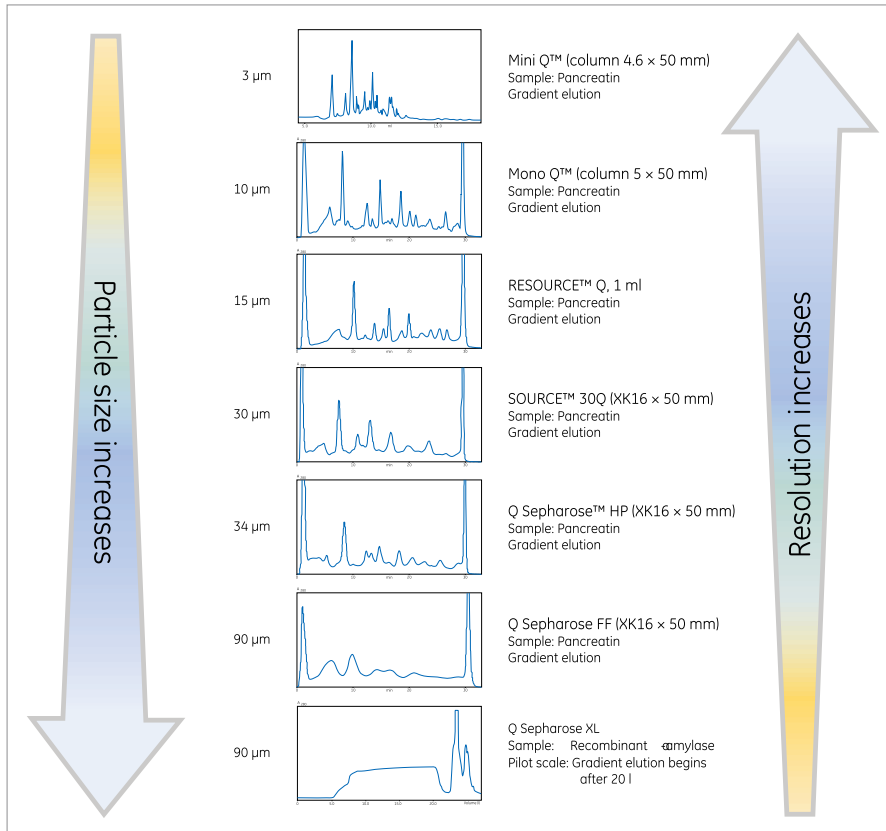


图7. 填料颗粒大小及选择性对最终分辨率的影响。

- 尽管以柱效来表征的分辨率可以通过减小分离填料颗粒大小来提高，但颗粒尺寸的减小会增加系统的背景压力，需要减小流速，从而增加了分离运行时间。因此需要将填料与所需的纯化过程相匹配（流速，分辨率，纯度等）。
- 如果将大体积的样品加载至装有小尺寸颗粒的分离柱时，高度浓缩的样品的黏度会降低分离柱的分辨率。

选择性

好的选择性（样品峰之间分离的程度）对于决定分辨率而言是一个比柱效更加重要的因素，它不仅取决于填料的性质及所带功能基团的数目，还取决于具体的试验条件，如pH值（会影响蛋白质的带电性质），离子强度和洗脱条件。当使用合适的色谱层析填料时，因为这些条件可以轻松的，可预见性的进行人为调整，因而离子交换色谱层析具有获得极高分辨率的潜能。

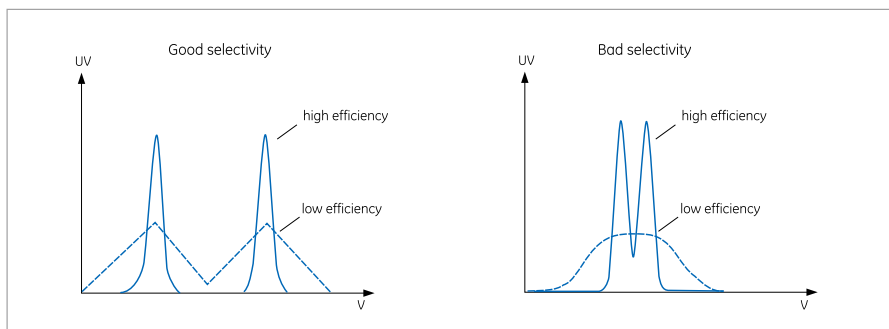


图8. 选择性及柱效对分辨率的影响。

选择性与PH值

当使用离子交换层析柱时，谨慎的选择pH值以使目的蛋白净电荷之间的差异最大化，可获得好的选择性。图9（下页）强调了pH的重要性。

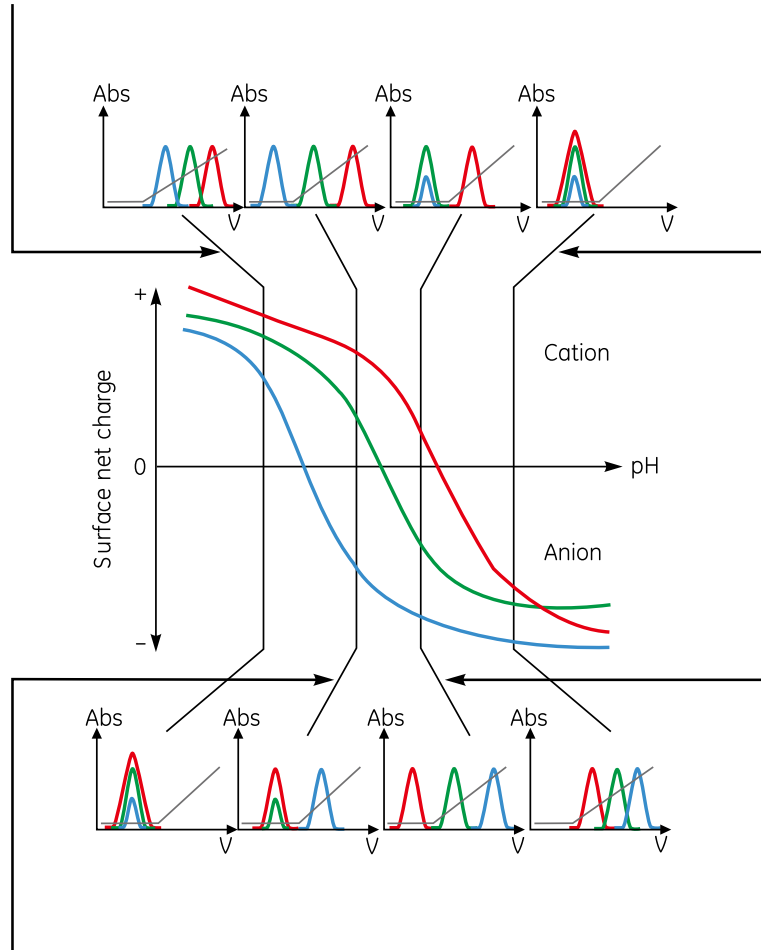
在某一选定pH条件下，如果不同蛋白的滴定曲线上有最大的分离（如各蛋白此时净电荷的差异最大）；或者所选用的离子交换剂与蛋白电性相反，那么很有可能会获得最佳的选择性。

蛋白洗脱的顺序并不能完全确定的预测出来，因为滴定曲线（通过电泳的迁移率而得出）反应的是整个蛋白的净电荷，而离子交换色谱层析反应的是蛋白表面的净电荷。

选择性及缓冲液的pH

大多数酸性pH值：三种蛋白质都处于它们的等电点之下，带正电荷而只同阳离子交换剂结合：蛋白按照它们所带电荷的多少顺序洗脱下来。

大多数碱性pH值：三种蛋白质都处于它们的等电点之上，带负电荷而只同阴离子交换剂结合：蛋白按照它们所带电荷的多少顺序洗脱下来。



弱酸pH条件下：蓝色蛋白在等电点之上带有负电荷，而其他蛋白仍然带有正电荷。蓝色蛋白可同阴离子交换剂结合，其他蛋白穿透从而达到分离效果。同样，红色和绿色蛋白可通过阳离子交换柱分离，因为蓝色蛋白会穿透而不结合。

弱碱pH条件下：红色蛋白在等电点之下，因而带有正电荷。红色蛋白可同阳离子交换柱结合而同其他蛋白分离开来；同样绿色和蓝色蛋白可通过阴离子交换柱同红色蛋白分离开。

图9：pH值对蛋白结合及洗脱模式的影响。

选择性及洗脱

下图展示的是利用离子交换色谱层析分离蛋白质的通常模式，通过采用线性梯度或分步骤的增加缓冲液中的离子强度（典型的采用氯化钠）的方式来洗脱蛋白。洗脱过程中，紫外吸收值及电导曲线会分别表征蛋白峰的洗脱及盐离子浓度的改变。

样品加载，洗脱，冲洗及再平衡过程中使用的缓冲液体积用柱床体积CV表示，如5 CV=5 ml 表示该分离柱的柱床体积为1毫升。利用柱床体积来描述分离过程有利于方法的建立以及放大实验规模时将方法应用于不同规格的分立柱。

梯度洗脱（图10a）通常用于未知的样品（尽可能多的组分结合在分离柱上，并将它们分别的洗脱以观察蛋白的总体情况），或需要高分辨率的分离及分析过程。

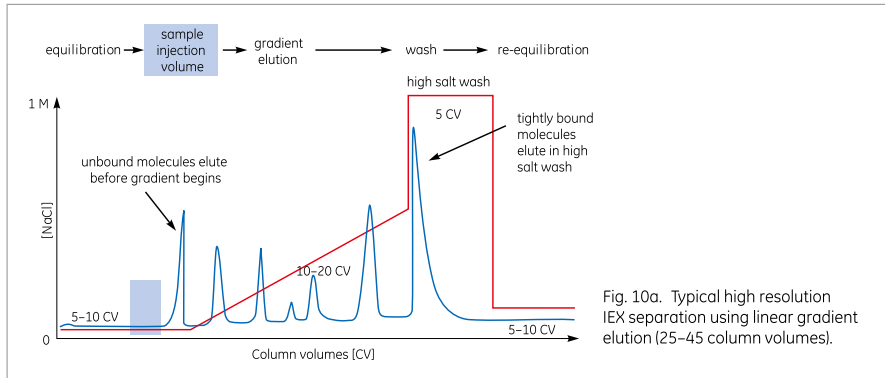


图10a，线性梯度洗脱模式下典型的高分辨率的离子交换色谱分离(25-45柱床体积)。

分步洗脱有几种不同的使用方式。当用线性梯度洗脱方式对纯化过程进行优化后，改用分步洗脱可在缩短纯化时间，减少缓冲液用量的同时保持原来的纯度。（图10b）

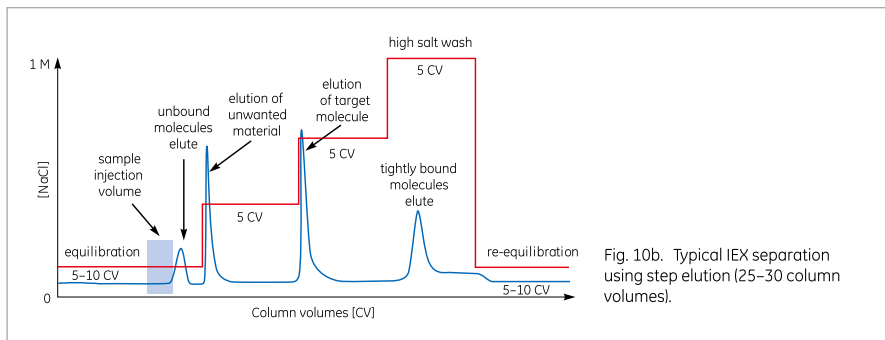


图10b，分步洗脱模式下典型的离子交换色谱分离(25-30柱床体积)。

分步洗脱还可被用于分组分离，将目的蛋白富集并迅速的将他们从不需要的分子中移出（10c）。目的蛋白会以富集浓缩的方式被洗脱下来。

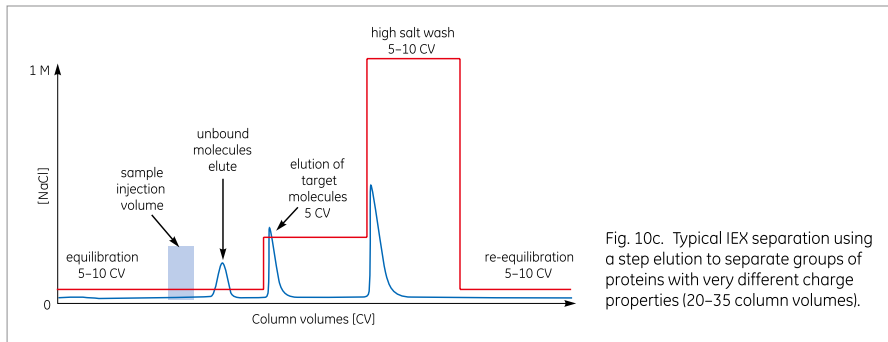


图10c，分步洗脱模式下典型的离子交换色谱分离，将带有非常不同电荷的蛋白分组分离。(25-35柱床体积)。

偶尔也会用分步洗脱来去除体系中的污染分子：选定条件使污染物分子最大量的结合在离子交换填料上而目的蛋白穿透，从而达到分离的目的（图10d）。必须注意确保分离柱有能力结合所有的污染物分子。

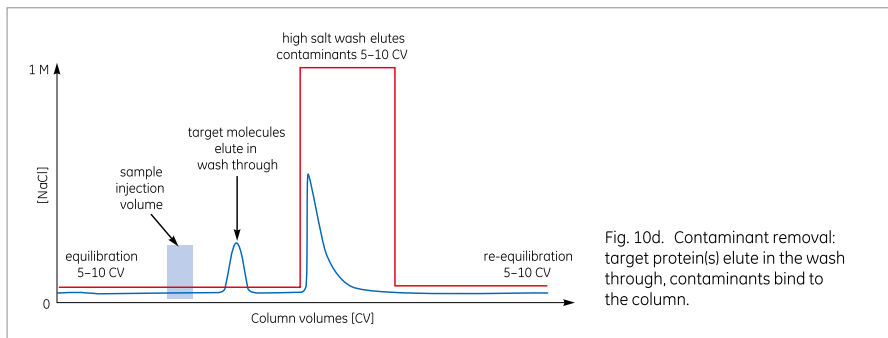


图10d，污染物去除：污染物结合在分离柱上，而目的蛋白穿透。

离子交换填料的组成

离子交换层析填料由多孔或无孔的材料制成，主要根据他们的物理性质，对剧烈清晰条件的化学抗性及其低水平的非特异性结合而选定。填料被许多功能性基团所替换，而后者决定了填料所带的电性。

填料

- 材料的多孔性可提供一个大的覆盖有带电基团的表面积，因而保证了高结合能力。在分离大的生物分子时，多孔性材料也有一定的优势。无孔性材料更适用于需要极端高分辨率，且需要避免扩散效应的分离过程。
- 惰性填料可减小同样品组分的非特异性结合。
- 高物理稳定性保证了在盐离子浓度或pH发生极端改变时，柱床体积保持恒定；这样可增加系统的可重复性，减少不必要的重装柱。
- 高物理稳定性及颗粒尺寸的一致性有利于高速液流的运行，特别是在清洗或再平衡步骤中，可增加系统的通量及工作能力。
- 高化学稳定性保证了在必要时可用剧烈的清洗溶液来对填料进行清洗。
- 现代离子交换色谱层析填料使用聚合物或琼脂糖为基础的填料，这样不仅满足对于高结合能力，物理及化学稳定性的要求，还可生产出合适尺寸大小的颗粒来满足不同的应用（表1）。

表1，离子交换填料。

	Form	Mean particle size
MiniBeads™	Polystyrene/divinyl benzene	3 μm
MonoBeads™	Polystyrene/divinyl benzene	10 μm
SOURCE 15	Polystyrene/divinyl benzene	15 μm
SOURCE 30	Polystyrene/divinyl benzene	30 μm
Sepharose High Performance	Agarose 6%	34 μm
Sepharose Fast Flow	Agarose 6%	90 μm
Sepharose 4 Fast Flow	Agarose 4%	90 μm
Sepharose XL	Agarose 6%, dextran chains coupled to agarose	90 μm

MiniBeads填料由聚苯乙烯制成，以联乙烯苯为交联剂，可产生高度球形（单分散的），非常小（3 μm），无孔的颗粒；当非常高的分辨率比高结合能力或高流速更重要是，该类型填料可进行微量制备或分析型的纯化过程。

MonoBeads和SOURCE填料是由聚苯乙烯及联乙烯苯制成的高度球形（单分散的），非常小（10, 15或30 μm ），多孔的颗粒（图11）；该类填料有利于高流速条件下高分辨率的分离过程。

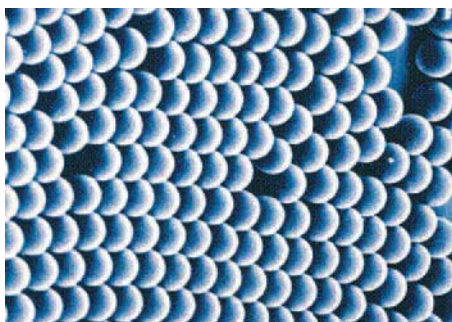


图11, MonoBeads的电镜照片展示了球形单分散的颗粒。

Sepharose填料基于琼脂糖链，成束状排列且具有不同程度的链内交联（图12）；因而所形成的不同硬度的大孔颗粒具有很高的结合能力及低非特异性吸收。可根据纯化过程对分辨率的要求程度，结合能力及流速来选择最合适的填料。例如，利用Sepharose High Performance（34 μm ）进行的梯度洗脱具有很高的分辨率；而更大尺寸的Sepharose Fast Flow (90 μm)或Sepharose Big Beads (200 μm)则更适用于高结合能力，高流速下的分步洗脱。

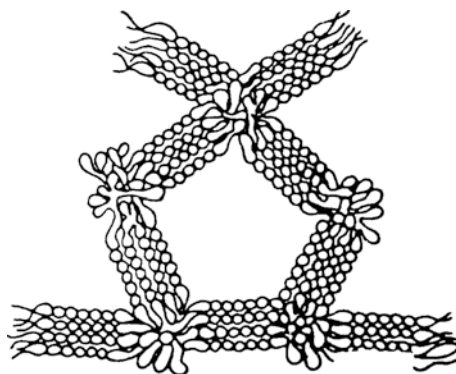


图12, 交联的琼脂糖填料的结构（Sepharose）。

许多不同的填料已经使用了很多年，并且对它们的称呼仍然存在于一些科学文献中，如Sephadex™, Sephacel™ and Sepharose CL-4B。在多数情况下，最新开发出的填料会提供改进的结合能力以及更高的化学，物理稳定性。为使您能够受益于更快的分离过程及改进的工作能力，请将旧的分离方案转移并优化至现代分离填料。

功能基团

替换至色谱层析填料的功能基团决定了离子交换填料所带的电荷，例如带正电的阴离子交换剂或带负电的阳离子交换剂。

表2，离子交换剂中使用的功能基团。

Anion exchangers		Functional group
Quaternary ammonium (Q)	strong	$-O-CH_2N^+(CH_3)_3$
Diethylaminoethyl (DEAE)*	weak	$-O-CH_2CH_2N^+H(CH_2CH_3)_2$
Diethylaminopropyl (ANX)*	weak	$-O-CH_2CHOHCH_2N^+H(CH_2CH_3)_2$
Cation exchangers		Functional group
Sulfopropyl (SP)	strong	$-O-CH_2CHOHCH_2OCH_2CH_2CH_2SO_3^-$
Methyl sulfonate (S)	strong	$-O-CH_2CHOHCH_2OCH_2CHOHCH_2SO_3^-$
Carboxymethyl (CM)	weak	$-O-CH_2COO^-$

* DEAE与ANX带电基团的活性末端是相同的，区别在于带电基团的碳链长度不同。DEAE以二乙基铵基团结合在琼脂糖上。而ANX具有二乙基氨基丙基基团，阻止了四价基团的形成，从而具有相对于DEAE不同的选择性。

填料的强和弱是指功能基团的离子化状态随着pH值的改变而改变的程度，而不是功能团同蛋白质分子结合能力的强弱。强离子交换剂在pH发生改变时，离子交换能力不变（图13）。这些离子交换剂并不会随着pH的改变而获取或者丢失质子，因而不具有缓冲能力，在一个宽pH范围内仍能充分的带有电荷。强离子交换剂包括Q（阴离子），S和SP（阳离子）。

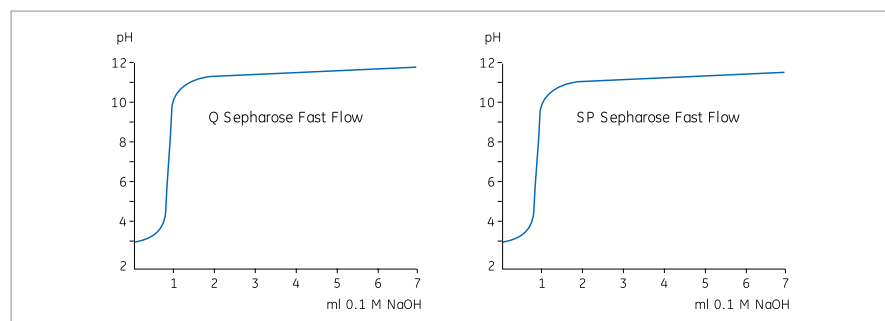
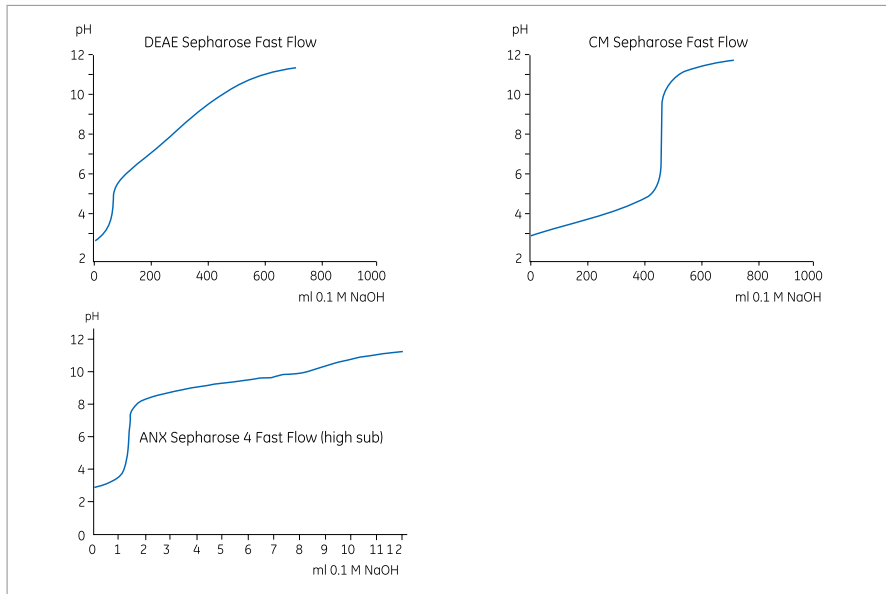


图13.滴定曲线展示了强离子交换剂Q和S的离子交换能力。大约5ml的Q或S Sepharose Fast Flow用1M KCl进行平衡，并用0.1M NaOH进行滴定。

强离子交换剂有如下优点：

- 由于填料的带电性质不随pH的改变而变化，因而分离过程的建立及优化会非常迅速和轻松。
- 由于电荷相互作用没有任何中间形式，因而相互作用机制简单。
- 在高或低pH条件下，样品结合能力仍然保持，因为离子交换剂不会丢失电荷。

大多数的蛋白质等电点在5.5至7.5之间，能够被强或弱离子交换剂所分开。同强离子交换剂相比，弱离子交换剂（如DEAE,ANX,CM）的好处在于它们可提供不同的选择性。缺点在于由于弱离子交换剂会随着pH的改变而获得或丢失质子，因而它们的离子交换能力也会随着pH的改变而变化（图14）。



🔄 当用强离子交换剂（替换为Q, S或SP）不能获得所需的选择性时，可试用弱离子交换剂，如DEAE, CM或 ANX Sepharose Fast Flow。

结合能力及样品回收

离子交换填料的能力是指定量测定其获取相反电性离子（蛋白质或其他带电分子）的能力。总离子结合能力是指每毫升填料所包含的带电功能基团的数目，对每种填料是一个固定的参数。更适当的表征为，在给定试验条件下，离子交换填料所结合蛋白质的实际量。这称为填料对于特定蛋白的有效载量。如果给定条件包括填料所处的液流速度，则结合量称为填料的动态载量。本手册中结合载量的图是指动态载量。

有效载量及动态载量取决于蛋白质的性质，离子交换填料及实验条件。离子交换填料的结合能力回溯这特定蛋白的分子大小（大小会影响分子进入填料中所有小孔的能力）及其电荷/pH之间的关系（蛋白质必须在选定的pH条件下以充足的表面密度带有正确的净电荷）而不同。对于早期的离子交换填料，大的生物分子由于不能够到达功能基团，因而极大的减弱了结合能力。现在，离子交换填料如MonoBeads, Source和Sephacrose等对于球状蛋白的排阻极限高达 1×10^6 以上，因而适用于绝大多数的生物大分子的分离。但结合能力仍然会随着生物分子大小的不同而有所不同。当比较不同离子交换填料的结合载量时，需考虑试验条件如pH，离子强度，相反电性离子，流速及温度等。

现代离子交换填料都具有低水平的非特异性吸收，因而在合适的分离条件下，样品的回收率很高，通常可达90-100%。

第二章 离子交换的应用

简介

本章包括对于如何控制实验条件以获得成功的分离的一些应用性建议，以及如何为每个应用过程选择最合适的填料或预装柱的指导方针。离子交换分离过程的最终分辨率取决于选择性及柱效。反过来，这些参数会被填料颗粒大小，多孔性及装柱质量所影响。分离效果收到很多因子的影响，如样品中每种蛋白表面净电荷随着pH而改变的方式，缓冲液的pH值及离子强度，以及洗脱条件。对于每种参数作用及重要性的理解可保证每个分离过程都按照所需要的分辨率，通量以及速度来执行。


填料选择


现代离子交换填料的来源及区别已在第一章中解释。对合适填料的选择取决与一些因素，如最终纯化的规模，分离的目的（如在获取步骤中富集样品或在最终精细纯化过程中获得高分辨率）及所需的通量。有关纯化策略中目的蛋白获取，中度纯化及最终精细纯化步骤的更多细节，参见第四章。


获取


最初的获取步骤的目的是分离，富集并稳定目的产物，该步骤使用的填料应该具有高流速及高结合能力。从如下填料中选择：

Sepharose Fast Flow (90 μm 颗粒大小) -适用于需要好的分辨率的获取或中度纯化步骤（流速可达300cm/h）。

 在获取步骤中，当较小尺寸颗粒的应用收到黏度及背景压力的限制时，选择Sepharose Big Beads (200 μm 颗粒尺寸)。

 当强离子交换剂（替换基团为Q, S, 或SP）不能够获得所需的选择性时，需选用弱离子交换剂，如DEAE,CM或ANX Sepharose Fast Flow。


 当澄清样品中选定蛋白需要高结合能力及快速分离时，选用Sepharose XL (90 μm 颗粒大小) 进行获取。


 如果只需要毫克级别的产物，且获取步骤不需进行规模扩大，请根据所需的结合能力使用高效分离填料，如Sepharose High Performance, MonoBeads 或MiniBeads。注意，当使用MonoBeads 或MiniBeads 时，特别重要的一点是需要去除颗粒物以避免分离柱的堵塞。

中度纯化过程

中度纯化过程的目的是去除绝大多数的大量杂质，因而选用的填料应该具有高结合能力及高分辨率。从如下分离柱中选择：

- SOURCE 15 (15 μ m) -实验室或更大规模应用中的的中间分离过程需要高分辨率及高通量（流速达1800cm/h）。
- Sepharose High Performance (34 μ m)-适用于需要高结合能力和高分辨率的中度纯化过程（流速达150cm/h）。
- Sepharose Fast Flow (90 μ m)-需要好的分辨率的中度纯化过程（流速达300cm/h）。

 如果只需要微克到毫克级别的样品，且中度纯化步骤不会进行规模放大，建议根据结合能力需求选用MonoBeads 或MiniBeads。

 当流速比分辨率更重要时，对大规模的应用或大量体积样品，可用SOURCE 30作为SOURCE 15的一种替代，流速可达2000cm/h。

精细纯化步骤

精细纯化步骤的目的是获得最终的纯的样品，去除痕量杂质或十分接近的物质，因而所选用填料应该能够提供可能的最高的分辨率。从如下分离填料中选择：

- MiniBeads (3 μ m)-当最高分辨率十分重要时，适用于微小规模的精细纯化。
- MonoBeads (10 μ m)- 当最高分辨率十分重要，且需要比MiniBeads更大的纯化规模时，适用于实验室规模的精细纯化。
- SOURCE 15 (15 μ m)-适用于需要高分辨率高通量的实验室规模或更大规模的精细纯化（流速可达1800cm/h）。


 当流速比分辨率更重要时，对大规模的应用或大量体积样品，可用SOURCE 30作为SOURCE 15的一种替代，流速可达2000cm/h。

图15给出了目前所能获得的离子交换填料及预装柱的全面选择指导信息。

离子交换填料的选择指导

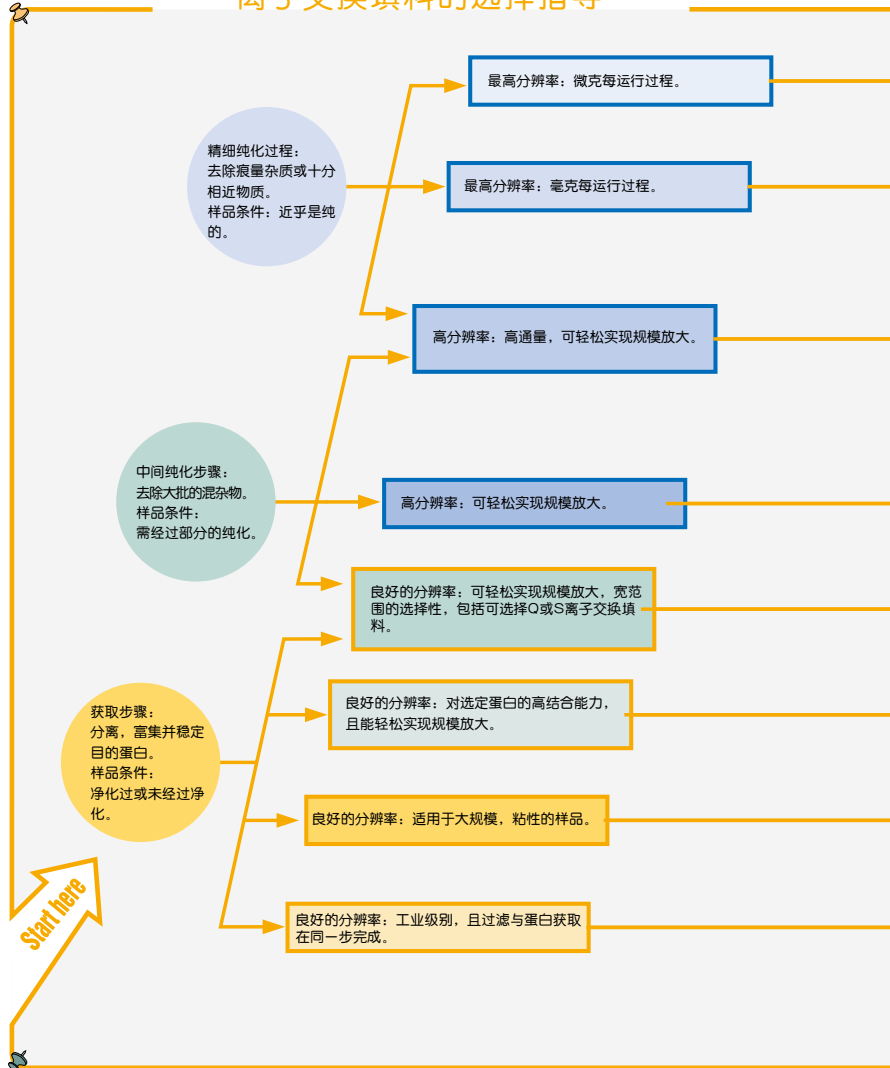
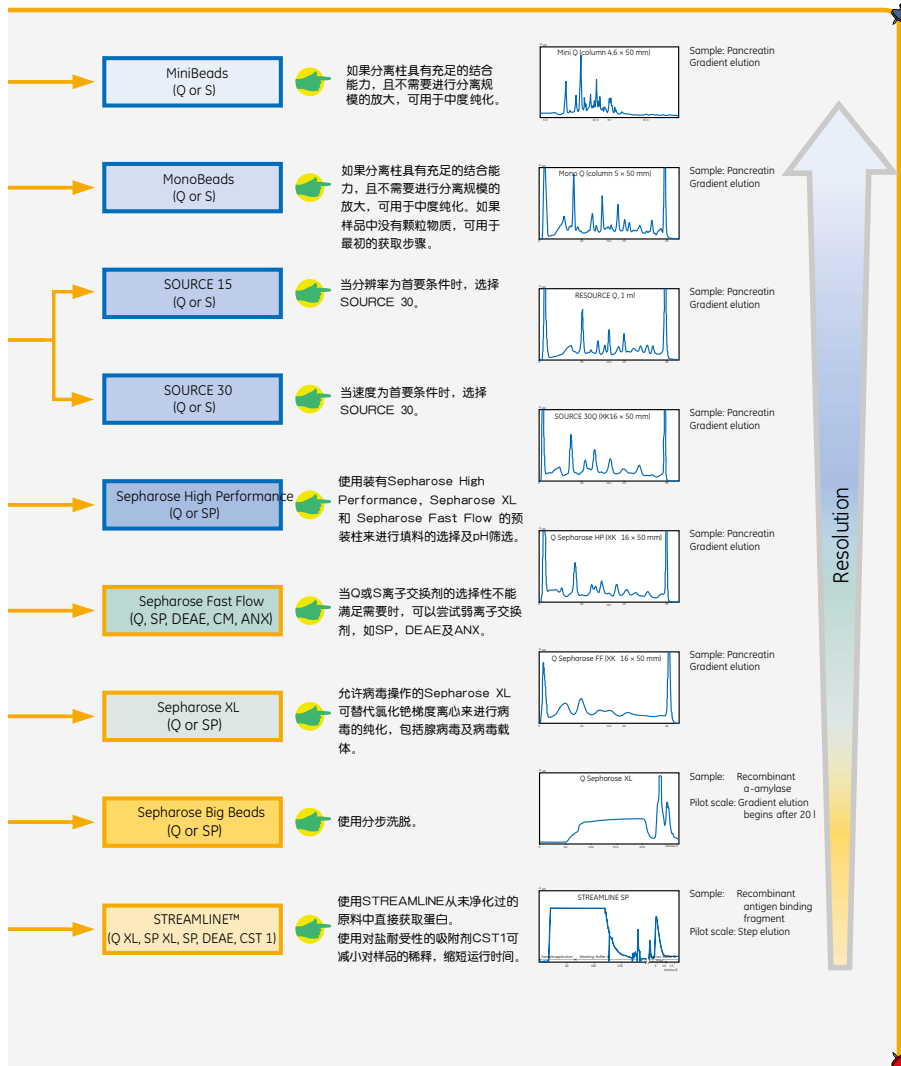


图15，典型的纯化策略分为三部分：蛋白获取，中度纯化步骤及最终的精细纯化过程。

每一部分都有自己特定的目的，很大程度上这取决于初始材料的性质。根据纯化的最终目的及初始材料的特点，选择合适的离子交换层析填料。



注意：基于扩张床吸附技术的STREAMLINE产品可从未经加工的颗粒状的原料中纯化蛋白，而不需进行单独的样品净化，富集及最初的纯化过程。STREAMLINE产品适用于工业级别的运行，及克级蛋白的生产。更多信息，请查阅www.bioprocess.amershambiosciences.com或索取扩张床吸附技术手册。

快速填料选择及方法建立



图16. 离子交换选择试剂盒。

在建立方法早期，通过使用小型的预装柱，如HiTrap离子交换选择试剂盒来快速高效的对最适合的带电基团进行筛选，建立基本的分离纯化方法，可节约大量时间和样品。当目的蛋白的性质未知时，这种方法特别有帮助。即使没有HiTrap规格的首选填料，方法可轻松转至在所需规模条件下对最佳填料的优化过程中。

HiTrap分离柱装有Sepharose快速流动填料（强或弱离子交换剂）或Sepharose XL（强离子交换剂），可运行于剧烈的蠕动泵或任何ÅKTA design系统上。这些柱子可用于小规模纯化过程，以及快速方法的建立；同时还配备有详细的使用方案。

自动填料选择，方法建立及优化

带有BufferPrep功能的ÅKTA design系统的用户可选择一系列的缓冲液方案，以在宽pH范围内及其他洗脱条件下对不同的填料进行测定（有关pH对选择性的影响的解释，见第18页）。BufferPrep功能会自动计算并将母液以正确比例混合，以在分离过程中维持恒定的pH值（增加离子强度通常会引起运行缓冲液实际pH的波动，BufferPrep会补偿这些波动，从而贯穿整个运行过程维持pH的稳定性）。当选定pH及接之后，程序会编辑方法改变流速及梯度斜率以优化分离效果。

注意，样品自身的条件对于获得最高效的分离纯化非常重要。理想情况下，样品应与起始缓冲液具有相同的条件（见附录1，样品准备，特别是缓冲液交换及脱盐，详见第156页）。当利用小体积进行条件筛选时，可用起始缓冲液来稀释样品，从而降低离子强度，并将样品的pH值调整至与起始缓冲液相近。

1. 在目的蛋白稳定的pH范围内进行最佳pH值的筛选。如果目的蛋白的等电点已知，则可以从一个较窄的pH范围开始，如等电点附近0.5-1个pH单位内。图17展示的是自动pH筛选的典型结果。
2. 如有必要，通过自动填料选择功能筛选最佳的选择性（测试强或弱离子交换剂）。
3. 在选定pH条件下，筛选能够获得可接受分辨率的最陡的梯度。
4. 筛选能够保持分辨率的最高流速以最小化分离时间。查阅特定填料的推荐流速。
5. 筛选能够保持满意分辨率的最大样品加载量。通常在梯度洗脱中，加载蛋白为分离柱总结能力的20%-30%时能够获得最佳分辨率。

当最佳分离条件确定后，转入分步洗脱以减少分离纯化的时间及所消耗缓冲液。使用分步洗脱时，通常可增加样品的加载量。

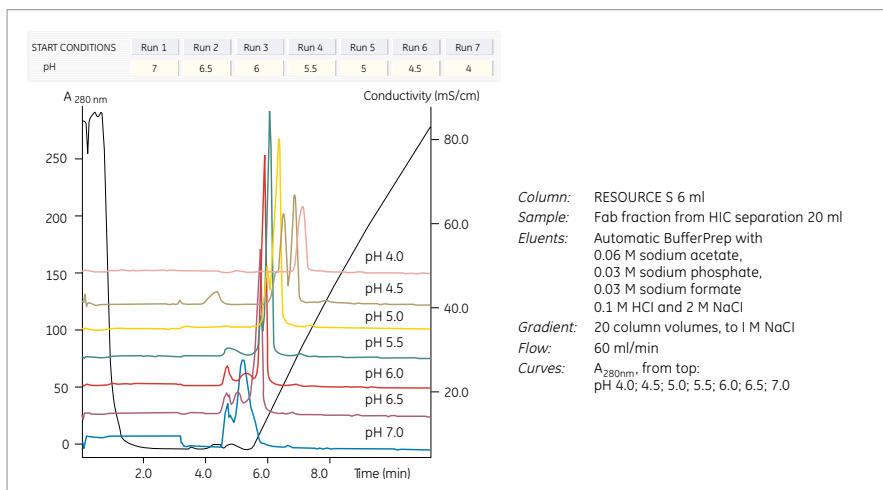


图17，ÄKTExplorer™系统的自动pH筛选过程。

手动填料选择，方法建立及优化

HiTrap分离柱非常适合于手动进行填料筛选，方法建立及方法优化，因为它们可以同注射器，蠕动泵以及自动的色谱系统一起使用。

注意，样品自身的条件对于获得最高效的分离纯化非常重要。理想情况下，样品应与起始缓冲液具有相同的条件（见附录1，样品准备，不例外是缓冲液交换及脱盐，详见第156页）。当利用小体积进行条件筛选时，可用起始缓冲液来稀释样品，从而降低离子强度，并将样品的pH值调整至与起始缓冲液相近。

- 在目的蛋白稳定的pH范围内进行最佳pH值的筛选。如果目的蛋白的等电点已知，则从一个较窄的pH范围开始，如等电点附近0.5-1个pH单位内。此处优化的方法只适用于1ml的HiTrap分离柱，如果使用其他型号分离柱应进行适当调整。

离子交换填料及pH条件的筛选

1. 起始缓冲液：配制一系列的缓冲液，使它们的pH值在4-8（SP,CM）或5-9（Q,DEAE,ANX）范围内，同时缓冲液之间具有0.5-1个pH单位的间隔。推荐缓冲液见附录2。
2. 洗脱缓冲液：配制另一系列具有相同pH值的缓冲液，但包含有1M的氯化钠。
3. 用5ml起始缓冲液以1ml/min的流速平衡分离柱。用5ml洗脱缓冲液冲洗。
4. 用5-10ml的起始缓冲液进行再平衡。
5. 将样品的pH调整至起始缓冲液的值，以1ml/min的流速加载已知量的样品。收集洗出液。
6. 用至少5毫升的起始缓冲液冲洗或知道没有任何东西出现在洗脱液中。收集洗脱液。
7. 用洗脱缓冲液洗脱吸附的分子（3-5ml通常是足够的，但其他规格分离柱所需量要根据具体试验条件确定）。收集洗出液。
8. 分析所有的洗出液（如用活性测定试验），确定样品的纯度以及同分离柱结合的量。
9. 用下一个缓冲液的pH执行步骤3-8。
10. 填料及pH的选定：**最适合的pH值应该是让目的蛋白结合在分离填料上，但又尽可能的靠近它们所要洗脱下来的那一点。**

离子强度的筛选


使用前述方案中确定的分离填料，起始缓冲液及pH值，设定一系列的洗脱缓冲液，他们具有相同的pH值，但盐浓度在0-0.5M之间变动，每个缓冲液间有0.05-0.1M的盐离子浓度差异。对每个盐浓度，重复前述方案中的步骤3-8。确定使目的蛋白结合的最高离子强度以及完全洗脱的最低离子强度。

进一步的优化

1. 如有制备梯度的设备，在选定pH条件下确定能够获得可接受分辨率的最陡的梯度。起始于10个柱床体积的梯度，让离子强度在筛选过程中所确定的最高及最低值之间变动。另外还可使系统起始于0-50%的含有1M氯化钠的洗脱缓冲液梯度以及10-20个柱床体积的梯度。
2. 确定能够保持分辨率的最高流速以缩短分离时间。查阅特定填料的推荐流速。
3. 确定能够保持满意分辨率的最大样品加载量。通常在梯度洗脱中，加载蛋白为分离柱总结和能力的20%-30%时能够获得最佳分辨率。**当分辨率令人满意或使用分步洗脱时，通常可增加样品的加载量。**

利用PD-10分离柱进行填料选择及方法建立

若果目的蛋白可以通过某种试验进行检测，且能获得所感兴趣的填料，那么可以将PD-10装入不同的填料来进行筛选，并建立最适合的分离条件。只需要知道最基本的pH和离子强度信息，便可装备合适的分离柱来开始条件优化。

 注意，样品自身的条件对于获得最高效的分离纯化非常重要。理想情况下，样品应与起始缓冲液具有相同的条件（见附录1，样品准备，不例外是缓冲液交换及脱盐，详见第156页）。当利用小体积进行条件筛选时，可用起始缓冲液来稀释样品，从而降低离子强度，并将样品的pH值调整至与起始缓冲液相近。

pH选择

1. 将需要测试的离子交换填料装入10根PD-10柱子，并用储存溶液将填料充分悬起。
2. 向PD-10柱中灌入约25ml的填料混合物，让填料随着分离柱的填充而沉积下来，但不能让柱子走干。
3. 通过冲洗五次5ml 0.5M的缓冲液来将分离柱平衡至不同的pH值：对于阳离子交换剂，缓冲液的pH范围为5-9；对于阴离子交换剂，pH范围为4-8。分离柱之间pH的间隔单位为0.5个pH单位。（见附录2，缓冲液推荐）
4. 在较低离子强度下平衡每个分离柱：用5ml 相同pH的缓冲液（0.02-0.05M）冲洗五次。
5. 将已知恒定量的样品加载到每个分离柱上，同时收集洗出液。
6. 对洗出液检测目的蛋白。最适合的填料和pH应该使蛋白结合（洗出液中无目的蛋白），但又同蛋白被洗脱下来的pH尽可能接近（蛋白出现在洗脱液中最初的pH值）。

离子强度选择


1. 设定10根PD-10分离柱，每个含有5毫升选定的离子交换填料。
2. 通过冲洗五次5ml 0.5M选定起始pH的缓冲液来平衡分离柱。
3. 用恒定pH，不同离子强度的换从业对分离柱进行平衡，用0.01-0.3M的NaCl冲洗五次，每次5ml。两次之间间隔0.05M NaCl即可。
4. 将样品加载并收集洗出液。
5. 检测洗出液中的蛋白以确定允许目的蛋白结合的最大离子强度，以及使目的蛋白完全洗脱的最低离子强度。允许目的蛋白结合的最大离子强度，以及使目的蛋白完全洗脱的最低离子强度将会在随后的梯度洗脱中作为起始缓冲液及洗脱缓冲液。


离子交换分离过程应用中所需注意事项

本节包括了离子交换分离过程中每一个步骤各方面的细节，同时还有应用中的如何提高分辨率及整体效果的一些提示及小技巧。实际操作中，分离过程可总结如下：

1. 用5-10个柱体积的起始缓冲液平衡分离柱，或直到基线，pH及电导稳定后。
2. 将样品调整至所选定的起始pH和离子强度，并加载至分离柱。
3. 用5-10个柱体积的起始缓冲液冲洗分离柱，或直到基线，pH及电导稳定，即所有未结合物质均被冲洗出分离柱。
4. 用10-20个柱体积的梯度进行洗脱，离子强度逐渐增加至0.5M的NaCl（50%B）。
5. 如果没有制备梯度的设备，也可用5个柱体积的起始缓冲液加入所选定离子强度的NaCl来进行冲洗。重复此过程并增加离子强度，直到目的蛋白被洗脱下来。
6. 用5-10个柱体积的起始缓冲液对分离柱进行再平衡，知道洗脱pH及电导达到所要求的值。

这些步骤会在本节中突出介绍。

 缓冲液体积用柱床体积CV表示，如3 CV=3 ml表示该分离柱的柱床体积为1毫升。利用柱床体积来描述分离过程有利于方法的建立以及放大实验规模时将方法应用于不同规格的分离子柱。

 分离过程中每步所需的缓冲液体积数可通过优化来减少使用量。例如，强离子交换剂可用少一些的缓冲液来平衡；当分辨率不变时，可使用更少的梯度洗脱体积；如果分离不是很复杂或者相对较为干净的样品，可减少冲洗的缓冲液的用量。

pH和离子强度

缓冲液的pH和离子强度必须同蛋白质的稳定性和活性相兼容。最适合的pH应该允许目的蛋白结合，但又尽可能的靠近蛋白洗脱下来的pH值。如果该pH值太高或太低，洗脱将会变得更加困难，此时需要高盐离子浓度。应避免这种情况的产生，因为一些蛋白在高离子强度条件下会沉淀，且很高的盐离子浓度会干扰一些试验或后续的色谱分离过程。

 **避免pH或其他条件的极端改变，防止蛋白的失活甚至是沉淀。**

样品的pH及离子强度对于获得最有效的高分辨率，基团的分离以及获得最大的负载能力十分重要。理想状态的样品应该一直处于与起始条件相同的的环境下。

(见附录1, 样品准备, 特别是缓冲液交换及脱盐, 详见第156页)。当利用小体积进行条件筛选时, 可用起始缓冲液来稀释样品, 从而降低离子强度, 并将样品的pH值调整至与起始缓冲液相近。

蛋白通常在偏离等电点0.5个pH单位, 离子强度在0.1M附近时开始从离子交换填料上解离。当使用阴离子交换剂(Q,DEAE,ANX)时, 起始缓冲液的pH应至少高于目的物质等电点0.5-1个pH单位; 当使用阳离子交换剂(S,SP,CM)时, 起始缓冲液的pH应至少低于目的物质等电点0.5-1个pH单位。

对于带电性质未知的样品, 尝试一下方案:

—— 阴离子交换 (Q,DEAE或ANX)

起始缓冲液: pH8.0

洗脱缓冲液: 起始缓冲液中加入1M NaCl, pH8.0

—— 阳离子交换 (S, SP, CM)

起始缓冲液: pH6.0

洗脱缓冲液: 起始缓冲液加入1M NaCl, pH 6.0

有关阳离子及阴离子交换剂所使用的挥发或非挥发型缓冲液系统的推荐, 参见附录2.

如果可能, 检查所选定pH及离子强度下蛋白的稳定性, 特别是当蛋白的生物活性的回收为首要考虑因素时。

阴离子或阳离子交换剂

对于只带有负电荷基团的分子, 如核酸, 显然应选用阴离子交换剂。然而一些分子如蛋白质(同时带有正电荷及负电荷的基团)的净电荷依赖于pH, 因此应在样品稳定的范围内, 选择哪种类型的离子交换剂及pH可获得所需的分辨率。例如, 图18展示了一个理论中的蛋白, 在等电点之下净电荷为正, 能够结合阳离子交换剂。在等电点之上净电荷为负, 能够结合阴离子交换剂。然而这个蛋白只在pH5-8之间稳定, 因此只能使用阴离子交换剂。

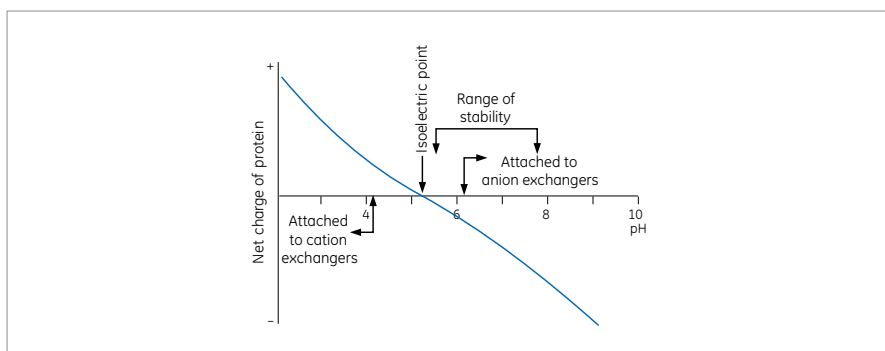


图18, 选用合适的离子交换剂时的注意事项。

- 如果样品组份在等电点之下最稳定，使用阳离子交换剂。
- 如果样品组份在等电点之上最稳定，使用阴离子交换剂。
- 如果样品组份在等电点两侧较宽pH范围内都比较稳定，则可使用任何一种类型的离子交换剂。

强或弱离子交换剂

表3展示了离子交换填料所用的功能基团。填料的强和弱是指功能基团的离子化状态随着pH值的改变而改变的程度，而不是功能团同蛋白质分子结合能力的强弱。

表3，离子交换填料所用的功能基团。

Anion exchangers		Functional group
Quaternary ammonium (Q)	strong	$-O-CH_2N^+(CH_3)_3$
Diethylaminoethyl (DEAE)*	weak	$-O-CH_2CH_2N^+H(CH_2CH_3)_2$
Diethylaminopropyl (ANX)*	weak	$-O-CH_2CHOHCH_2N^+H(CH_2CH_3)_2$
Cation exchangers		Functional group
Sulfopropyl (SP)	strong	$-O-CH_2CHOHCH_2OCH_2CH_2CH_2SO_3^-$
Methyl sulfonate (S)	strong	$-O-CH_2CHOHCH_2OCH_2CHOHCH_2SO_3^-$
Carboxymethyl (CM)	weak	$-O-CH_2COO^-$

* DEAE与ANX带电基团的活性末端是相同的，区别在于带电基团的碳链长度不同。DEAE以二乙基乙胺基团结合在琼脂糖上。而ANX具有二乙基氨基丙基基团，阻止了四价基团的形成，从而具有相对于DEAE不同的选择性。

- 开始时使用强离子交换剂，以便于方法建立过程可在较宽的pH范围内进行。如果样品的等电点低于pH7.0或未知，使用强的阴离子交换剂Q来结合蛋白。
- 当最佳分辨率出现在极端pH条件下，且目的蛋白在该条件下稳定，使用强离子交换剂。

当强离子交换剂的选择性达不到要求时，考虑使用弱离子交换剂，但切记弱离子交换剂的结合能力随着pH的改变而变。由此：

- 由于离子交换剂上电荷的丢失，结合能力会随着pH的增加而改变。
- 流速及样品加载条件的改变很容易影响分辨率，因为一些中间形式的电荷相互作用会产生。
- 预测的结果（根据样品组份已知的信息，如等电点以及表面净电荷如何随着pH改变而变化）有时同实际结果不相干，因为弱离子交换剂的带电基团数目会随着pH的变化而改变。
- 滴定弱离子交换剂的功能基团时，需要更长的平衡时间。

- 当使用弱离子交换剂时，在如下pH范围内使用能够将效果的浮动减至最小：
 - DEAE: pH 2-9
 - ANX: pH 2-9
 - CM: pH 6-10

溶液选择及准备

溶液离子

溶液中的离子应该具有与离子交换填料上功能基团相同的电性（具有与功能基团相反电性的缓冲液离子会占据离子交换过程，并在洗脱过程中引起pH的大范围波动），且最好pKa值在工作pH附近0.6个单位内。该规则的一个例外是离子交换分离过程常用的磷酸盐缓冲液。因此，磷酸盐缓冲液应该非常小心的准备以保证不同批次之间的可重复性。

- 使用足够维持缓冲能力及恒定pH的缓冲液浓度，典型为20-50 mM。
- 如果纯化后的样品需要冷冻干燥，使用挥发性的缓冲液。
有关阴阳离子交换剂使用的挥发性或非挥发性缓冲液系统的推荐指导，参见附录2。
- 当所有的盐或添加剂加入后，过滤缓冲液。使用高质量的水及化学试剂。对尺寸在90 μm 以上的颗粒，使用1 μm 的膜过滤溶液；34 μm 的颗粒用0.45 μm 的膜，使用0.22 μm 的膜当颗粒尺寸在15 μm 之下，或需要对样品进行除菌或特别的净化时。为避免转好的分离柱中气泡的产生，确保准备运行时分离柱及缓冲液温度相同。

温度对缓冲液pH的影响

选择在工作温度下具有适当pKa值的缓冲液。缓冲物质的pKa会随着温度改变而变化。例如，Tris™ 在零度pKa值为8.85,25摄氏度时为8.06, 27摄氏度时为7.72。在4摄氏度，pH7.9条件下使用Tris会有很低的缓冲能力，并且工作pH会在缓冲液的可用pH范围之外（ $\text{pKa} + 0.5$ ）。

- 准备缓冲液的温度应与使用时的温度相同。
- 温度 $<10^{\circ}\text{C}$ 可最小化样品组分之间的疏水相互作用。在低温下纯化可替代加入去垢剂来增大溶解性的方法。

抗衡离子

离子交换中常用的抗衡离子（盐离子）对于阳离子交换几乎总是Na离子，而阴离子为Cl离子。

盐类，如NaCl具有离液性（即减弱水的极性），因此对疏水分子具有较低的盐析效应。这保证了洗脱过程中蛋白的最大可溶性，提高了回收率。如有必要，在使用有机溶剂的同时也可使用离液盐。硫酸铵及磷酸钾等盐应该尽量避免使用，因为高浓度下它们很容易引起蛋白沉淀。

在一些应用过程中，可选择的抗衡例子，如 Li^+ 、 Br^- 、 SO_4^{2-} 、 CH_3COO^- 或 HCOO^- 等可提高甚至改变选择性，因为它们会展现出不同的洗脱强度。需要注意的是，使用这些离子有可能会影响到填料的蛋白结合能力。

图19展示了使用不同的抗衡离子时填料选择性及分离分辨率的改变。

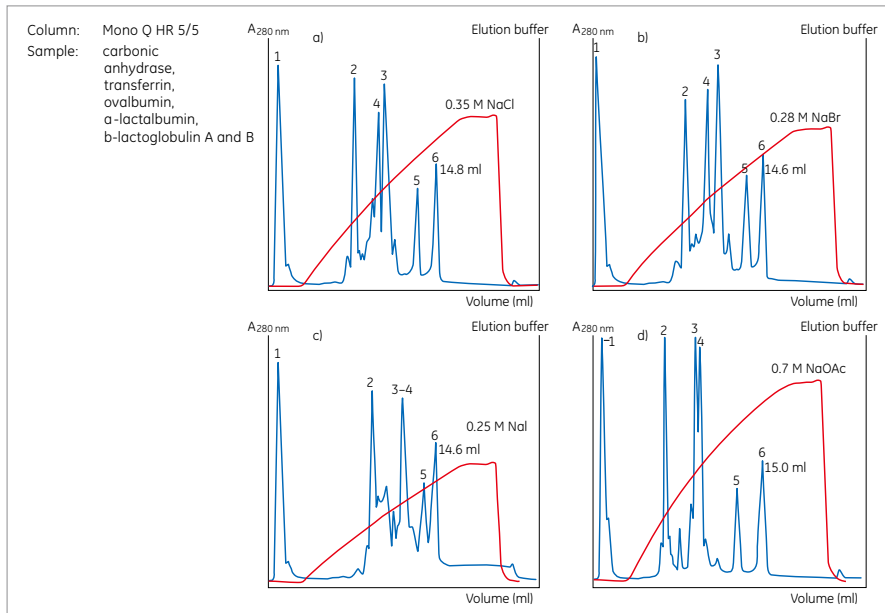


图19，抗衡离子对选择性和分辨率的影响。（Mono Q HR 5/5 现在改称 Mono Q 5/50 GL）。注意样品峰3和4的洗脱顺序不同。

如果使用钠离子及氯离子以外的抗衡离子，请使用如下操作：

1. 用10个柱体积的含有新抗衡离子的0.5-1M盐浓度的溶液冲洗装好的分离柱。
流速：见第三章相关填料的章节。
2. 用10个柱体积的起始缓冲液冲洗，流速同步骤1。
3. 重复前两个步骤数次。

空运行一次以便检查电导及pH值。

分离柱及填料准备

用5-10个柱体积的起始缓冲液平衡柱子，或者到基线，洗脱pH及电导稳定后。

强烈推荐使用预装柱以保证最佳分离效果及结果的可重复性。均匀填充的分离柱可保证组分峰在穿越分离柱时不被无必要的放宽，从而获得最好的分辨率。

在使用前，使缓冲液，填料或预装柱达到相同的温度。温度的快速改变，如将填充好的分离柱从冷室取出并使用室温的缓冲液，会导致填充填料中气泡的产生，影响分离效果。

使用离子交换填料前，冲掉储存溶液及防腐剂。

如果所用缓冲液中包含去垢剂，或填料曾储存在不同抗衡离子的缓冲液中，在第一次运行前增加平衡分离柱的缓冲液体积。

附录3为分离柱填充的详细描述。所需要填充的柱床体积是由所需纯化样品的量及填料的结合能力所决定。填充一个分离柱，其结合能力大约五倍高于所需结合能力，柱床高度最高可达20cm。

通过确定柱效及峰的对称性，定期检查分离柱的工作能力。见附录3。注意，这并不适用于HiTrap或HiPrep™分离柱。

样品准备

正确的样品及缓冲液准备对于获得最佳分离效果，避免分离柱工作能力的损失十分关键。加载样品前简单的对样品净化的步骤会避免分离柱堵塞的风险，减少剧烈冲洗的可能。附录1为样品准备技术的总览。

将样品脱盐，并转移至所选定的起始缓冲液中（有关缓冲液更换及脱盐的详细信息，参阅第156页）。样品的pH和离子强度对于获得高效的分辨率，分组分离以及充分发挥分离柱的结合能力至关重要。

对于处在高盐浓度缓冲液中，且没有脂类，离子性去垢剂等主要污染物的小体积样品，用起始缓冲液稀释样品足以将盐离子浓度降低到一定水平，不会干扰样品与填料的结合。然而，缓冲液更换及脱盐是唯一可保证样品处于正确pH和离子强度的方法。

必须对样品进行净化，使其中没有颗粒物质，特别是使用填料的颗粒大小在34 μm或更小时。对于小体积的样品，可用注射器连接的醋酸纤维素膜或PVDF膜来进行样品过滤。

浓度及黏度

样品的溶解度及黏度或许会限制分离柱分离样品的数量。样品的高粘度会引起分离过程的不稳定，不规则的液流模式，从而导致很宽而又扭曲的峰形，以及背景压力的问题。关键参数在于样品的黏度相对于洗脱液的黏度的量。

● 用起始缓冲液稀释粘性样品。如果高粘度是由核酸污染物的存在引起，去除建议参见附录1。记住，黏度会随着温度的变化而改变。如果不能选择稀释的方式，采用更大颗粒尺寸的填料或许会解决此问题。

● 通常样品不应超过50-70mg/ml的蛋白浓度，但根据样品及色谱分析填料的类型而有所不同。

上样

将样品调节到选定的起始pH和离子强度（见样品准备章节）并加载至分离柱上。

用5-10个柱体积的起始缓冲液冲洗，知道基线，洗脱液pH及电导稳定，即所有未结合的分子都被冲洗出分离柱。

初始条件应使目的蛋白最大可能的结合在分离柱顶部，如有可能使污染物结合降至最低而穿透过分离柱。

● 高效结合需要样品处在与起始缓冲液相同的pH和离子强度。样品体积可相对的大一些而不影响分离效果，因为只要平衡和样品条件正确，样品会结合在分离柱顶部。

● 通过色谱系统，蠕动泵或注射器直接将样品加载至分离柱。设备的选择主要取决于样品体积，分离柱尺寸，离子交换填料的类型以及梯度洗脱中对于精确度的要求。在样品加载过程中，确保柱床顶部未被扰动。

● 不需要更换缓冲液条件直到所有未结合分子都已被冲洗出分离柱（通过紫外吸收检测），以及紫外及电导值都已返回起始水平。

样品负载

样品负载比样品体积更加重要。能够加载到分离柱的样品量取决于离子交换填料的动态结合能力以及对分辨率的要求。样品负载对于分辨率起主要的影响，因为峰的宽度同加入样品的量直接相关，如图20所示。因此，为了获取让人满意的分辨率加载及结合在填料上的蛋白总量不应该超过填充柱的总结和能力。

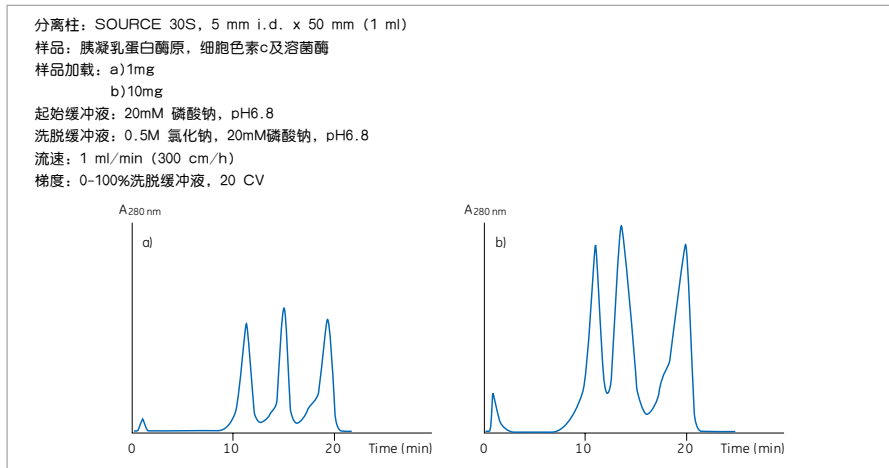


图20, 增加样品加载量对分辨率的影响

- 使用梯度洗脱时, 加载分离柱总结合能力30%量的蛋白以获得最佳分辨率。如果样品的分辨率符合要求, 或者使用分步洗脱时, 可增加样品的加载量。
- 如果同总的柱床体积相比, 样品的体积较大, 则样品的缓冲组成, 特别是离子强度应该与起始缓冲液相同以保证适当的结合条件。

第三章给出了每种填料的典型结合能力以作为总结合能力的一个指导。实际(动态)结合能力会被一些因素所影响, 如分子的大小和形状, 填料孔径的大小, 流速, 样品浓度, pH/蛋白的电性及离子强度等。对直径或长度非常大的分子, 结合能力会降低, 如分子量大于400,000的蛋白复合体, 非对称蛋白以及DNA。这些分子不能够穿过填料的孔穴, 因而他们的结合能力仅限于同填料的表面电荷相互作用。在不同的缓冲液条件下, 填料上具体孔径大小的分布会改变, 而蛋白分子的表现尺寸也会改变, 因而没有一个明确的分子量界限, 使得分子可以或不能够穿过填料的孔穴。

- 通过调整样品pH使其带有比最佳分离pH条件下更高的电荷, 可增加样品的动态结合能力。

样品体积

作为一种结合技术, 离子交换与样品体积无关, 只要样品的离子强度等同于或低于起始缓冲液, 且目的蛋白在选定pH条件下带有充足的电荷。大体积稀释的样品, 如脱盐过程的组分, 或细胞培养物的上清, 可直接应用至离子交换填料而不需预先浓缩。

洗脱

通过控制离子强度或pH的改变来将结合蛋白洗脱。采用何种方式来改变条件，线性还是分步洗脱需根据分离的目的而选定：

- 线性梯度洗脱
 - 高分辨率分离或分析
 - 在增加速度并保持所需分辨率条件下，优化的梯度洗脱
- 分步洗脱
 - 更快的分离时间，并减少缓冲液的消耗量
 - 分组分离

线性梯度洗脱

目的：**高分辨率分离或分析，筛选**

使用10-20个柱体积的线性梯度开始洗脱，且离子强度增加至0.5M NaCl(50%B)。

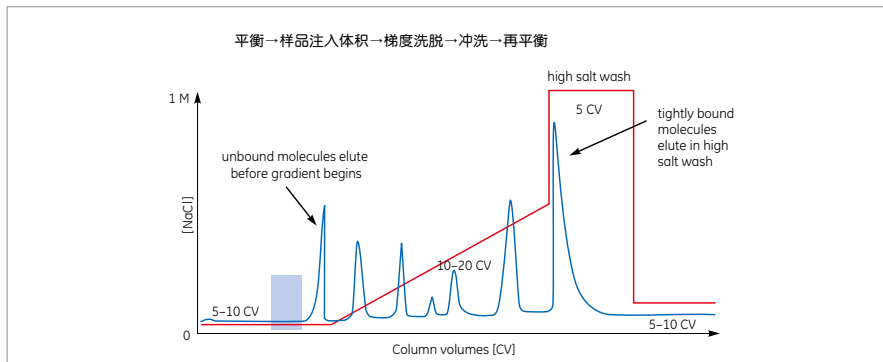


图21，利用线性梯度洗脱进行的典型的离子交换分离过程。紫外吸收（表征蛋白）和电导（表征盐浓度）曲线展示了蛋白峰的洗脱以及洗脱过程中盐浓度的变化。

现行梯度洗脱，如图21所示，是最常用的洗脱方式，且应该用于未知样品的分离（当尽可能多组分结合于分离柱，分别洗脱以观察总蛋白情况）。在低离子强度时，对离子交换填料上带电基团的竞争处于最低状态。增加离子强度会增加该竞争，并减少填料与结合物质之间的相互租用，此时样品开始被洗脱下来。洗脱缓冲液通常是同缓冲液相同的盐，以及与起始缓冲液相同的pH，但包含有额外的盐，通常是氯化钠。

在方法建立的过程中，强烈建议采用线性洗脱。线性离子强度梯度很容易制备，且对于合适的色谱层析系统该方法很容易重复。所获取结果可作为进一步优化分离纯化过程的基础。

带电蛋白在分离柱上的滞留与分离柱的体积以及浓度区别有关：

- 长而缓的梯度会使峰之间获得最佳分离效果，但分离时间会变长，且会有更大的峰变宽现象。
 - 短而陡的梯度会使峰之间获得最快分离效果，但峰之间会被洗脱的非常靠近。
 - 在梯度后面洗脱下来的蛋白峰通常要比早些洗脱下来的峰形稍微变宽。
- 在选定pH下，选择能够获得可接受分辨率的最陡的梯度。

梯度斜率的效果，如图22。

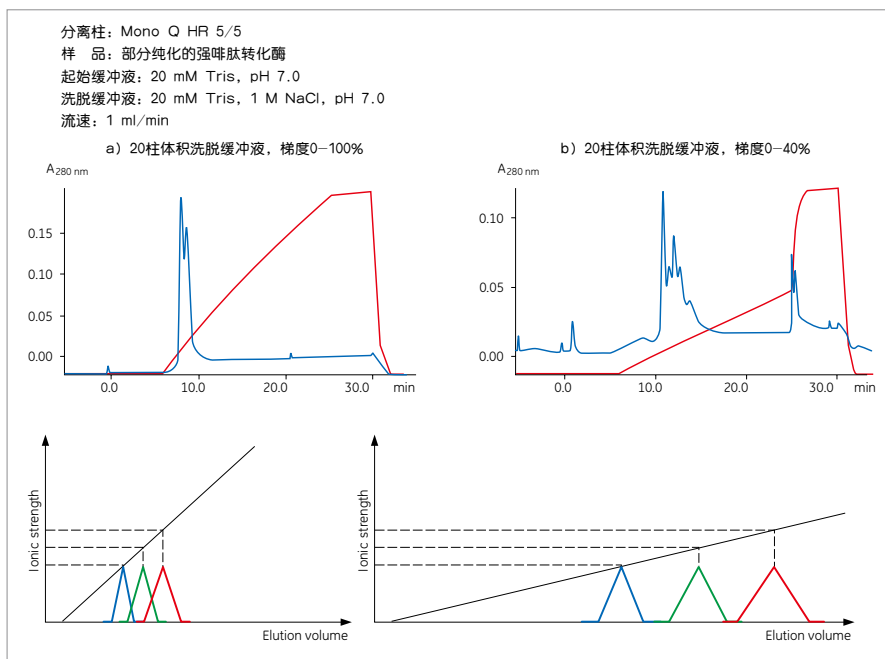


图22，理论上以及实际上梯度斜率对分辨率的影响。

- 如果梯度洗脱的体积减少，则有必要按比例减少样品加载的体积以维持相同的分辨率。与此相似，如果增加样品的加载量（在分离柱总结和能力之内），梯度洗脱的体积也应该增加以维持分辨率。

梯度最好有特别设计的设备来形成，如ÄKTAdesign系统。后者程序中具有预设的方法模板，可自动控制供向分离柱的溶液的混合。ÄKTAdesign系统及BufferPrep功能的使用者可以从一系列缓冲液配方中进行选择，在恒定pH条件下进行盐离子浓度梯度洗脱。

BufferPrep功能会自动计算并以正确比例将溶液储液进行混合，以在运行过程中维持恒定的pH值。同样，系统可以使用两台泵分别用于起始缓冲液及洗脱缓冲液的输入，也可以使用单独一台泵同转换阀门联合应用以混合不同缓冲液。

精确的缓冲液制备，有效的混合，混合器与分离柱顶端的液流路径尽可能最短等都有利于保证形成精确的梯度很有帮助。

目的：减少分离时间，维持分辨率

对于某些特定的分离过程，当使用现行梯度洗脱获得高分辨率的分离的条件已经建立后，就有可能通过使用更复杂的洗脱模式来减少总的洗脱时间，如图23所示。当需要最高的分辨率时可以使用平缓的梯度；而对于分辨率尚可的区域可以使用稍陡一些的梯度。

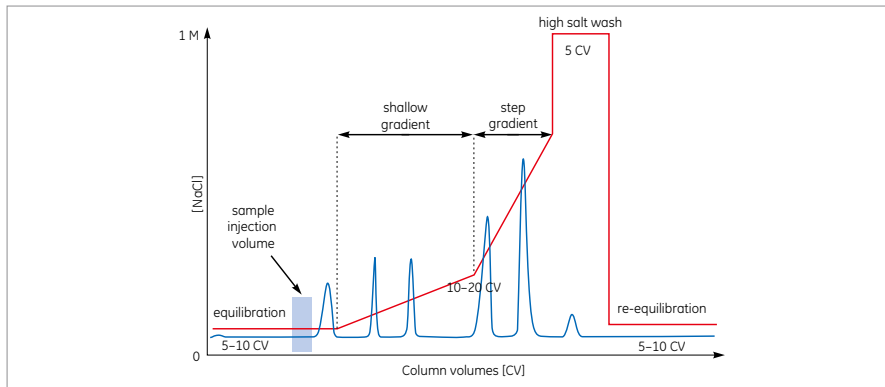


图23，对某些特定的分离过程，可使用复杂的线性模式以缩短总的分离时间。

分步洗脱

用5个柱体积的起始缓冲液加选定离子强度的NaCl来洗脱结合蛋白。重复此过程，并加入更高一些的离子强度知道目的蛋白被洗脱下来。

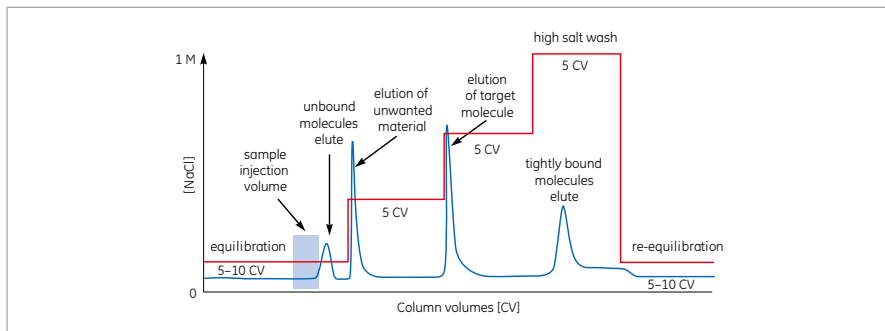


图24，典型的使用分步洗脱的离子交换分离过程。紫外吸收（表征蛋白）和电导（表征盐离子浓度）曲线分别展示了蛋白峰的洗脱以及洗脱过程中盐离子浓度的变化。

如图24所示，分步洗脱是通过连续加入离子强度逐渐增加的相同缓冲液而实现。分步洗脱在技术上比较简单，但在步骤设计以及对结果进行解释时必须小心，因为通过离子强度的剧烈变化洗脱下来的物质峰会非常接近，从而有可能获得一个假的包含有几种不同组分的样品峰。样品峰通常会有一个锐利的前半部分，但有拖尾现象，因为它们通常包含有不止一种组分。拖尾现象有可能导致假峰的出现，如果离子强度改变的太早。由于这些原因，推荐在建立一个新的纯化方法时，采用线性离子强度梯度。

目的：更短的分选时间以及减少缓冲液的用量

当离子交换分离过程通过梯度洗脱进行优化后，可改用分步洗脱来减少总的缓冲液的用量。这样可以获得更短的分选时间以及减少缓冲液的用量，同时保持所需要的纯度水平。这种类型的分步洗脱经常用于常规性大规模的分选过程。当使用更大规模的分选纯化过程时，分步洗脱的另一个优点是通常可适用于更大量的样品，因为在梯度洗脱中较早洗脱下来的蛋白分子将不会占据分离柱上的结合位点。

目的：分组分离

在分组分离过程中，目的蛋白被富集，且迅速的从不需要的物质中分离出来。当目的蛋白以及污染分子的结合及洗脱条件确定时，通常是在最初的梯度洗脱中获得，可以选定条件使加载过程中目的蛋白的结合达到最大化而污染物的结合最少。随后通过单独的缓冲液改变，使得目的蛋白以一种浓缩状态被洗脱下来。图25展示了分组分离的一个例子：利用HiTrap Q HP 分离柱来从不需要的免疫球蛋白中分离人类血清蛋白，前者直接从分离柱中穿透。

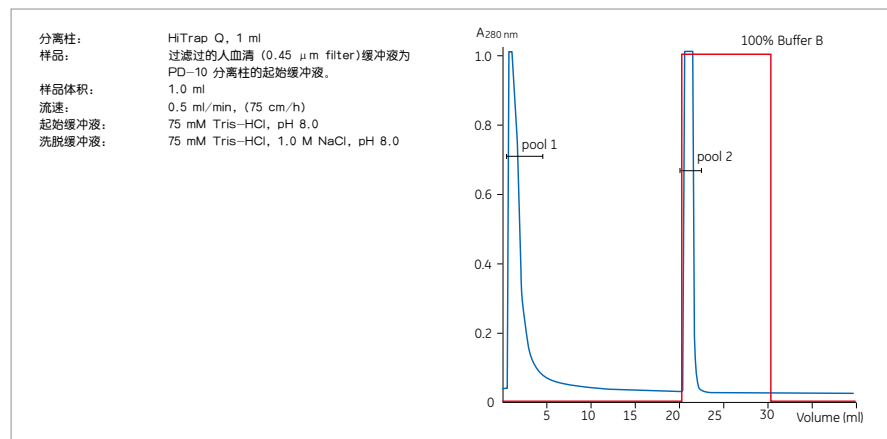


图25，利用HiTrap Q HP 分离柱对人血清蛋白的分组分离。

目的：去除污染分子

如果选定的起始条件可是污染分子的结合达到最大，则无需改变洗脱条件，因为目的蛋白将会从分离柱中穿透。在许多应用情况下，更好的做法是丢弃分离柱，而不是花费时间和敬礼来移除不需要的结合物质。

pH洗脱

由于蛋白质的净电荷具有pH依赖性，因此可通过改变洗脱缓冲液的pH值来将其从离子交换填料上洗脱下来。由于没有盐离子梯度，在某一pH条件下样品将会保持在分离柱上，通过增加或降低pH值来将目的蛋白洗脱下来。样品或分离柱填料上不同的带电基团会被逐渐滴定，直到它们变为中性或同填料带有相反电荷，此时样品被洗脱下来。


- 同阴离子交换剂（Q,DEAE,ANX）结合的蛋白会随着pH的降低而被洗脱下来。
- 同阳离子交换剂（SPS,CM）结合的蛋白会随着pH的升高而被洗脱下来。

由于pH洗脱的工作pH值接近蛋白的等电点，而许多蛋白在等电点时具有最低的溶解度，因此必须小心以避免样品在分离柱上的沉淀（有关使用添加剂以避免蛋白沉淀的信息，参见第48页）。

 务必提前测试在纯化过程中使用的pH及盐离子浓度下，样品组分的溶解性。

对于任何类型的pH洗脱，在选择及混合缓冲液系统时必须多加小心以获得好的重复性。分阶段洗脱要比线性pH洗脱更容易操作，且具有更好的重复性。注意，对于弱离子交换剂而言，缓冲液会滴定掉填料上的带电集团，因此在新的pH缓冲液到达之前，应该由一个短时间的再平衡过程。

在恒定离子强度条件下获取线性pH梯度非常困难，因为离子强度同时也会改变，尽管很小，但还是会发生。这些提督也不能够简单的通过把不同pH的缓冲液按线性体积比例混合而得到，因为系统的缓冲能力具有pH依赖性。通过混合具有相同盐离子浓度，且pH调整至高于及低于pKa 1个pH单位的两种溶液，来获取窄pH间隔（最大两个pH单位）的近似线性梯度。

 通常，利用色谱聚焦，根据蛋白等电点的不同而进行分离的方法要比利用离子交换层析的pH梯度洗脱蛋白要更加可靠，获得的分辨率也更高。

流速

分离纯化过程中的最大流速根据分离阶段的不同而有所改变。例如，在样品加载及洗脱阶段，第六苏可是样品组分有足够的时间扩散进出填料的孔穴，并同功能基团结合或解离。图26展示了流速对于分辨率的影响。高流速可用于分离柱平衡，冲洗及再平衡，主要受限于填料的硬度以及设备的压力设定。

对每种色谱层析填料，推荐的流速参见第三章。从这些推荐中，选定维持所需分辨率且分离时间最短的最高流速。例如，如果样品峰在第六苏下分离效果很好，那么增加流速或增加样品体积，以在分辨率没有大的损失下获取更强的结合能力。

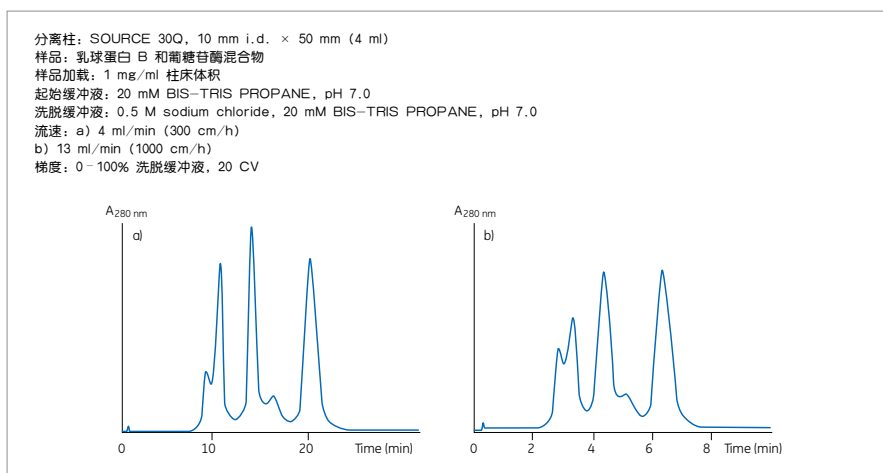


图26, 增加流速对分辨率的影响。

流速简单的以体积来表征，如ml/min；但当需要对不同规格的分离柱的结果进行比较，或需要放大规模时，线形流速将会更有用些，即cm/hour（见附录5）。当考虑流速对结果的影响时，不同规格的分离柱在同一线性流速下的结果才具有可比性。

- 在高盐冲洗及再平衡过程中，使用较高流速可以节省时间，但不要超过填料所推荐的最大流速。
- 高流速及粘性的缓冲液会增加系统的运行压力（切记，当系统在4℃运行时缓冲液的黏度会增加）。检查所装柱的最高运行压力，并在色谱系统中相应的设定压力上限。

液流控制

精确，可重复的液流控制对于好的分辨率及结果可重复性十分重要。

- 使用色谱层析系统的输入泵而不是蠕动泵，以充分利用填料的高硬度及出色的液流特性，如MiniBeads, MonoBeads, SOURCE or Sepharose High Performance。
- 利用输入泵将缓冲液注入分离柱中，而不是用分离柱下部的泵将缓冲液吸入，这样可避免由于吸引力而形成气泡的风险。
- 若果使用自己填充的分离柱，分离操作室所使用的流速应低于装柱时的流速，以避免运行时由于压力而导致的柱床缩短。


冲洗及再平衡


用5个柱体积的1M NaCl (100%B) 冲洗分离柱，以洗脱掉任何残留的离子性结合物质。

在每个运行的末尾设定一个冲洗步骤，以去除仍然结合在填料上的任何分子。检测紫外吸收值，如有必要冲洗步骤可缩短或延长。


用5-10个柱体积的起始缓冲液对分离柱进行再平衡，知道洗出液pH及电导达到要求值。


在处理别的样品之前，冲洗后的再生步骤可使分离柱回到起始状态。只要可能，检测pH及电导以观测合适到达初始状态。根据需要，可将再平衡过程缩短或延长。

 冲洗及再平衡时可提高流速以节约运行过程之间的时间。

 如果使用了离子性去污剂，则应用5个柱体积的蒸馏水冲洗分离柱后，用2个柱体积的2M NaCl冲洗。用至少10个柱体积的起始缓冲液平衡知道紫外吸收基线，洗出液pH及电导达到稳定水平。有机溶剂，如乙醇可用来去除非离子型去垢剂。当选用有机溶剂时，检查填料的化学稳定性以确定一个适当的浓度。

去污剂，变性剂及其他添加剂

 任何用于解离，增溶，螯合金属离子，抑制酶活等的添加实际，在使用前都应该查阅它们在工作温度时的带电性质。加入添加试剂后空运行一个梯度以便于检测它们对于色谱分析过程的影响。

 样品准备过程中使用的添加剂在离子交换层析后都会被从样品组份中分离出去。如果发现蛋白出现沉淀，洗出比预想的要晚，或者溶解度很差，则应向起始及洗脱缓冲液中加入适当浓度的最初溶解所用的添加剂。

两性添加剂如甜菜碱可阻止沉淀的产生，同时可高浓度使用而不干扰梯度洗脱。


对于低水溶性的蛋白，如膜组分，去污剂可作为助溶试剂。在离子交换色谱层析中，可以使用阳离子性，阴离子性，两性及非离子性（中性）去污剂。

变性剂如盐酸胍或尿素可用于最初样品的溶解及分离过程中。然而应该尽量避免使用它们除非必须进行变性。注意，在分离时所用的pH条件下，盐酸胍为带电分子，含有抗衡离子，因此会在离子交换过程中起到跟NaCl一样的作用。

常用的去污剂及变性剂的举例见表4。


表4, 常用的去污剂及变性剂

去污剂	类型	典型的应用条件	兼容性
尿素		2M-8M	阴离子/阳离子交换剂
盐酸胍		3M-6M	阴离子/阳离子交换剂
Triton™ X-100	非离子性	2%	阴离子/阳离子交换剂
N-octylglucoside	非离子性	0.1%-0.5%	在第一步色谱层析中交换非离子型去垢剂, 避免用于阴离子交换剂
Sarcosyl	非离子性	1.5%	阴离子/阳离子交换剂
Nonidet P40	非离子性		阴离子/阳离子交换剂
聚乙烯醚 (如Brij 35)	非离子性		阴离子/阳离子交换剂
聚乙烯山梨聚糖如 Tween™ 80	非离子性		阴离子/阳离子交换剂
CHAPS	两性, 胆汁酸衍生物		阴离子/阳离子交换剂 (pH依赖性)
CHAPSO	两性, 胆汁酸衍生物		阴离子/阳离子交换剂 (pH依赖性)
Deoxycholate	阳离子性		阴离子交换剂

 温度 10°C 时可减小样品组份之间由于疏水相互作用引起的聚集。在较低温度下操作或许可替代以去污剂来增加溶解度的方法。

用含有去污剂的缓冲液来建立并优化分离纯化过程

1. 选择同样品兼容的去污剂。去污剂必须是中性, 两性或者与离子交换填料有相同的电性。同填料相结合的去污剂的去除将会非常困难, 因此会影响蛋白的结合能力, pH, 电导及分离的分辨率。
2. 确定分离过程中可保持样品溶解状态的最低浓度。注意, 不同的去污剂会有不同的促溶解性质, 从而导致不同的样品峰模式。
3. 用含有去污剂的溶液充分平衡分离柱, 对特定的去污剂而言使用浓度应该低于形成微团的临界浓度。
4. 空运行一次盐梯度以确定去污剂的紫外吸收模式, 并检测对pH的影响。微团的形成会有光散射现象, 儿童在紫外检测器上出现一个峰。微团形成的问题, 参阅下述解决方法:
 - 在不影响样品溶解性的前提下, 尽可能减少去污剂的浓度。
 - 增加去污剂的浓度至微团形成临界点至上来运行梯度 (这样会导致紫外逐渐而不是突然的升高)。
 - 改变盐的梯度, 从而使得紫外吸收的突然变化不再发生。
 - 选用高度离液盐如LiClO₄或三氯乙酸钠, 它们可在高浓度下使用而不会引起微团的形成。
5. 进行测试运行以寻找能够获得最佳溶解效果及分辨率的去污剂。

 通过添加去污剂的运行获得的单峰通常会包含有多于一种的组分, 因此分析时应多加小心。选用不同的去污剂有可能会提高分离效果。

- 高浓度的去污剂会增加溶液黏度，因此必须降低流速以防止分离柱超压。在分离过程中，通常可降低溶解所需的去污剂浓度。
- 使用最高质量，无盐的去污剂。通过轻柔吸气来过滤含有去污剂的缓冲液，并利用超声来除气以避免泡沫的产生。
- 在使用含有去污剂的缓冲液之前，用推荐的操作充分冲洗以前用过的分离柱。

减小极性的试剂

单乙烯基乙二醇，甘油及相似而性质温和的试剂可添加在缓冲液中以减少极性。避免高浓度 (>40% w/w)，因为缓冲液黏度会增加，并导致分离柱超压。

金属螯合剂：EDTA,EGTA

EDTA（乙二胺四乙酸）及EGTA（乙二醇双(2-氨基乙基)四乙酸）通常用在缓冲液中作为金属离子螯合剂，他们可用于离子交换色谱层析。EDTA和EGTA包含数个羧酸基团，有可能会同阴离子交换剂发生相互作用。在阴离子交换层析中，EDTA和EGTA会在分离柱上富集成一条带，并在盐梯度中洗脱下来。两种分子都会吸收紫外，因而在色谱图上会出现对应的峰或是背景噪音。

结果分析及后续步骤

对初次分离的结果进行分析可确定能否改善条件来增加产量，获得更高的纯度，加速分离过程或增加每个单独的运行过程中所能够处理的样品量。

利用盐梯度洗脱的样品会含有不同浓度的盐离子。如果检测试验对盐离子浓度的改变较为敏感，分析前稀释或对组分进行脱盐操作。

常用的分析实验列于附录8。

规模放大

对于快速分离过程而言，在小分离柱上重复分离过程数次并收集目的组分要比将分离扩大至更大的分离柱更容易。然而，对于大体积样品的常规分离操作，大一些的分离柱更为适用。规模放大的通用指导原则见表5。

表5，规模放大的指导原则。

不变项目	增加项目
分离柱柱床高度	分离柱体积，及分离柱的直径
线性流速 (cm/h)	体积度量的流速 (ml/min)
样品浓度	样品加载
梯度洗脱体积，及洗脱所需的柱床体积数	

放大离子交换层析纯化过程时，遵循如下几点以保证小规模纯化与更大规模纯化具有相同的周期：

1. 在小规模进行分离条件优化。
2. 维持柱床高度，样品浓度及样品体积与填料体积的比值恒定。
3. 通过增加分离柱的横截面积（直径）来增加分离柱的体积。
4. 使用与小分离柱一样的线性梯度（见附录5），以及相同的梯度体积与柱床体积的比值。

在方法建立过程中，为了提高率需要使用小尺寸颗粒的填料。然而小尺寸颗粒会导致背景压力的增加，该因素会成为规模放大时的限制因素。考虑使用大一些尺寸的颗粒，最好是相同的填料以便于获得低背景压力及高流速。

当分离规模扩大时，样品洗脱时的盐离子浓度可能会随着样品加载量的增加而降低。当样品经过分离柱时，含有较低净电荷的组分会被带有交稿净电荷的组分所取代。分子会以同样顺序被洗脱下来，但是会在洗脱模式的不同位置。

在进行方法筛选时，只要可能，请使用大规模分离时所用的填料来进行方法建立。

对于工业级别的纯化过程，必须满足生产对于通量以及原位清洗的要求，因此应该将优化后的方法尽可能早的转入为生物过程而设计的填料中，如SOURCE, Sepharose High Performance, Sepharose Fast Flow or Sepharose Big Beads。





关于分离柱选择及填充，参见附录3。

设备选择

附录4为选择离子交换色谱层析系统提供了指导。

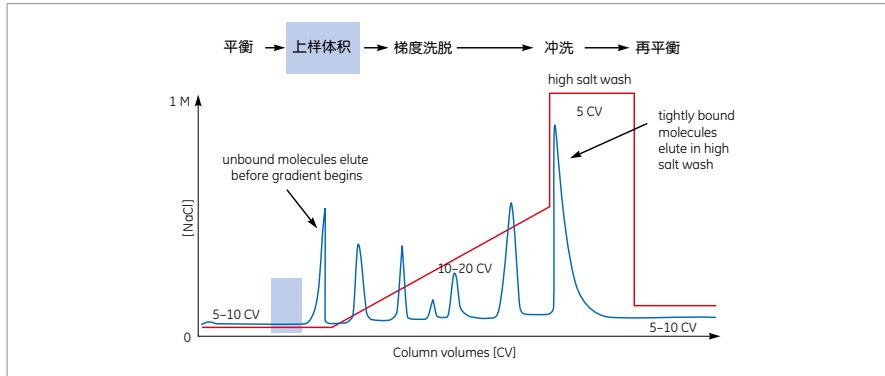
离子交换填料的注意事项

当离子交换填料使用了一段时间后，有必要去除残留在分离柱中的沉淀蛋白及其他污染物。以下现象表明分离柱需要进行清洗：**分离柱顶端出现带有颜色的区带，顶部转换器与柱床表面出现空隙，分辨率的下降以及背景压力的显著增加**。第3章给出了每种离子交换填料的通常清洗操作过程，附录10同样包含有对于沉淀蛋白，脂类，疏水结合的蛋白或脂蛋白污染的推荐清洗操作。无论如何，预防要好于事后清洗，同时推荐定期对分离柱进行清洁工作。

-  坚持使用过滤过得缓冲液及样品，以减少分离柱需要额外保养的可能。
-  坚持对缓冲液进行脱气操作，并保持缓冲液，分离柱及样品处于相同的温度以避免分离柱中气泡的产生。
-  使用前过滤净化所有溶液，并在分离过程之间坚持用起始缓冲液对分离柱进行再平衡。
-  如果从压力检测器上观察到背景压力升高，或者看到填料表面发生下降，在启动分离柱清洗操作前请检查确认问题是否确实由分离柱引起。每次拆下设备的一部分（从组分收集器开始），启动输入泵并检查每部分拆下后系统的压力。在线过滤器的变脏是背景压力升高的一个通常原因。在每个运行过程的同一阶段检测背景压力，因为在运行中，样品加注及更换缓冲液时的柱压值是不一样的。

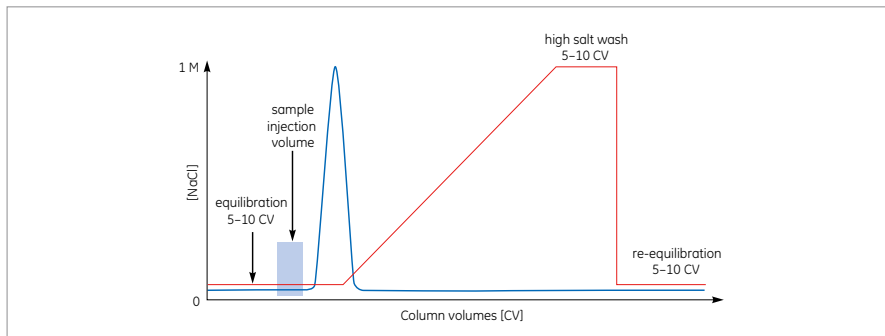
问题及解决方案

理想的离子交换层析分离过程：通过梯度洗脱完整的获取目的蛋白



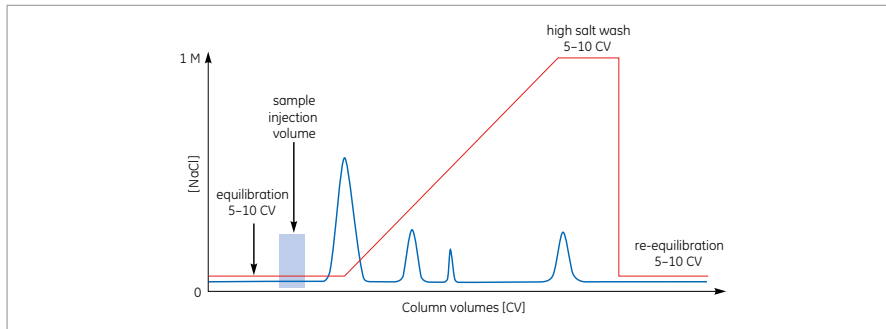
只要目的蛋白峰能够通过梯度洗脱很好的获得分离，就可以转入分步洗脱以节约时间及缓冲液。本节剩余部分将集中在有可能导致不理想离子交换色谱层析效果的实际问题。

在盐离子梯度开始前样品洗脱出来



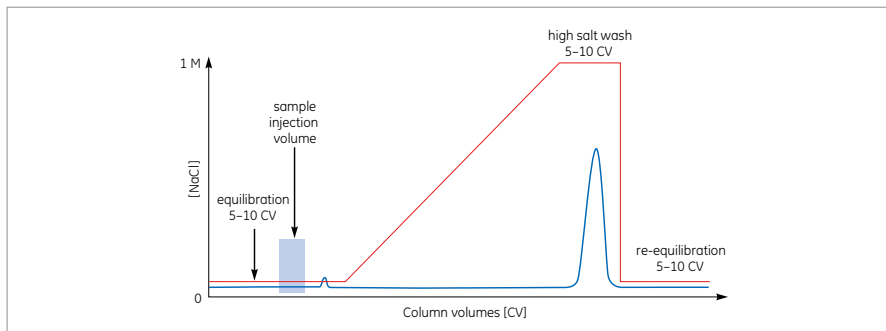
确保缓冲液在正确的容器中。通过脱盐来降低样品的离子强度，见第156页或用起始缓冲液稀释样品。对于阴离子交换剂增加缓冲液的pH值，对于阳离子交换剂降低缓冲液的pH值。如果蛋白在任何pH下都不结合，很有可能分离柱被去污剂所污染。

梯度开始前样品仍被洗脱出



样品加载后必须等到紫外吸收值返回到基线后才能开始洗脱过程，否则不结合蛋白会影响分离效果。可在梯度洗脱前增加平衡步骤中起始缓冲液的用量。

样品在高盐冲洗时洗脱出



蛋白结合过于紧密。确保缓冲液处在正确的容器中。如果使用阴离子交换柱，降低缓冲液的pH；如果使用阳离子交换柱，增加缓冲液的pH。

目的蛋白在梯度后部洗脱下来

蛋白结合过于紧密。增加梯度的离子强度。如果洗脱需要非常高的盐离子强度时，最好改变pH。如果使用阴离子交换柱，降低缓冲液的pH；如果使用阳离子交换柱，增加缓冲液的pH。参见表6。

目的蛋白过早从梯度中洗脱下来

蛋白结合太弱。检查梯度的离子强度。调整pH值，如果使用阴离子交换柱，增加缓冲液的pH；如果使用阳离子交换柱，降低缓冲液的pH。参见表6。

目的蛋白未能充分的得到分离

参见本章内容，检查提高分辨率的主要参数。参见表6。

异常情况	原因	解决方案
液流减弱或没有液流通过	输出口关闭, 或输入泵不工作	打开输出口。检测输入泵是否存在渗漏(使用蠕动泵时, 检查管道)
	过滤膜, 末端接口, 转换器或管道堵塞。	除堵塞部分, 如有可能将其更换掉。使用前应对样品及缓冲液进行过滤。
	脂蛋白或蛋白的聚集导致沉淀	在样品准备时去除脂蛋白, 阻止聚集的发生(附录1); 清洗操作见附录10。
	蛋白在分离柱中沉淀	调整运行过程中的缓冲液, pH或盐离子条件以保持蛋白稳定性。清洗操作见附录10
	分离过程中由于稳定试剂的去除而导致蛋白在分离柱中发生沉淀	调整洗脱液以维持蛋白的稳定性
	分离柱中微生物的生长	分离柱不用时请将其保存于20%乙醇中。对缓冲液使用前进行过滤。清洗操作见附录10。
目的蛋白的峰不能同其他物质峰分开	样品加载不正确	检查柱床表面及顶部过滤器是否被污染。
	在分离柱顶部或之后是否有较大的使样品混合的体积存在	如有必要, 将顶部转换器调整至靠近填料表面。减少出柱后的管道体积。
	错误的pH或离子强度的缓冲液	检查缓冲液的pH及离子强度, 确保在前一个运行过程后对分离柱进行了再平衡。检查运行条件是否符合要求, 或准备新的溶液
	洗脱条件不是最佳, 如不正确的pH, 梯度太陡, 流速太高等	改变洗脱条件: 改变pH, 使用更平缓的梯度, 降低流速(优先考虑)。
	样品粘度太大	用缓冲液稀释样品。保持样品浓度在50mg/ml之下。
	分离柱填充效果差。	检查柱效(附录3), 如有必要重新填充, 或使用预装柱。
	分离柱过载。	减少样品加载量。
	脂蛋白, 或蛋白聚集而导致沉淀	在样品准备过程中去除脂蛋白以防止沉淀(附录1)。
	分离过程中由于稳定试剂的去除而导致蛋白在分离柱中发生沉淀	调整洗脱液以维持蛋白的稳定性
	分离柱中微生物的生长	分离柱不用时请将其保存于20%乙醇中。对缓冲液使用前进行过滤。清洗操作见附录10。
蛋白不结合, 或不按预期洗脱下来	蛋白质或脂类沉淀在分离柱或分离柱过滤膜上	清洗分离柱, 更换或清洗过滤膜。检查样品的pH及盐离子稳定性。
	样品没有经过合适的过滤。	清洗分离柱, 过滤样品并重复此过程。
	在储存过程中样品发生了改变。	制备新鲜样品。
	蛋白在洗脱缓冲液中不稳定或失活	确定蛋白的稳定pH及离子强度。
	分离柱平衡不完全。	重复或延长平衡步骤直到电导及pH达到恒定水平。
	不正确pH及离子强度的缓冲液	检查所需分离条件, 准备新的溶液。
	蛋白产生聚集并同填料紧密结合。	使用最高浓度可达10%的尿素或两性试剂, 甜菜碱; 或高达4%的牛磺酸进行清洗。
	样品及缓冲液条件同前面运行过程不同	检查样品及缓冲液条件
	分离柱中微生物的生长	分离柱不用时请将其保存于20%乙醇中。对缓冲液使用前进行过滤。清洗操作见附录10。

异常情况	原因	解决方案
蛋白洗脱时间比预计要晚, 或完全洗脱不下来	错误pH值的缓冲液。	检查pH计准确度。使用pH值靠近蛋白质等电点的缓冲液。
	离子强度太低。	在洗脱缓冲液中添加盐离子浓度。
	蛋白质与填料间的离子相互作用。	降低盐离子浓度以使疏水相互作用降至最低。增加pH。加入适当的去污剂或有机溶剂, 如5%异丙醇。
	错误的pH条件。	增加pH (阴离子交换剂) 降低pH (阳离子交换剂)
色谱图中的峰非常平缓或不均衡	分离柱平衡不完全。	重复或延长平衡步骤直到电导及pH达到恒定水平。
	分离柱中产生通道	使用填料的悬浮液重新装柱。检查分离柱的填充情况, 见附录3。
	分离柱过载	减少样品加载量及重复过程
	分离柱被污染	使用推荐操作清洗分离柱。
样品峰拖尾	错误条件的起始缓冲液: 或样品不同分离柱结合。	调整pH。检查起始缓冲液中的盐离子浓度。
	样品粘性太大	用缓冲液对样品稀释。
	分离柱填充太松散。	检查柱效 (见附录3)。使用更高流速重新装柱, 或使用预装柱。
样品峰具有向前的边缘	分离柱被压缩	检查柱效 (见附录3)。使用更低流速重新装柱, 或使用预装柱。
填料颗粒出现在洗脱液中	分离柱被压缩	检查柱效 (见附录3)。使用更低流速重新装柱, 或使用预装柱。
	柱床支撑物末端接口太松或破损	更换或拧紧。
	分离柱运行压力过高。	不要使用超过填料或分离柱所推荐的工作压力。
蛋白回收正常, 但活力回收低	蛋白在缓冲液中不稳定或失活。	确定蛋白的pH及盐离子浓度稳定性。
	酶与辅因子等分子分离。	将组分合并, 重复检测活力。
蛋白产量比预计的低	蛋白或许被蛋白酶降解。	向样品及缓冲液中添加蛋白酶抑制剂以阻止对蛋白的降解。将样品通过一些填料, 如Benzamidine 4 Fast Flow以去除类似胰岛素的丝氨酸蛋白酶。
	样品准备过程中过滤膜对蛋白的吸收。	更换另一种类型的过滤膜。
	样品沉淀。	检查pH及盐离子条件, 调整以增加蛋白的溶解性。
	疏水蛋白。	增加变性剂, 破坏极性的试剂或去污剂。向运行缓冲液中添加10%的乙烯基乙二醇以阻止疏水相互作用。
	非特异性吸收。	减少盐离子浓度以使疏水相互作用降至最低。添加适当的去污剂或有机溶剂, 如5%异丙醇。如有必要, 向运行缓冲液中添加10%的乙烯基乙二醇以阻止疏水相互作用。

异常情况	原因	解决方案
峰很小。	样品在选定波长下吸收差。	如果适当，检查检测器的吸收范围。如果满足要求，使用另一不同的波长，如214nm取代280nm。
	在色谱层析步骤前后使用了不同的试验方法。	所有检测使用相同的方法。
	条带过分变宽	检查分离柱填充情况。如有需要，重新填充。
获取蛋白量比预想的多	蛋白同其他物质一起洗脱下来。	优化条件以提高分辨率。检查运行前后活性检测试验的缓冲液条件。检查填料的选定。
回收的活力高于加载量	在色谱层析步骤前后使用了不同的试验条件。	所有检测使用相同的方法。
	分离过程去除了抑制剂。	
运行中或连续运行时背景压力增高。	柱床被压缩。	如有可能重新装柱或使用新柱。检查样品准备过程。
	分离柱中微生物的生长	分离柱不用试请将其保存于20%乙醇中。对缓冲液使用前进行过滤。清洗操作见附录10。
	样品浑浊	改善样品准备过程（附录1）。增加样品溶解性：加入甜菜碱（25℃时最高10% w/v），牛磺酸（25℃pH8.5之下最高4% w/v）。对于疏水样品，加入乙烯基乙二醇，尿素，去污剂或有机溶剂。
	错误的pH会导致沉淀的产生。	校准pH计，准备新的溶液再试一次。改变pH。
	随着离子强度的增加脂蛋白的沉淀。	脂蛋白可在色谱层析前通过添加10%的硫酸葡聚糖（终浓度0.2%）及1M CaCl ₂ （终浓度0.5M）除去。
柱床上有气泡。	缓冲液未进行适当的除气。	彻底除气。
	分离柱填充及储存于较低温度，然后温度上升。	通过使除气的缓冲液通过分离柱去除小的气泡。如果使用的缓冲液在冰箱冷室中储存过，使用时多加小心。不要使分离柱因为阳光或加热系统而变热。如有可能，重新填充分离柱。（见附件3）。
柱床有裂缝。	大体积空气渗透于分离柱中	检查所有连接点排除渗漏。如有可能，重新填充分离柱。（见附件3）。
柱床有裂缝。	大体积空气渗透于分离柱中	检查所有连接点排除渗漏。如有可能，重新填充分离柱。（见附件3）。
溶剂前沿的负峰。	折射率效应。	将样品更换为起始缓冲液中。
色谱层析中为预计的峰	缓冲液不纯。	通过预处理柱净化缓冲液。使用高质量试剂。
峰以梯度形式出现	前面样品洗脱不完全	根据建议的空运行方法冲洗分离柱。
色谱曲线的中断。	气泡停滞在紫外检测器的液流池中。	坚持使用除气缓冲液。
紫外基线随着梯度而上升。	随着盐离子浓度增加，微团形成。	在任何一种去污剂形成微团的临界点之下运行，或更换梯度，这样样品洗脱时紫外吸收不会增加。
	缓冲液不纯。	使用高纯度试剂。

* 极性有机溶剂，如甲醇，乙醇，异丙醇和乙腈等可在0-20%浓度内使用，但切记有写蛋白在有机溶剂存在时会不可逆的丧失掉生物活性。在运行分离前，检查样品及缓冲液的溶解性，缓冲液pH值及填料的化学稳定性。注意，当使用有机溶剂时，系统的背景压力或许会增加。

BioProcess填料——适合生产的填料

特定的BioProcess™填料为生产过程中的每个色谱分析阶段而设计，从获取到精细纯化。高生产能力同高效订货系统以及运输流的结合保证了客户可在正确的时间，正确的地点获得正确数量的BioProcess 填料。GE Healthcare可保证BioProcess 填料在未来的持续供应，从而使其成为意向安全的长期生产投资。所有填料都是按照标准认定的方法生产，并经过严格控制的检测以保证高效规范。每一笔订单都会有分析证明书。

法规支持文件包含有系统运行，稳定性，可提出物质以及分析性方法的细节。这些文件的关键信息可为生产流程确立提供无价的起点，同时还为调整权威人士提供技术支持。在分离纯化的每一步中使用BioProcess填料会获得轻松而又有效的结果。高流速，高结合能力以及高回收率都有利于提高整个工业化生产过程的生产能力。

所有BioProcess填料都具有化学稳定性，从而允许有效地清洁及净化处理操作。装柱方法适用于各种规模分离纯化，且相兼容的大规模分离柱及设备也可获得。有关BioProcess产品的最新信息，请浏览www.bioprocess.amershambiosciences.com。

客户定制填料

客户定制的填料（CDM）为同工业级别的客户提供的写协作服务以生产特制的色谱层析填料。当合适的填料从标准系列中不能获得时，CDM为特定的工业分离过程而设计。Amersham Biosciences的CDM工作人员会同客户紧密合作以设计，制造，测试并运输适合于大规模纯化的分离填料。

用户定制的实验室级别分离柱

Amersham Biosciences的客户产品集团可提供预装柱。各种类型的分离柱保证了我们所有纯化填料能够高效运行，并满足现代药物生产的需求。每个柱子都在ISO9001标准严格控制下进行装柱，测试及认证。

更多信息，请咨询当地销售代表。

第三章 离子交换填料


简介

历史上曾有几种不同类型的材料作为填料的基础，它们共价连接有带正电或负电的基团，从而形成离子交换填料。第一张描述了填料性质如何影响色谱分析的特征，如柱效，结合能力，回收率以及化学物理稳定性和流速特征。

第一个合成的离子交换填料并不适用于生物样品。他们具有很强的结合能力，但是同蛋白质结合能力非常弱。这些疏水填料很容易将易变得到生物材料变性。纤维素填料，尽管他们比合成填料柔和一些，但却具有低结合能力以及由于不规则形状带来的低流速问题。右旋糖苷填料随着缓冲液离子强度的增加或pH的改变有皱缩的倾向，从而影像分辨率及运行之间的可重复性。

这些年来许多不同的填料曾被使用，包括Sephadex, Sephacel 和 Sepharose CL-4B，有关它们的参考文献仍可在一些古老的科学文献中找到。现代发展起来的填料在具有改良的结合能力同时，还有很高的化学及物理稳定性。

同早期填料相比，现代离子交换层析填料极大的改善了流速特征，并且在改变离子强度及pH条件下柱床体积不会改变。如有必要，可使用剧烈条件对分离填料进行清洗，并且不需要频繁的重新装柱。大部分的填料还可满足大规模工业级别色谱分析的通量及原位清洗要求。

 为更好的利用现代填料快速的分离及改善的分离效果，请将旧的方法转移或优化至本章所描述的适用于新填料的方案。

MiniBeads: 微克至毫克级最高分辨率的纯化及分析

- 使用MiniBeads进行蛋白质，多肽及寡核苷酸的分离纯化及分析。
- 微小规模分离时，如果最高分辨率为首要因素，且预装柱具有充足的结合能力，使用MiniBeads进行最后的精细纯化过程。
- 如果只需要进行微克至毫克级别样品的处理，如果不需要进行纯化规模放大，如果预装柱具有充足的结合能力，可以使用MiniBeads进行中间的纯化过程。注意，为避免分离柱堵塞，在使用MiniBeads前去除样品中颗粒物特别重要。
- 在ÅKTAdesign, FPLC™ System 及 HPLC.等系统上使用MiniBeads。附录4给出了怎样选择最适合的ÅKTAdesign系统的指导。

MiniBeads基于无孔而单分散的填料，由坚硬的亲水聚合物颗粒制成，表面由季铵（Q）或甲烷磺酸（S）基团所取代。颗粒的小尺寸（3 μm），同一性及物理硬度为在相对高流速以及低背景压力（非均一性，多孔的颗粒会产生高的背景压力，从而使流速降低，并破坏有可能获得的分辨率）下进行极端高分辨率的离子交换层析分离提供了理想条件。如此高的分辨率对于成功分离pg至 μg级别的复杂样品至关重要。强离子交换基团（Q及S）可在宽pH范围内保持带电性，从而可使每个应用过程中选定最合适的pH值。

突出MiniBeads应用的参考列表请见www.chromatography.amershambiosciences.com

纯化选项



图27, Mini Q和 Mini S™填料被预装在Tricorn™ (4.6/50 PE) 及Precision (PC 3.2/3) 分离柱中。

产品, 分离柱体积	每分离柱的结合能力	最大流速	推荐工作流速	工作pH范围*	最大工作背景压力** (MPa/psi) 1 MPa=10 bar
强阴离子交换剂					
Mini Q PC 3.2/3, 0.24 ml***	1.44 mg (α-amylase, Mr49 000) 1.44 mg (trypsin inhibitor, Mr 20 100)	1 ml/min	0.1-1.0 ml/min	3-11	10/1450
Mini Q 4.6/50 PE, 0.8 ml	4.8 mg (α-amylase, Mr 49 000) 4.8 mg (trypsin inhibitor, Mr 20 100)	2 ml/min	0.5-2.0 ml/min	3-11	18/2600
强阳离子交换剂					
Mini S PC 3.2/3, 0.24 ml***	1.2 mg (ribonuclease, Mr 13 700) 1.2 mg (lysozyme, Mr 14 300)	1 ml/min	0.1-1.0 ml/min	3-11	10/1450
Mini S 4.6/50 PE, 0.8 ml	4 mg (ribonuclease, Mr 13 700) 4 mg (lysozyme, Mr 14 300)	2 ml/min	0.5-2.0 ml/min	3-11	18/2600

* 工作pH是指填料结合蛋白的pH间隔或洗脱所需要的pH, 而不是产生不利的长期效应的pH值。

** 最大工作背景压力是指高于此压力时, 填料会被压缩。

*** 需要精密分离柱固定器以便于连接至ÅKTApurifier™ 及其他 HPLC 系统上。

纯化举例

高分辨率快速分离纯化

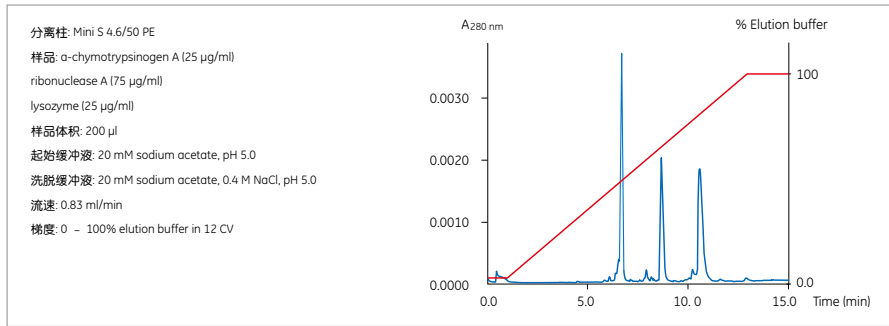


图28, 利用Mini S 4.6/50进行的蛋白混合物分离。

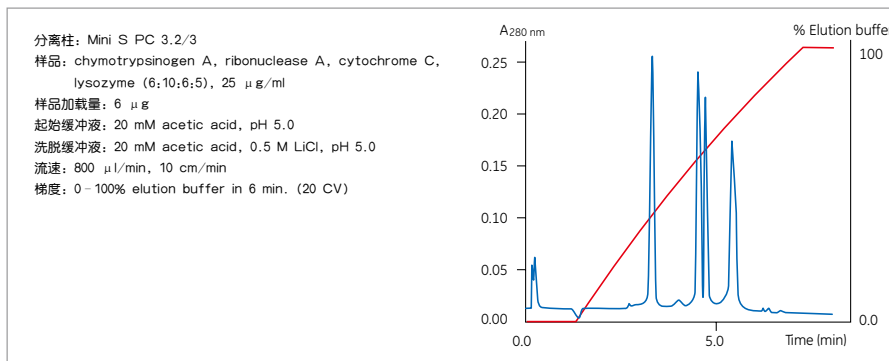


图29, Mini S PC 3.2/3可以进行快速, 高分辨率的分离。

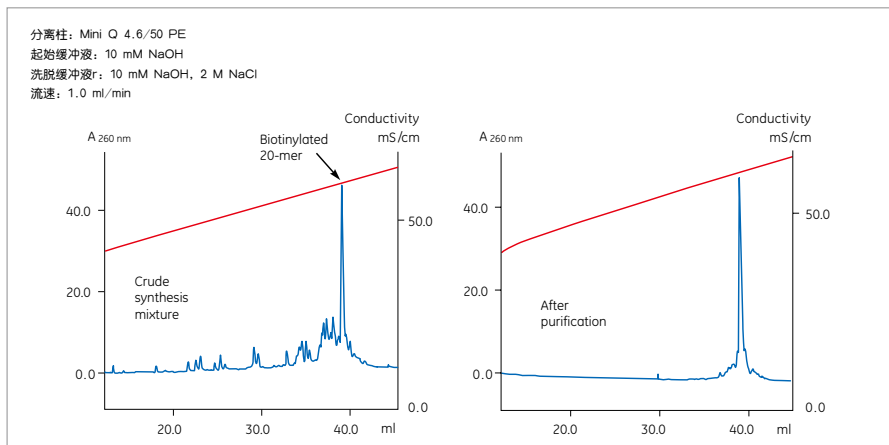


图30, 利用Mini Q 4.6/50 PE对RESOURCE RPC分离柱分离5'-生物素标记的合成29mer寡核苷酸分离效果进行纯度检测。

长期可重复性

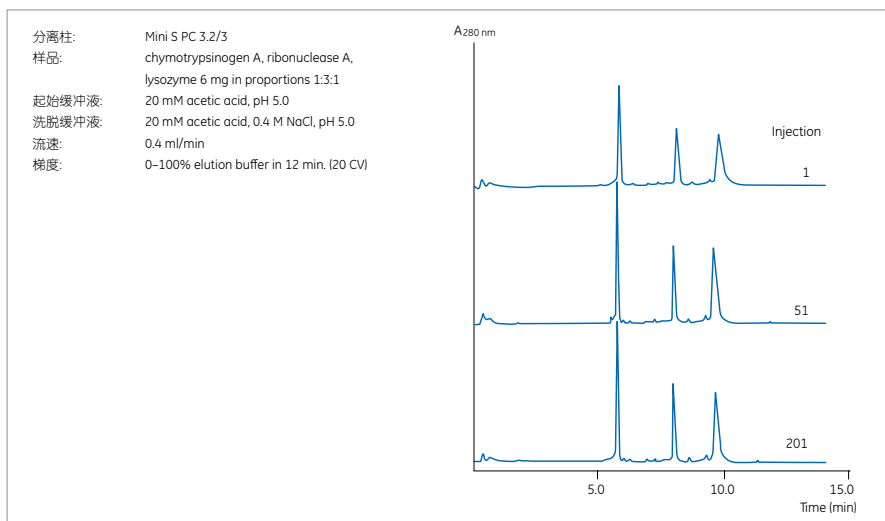


图31, 在同一Mini S PC 3.2/3分离柱上第1, 5及201次分离过程的色谱分析图, 不同运行过程之间的重复性已得到确认(数据未展示)。

运行分离过程

有关填料, 缓冲液, pH及离子强度的选择和方法优化方面的指导参见第二章。本节所给出的说明可用于分离过程的优化。

- 正确的样品及缓冲液准备工作对于获得最佳分辨效果, 避免分离柱工作能力受损至关重要, 特别是使用小颗粒填料时, 如MiniBeads。样品必须完全溶解, 并且没有颗粒或其他干扰分离纯化效果的物质。有关样品准备方面的推荐以及建议参见第二章及附录1。
- 在所有盐及添加剂加入后, 过滤缓冲液。使用高质量的水及化学试剂。用0.22 μm孔径的过滤器过滤溶液。为避免装好的分离柱中气泡的产生, 确保准备运行时分离柱与缓冲液处在相同的温度。
- 使用阴离子交换剂(Q)时, 起始缓冲液的pH应至少高于目标蛋白等电点0.5-1个pH单位; 使用阳离子交换剂(S)时, 起始缓冲液的pH应至少低于目标蛋白等电点0.5-1个pH单位。有关阴阳离子交换剂所使用的挥发性或非挥发性缓冲液系统的建议, 参见附录2。

对于电性未知样品，尝试以下方案：

—— 阴离子交换（Q）

起始缓冲液：pH 8.0

洗脱缓冲液：起始缓冲液中包含1M NaCl，pH8.0

—— 阳离子交换（S）

起始缓冲液：pH 6.0

洗脱缓冲液：起始缓冲液中包含1M NaCl，pH 6.0

带有BufferPrep功能的ÅKTAdesign系统的使用者可选用系统所推荐的阴阳离子色谱层析缓冲液配方，pH分别为8和6。

第一次使用或长期储存后：

1. 用4个柱体积蒸馏水以0.5ml/min速度冲洗以去除乙醇。该步骤可保证乙醇的去除，从而避免缓冲液中的盐与乙醇相遇时产生沉淀的风险。如果沉淀不是问题，则该步骤可省略。
用起始缓冲液以0.8ml/min速度冲洗4个柱体积。
2. 用洗脱缓冲液以0.8ml/min速度冲洗4个柱体积。
3. 用起始缓冲液以0.8ml/min速度冲洗4个柱体积。
4. 加入样品前空运行洗脱过程一次。

梯度洗脱进行分离

流速：0.4 ml/min (PC 分离柱) 或0.8 ml/min (PE 分离柱)。收集分离过程的所有组分。

1. 用5-10柱体积的起始缓冲液平衡分离柱，直到基线，洗脱pH及电导稳定。
2. 将样品调节至选定起始pH及离子强度，加载到分离柱上。
3. 用5-10柱体积的起始缓冲液平衡分离柱，直到基线，洗脱pH及电导稳定，即所有未结合物质都被冲洗出了分离柱
4. 用10-20个柱体积的梯度进行洗脱，同时盐离子浓度逐渐增加至0.5M NaCl（50%B）。
5. 用5个柱体积的1M NaCl（100%B）冲洗分离柱以洗脱任何残留的离子性结合物质。
6. 用5-10柱体积的起始缓冲液再平衡分离柱，直到基线，洗脱pH及电导到达所需值。

分步洗脱进行分离纯化


尽管使用MiniBeads也可以进行分步洗脱（见第二章，第19页）的纯化过程，但推荐使用梯度洗脱以获得可能的最高分辨率。

- 如果使用了离子性去污剂，用5个柱体积的蒸馏水冲洗分离柱后，用2个柱体积的2M NaCl冲洗。用至少10柱体积的起始缓冲液再平衡分离柱，直到基线，洗脱pH及电导稳定。有机溶剂如乙醇可用来去除非离子型去污剂。当选用有机溶剂时，检查填料的化学稳定性以确定一个合适的浓度。

- 分离过程优化的建议参见第二章。定期通过确定柱效及峰的对称性检查分离柱的工作能力，见附录3。

清洗

样品及缓冲液的正确准备，以及每次分离过程后用高盐溶液（1M NaCl）冲洗回使分离柱处于良好的状态。然而，工作能力的下降，流速的变慢，背景压力的增加以及完全的堵塞都表明分离柱需要使用剧烈的操作来进行清洗以出去污染物。

 清洗分离柱时建议采用反向液流，这样污染物就不用穿越整根分离柱而被冲洗出来。根据污染程度的不同清洗所用的缓冲液体积数及清洗时间也有所不同。

以下步骤足以满足对普通污染物的清除：

1. 用2M 的NaCl以0.2ml/min的速度清洗2个柱体积。
2. 用1M 的NaOH以0.2ml/min的速度清洗4个柱体积。
3. 用2M 的NaCl以0.2ml/min的速度清洗2个柱体积。
4. 用至少2个柱体积的蒸馏水以0.2ml/min的速度润洗分离柱，直到基线，洗脱pH及电导稳定。
5. 用至少4个柱体积的起始缓冲液或储存缓冲液以0.2ml/min的速度冲洗分离柱，直到基线，洗脱pH及电导稳定

如需去除沉淀的蛋白，脂类，疏水结合蛋白或脂蛋白，参见附录1。

填料特性

组成：刚性单分散的无孔填料，亲水聚合物颗粒（3 μm）通过表面基团被季铵（Q）或甲烷磺酸（S）基团所取代。

产品	功能团	pH稳定性 *	平均颗粒尺寸
Mini Q	-CH ₂ N ⁺ (CH ₃) ₃	长期： 3-11 短期： 1-14	3 μm（单一尺寸）
Mini S	-CH ₂ SO ₃ ⁻	长期： 3-11 短期： 1-14	3 μm（单一尺寸）

* 长期pH稳定性是指填料在长期储存后保持稳定，没有色谱分离效果降低的pH区间。

短期pH是指再生，原位清洗以及净化操作时的pH区间。所有的区间都是通过Amersham Biosciences内部试验确定。

化学稳定性

对于日常应用，MiniBeads在所有通常水溶液pH3-11条件下，以及存在添加剂条件下，如变性剂（8M尿素或6M盐酸胍），离子性或非离子性去污剂，以及高达30%的乙腈中都保持稳定。注意，水溶液中的尿素，乙烯基乙二醇及相似的化合物会使黏度增加而增大背景压力。

MiniBeads可使用有机溶剂，如DMSO, dimethylformamide或甲酸，但此时填料的分离特性会发生改变。

 避免MiniQ中使用阴离子去污剂。避免MiniS中使用阳离子去污剂。避免氧化性试剂。

储存

分离柱储存时，用4个柱体积的蒸馏水冲洗，随后用4个柱体积的20%乙醇冲洗。对乙醇/水的混合物充分脱气，并在较低流速下使用以避免分离柱超压。室温储存，或者在4°C - 8°C之间长期储存。如有可能，尽量使用制造商提供的储存及运输装备。确保分离柱密封严实以避免干掉。不能使分离柱冰冻。

MonoBeads: 毫克级别最高分辨率的纯化

- 使用MonoBeads来纯化蛋白质，多肽及寡核苷酸。
- 在实验室规模的纯化中如果最高分辨率为首要因素，且需要比MiniBeads更高的结合能力，可使用MonoBeads进行精细步骤的纯化。
- 纯化毫克级别蛋白时，如果不需要进行纯化规模放大，或预装的MiniBead分离柱不能提供充足的结合能力时，可使用MonoBeads进行获取或中度纯化。注意，为避免分离柱的堵塞，在使用前去除样品中的颗粒物特别重要。
- 在ÅKTA design, FPLC 系统及 HPLC上运行MonoBeads。有关如何选择最合适的ÅKTA design 系统的指导，参见附录4。

MonoBeads为基于单分散刚性聚苯乙烯及联乙烯苯颗粒制成的亲水填料，表面由季铵（Q）或甲烷磺酸（S）基团所取代（图32）。这种结合为填料提供了极高的化学及物理稳定性。颗粒的小尺寸（10 μ m），可实现快速结合解离从而保证了高分辨率；而颗粒大小的一直保证了系统高流速低背景压力的运行。强离子交换基团（Q及S）可在宽pH范围内保持带电性（图33），从而可使每个应用过程中选定最合适的pH值。

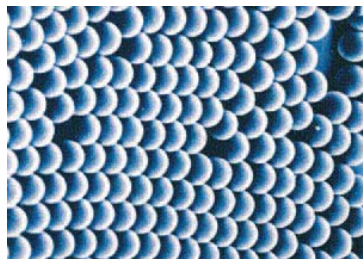


图32， MonoBeads的电镜照片展示了它们明显的单分散性。

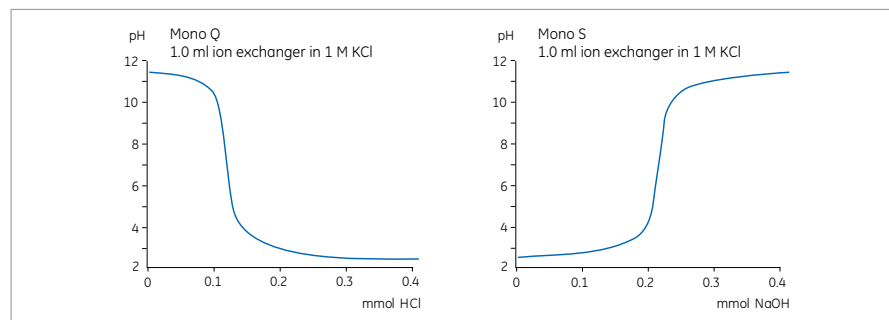


图33， Mono Q和Mono S TM的滴定曲线，在很宽的工作pH范围内保持恒定的结合能力。

有关突出介绍MonoBeads使用的信息参见www.chromatography.amershambiosciences.com

纯化选项



图34， MonoBeads Q及S的Tricorn PE (PEEK)和 Tricorn GL（玻璃）预装柱。

产品，柱床体积	每分离柱的结合能力	推荐工作流速	最大流速	工作pH区间*	最大运行背景压力** (MPa / psi) 1 MPa=10 bar
强阴离子交换剂					
Mono Q 5/50 GL, 1 ml	25 mg (thyroglobulin, M _r 669 000) 65 mg (HSA, M _r 68 000) 80 mg (α-lactalbumin, M _r 14 300)	0.5–3.0 ml/min	3 ml/min	2–12	4/580
Mono Q 4.6/100 PE, 1.7 ml	40 mg (thyroglobulin, M _r 669 000) 110 mg (HSA, M _r 68 000) 140 mg (α-lactalbumin, M _r 14 300)	0.5–3.0 ml/min	3 ml/min	2–12	4/580
Mono Q 10/100 GL, 8 ml	200 mg (thyroglobulin, M _r 669 000) 520 mg (HSA, M _r 68 000) 640 mg (α-lactalbumin, M _r 14 300)	2.0–6.0 ml/min	10 ml/min	2–12	4/580
Mono Q HR 16/10, 20 ml	500 mg (thyroglobulin, M _r 669 000) 1300 mg (HSA, M _r 68 000) 1600 mg (α-lactalbumin, M _r 14 300)	up to 10 ml/min	10 ml/min	2–12	3/435
强阴离子交换剂					
Mono S 5/50 GL, 1 ml	75 mg (human IgG, M _r 160 000) 75 mg (ribonuclease, M _r 13 700)	0.5–3.0 ml/min	3 ml/min	2–12	4/580
Mono S 4.6/100 PE, 1.7 ml	130 mg (human IgG, M _r 160 000) 130 mg (ribonuclease, M _r 13 700)	0.5–3.0 ml/min	3 ml/min	2–12	4/580
Mono S 10/100 GL, 8 ml	600 mg (human IgG, M _r 160 000) 600 mg (ribonuclease, M _r 13 700)	2.0–6.0 ml/min	10 ml/min	2–12	4/580
Mono S HR 16/10, 20 ml	1500 mg (human IgG, M _r 160 000) 1500 mg (ribonuclease, M _r 13 700)	up to 10 ml/min	10 ml/min	2–12	3/435

* 工作pH是指填料结合蛋白的pH间隔或洗脱所需要的pH，而不是产生不利的长期效应的pH值。

** 最大工作背景压力是指高于此压力时，填料会被压缩。

纯化举例

利用互补选择性进行两步纯化

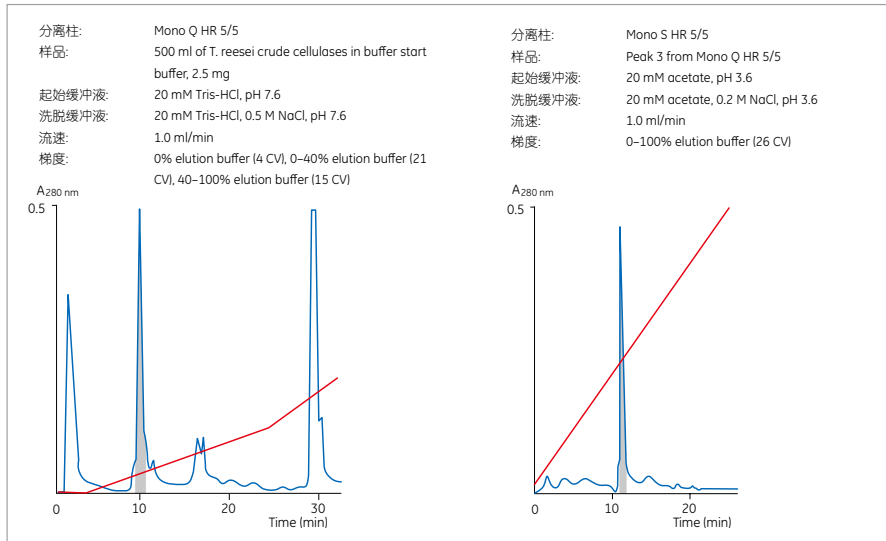


图35, 利用Mono Q和Mono S HR 5/5分离柱对纤维素酶的纯化(现改为Mono Q 5/50 GL and Mono S 5/50 GL)。

高分辨率, 精细纯化步骤

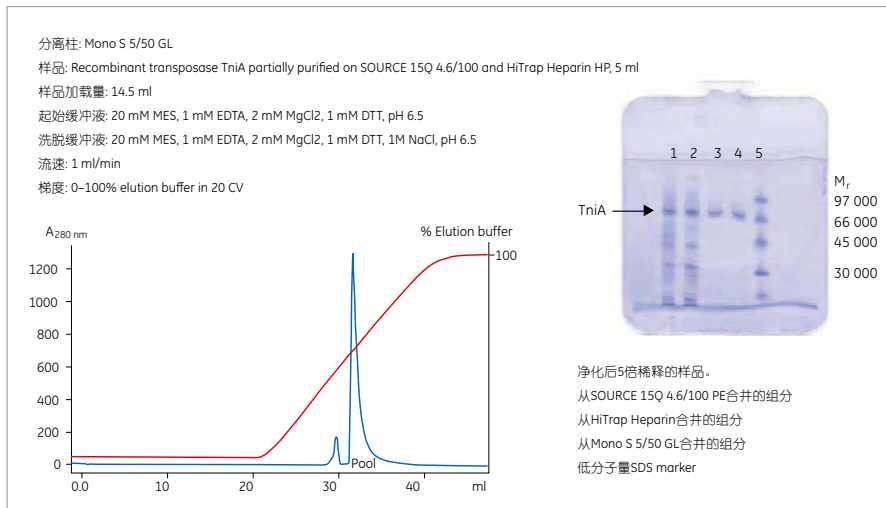


图36, 对DNA结合蛋白transposase TniA的最终精细纯化步骤。经过MonoS5/50 GL后两个峰完整分开。(a) SDS-PAGE分析展示了本方案的三个步骤的纯化效果。(b) PhastSystem™系统, 使用了SDS-PAGE PhastGel™ Homogenous - 12.5及考马斯亮蓝染色。

长期可重复性

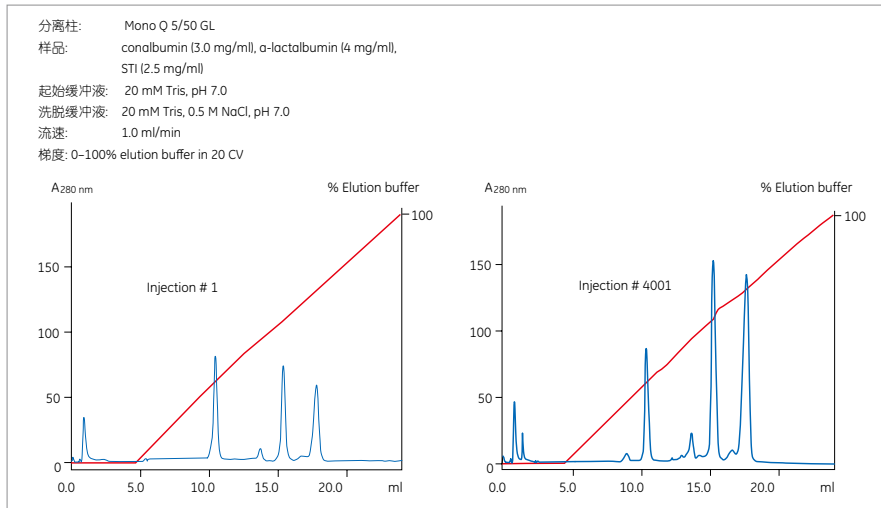


图37，色谱曾稀士展示了Mono Q 5/50 GL分离柱的可重复性。展示了第1，1000及2000个运行过程。

使用有机溶剂的分离过程

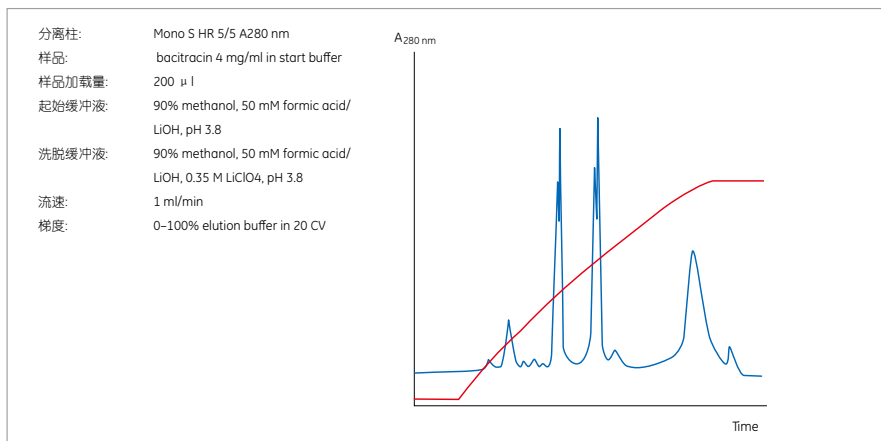





图38，利用Mono S HR 5/5（现在为Monos 5/50 GL）对枯草杆菌素进行分离。

运行分离过程

有关填料，缓冲液，pH及离子强度的选择和方法优化方面的指导参见第二章。本节所给出的说明可用于分离过程的优化。

-  正确的样品及缓冲液准备工作对于获得最佳分辨效果，避免分离柱工作能力受损至关重要，特别是使用小颗粒填料时，如MiniBeads。样品必须完全溶解，并且没有颗粒或其他干扰分离纯化效果的物质。有关样品准备方面的推荐以及建议参见第二章及附录1。
-  在所有盐及添加剂加入后，过滤缓冲液。使用高质量的水及化学试剂。用0.22 μm孔径的过滤器过滤溶液。为避免装好的分离柱中气泡的产生，确保准备运行时分离柱与缓冲液处在相同的温度。
-  使用阴离子交换剂（Q）时，起始缓冲液的pH应至少高于目标蛋白等电点0.5-1个pH单位；使用阳离子交换剂（S）时，起始缓冲液的pH应至少低于目标蛋白等电点0.5-1个pH单位。有关阴阳离子交换剂所使用的挥发性或非挥发性缓冲液系统的建议，参见附录2。

对于电性未知样品，尝试以下方案：

—— 阴离子交换（Q）


起始缓冲液：pH 8.0

洗脱缓冲液：起始缓冲液中包含1M NaCl，pH8.0

—— 阳离子交换（S）

起始缓冲液：pH 6.0

洗脱缓冲液：起始缓冲液中包含1M NaCl，pH 6.0

-  带有BufferPrep功能的ÅKTAdesign系统的使用者可选用系统所推荐的阴阳离子色谱层析缓冲液配方，pH分别为8和6。

第一次使用或长期储存后

1. 用五个柱体积的蒸馏水将分离柱中的乙醇冲洗出，流速如下：1ml/min（1.7ml及1ml分离柱），2ml/min（8ml分离柱），4ml/min（20ml分离柱）。该步骤可保证乙醇的去除，从而避免缓冲液中的盐与乙醇相遇时产生沉淀的风险。如果沉淀不是问题，则该步骤可省略。
2. 用起始缓冲液冲洗五个柱体积，流速如下：1ml/min（1.7ml及1ml分离柱），2ml/min（8ml分离柱），4ml/min（20ml分离柱）。
3. 用洗脱缓冲液冲洗五个柱体积，流速同步步骤2。
4. 用起始缓冲液冲洗五个柱体积，流速同步步骤2。
5. 加载样品前空运行一次洗脱过程。

梯度洗脱进行分离

流速: 2ml/min (1.7ml及1ml分离柱), 4ml/min (8ml分离柱), 8ml/min (20ml分离柱)。收集分离过程的所有组分。

1. 用5-10柱体积的起始缓冲液平衡分离柱, 直到基线, 洗脱pH及电导稳定。
2. 将样品调节至选定起始pH及离子强度, 加载到分离柱上。
3. 用5-10柱体积的起始缓冲液平衡分离柱, 直到基线, 洗脱pH及电导稳定, 即所有未结合物质都被冲洗出了分离柱
4. 用10-20个柱体积的梯度进行洗脱, 同时盐离子浓度逐渐增加至0.5M NaCl (50%B)。
5. 用5个柱体积的1M NaCl (100%B) 冲洗分离柱以洗脱任何残留的离子性结合物质。
6. 用5-10柱体积的起始缓冲液再平衡分离柱, 直到基线, 洗脱pH及电导到达所需值。

分步洗脱进行分离纯化

尽管使用MiniBeads也可以进行分步洗脱 (见第二章, 第19页) 的纯化过程, 但推荐使用梯度洗脱以获得可能的最高分辨率。

- 在高盐冲洗及再平衡过程中可使用更高流速以节约时间。但不要超过分离柱的推荐最大流速。

- 如果使用了离子性去污剂, 用5个柱体积的蒸馏水冲洗分离柱后, 用2个柱体积的2M NaCl冲洗。用至少10柱体积的起始缓冲液再平衡分离柱, 直到基线, 洗脱pH及电导稳定。有机溶剂如乙醇可用来去除非离子型去污剂。当选用有机溶剂时, 检查填料的化学稳定性以确定一个合适的浓度。

- 定期通过确定柱效及峰的对称性检查分离柱的工作能力, 见附录3。分离过程优化的建议参见第二章。

清洗

样品及缓冲液的正确准备, 以及每次分离过程后用高盐溶液 (1M NaCl) 冲洗回使分离柱处于良好的状态。然而, 工作能力的下降, 流速的变慢, 背景压力的增加以及完全的堵塞都表明分离柱需要使用剧烈的操作来进行清洗以出去污染物。

- 清洗分离柱时建议采用反向液流, 这样污染物就不用穿越整根分离柱而被冲洗出来。根据污染程度的不同清洗所用的缓冲液体积数及清洗时间也有所不同。如果去除普通污染物的操作不能是分离柱柱效恢复, 在使用其他清洗方法前更换分离柱顶部滤膜。更换滤膜时应多加小心, 防止影响到分离柱的填充质量, 干扰分离柱效。

以下步骤足以满足对普通污染物的清除:

1. 用2M的NaCl至少清洗2个柱体积, 流速如下: 0.2 ml/min (1.7 ml分离柱), 0.5 ml/min (1 ml分离柱), 2 ml/min (8 ml分离柱) or 5 ml/min (20 ml分离柱)。
2. 用1M的NaOH至少清洗4个柱体积, 流速同步骤一。
3. 用2M的NaCl至少清洗2个柱体积, 流速同步骤一。
4. 用至少2个柱体积的蒸馏水润洗分离柱, 流速同步骤一, 直到基线, 洗脱pH及电导稳定。
5. 用至少4个柱体积的起始缓冲液或储存缓冲液冲洗分离柱, 流速同步骤一, 直到基线, 洗脱pH及电导稳定。

如需去除沉淀的蛋白, 脂类, 疏水结合蛋白或脂蛋白, 参见附录1。

填料特性

组成: 刚性单分散的无孔填料, 亲水聚合物颗粒 (10 μ m) 通过表面基团被季铵 (Q) 或甲烷磺酸 (S) 基团所取代。

产品	功能团	pH稳定性*	平均颗粒尺寸
Mini Q	$-\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	长期: 2-12 短期: 2-14	10 μ m (单一尺寸)
Mini S	$-\text{CH}_2\text{SO}_3^-$	长期: 2-12 短期: 2-14	10 μ m (单一尺寸)

* 长期pH稳定性是指填料在长期储存后保持稳定, 没有色谱分离效果降低的pH区间。

短期pH是指再生, 原位清洗以及净化操作时的pH区间。所有的区间都是通过Amersham Biosciences内部试验确定。

化学稳定性

对于日常应用, MonoBeads在所有通常水溶液pH2-12条件下, 以及存在添加剂条件下, 如变性剂 (8M尿素或6M盐酸胍), 离子性或非离子性去污剂, 以及高达30%的乙醇中都保持稳定。注意, 水溶液中的尿素, 乙烯基乙二醇及相似的化合物会使黏度增加而增大背景压力。

MonoBeads可使用有机溶剂, 如DMSO, dimethylformamide或甲酸, 但此时填料的分离特性会发生改变。

避免MonoQ中使用阴离子去污剂。避免MonoS中使用阳离子去污剂。避免氧化性试剂。

储存

分离柱储存时, 用5个柱体积的蒸馏水冲洗, 随后用5个柱体积的20%乙醇冲洗。对乙醇/水的混合物充分脱气, 并在较低流速下使用以避免分离柱超压。室温储存, 或者在4 $^{\circ}$ C - 8 $^{\circ}$ C之间长期储存。如有可能, 尽量使用制造商提供的储存及运输装备。确保分离柱密封严实以避免干掉。不能使分离柱冰冻。

SOURCE: 高通量高分辨率的纯化, 且可轻松实现规模扩大

- 使用SOURCE填料来纯化蛋白质, 多肽及寡核苷酸。
- SOURCE 15适用于需要高分辨率及高通量 (液流达1800cm/h) 的实验室及大规模应用中的中间分离步骤或精细纯化步骤。
- SOURCE 30可替换SOURCE 15,适用于当速度相对于分辨率更重要时的大规模应用的中间纯化步骤或精细纯化步骤 (流速可达2000cm/h)。
- SOURCE 30可替换SOURCE 15,适用于大体积样品, 且速度为首先考虑因素时的大规模应用。更大尺寸的颗粒会轻微降低分辨率, 但却使分离液流速度更快。
- 在ÅKTAdesign, FPLC 系统, HPLC或带有蠕动泵的系统上运行SOURCE。有关如何选择最合适的ÅKTAdesign 系统的指导, 参见附录4。

MonoBeads为基于单分散刚性聚苯乙烯及联乙烯苯颗粒制成的亲水填料, 表面由季铵(Q)或甲烷磺酸(S)基团所取代(图39)。这种结合为填料提供了极高的化学及物理稳定性。颗粒的小尺寸, 可实现快速结合解离从而保证了高分辨率; 而颗粒大小的一直保证了系统高流速低背景压力的运行。强离子交换基团(Q及S)可在宽pH范围内保持带电性(图33), 从而可使每个应用过程中选定最合适的pH值。SOURCE填料适用于高流速分离过程, 通常限制性因素为其他设备, 而不是填料的物理性质。

分离方法可很容易实现规模扩大, 从比如预装SOURCE 15的1ml RESOURCE Q或S分离柱到大规模分离柱, 如FvinegarLINETM。

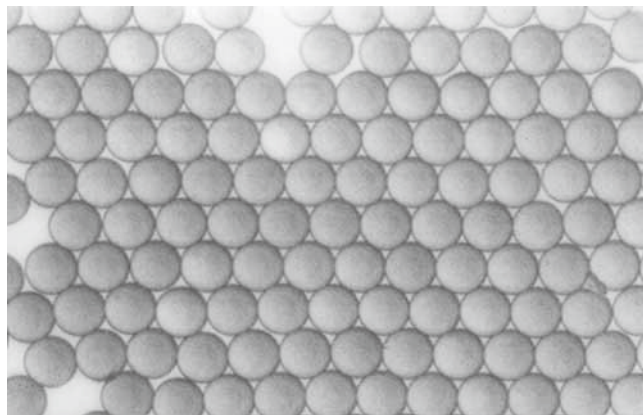


图39, SOURCE单分散颗粒的均一尺寸分布。

纯化选项



图40, SOURCE填料可单独或以预装Tricorn或RESOURCE分离柱的性质获取。

产品, 柱床体积	每分离柱的结合能力	推荐工作流速	最大流速	工作pH区间*	最大运行背景压力** (MPa/psi) 1 MPa=10 bar
强阴离子交换剂					
HiTrap Q HP, 1 ml	50 mg (HSA, Mr 68 000)	up to 1 ml/min	4 ml/min	2-12	0.3/43
HiTrap Q HP, 5 ml	250mg (HSA, Mr 67 000)	up to 5 ml/min	20 ml/min	2-12	0.3/43
HiLoad 16/10 Q Sepharose High Performance, 20 ml	<1200 mg (BSA, Mr 67 000)	up to 5 ml/min	5 ml/min	2-12	0.3/43
HiLoad 26/10 Q Sepharose High Performance, 53 ml	<3000 mg (BSA, Mr 67 000)	up to 13 ml/min	13 cm/h	2-12	0.3/43
Q Sepharose High Performance	70 mg/ml (HSA, Mr 68 000)	30-150 cm/h	150 cm/h	2-12	0.5/72
强阳离子交换剂					
HiTrap Q HP, 1 ml	55 mg (ribonuclease, Mr 13 700)	up to 1 ml/min	4 ml/min	2-13	1.5/220
HiTrap Q HP, 5 ml	275 mg (ribonuclease, Mr 13 700)	up to 5 ml/min	20 ml/min	2-13	0.6/87
HiLoad 16/10 Q Sepharose High Performance, 20 ml	<1000 mg (ribonuclease, Mr 13 700)	up to 5 ml/min	5 ml/min	2-13	4/580
HiLoad 26/10 Q Sepharose High Performance, 53 ml	<3000 mg (ribonuclease, Mr 13 700)	up to 13 ml/min	13 cm/h	2-13	0.5/72

* 线性流速 (cm/hour) 与体积流速 (ml/min) 之间的互相转换参见附录5。

** 工作pH是指填料结合蛋白的pH间隔或洗脱所需要的pH, 而不是产生不利的长期效应的pH值。

*** 最大工作背景压力是指高于此压力时, 填料会被压缩。

使用RESOURCE预装柱（1ml或6ml）进行快速填料选择，方法筛选，分组分离，样品浓缩或清洗。

使用SOURCE 15Q PE 4.6/100在进一步优化过程中，通过增加分离柱长度提高分辨率，同时作为分离规模放大的第一步。

分离柱填充信息

	Volume	Bed height
SOURCE 15		
Tricorn 10/100	up to 8 ml	up to 10 cm
Tricorn 10/150	up to 12 ml	up to 15 cm
Tricorn 10/200	up to 16 ml	up to 20 cm
SOURCE 30		
XK 16/20	up to 30 ml	up to 15 cm
XK 26/20	up to 80 ml	up to 15 cm
XK 26/40	up to 196 ml	> 15 cm

对于更大体积样品，选择如FineLINE等的生产级别分离柱。

纯化举例：

快速，高分辨率分离

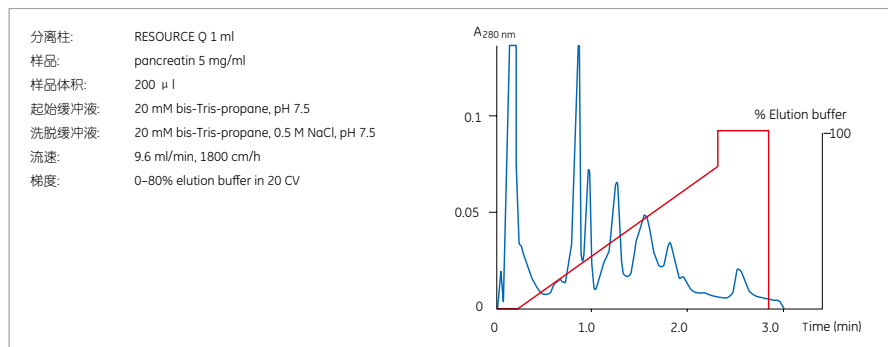


图41，用RESOURCE Q 1ml在三分钟内对pancreatin的分离纯化。

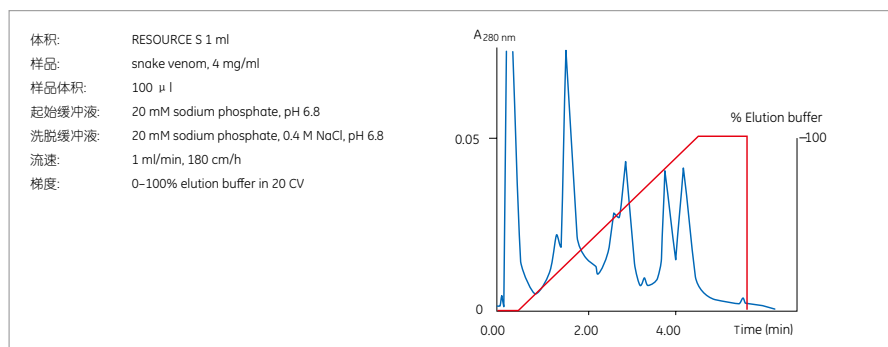


图42，用RESOURCE S 1ml在四分钟内对蛇毒的分离纯化。

规模放大：分辨率的保持

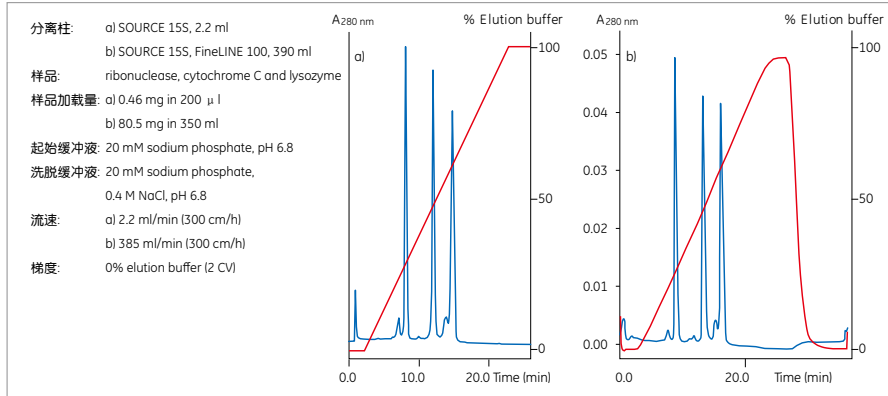


图43，蛋白的分离纯化规模从2.2ml分离柱扩大至390ml分离柱。

中间步骤纯化

图44为用SOURCE30Q在一个大规模纯化过程中进行中间步骤纯化的例子。重组蛋白P. aeruginosa exotoxin A由E. coli表达为细胞质蛋白，首先用STREAMLINE DEAE膨胀床吸附进行最初的纯化，随后用Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (high sub) 进行疏水相互作用色谱层析（HIC）。在对目的蛋白用SOURCE 15PHE进行最终的精细纯化以出去最终的污染物之前，用SOURCE 30Q进行进一步纯化。

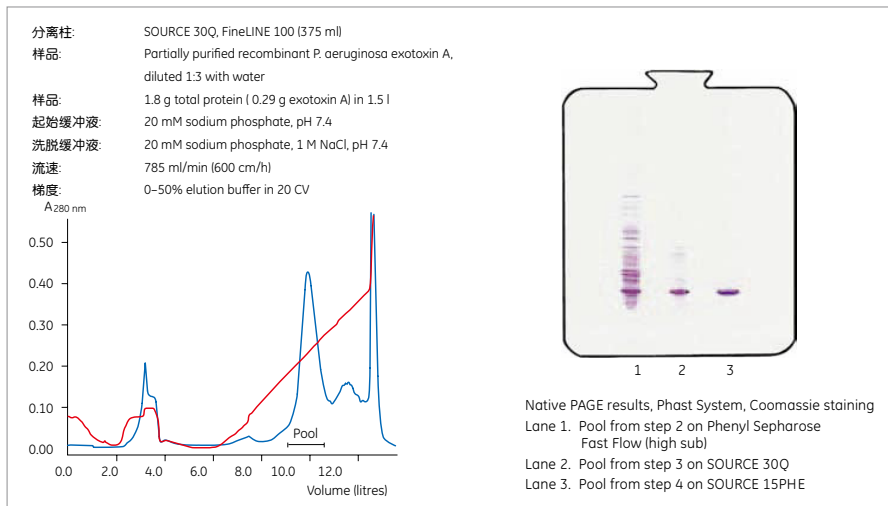


图44，对重组蛋白P. aeruginosa exotoxin A 进行的中间纯化过程。

极端pH条件下的分离

SOURCE系列填料的高pH稳定性使得他们很好的适用于需要极端pH的应用，如对某些特定的肽或合成的寡核苷酸的分离纯化，如图45和46所示。

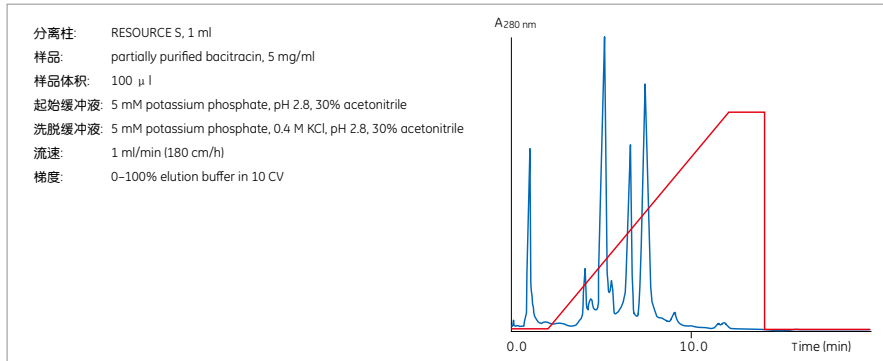


图45, 用RESOURCE Q, 1ml对Bacillus subtilis 产的小肽bacitracin进行中间步骤的分离纯化。

方法优化

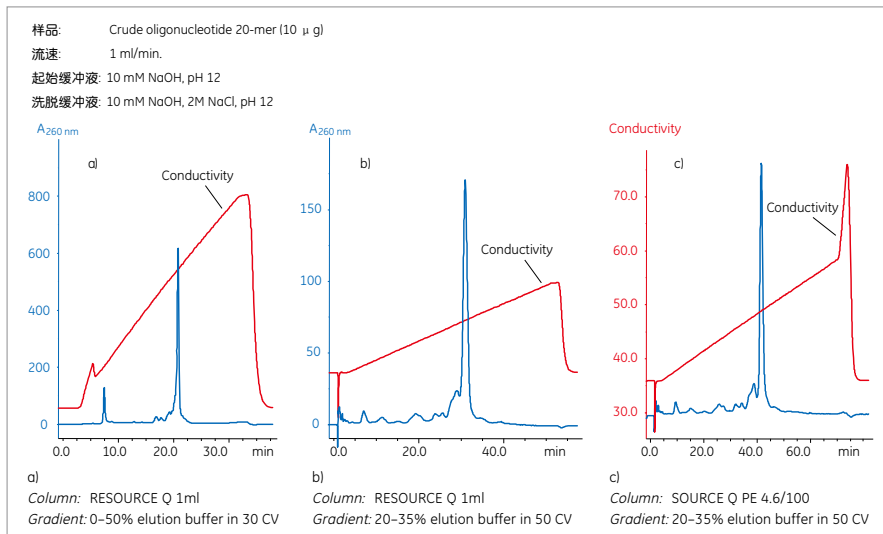


图46, 通过对梯度斜率和形状的调节使分辨率达到最大。20mer寡核苷酸的最初纯化过程用RESOURCE Q 1ml进行优化, 随后转移至SOURCE Q PE 4.6/100分离柱, 通过将柱床高度增加至10cm来进一步提高分辨率。

批次之间的重复性

批次之间的可重复性对于规模放大以及大规模的工业化应用十分重要，需要严格的调节控制。图47和48展示了SOURCE 15及SOURCE 30填料使用时的高度可重复性。

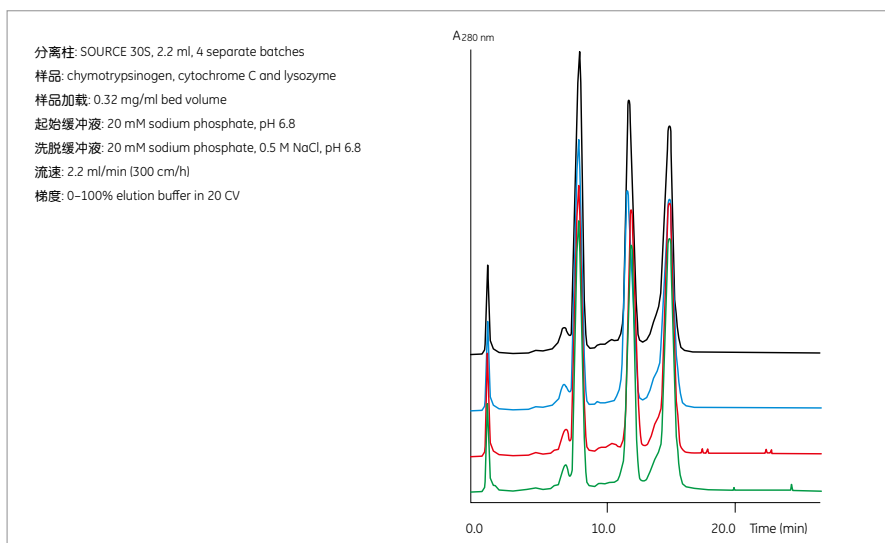


图47, SOURCE 30S 四批次之间的选择性测试。

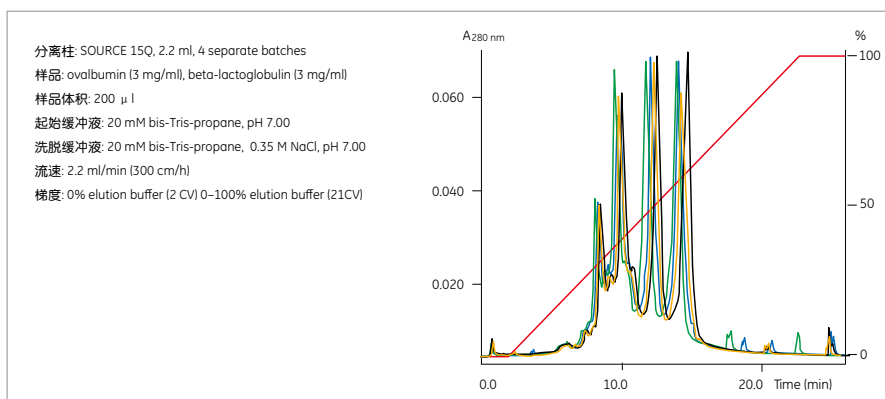





图47, SOURCE 30Q 四批次之间的选择性测试。

运行分离过程

有关填料，缓冲液，pH及离子强度的选择和方法优化方面的指导参见第二章。本节所给出的说明可用于分离过程的优化。

-  正确的样品及缓冲液准备工作对于获得最佳分辨效果，避免分离柱工作能力受损至关重要，特别是使用小颗粒填料时，如MiniBeads。样品必须完全溶解，并且没有颗粒或其他干扰分离纯化效果的物质。有关样品准备方面的推荐以及建议参见第二章及附录1。
-  在所有盐及添加剂加入后，过滤缓冲液。使用高质量的水及化学试剂。用0.22 μm孔径的过滤器过滤溶液。为避免装好的分离柱中气泡的产生，确保准备运行时分离柱与缓冲液处在相同的温度。
-  使用阴离子交换剂（Q）时，起始缓冲液的pH应至少高于目标蛋白等电点0.5-1个pH单位；使用阳离子交换剂（S）时，起始缓冲液的pH应至少低于目标蛋白等电点0.5-1个pH单位。有关阴阳离子交换剂所使用的挥发性或非挥发性缓冲液系统的建议，参见附录2。

对于电性未知样品，尝试以下方案：

—— 阴离子交换（Q）

起始缓冲液：pH 8.0

洗脱缓冲液：起始缓冲液中包含1M NaCl，pH8.0

—— 阳离子交换（S）

起始缓冲液：pH 6.0

洗脱缓冲液：起始缓冲液中包含1M NaCl，pH 6.0

带有BufferPrep功能的ÅKTA design系统的使用者可选用系统所推荐的阴阳离子色谱层析缓冲液配方，pH分别为8和6。

第一次使用或长期储存后

1. 用五个柱体积的蒸馏水将分离柱中的乙醇冲洗出，流速如下：2ml/min（SOURCE 15 4.6/100PE分离柱），4ml/min（RESOURCE 1ml分离柱）或200cm/h（用SOURCE填料填充的更大分离柱）。该步骤可保证乙醇的去除，从而避免缓冲液中的盐与乙醇相遇时产生沉淀的风险。如果沉淀不是问题，则该步骤可省略。
2. 用起始缓冲液冲洗五个柱体积，流速如下：2ml/min（SOURCE 15 4.6/100PE分离柱），4ml/min（RESOURCE 1ml分离柱）或200cm/h（用SOURCE填料填充的更大分离柱）。
3. 用洗脱缓冲液冲洗五个柱体积，流速同步步骤2。
4. 用起始缓冲液冲洗五个柱体积，流速同步步骤2。

-  空运行一次以检测电导及pH。

梯度洗脱进行分离


流速: 2ml/min (SOURCE 15 4.6/100PE分离柱), 4ml/min (RESOURCE 1ml分离柱) 或200cm/h (用SOURCE填料填充的更大分离柱).收集分离过程 的所有组分。


1. 用5-10柱体积的起始缓冲液平衡分离柱, 直到基线, 洗脱pH及电导稳定。
2. 将样品调节至选定起始pH及离子强度, 加载到分离柱上。
3. 用5-10柱体积的起始缓冲液平衡分离柱, 直到基线, 洗脱pH及电导稳定, 即所有未结合物质都被冲洗出了分离柱
4. 用10-20个柱体积的梯度进行洗脱, 同时盐离子浓度逐渐增加至0.5M NaCl (50%B)。
5. 用5个柱体积的1M NaCl (100%B) 冲洗分离柱以洗脱任何残留的离子性结合物质。
6. 用5-10柱体积的起始缓冲液再平衡分离柱, 直到基线, 洗脱pH及电导到达所需值。

分步洗脱进行分离纯化

流速: 2ml/min (SOURCE 15 4.6/100PE分离柱), 4ml/min (RESOURCE 1ml分离柱) 或200cm/h (用SOURCE填料填充的更大分离柱).收集分离过程 的所有组分。

1. 用5-10柱体积的起始缓冲液平衡分离柱, 直到基线, 洗脱pH及电导稳定。
2. 将样品调节至选定起始pH及离子强度, 加载到分离柱上。
3. 用5-10柱体积的起始缓冲液平衡分离柱, 直到基线, 洗脱pH及电导稳定, 即所有未结合物质都被冲洗出了分离柱
4. 用5个柱体积的加入选定离子强度NaCl的起始缓冲液进行洗脱。
5. 重复步骤4, 使用更高的离子强度知道目的蛋白都被洗脱下来。
6. 用5个柱体积的1M NaCl (100%B) 冲洗分离柱以洗脱任何残留的离子性结合物质。
7. 用5-10柱体积的起始缓冲液再平衡分离柱, 直到基线, 洗脱pH及电导到达所需值。


 在高盐冲洗及再平衡过程中可使用更高流速以节约时间。但不要超过分离柱的推荐最大流速。

 如果使用了离子性去污剂, 用5个柱体积的蒸馏水冲洗分离柱后, 用2个柱体积的2M NaCl冲洗。用至少10柱体积的起始缓冲液再平衡分离柱, 直到基线, 洗脱pH及电导稳定。有机溶剂如乙醇可用来去除非离子型去污剂。当选用有机溶剂时, 检查填料的化学稳定性以确定一个合适的浓度。

 定期通过确定柱效及峰的对称性检查分离柱的工作能力, 见附录3。

清洗

样品及缓冲液的正确准备，以及每次分离过程后用高盐溶液（1M NaCl）冲洗回使分离柱处于良好的状态。然而，工作能力的下降，流速的变慢，背景压力的增加以及完全的堵塞都表明分离柱需要使用剧烈的操作来进行清洗以出去污染物。

 清洗分离柱时建议采用反向液流，这样污染物就不用穿越整根分离柱而被冲洗出来。根据污染程度的不同清洗所用的缓冲液体积数及清洗时间也有所不同。如果去除普通污染物的操作不能使分离柱柱效恢复，在使用其他清洗方法前更换分离柱顶部滤膜。更换滤膜时应多加小心，防止影响到分离柱的填充质量，干扰分离柱效。

以下步骤足以满足对普通污染物的清除：

1. 用2M的NaCl至少清洗2个柱体积，流速如下：0.2 ml/min (SOURCE 15 4.6/100 PE分离柱), 1 ml/min (RESOURCE1 ml 分离柱), 6 ml/min (RESOURCE 6 ml分离柱);对于SOURCE柱材填充的更大分离柱，以40cm/h冲洗1-2小时。
2. 用1M的NaOH至少清洗4个柱体积，流速同步骤一。
3. 用2M的NaCl至少清洗2个柱体积，流速同步骤一。
4. 用至少2个柱体积的蒸馏水润洗分离柱，流速同步骤一，直到基线，洗脱pH及电导稳定。
5. 用至少4个柱体积的起始缓冲液或储存缓冲液冲洗分离柱，流速同步骤一，直到基线，洗脱pH及电导稳定。

如需去除沉淀的蛋白，脂类，疏水结合蛋白或脂蛋白，参见附录1。

填料特性

组成：刚性单分散的无孔填料，亲水聚合物颗粒（15 μm）通过表面基团被季铵（Q）或甲烷磺酸（S）基团所取代。


产品	功能团	pH稳定性 *	平均颗粒尺寸
SOURCE 15Q	-CH ₂ N ⁺ (CH ₃) ₃	长期： 2-12 短期： 1-14	15 μm（单一尺寸）
SOURCE 30Q	-CH ₂ N ⁺ (CH ₃) ₃	长期： 2-12 短期： 1-14	30 μm（单一尺寸）
SOURCE 15S	-CH ₂ SO ₃ ⁻	长期： 2-13 短期： 1-14	15 μm（单一尺寸）
SOURCE 15S	-CH ₂ SO ₃ ⁻	长期： 2-13 短期： 1-14	30 μm（单一尺寸）

* 长期pH稳定性是指填料在长期储存后保持稳定，没有色谱分离效果降低的pH区间。

短期pH是指再生，原位清洗以及净化操作时的pH区间。所有的区间都是通过Amersham Biosciences内部试验确定。

化学稳定性

对于日常应用，SOURCE填料在所有通常水溶液pH2-12条件下，以及存在添加剂条件下，如变性剂（8M尿素或6M盐酸胍），75%乙酸，1 M NaOH, 1 M HCl, 70%乙醇及30%的乙腈中都保持稳定。

 避免SOURCE Q使用阴离子去污剂。避免SOURCE S中使用阳离子去污剂。避免氧化性试剂。

储存

分离柱储存时，用5个柱体积的蒸馏水冲洗，随后用5个柱体积的20%乙醇冲洗。对于SOURCE S在20%乙醇中添加0.2M的醋酸钠。对乙醇/水的混合物充分脱气，并在较低流速下使用以避免分离柱超压。室温储存，或在4℃ - 8℃之间长期储存。确保分离柱密封严实以避免干掉。如有可能，尽量使用制造商提供的储存及运输装备。不用的填料储存于20%乙醇中，4℃ - 30℃，不能使分离柱冰冻。

Sepharose High Performance: 高分辨率分离纯化

- 使用Sepharose High Performance填料来纯化蛋白质，多肽及寡核苷酸。
- Sepharose High Performance适用于需要高分辨率及高吸附能力（液流达150cm/h）的间分离步骤。
- 在ÄKTAdesign, FPLC 系统，HPLC或带有蠕动泵的系统上运行SOURCE。有关如何选择最合适的ÄKTAdesign 系统的指导，参见附录4。

Sepharose High Performance基于6%的琼脂糖颗粒制成，填料尺寸为34 μ m；高度交联性提供了化学及物理稳定性。颗粒的小尺寸，保证了即便是高样品加载量及高流速条件下的快速结合解离，连同高选择性，保证了系统的高分辨率。尽管离子强度及pH会改变，但颗粒大小及柱床体积仍会保持稳定从而保证了快速分离纯化。强离子交换基团（Q及S）可在宽pH范围内保持带电性，从而可使每个应用过程中选定最合适的pH值。

- Sepharose High Performance填料同其他离子交换剂一样，可用于分组分离或样品的浓缩。然而，分离纯化的样品仅限于相对洁净的样品以避免分离柱滤膜的堵塞。（34 μ 局面的颗粒尺寸需要使用更好的分离柱滤膜）

HiLoad™ Sepharose High Performance分离柱的突出介绍，参见www.chromatography.amershambiosciences.com。

分离纯化选项




图49，Q及S Sepharose High Performance填料可以预装的HiTrap 和HiLoad分离柱形式，或分装的填料的形式获取。


产品, 柱床体积	每分离柱的结合能力	推荐工作流速	最大流速	工作pH区间*	最大运行背景压力** (MPa/psi) 1 MPa=10 bar
强阴离子交换剂					
HiTrap Q HP, 1 ml	50 mg (HSA, Mr 68 000)	up to 1 ml/min	4 ml/min	2-12	0.3/43
HiTrap Q HP, 5 ml	250mg (HSA, Mr 67 000)	up to 5 ml/min	20 ml/min	2-12	0.3/43
HiLoad 16/10 Q Sepharose High Performance, 20 ml	<1200 mg (BSA, Mr 67 000)	up to 5 ml/min	5 ml/min	2-12	0.3/43
HiLoad 26/10 Q Sepharose High Performance, 53 ml	<3000 mg (BSA, Mr 67 000)	up to 13 ml/min	13 cm/h	2-12	0.3/43
Q Sepharose High Performance	70 mg/ml (HSA, Mr 68 000)	30-150 cm/h	150 cm/h	2-12	0.5/72
强阳离子交换剂					
HiTrap Q HP, 1 ml	55 mg (ribonuclease, Mr 13 700)	up to 1 ml/min	4 ml/min	2-13	1.5/220
HiTrap Q HP, 5 ml	275 mg (ribonuclease, Mr 13 700)	up to 5 ml/min	20 ml/min	2-13	0.6/87
HiLoad 16/10 Q Sepharose High Performance, 20 ml	<1000 mg (ribonuclease, Mr 13 700)	up to 5 ml/min	5 ml/min	2-13	4/580
HiLoad 26/10 Q Sepharose High Performance, 53 ml	<3000 mg (ribonuclease, Mr 13 700)	up to 13 ml/min	13 cm/h	2-13	0.5/72
Q Sepharose High Performance	55 mg (ribonuclease, Mr 13 700)	30-150 cm/h	150 cm/h	2-13	0.5/72

* 线性流速 (cm/hour) 与体积流速 (ml/min) 之间的互相转换参见附录5。

** 工作pH是指填料结合蛋白的pH间隔或洗脱所需要的pH, 而不是产生不利的长期效应的pH值。

** * 最大工作背景压力是指高于此压力时, 填料会被压缩。

 使用HiTrap预装柱 (1ml或5ml) 进行快速填料选择, 方法筛选, 分组分离, 小规模分离纯化, 样品浓缩或清洗。可连接多达3根HiTrap系列分离柱用于规模扩大。

 使用HiLoad预装柱 (20ml或53ml) 进行方法建立, 分组分离, 更大规模分离纯化, 或样品浓缩。

分离柱填充信息

Column	Volume	Bed height
Tricorn 10/100	up to 8 ml	up to 10 cm
Tricorn 10/150	up to 12 ml	up to 15 cm
Tricorn 10/200	up to 16 ml	up to 20 cm
XK 16/20	up to 30 ml	up to 15 cm
XK 26/20	up to 80 ml	up to 15 cm
XK 26/40	up to 196 ml	>15 cm

对于更大体积样品, 选择如FineLINE等的生产级别分离柱。

分离纯化举例

中间步骤的分离纯化

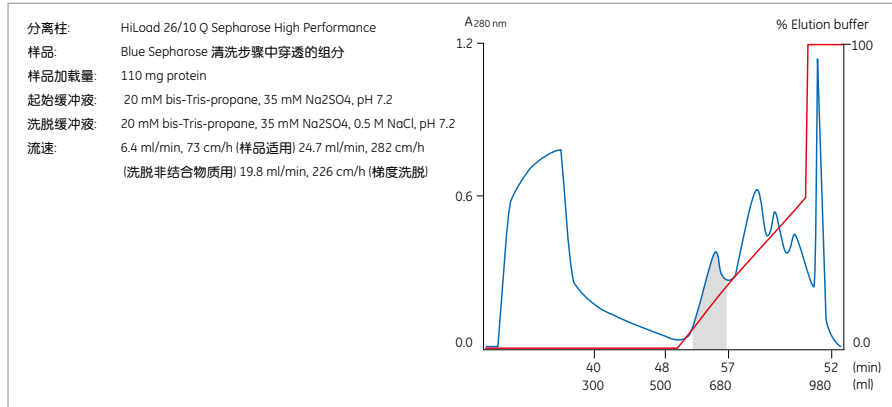


图50, α 2-macroglobulin分离纯化方案中的中度纯化步骤。在离子交换层析前, 使用Blue Sepharose亲和层析用于去除白蛋白。

规模放大

使用预装的Sepharose High Performance预装柱有利于快速进行规模放大, 并保证系统的可重复性, 如图51及52所示。

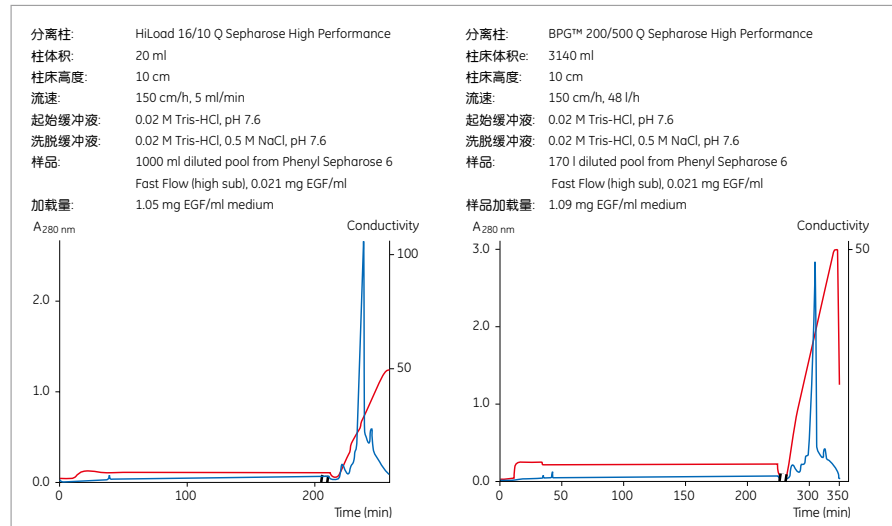


图51, 当分离规模从HiLoad分离柱扩大至BPG分离柱时, 洗脱模式, 纯度及产量维持不变。

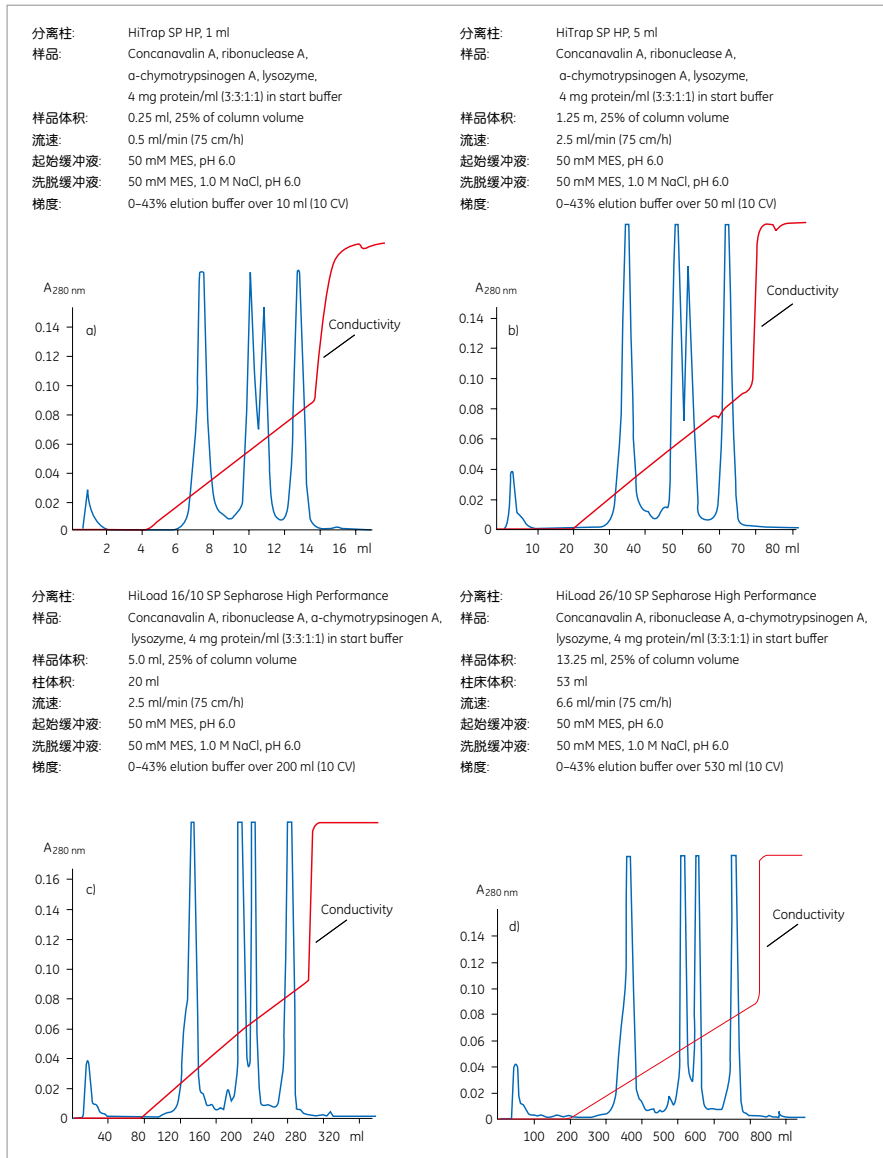


图52, 分离纯化规模从1 ml HiTrap 分离柱逐步扩大至53 ml HiLoad 26/10 SP Sepharose High Performance分离柱后, 可重复性保持不变。

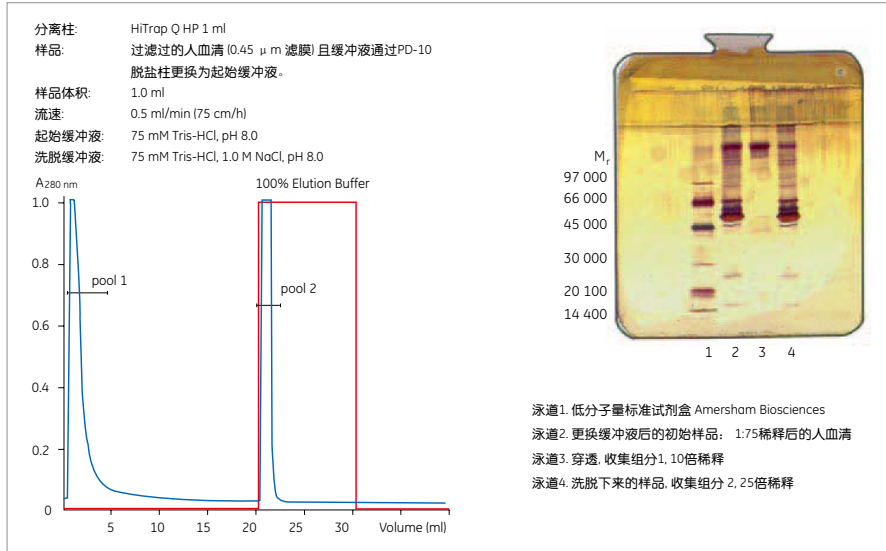


图53, 利用HiTrap Q HP, 1ml分离柱, 一步洗脱法将IgG从人血清蛋白中分离纯化出来, 并通过SDS-PAGE分析 (Phast System, PhastGel 10-15, 银染)。

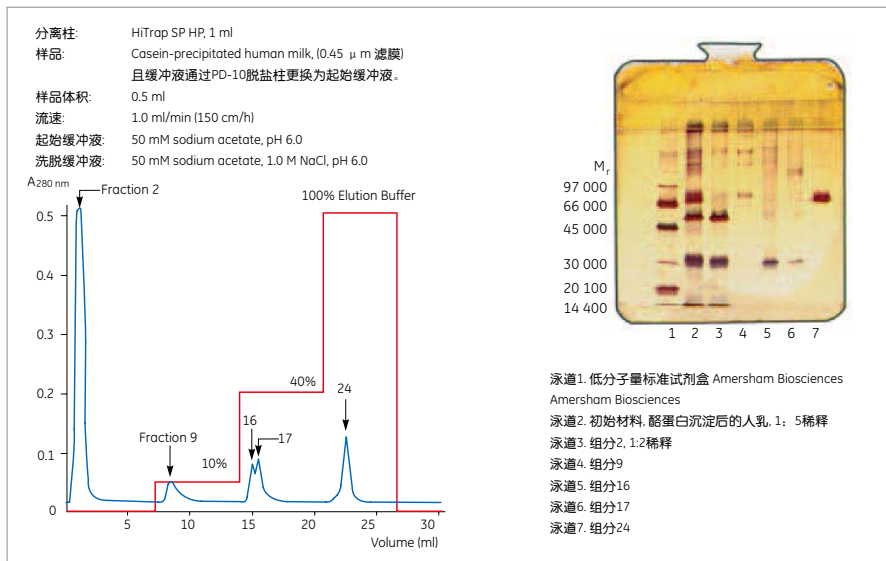


图54, 利用HiTrap Q HP, 1ml分离柱, 一步洗脱法分离人乳蛋白, 并通过SDS-PAGE分析 (Phast System, PhastGel 10-15, 银染)。

样品浓度

在进行凝胶排阻层析前对样品进行浓缩，使其体积最小有利于快速，高分辨率的进行大小分离纯化。HiTrap分离柱可为样品浓缩提供方便即用的溶液。表7给出了利用预装Sephacrose HP填料的HiTrap分离柱对非常稀的样品进行浓缩的高浓缩倍数。使用预装Sephacrose Fast Flow 或 Sephacrose XL填料的HiTrap分离柱可获得与此相似的结果。

表7, 使用1ml 的HiTrap离子交换柱进行的样品浓缩。

分离柱	样品	样品浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	样品体积 (ml)	洗脱后样品浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	洗脱后样品体积 (ml)	浓缩倍数 (体积)	产率 (%)
HiTrap Q HP, 1 ml	Human IgG	23	450	3180	3.0	150	92
		10	100	4700	2.0	50	93
		1010	10	3370	3.0	3	100
HiTrap SP HP, 5 ml	Lysozyme	23	150	3170	16.0	9	100
		23	1500	3720	13.2	150	92

运行分离过程

有关填料，缓冲液，pH及离子强度的选择和方法优化方面的指导参见第二章。本节所给出的说明可用于分离过程的优化。

- 正确的样品及缓冲液准备工作对于获得最佳分辨效果，避免分离柱工作能力受损至关重要。样品必须完全溶解，并且没有颗粒或其他干扰分离纯化效果的物质。有关样品准备方面的推荐以及建议参见第二章及附录1。
- 在所有盐及添加剂加入后，过滤缓冲液。使用高质量的水及化学试剂。用 $0.22\ \mu\text{m}$ 或 $0.45\ \mu\text{m}$ 孔径的过滤器过滤溶液。为避免装好的分离柱中气泡的产生，确保准备运行时分离柱与缓冲液处在相同的温度。
- 使用阴离子交换剂(Q)时，起始缓冲液的pH应至少高于目标蛋白等电点 $0.5\text{-}1$ 个pH单位；使用阳离子交换剂(S)时，起始缓冲液的pH应至少低于目标蛋白等电点 $0.5\text{-}1$ 个pH单位。有关阴阳离子交换剂所使用的挥发性或非挥发性缓冲液系统的建议，参见附录2。

对于电性未知样品，尝试以下方案：

—— 阴离子交换 (Q)

起始缓冲液：pH 8.0

洗脱缓冲液：起始缓冲液中包含 1M NaCl ，pH8.0

—— 阳离子交换 (S)

起始缓冲液：pH 6.0

洗脱缓冲液：起始缓冲液中包含 1M NaCl ，pH 6.0

- 带有BufferPrep功能的ÅKTA design系统的使用者可选用系统所推荐的阴阳离子色谱层析缓冲液配方，pH分别为8和6。

第一次使用或长期储存后

1. 用五个柱体积的蒸馏水将分离柱中的乙醇冲洗出，流速如下：1ml/min（HiTrap 1ml分离柱），5ml/min（HiTrap 5ml分离柱），0.8ml/min（HiLoad 20ml分离柱），2.2ml/min（HiLoad 53ml分离柱）或25cm/h（用Sepharose High Performance填料填充的更大分离柱）。该步骤可保证乙醇的去除，从而避免缓冲液中的盐与乙醇相遇时产生沉淀的风险。如果沉淀不是问题，则该步骤可省略。
2. 用起始缓冲液冲洗五个柱体积，流速如下：1ml/min（HiTrap 1ml分离柱），5ml/min（HiTrap 5ml分离柱），3ml/min（HiLoad 20ml分离柱），8ml/min（HiLoad 53ml分离柱）或50cm/h（用Sepharose High Performance填料填充的更大分离柱）。
3. 用洗脱缓冲液冲洗五个柱体积，流速同步骤2。
4. 用起始缓冲液冲洗五个柱体积，流速同步骤2。
5. 加载样品前空运行一次洗脱过程。

梯度洗脱进行分离

流速: 1ml/min（HiTrap 1ml分离柱），5ml/min（HiTrap 5ml分离柱），3ml/min（HiLoad 20ml分离柱），8ml/min（HiLoad 53ml分离柱）或50-100cm/h（用Sepharose High Performance填料填充的更大分离柱）。收集分离过程的所有组分。

1. 用5-10柱体积的起始缓冲液平衡分离柱，直到基线，洗脱pH及电导稳定。
2. 将样品调节至选定起始pH及离子强度，加载到分离柱上。
3. 用5-10柱体积的起始缓冲液平衡分离柱，直到基线，洗脱pH及电导稳定，即所有未结合物质都被冲洗出了分离柱
4. 用10-20个柱体积的梯度进行洗脱，同时盐离子浓度逐渐增加至0.5M NaCl（50%B）。
5. 用5个柱体积的1M NaCl（100%B）冲洗分离柱以洗脱任何残留的离子性结合物质。
6. 用5-10柱体积的起始缓冲液再平衡分离柱，直到基线，洗脱pH及电导到达所需值。

分步洗脱进行分离纯化

流速: 1ml/min（HiTrap 1ml分离柱），5ml/min（HiTrap 5ml分离柱），3ml/min（HiLoad 20ml分离柱），8ml/min（HiLoad 53ml分离柱）或50-100cm/h（用Sepharose High Performance填料填充的更大分离柱）。收集分离过程的所有组分。

1. 用5-10柱体积的起始缓冲液平衡分离柱，直到基线，洗脱pH及电导稳定。
2. 将样品调节至选定起始pH及离子强度，加载到分离柱上。
3. 用5-10柱体积的起始缓冲液平衡分离柱，直到基线，洗脱pH及电导稳定，即所有未结合物质都被冲洗出了分离柱
4. 用5个柱体积的加入选定离子强度NaCl的起始缓冲液进行洗脱。
5. 重复步骤4，使用更高的离子强度知道目的蛋白都被洗脱下来。
6. 用5个柱体积的1M NaCl（100%B）冲洗分离柱以洗脱任何残留的离子性结合物质。
7. 用5-10柱体积的起始缓冲液再平衡分离柱，直到基线，洗脱pH及电导到达所需值。

在高盐冲洗及再平衡过程中可使用更高流速以节约时间。但不要超过分离柱的推荐最大流速。

如果使用了离子性去污剂，用5个柱体积的蒸馏水冲洗分离柱后，用2个柱体积的2M NaCl冲洗。用至少10柱体积的起始缓冲液再平衡分离柱，直到基线，洗脱pH及电导稳定。有机溶剂如乙醇可用来去除非离子型去污剂。当选用有机溶剂时，检查填料的化学稳定性以确定一个合适的浓度。

定期通过确定柱效及峰的对称性检查分离柱的工作能力，见附录3。

清洗

样品及缓冲液的正确准备，以及每次分离过程后用高盐溶液（1M NaCl）冲洗回使分离柱处于良好的状态。然而，工作能力的下降，流速的变慢，背景压力的增加以及完全的堵塞都表明分离柱需要使用剧烈的操作来进行清洗以出去污染物。

清洗分离柱时建议采用反向液流，这样污染物就不用穿越整根分离柱而被冲洗出来。根据污染程度的不同清洗所用的缓冲液体积数及清洗时间也有所不同。如果去除普通污染物的操作不能使分离柱柱效恢复，在使用其他清洗方法前更换分离柱顶部滤膜。更换滤膜时应多加小心，防止影响到分离柱的填充质量，干扰分离柱效。

以下步骤足以满足对普通污染物的清除：

1. 用2M的NaCl至少清洗2个柱体积，流速如下：1ml/min（HiTrap 1ml分离柱），5ml/min（HiTrap 5ml分离柱），3ml/min（HiLoad 20ml分离柱），8ml/min（HiLoad 53ml分离柱）或40cm/h处理时间为1-2小时（用Sepharose High Performance填料填充的更大分离柱）。
2. 用1M的NaOH至少清洗4个柱体积，流速同步骤一。
3. 用2M的NaCl至少清洗2个柱体积，流速同步骤一。
4. 用至少2个柱体积的蒸馏水润洗分离柱，流速同步骤一，直到基线，洗脱pH及电导稳定。
5. 用至少4个柱体积的起始缓冲液或储存缓冲液冲洗分离柱，流速同步骤一，直到基线，洗脱pH及电导稳定。

如需去除沉淀的蛋白，脂类，疏水结合蛋白或脂蛋白，参见附录1。

填料特性

组成：磺丙基（SP）或季铵（Q）基团通过化学稳定的醚键同高度交联的6%的琼脂糖连接。

产品	功能团	pH稳定性 *	平均颗粒尺寸
Q Sepharose High Performance	-CH ₂ N ⁺ (CH ₃) ₃	长期: 2-12 短期: 1-14	34 μm (单一尺寸)
Q Sepharose High Performance	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ SO ₃ ⁻	长期: 4-13 短期: 3-14	34 μm (单一尺寸)


* 长期pH稳定性是指填料在长期储存后保持稳定，没有色谱分离效果降低的pH区间。

短期pH是指再生，原位清洗以及净化操作时的pH区间。所有的区间都是通过Amersham Biosciences内部试验确定。

化学稳定性


对于日常应用，Sepharose High Performance填料在所有通常水溶液条件下，如1 M NaOH, 变性剂（8M尿素或6M盐酸胍），70%乙醇，1M乙酸，30%的乙腈，以及存在添加剂条件下，如非离子型去污剂条件下都保持稳定。

Sepharose High Performance填料可在有机溶剂条件下使用，如二甲亚砜，二甲基甲酰胺，四氢呋喃，丙酮，氯仿，二氯甲烷，二氯乙烷，二氯乙烷/哌啶（50：50）以及极性溶剂和水/有机溶剂。填料中的水可以被与基架内孔有微弱效应的溶剂替换掉。

 避免Sepharose High Performance SP 使用阳离子去污剂。避免Sepharose High Performance Q 中使用阴离子去污剂。避免氧化性试剂。

储存

分离柱储存时，用5个柱体积的蒸馏水冲洗，随后用5个柱体积的20%乙醇冲洗。对于Sepharose High Performance填料填充的分离柱，在20%乙醇中添加0.2M 的醋酸钠。对乙醇/水的混合物充分脱气，并在较低流速下使用以避免分离柱超压。室温储存，或者在4℃ - 8℃之间长期储存。确保分离柱密封严实以避免干掉。如有可能，尽量使用制造商提供的储存及运输装备。不用的填料储存于20%乙醇中，+4° C +30° C，不能使分离柱冰冻。

 为避免填充好的分离柱内产生气泡，请确保准备运行时，分离柱与缓冲液温度相同。

Sepharose Fast Flow: 良好的分辨率及轻松实现规模扩大的分离纯化

- 使用Sepharose Fast Flow用于蛋白质的纯化。
- 在需要良好分辨率时，利用Sepharose Fast Flow 进行获取及中间步骤的分离纯化（流速可达300cm/h）。
- 当强离子交换剂（取代基为Q, S或SP时）不能获得所需选择性时，使用弱离子交换剂，如DEAE, CM或ANX Sepharose Fast Flow。
- 在ÅKTAdesign, FPLC 系统, HPLC系统或使用蠕动泵的系统上运行Sepharose Fast Flow。有关如何选择最合适的ÅKTAdesign 系统的指导，参见附录4。

Sepharose Fast Flow基于6%的琼脂糖颗粒制成，填料尺寸为60 μ m；高度交联性提供了化学及物理稳定性。ANX Sepharose 4 Fast Flow (high sub)基于4%的琼脂糖而成，在分离大分子如甲状腺球蛋白(Mr = 650 000)时仍可维持高结合能力，因此特别适合于从经济角度考虑总结和特别重要的大规模生产过程。

Sepharose Fast Flow填料由广泛的离子交换基团所取代（Q, DEAE, ANX, SP, CM），从而可测试并使用不同的选择性（有关强/弱离子交换剂的解释，见第一章）。带有强离子交换基团（Q, SP）的离子交换剂可在广泛的pH范围内保持它们的带电性，从而可为分离过程选择最适当的pH值。

带有弱离子交换基团（DEAE, CM, ANX）的离子交换剂提供了不同的选择性，但它们的工作pH范围较窄。图55展示了Sepharose Fast Flow 的选择性随着阴离子交换基团的不同而发生的改变。

尽管离子强度或pH会改变，但颗粒尺寸及柱床体积保持稳定，从而保证了高流速条件下高分辨率的快速分离纯化。所使用的方法可轻松的从HiTrap Q FF (1 ml, 预装 Q Sepharose Fast Flow)分离柱转移至大规模分离柱如FineLINE。Sepharose Fast Flow分离填料的分离能力已被充分证明，有许多从实验室规模平稳转移至中试及生产的例证。

Sepharose Fast Flow分离填料的突出介绍，参见www.chromatography.amershambiosciences.com。

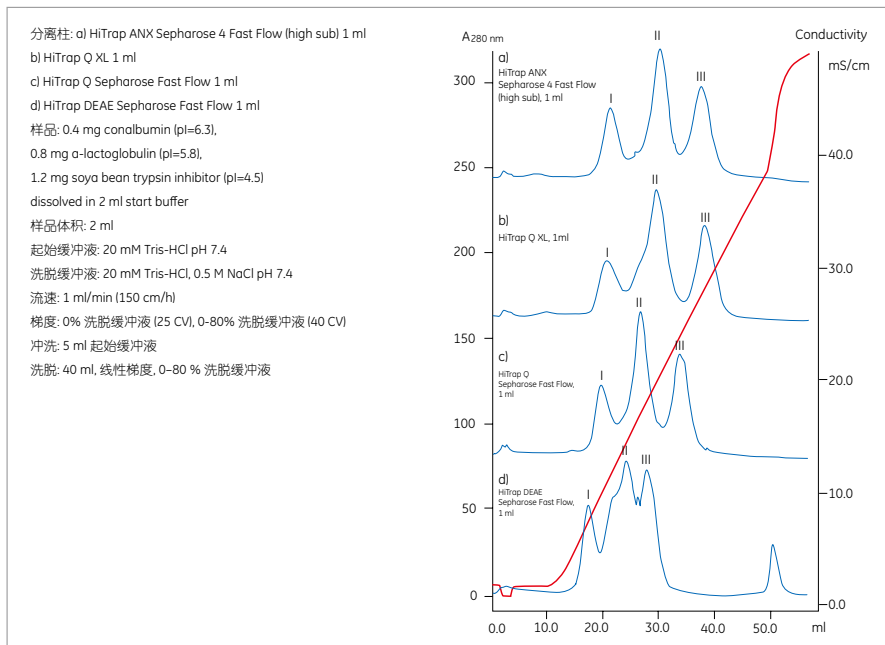


图55, 对conalbumin (I), α -lactalbumin (II) 和 soya bean trypsin inhibitor (III)通过一系列阴离子交换HiTrap分离柱进行的纯化表明, 阴离子交换基团不同, 选择性也有所不同。

纯化选项



图56, 具有广泛选择性的Sepharose Fast Flow填料可以以预装HiTrap或HiPrep分离柱, 或单独包装填料的形式获得。


产品、柱床体积	每分离柱的结合能力	推荐工作流速*	最大流速*	工作pH 区间**	最大运行背景压力*** (MPa/psi) 1 MPa=10 bar
强阴离子交换剂					
HiTrap Q FF, 1 ml	3 mg (thyroglobulin, M _r 669 000) 120 mg (HSA, M _r 68 000) 110 mg (α-lactalbumin, M _r 14 300)	up to 1 ml/min	4 ml/min	2-12	0.3/43
HiTrap Q FF, 5 ml	15 mg (thyroglobulin, M _r 669 000) 600 mg (HSA, M _r 68 000) 550 mg (α-lactalbumin, M _r 14 300)	up to 5 ml/min	20 ml/min	2-12	0.3/43
HiPrep 16/10 Q FF, 20 ml	60 mg (thyroglobulin, M _r 669 000) 2400 mg (HSA, M _r 68 000) 2200 mg (α-lactalbumin, M _r 14 300)	2-10 ml/min	10 ml/min	2-12	0.15/22
Q Sepharose Fast Flow	3 mg/ml (thyroglobulin, M _r 669 000) 120 mg/ml (HSA, M _r 68 000) 110 mg/ml (α-lactalbumin, M _r 14 300)	50-400 cm/h	750 cm/h	2-12	0.3/43
强阳离子交换剂					
HiTrap SP FF, 1 ml	50 mg (bovine COHb, M _r 69 000) 50 mg (human IgG, M _r 160 000) 70 mg (ribonuclease A, M _r 13 700)	up to 1 ml/min	4 ml/min	4-13	0.3/43
HiTrap SP FF, 5 ml	250 mg (bovine COHb, M _r 69 000) 250 mg (human IgG, M _r 160 000) 350 mg (ribonuclease A, M _r 13 700)	up to 5 ml/min	20 ml/min	4-13	0.3/43
HiPrep 16/10 SP FF, 20 ml	1000 mg (bovine COHb, M _r 69 000) 1000 mg (human IgG, M _r 160 000) 1400 mg (ribonuclease A, M _r 13 700)	2-10 ml/min	10 ml/min	4-13	0.15/22
SP Sepharose Fast Flow	50 mg/ml (bovine COHb, M _r 69 000) 50 mg/ml (human IgG, M _r 160 000) 70 mg/ml (ribonuclease A, M _r 13 700)	50-400 cm/h	750 cm/h	4-13	0.3/43
弱阴离子交换剂					
HiTrap DEAE FF, 1 ml	100 mg (α-lactalbumin, M _r 14 300) 110 mg (HSA, M _r 68 000)	up to 1 ml/min	4 ml/min	2-9	0.3/43


产品, 柱床体积	每分离柱的结合能力	推荐工作流速*	最大流速*	工作pH 区间**	最大运行背景压力*** (MPa/psi) 1 MPa=10 bar
强阴离子交换剂					
HiTrap DEAE FF, 5 ml	500 mg (α-lactalbumin, M _r 14 300) 550 mg (HSA, M _r 68 000)	up to 5 ml/min	20 ml/min	2-9	0.3/43
HiPrep 16/10 DEAE FF, 20 ml	2000 mg (α-lactalbumin, M _r 14 300) 2200 mg (HSA, M _r 68 000)	2-10 ml/min	10 ml/min	2-9	0.15/22
DEAE Sepharose Fast Flow	100 mg/ml (α-lactalbumin, M _r 14 300) 110 mg/ml (HSA, M _r 68 000)	50-400 cm/h	750 cm/h	2-9	0.3/43
HiTrap ANX FF (high sub), 1 ml	43 mg (BSA, M _r 67 000) 5 mg (thyroglobulin, M _r 669 000)	up to 1 ml/min	4 ml/min	2-9	0.3/43
HiTrap ANX FF (high sub), 5 ml	215 mg (BSA, M _r 67 000) 25 mg (thyroglobulin, M _r 669 000)	up to 5 ml/min	20 ml/min	2-9	0.3/43
HiPrep 16/10 ANX FF (high sub), 20 ml	860 mg (BSA, M _r 67 000) 100 mg (thyroglobulin, M _r 669 000)	2-10 ml/min	10 ml/min	2-9	0.15/22
ANX Sepharose 4 Fast Flow (high sub)	43 mg/ml (BSA, M _r 67 000) 5 mg/ml (thyroglobulin, M _r 669 000)	50-300 cm/h	400 cm/h	2-9	0.1/14
强阳离子交换剂					
HiTrap CM FF, 1 ml	50 mg (ribonuclease A, M _r 13 700)	up to 1 ml/min	4 ml/min	6-10	0.3/43
HiTrap CM FF, 5 ml	250 mg (ribonuclease A, M _r 13 700)	up to 5 ml/min	20 ml/min	6-10	0.3/43
HiPrep 16/10 CM FF, 20 ml	1000 mg (ribonuclease A, M _r 13 700)	2-10 ml/min	10 ml/min	6-10	0.15/22
CM Sepharose Fast Flow	50 mg/ml medium (ribonuclease A, M _r 13 700)	50-400 cm/h	750 cm/h	6-10	0.3/43


* 线性流速 (cm/hour) 与体积流速 (ml/min) 之间的互相转换参见附录5。

** 工作pH是指填料结合蛋白的pH间隔或洗脱所需要的pH, 而不是产生不利的长期效应的pH值。

*** 最大工作背景压力是指高于此压力时, 填料会被压缩。

 使用HiTrap预装柱 (1ml或5ml) 进行填料选择, 方法筛选, 分组分离, 小规模纯化, 样品浓缩或清洗。可同时连接多达3根HiTrap系列分离柱以扩大纯化规模。

 使用HiPrep预装柱 (20ml) 进行方法建立, 分组分离, 更大规模纯化, 样品浓缩或清洗。可同时连接几根HiTrap系列分离柱以增加结合能力。

 分离柱填充信息:


分离柱	体积	柱床高度
Tricorn 10/100	up to 8 ml	up to 10 cm
Tricorn 10/150	up to 12 ml	up to 15 cm
Tricorn 10/200	up to 16 ml	up to 20 cm
XK 16/20	up to 30 ml	up to 15 cm
XK 26/20	up to 80 ml	up to 15 cm
XK 26/40	up to 196 ml	> 15 cm
XK 50/20	up to 274 ml	up to 14 cm
XK 50/30	up to 559 ml	up to 28.5 cm

如需更大体积，选用生产级别分离柱，如BPG或Chromaflo。

纯化举例

填料筛选

在进行分离条件优化及规模放大前，使用1 ml HiTrap分离柱可快速轻松的为分离纯化过程选定最佳填料及带电基团。图57比较了相同样品相同条件下使用三种不同填料的洗脱模式，表明电荷基团及颗粒尺寸的不同可导致选择性及分辨率的差异。可根据分离纯化的具体需要来选择最合适的填料以及最佳分离条件，如分离单个很好的分开的峰，还是在几个目的峰之间获得最大分辨率。

 使用强离子交换剂（Q, S, SP）来进行筛选以发现目的分子之间最大的电性差异。

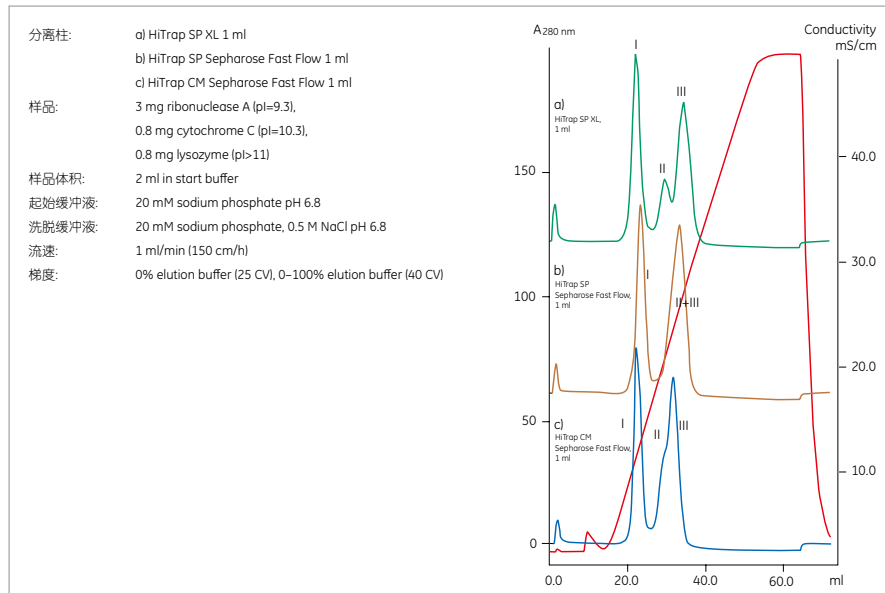


图57， 填料选择: ribonuclease A (I), cytochrome C (II) 及 lysozyme (III) 通过HiTrap CM Sepharose Fast Flow 1 ml, HiTrap SP Sepharose Fast Flow 1 ml 及 HiTrap SP XL 1 ml 的分离纯化。

获取

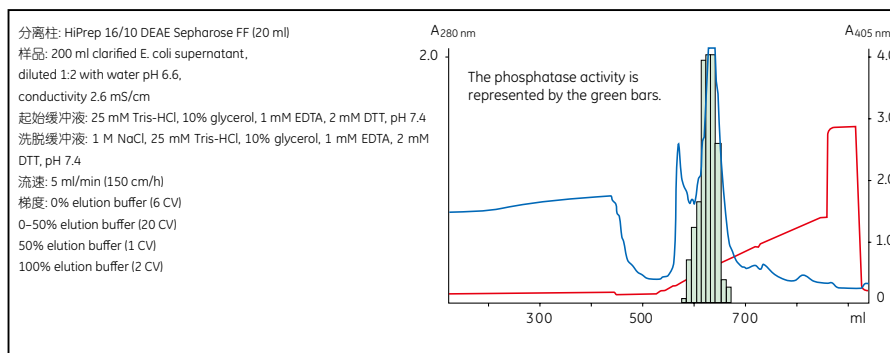
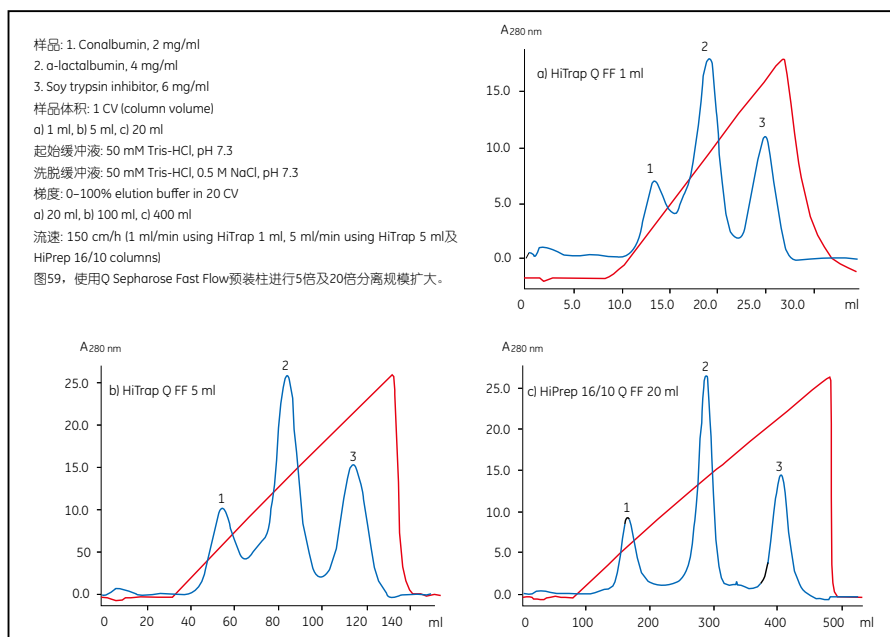


图58, HiPrep 16/10 DEAE Sepharose Fast Flow分离柱用于获取步骤以富集rPhosphatase并去除绝大多数污染物。

规模放大

图59展示了Sepharose Fast Flow填料的预装柱可轻松实现规模放大。从1ml的HiTrap分离柱开始, 通过一个20倍规模放大后仍保持可重复性。



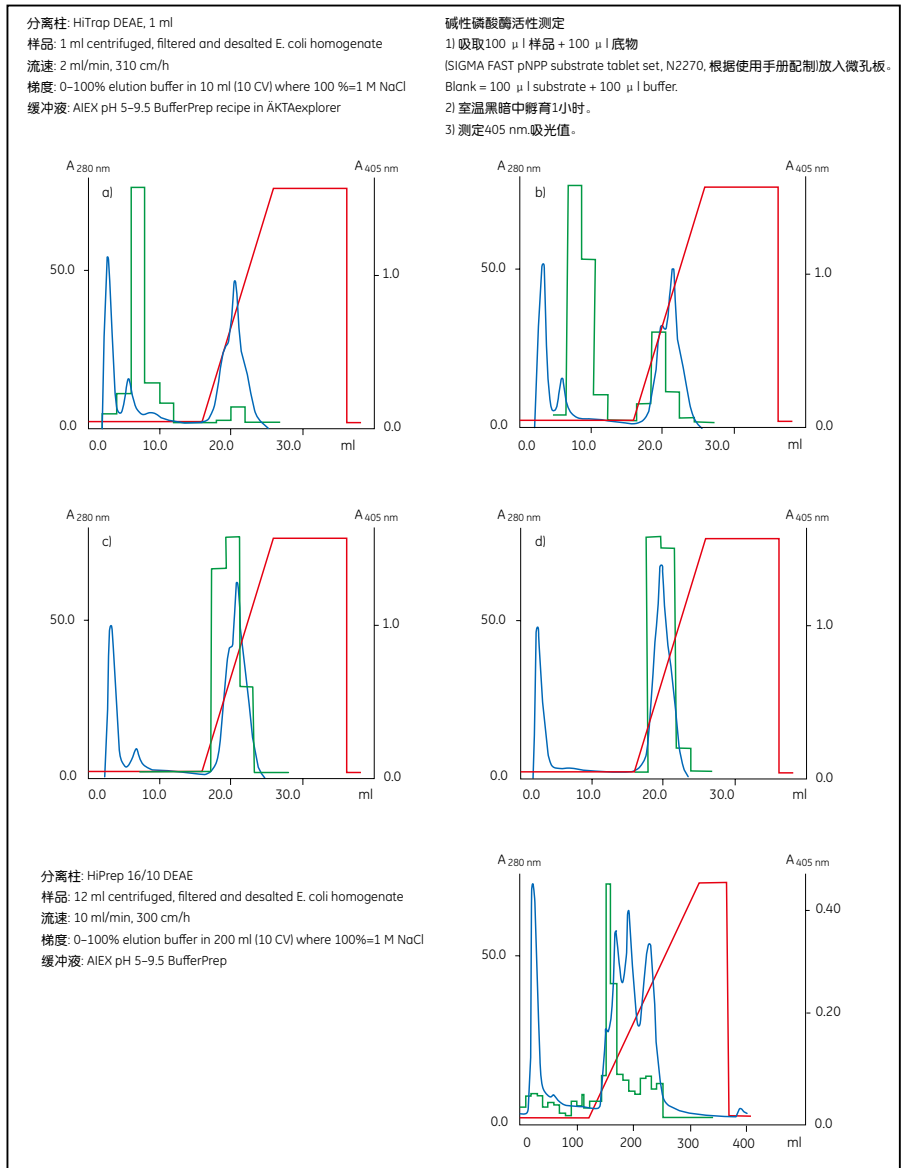


图60. 利用DEAE Sepharose Fast Flowers分离柱进行分离条件优化及规模放大。

优化pH

当分离过程最适合的填料选定后，可通过调整一些参数，如pH来进行进一步的优化。

图61展示了增加pH值可显著的提高CM Sepharose Fast Flow (HiPrep 16/10 CM FF)分离柱对于模型蛋白混合物分离的分辨率。

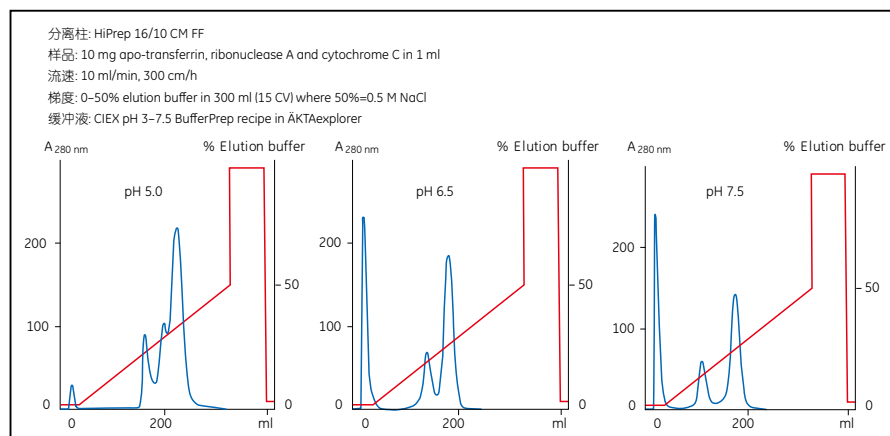


图61. 基于HiPrep 16/10 CM FF分离柱对标准蛋白的分离过程选择最佳pH值。

样品浓度

在进行凝胶排阻层析前对样品进行浓缩，使其体积最小有利于快速，高分辨率的进行大小分离纯化。HiTrap分离柱可为样品浓缩提供方便即用的溶液。第89页表7给出了利用预装Sepharose HP填料的HiTrap分离柱对非常稀的样品进行浓缩的高浓缩倍数。使用预装Sepharose Fast Flow或Sepharose XL填料的HiTrap分离柱可获得与此相似的结果。

运行分离过程

有关填料，缓冲液，pH及离子强度的选择和方法优化方面的指导参见第二章。本节所给出的说明可用于分离过程的优化。

- 正确的样品及缓冲液准备工作对于获得最佳分辨效果，避免分离柱工作能力受损至关重要。样品必须完全溶解，并且没有颗粒或其他干扰分离纯化效果的物质。有关样品准备方面的推荐以及建议参见第二章及附录1。
- 在所有盐及添加剂加入后，过滤缓冲液。使用高质量的水及化学试剂。用0.22 μm 或0.45 μm 孔径的过滤器过滤溶液。为避免装好的分离柱中气泡的产生，确保准备运行前后分离柱与缓冲液处在相同的温度。

- 使用阴离子交换剂（Q，DEAE或ANX）时，起始缓冲液的pH应至少高于目标蛋白等电点0.5-1个pH单位；使用阳离子交换剂（S，CM）时，起始缓冲液的pH应至少低于目标蛋白等电点0.5-1个pH单位。有关阴阳离子交换剂所使用的挥发性或非挥发性缓冲液系统的建议，参见附录2。

对于电性未知样品，尝试以下方案：

——阴离子交换（Q）

起始缓冲液：pH 8.0

洗脱缓冲液：起始缓冲液中包含1M NaCl，pH8.0

——阳离子交换（S）

起始缓冲液：pH 6.0

洗脱缓冲液：起始缓冲液中包含1M NaCl，pH 6.0

- 当使用强离子交换剂（Q或SP）不能获得所需选择性分离效果时，尝试弱离子交换剂（DEAE,ANX或CM）。
- 带有BufferPrep功能的AKTAdesign系统的用户可选用系统所推荐的阴阳离子色谱层析缓冲液配方，pH分别为8和6。

第一次使用或长期储存后

1. 用五个柱体积的蒸馏水将分离柱中的乙醇冲洗出，流速如下：1ml/min（HiTrap 1ml分离柱），5ml/min（HiTrap 5ml分离柱），2ml/min（HiPrep 20ml分离柱），或50cm/h（用Sephacrose Fast Flow填料填充的更大分离柱）。该步骤可保证乙醇的去除，从而避免缓冲液中的盐与乙醇相遇时产生沉淀的风险。如果沉淀不是问题，则该步骤可省略。
2. 用起始缓冲液冲洗五个柱体积，流速如下：1ml/min（HiTrap 1ml分离柱），5ml/min（HiTrap 5ml分离柱），5ml/min（HiPrep 20ml分离柱）。
3. 用洗脱缓冲液冲洗五个柱体积，流速同步骤2。
4. 用起始缓冲液冲洗五个柱体积，流速同步骤2。
5. 加载样品前空运行一次洗脱过程。

梯度洗脱进行分离


流速：1ml/min（HiTrap 1ml分离柱），5ml/min（HiTrap 5ml分离柱），5ml/min（HiPrep 20ml分离柱），150cm/h（用Sephacrose Fast Flow填料填充的更大分离柱）。收集分离过程的所有组分。


1. 用5-10柱体积的起始缓冲液平衡分离柱，直到基线，洗脱pH及电导稳定。
2. 将样品调节至选定起始pH及离子强度，加载到分离柱上。
3. 用5-10柱体积的起始缓冲液平衡分离柱，直到基线，洗脱pH及电导稳定，即所有未结合物质都被冲洗出了分离柱
4. 用10-20个柱体积的梯度进行洗脱，同时盐离子浓度逐渐增加至0.5M NaCl（50%B）。
5. 用5个柱体积的1M NaCl（100%B）冲洗分离柱以洗脱任何残留的离子性结合物质。
6. 用5-10柱体积的起始缓冲液再平衡分离柱，直到基线，洗脱pH及电导到达所需值。


分步洗脱进行分离纯化


流速: 1ml/min (HiTrap 1ml分离柱), 5ml/min (HiTrap 5ml分离柱), 5ml/min (HiPrep 20ml分离柱), 150cm/h (用Sepharose Fast Flowers填料填充的更大分离柱). 收集分离过程的所有组分。

1. 用5-10柱体积的起始缓冲液平衡分离柱, 直到基线, 洗脱pH及电导稳定。
2. 将样品调节至选定起始pH及离子强度, 加载到分离柱上。
3. 用5-10柱体积的起始缓冲液平衡分离柱, 直到基线, 洗脱pH及电导稳定, 即所有未结合物质都被冲洗出了分离柱
4. 用5个柱体积的加入选定离子强度NaCl的起始缓冲液进行洗脱。
5. 重复步骤4, 使用更高的离子强度知道目的蛋白都被洗脱下来。
6. 用5个柱体积的1M NaCl (100%B) 冲洗分离柱以洗脱任何残留的离子性结合物质。
7. 用5-10柱体积的起始缓冲液再平衡分离柱, 直到基线, 洗脱pH及电导到达所需值。

 在高盐冲洗及再平衡过程中可使用更高流速以节约时间。但不要超过分离柱的推荐最大流速。


 如果使用了离子性去污剂, 用5个柱体积的蒸馏水冲洗分离柱后, 用2个柱体积的2M NaCl冲洗。用至少10柱体积的起始缓冲液再平衡分离柱, 直到基线, 洗脱pH及电导稳定。有机溶剂如乙醇用来去除非离子型去污剂。当选用有机溶剂时, 检查填料的化学稳定性以确定一个合适的浓度。

 有关优化分离过程的建议, 参见第二章。

 定期通过确定柱效及峰的对称性检查分离柱的工作能力, 见附录3。注意这并不适用于HiTrap或HiPrep分离柱

清洗

样品及缓冲液的正确准备, 以及每次分离过程后用高盐溶液 (1M NaCl) 冲洗回使分离柱处于良好的状态。然而, 工作能力的下降, 流速的变慢, 背景压力的增加以及完全的堵塞都表明分离柱需要使用剧烈的操作来进行清洗以出去污染物。

 清洗分离柱时建议采用反向液流, 这样污染物就不用穿越整根分离柱而被冲洗出来。根据污染程度的不同清洗所用的缓冲液体积数及清洗时间也有所不同。如果去除普通污染物的操作不能是分离柱柱效恢复, 在使用其他清洗方法前更换分离柱顶部滤膜。更换滤膜时应多加小心, 防止影响到分离柱的填充质量, 干扰分离柱效。

以下步骤足以满足对普通污染物的清除:

1. 用2M的NaCl至少清洗2个柱体积, 流速如下: 1ml/min (HiTrap 1ml分离柱), 5ml/min (HiTrap 5ml分离柱), 5ml/min (HiPrep 20ml分离柱), 或40cm/h处理时间为1-2小时 (用Sepharose Fast Flow填料填充的更大分离柱)。
2. 用1M的NaOH至少清洗4个柱体积, 流速同步骤一。
3. 用2M的NaCl至少清洗2个柱体积, 流速同步骤一。
4. 用至少2个柱体积的蒸馏水润洗分离柱, 流速同步骤一, 直到基线, 洗脱pH及电导稳定。
5. 用至少4个柱体积的起始缓冲液或储存缓冲液冲洗分离柱, 流速同步骤一, 直到基线, 洗脱pH及电导稳定。

如需去除沉淀的蛋白, 脂类, 疏水结合蛋白或脂蛋白, 参见附录1。

填料特性

组成:

- 磺丙基 (SP), 羧甲基 (CM) 季铵 (Q) 或DEAE基团通过化学稳定的醚键同高度交联的6%的琼脂糖连接。
- ANX基团通过化学稳定的醚键同高度交联的4%的琼脂糖连接。

产品	功能团	pH稳定性*	平均颗粒尺寸
Q Sepharose Fast Flow	$-\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	Long term: 2-12 Short term: 1-14	90 μm
SP Sepharose Fast Flow	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$	Long term: 4-13 Short term: 3-14	90 μm
DEAE Sepharose Fast Flow	$-\text{O}-\text{CH}_2\text{CHOHCH}_2\text{N}^+\text{H}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$	Long term: 2-13 Short term: 1-14	90 μm
ANX Sepharose 4 Fast Flow	$-\text{OCH}_2\text{CHOHCH}_2\text{OCH}_2\text{CHOHCH}_2\text{N}^+\text{H}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$	Long term: 3-13 Short term: 2-14	90 μm
CM Sepharose Fast Flow	$-\text{O}-\text{CH}_2\text{COO}^-$	Long term: 4-13 Short term: 2-14	90 μm


* 长期pH稳定性是指填料在长期储存后保持稳定, 没有色谱分离效果降低的pH区间。

短期pH是指再生, 原位清洗以及净化操作时的pH区间。所有的区间都是通过Amersham Biosciences内部试验确定。

化学稳定性

对于日常应用，Sephacrose Fast Flow填料在所有通常水溶液条件下，如1 M NaOH, 变性剂（8M尿素或6M盐酸胍），，以及存在添加剂条件下，如非离子型去污剂，70%乙醇，1M乙酸，30%的异丙醇条件下都保持稳定。

Sephacrose Fast Flow填料可在有机溶剂条件下使用，如二甲亚砜，二甲基甲酰胺，四氢呋喃，丙酮，氯仿，二氯甲烷，二氯乙烷，二氯乙烷/吡啶（50: 50）以及极性溶剂和水/有机溶剂。填料中的水可以被与基架内孔有微弱效应的溶剂替换掉。

 避免Sephacrose Fast Flow SP 或CM使用阳离子去污剂。避免Sephacrose Fast Flow Q，DEAE或ANX中使用阴离子去污剂。避免氧化性试剂。

储存

分离柱储存时，用5个柱体积的蒸馏水冲洗，随后用5个柱体积的20%乙醇冲洗。对于Sephacrose High Performance填料填充的分离柱，在20%乙醇中添加0.2M的醋酸钠。对乙醇/水的混合物充分脱气，并在较低流速下使用以避免分离柱超压。室温储存，或者在4°C — 8°C之间长期储存。确保分离柱密封严实以避免干掉。如有可能，尽量使用制造商提供的储存及运输装备。不用的填料储存于20%乙醇中，4°C — 8°C，不能使分离柱冰冻。

 为避免填充好的分离柱内产生气泡，请确保准备运行时，分离柱与缓冲液温度相同。

Sepharose XL——适用于所选蛋白需要非常高的结合能力以提高产量，可轻松实现规模扩大

- ▶ 当同其他Sepharose填料相比，对于特定的蛋白具有改善的结合能力时，选用Sepharose XL进行分离纯化。
- ▶ 对于净化过的样品，如果所选定蛋白需要高结合能力及快速分离纯化，选用Sepharose XL作为最初的获取步骤。
- ▶ 在ÄKTAdesign, FPLC 系统，HPLC或带有蠕动泵的系统上运行Sepharose XL填充的分离柱。有关如何选择最合适的ÄKTAdesign 系统的指导，参见附录4。
- ▶ 可使用Q Sepharose XL 对病毒或病毒载体进行分离纯化。
- ▶ Sepharose XL基于6%的琼脂糖颗粒制成，填料尺寸为90 μ m；高度交联性提供了化学及物理稳定性，表面替换基团为季铵基团（Q）或磺丙基（SP）。离子性基团结合于偶联在琼脂糖上的长而具有柔性的右旋糖苷链上。这样会增加Q或SP基团暴露在外的表面积从而将结合能力提高到很高水平，而不会限制带电分子的通过。强离子交换基团（Q及S）可在宽pH范围内保持带电性，从而可使每个应用过程中选定最合适的pH值。尽管离子强度及pH会改变，但颗粒大小及柱床体积仍会保持稳定从而保证了快速高分辨率的分离纯化。

纯化选项

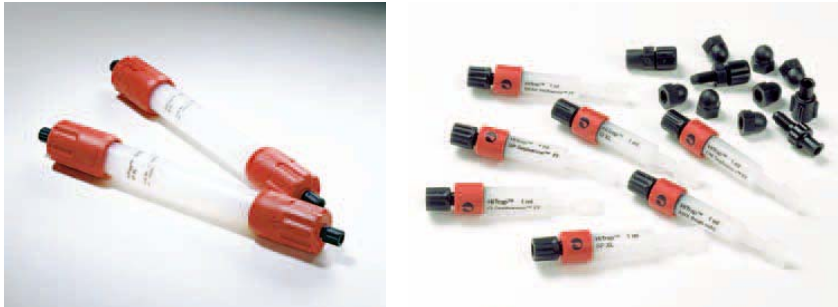


图62，Q及S Sepharose XL 填料可以HiTrap或HiPrep预装柱，单独包装的填料或离子交换筛选试剂盒的形式获取。

产品, 柱床体积	每分离柱的结合能力	推荐工作流速*	最大流速*	工作pH区间**	最大运行背景压力*** (MPa/psi) 1 MPa=10 bar
强阴离子交换剂					
HiTrap Q XL, 1 ml	>130 mg (BSA, M _r 67 000)	up to 1 ml/min	4 ml/min	2-12	0.3/43
HiTrap Q XL, 5 ml	>650 mg (BSA, M _r 67 000)	up to 5 ml/min	20 ml/min	2-12	0.3/43
HiPrep 16/10 Q XL, 20 ml	>2600 mg (BSA, M _r 67 000)	2-10 ml/min	10 ml/min	2-12	0.15/22
Q Sepharose XL and Q Sepharose XL virus licensed****	>130 mg/ml (BSA, M _r 67 000)	300-500 cm/h	700 cm/h	2-12	0.3/3
Strong cation exchangers					
HiTrap SP XL, 1 ml	>160 mg (lysozyme, M _r 14 500)	up to 1 ml/min	4 ml/min	4-13	0.3/43
HiTrap SP XL, 5 ml	>800 mg (lysozyme, M _r 14 500)	up to 5 ml/min	20 ml/min	4-13	0.3/43
HiPrep 16/10 SP XL, 20 ml	>3200 mg (lysozyme, M _r 14 500)	2-10 ml/min	10 ml/min	4-13	0.15/22
SP Sepharose XL	>160 mg/ml (lysozyme, M _r 14 500)	300-500 cm/h	700 cm/h	4-13	0.3/43




Column	Volume	Bed height
Tricorn 10/100	up to 8 ml	up to 10 cm
Tricorn 10/150	up to 12 ml	up to 15 cm
Tricorn 10/200	up to 16 ml	up to 20 cm
XK 16/20	up to 30 ml	up to 15 cm
XK 26/20	up to 80 ml	up to 15 cm
XK 26/40	up to 196 ml	> 15 cm
XK 50/20	up to 274 ml	up to 14 cm
XK 50/30	up to 559 ml	up to 28.5 cm

* 线性流速 (cm/hour) 与体积流速 (ml/min) 之间的互相转换参见附录5。

** 工作pH是指填料结合蛋白的pH间隔或洗脱所需要的pH, 而不是产生不利的长期效应的pH值。

*** 最大工作背景压力是指高于此压力时, 填料会被压缩。

**** 重要信息: 利用Q Sepharose XL对病毒颗粒的分离纯化需要美国专利6537793 B2及Gencell SAS 所有的国外专利许可。购买Q Sepharose XL 填料不包含该许可, 但购买允许病毒分离的Q Sepharose XL填料产品包含该许可。购买允许病毒分离的Q Sepharose XL填料产品的人被美国专利6537793 B2及Gencell SAS 所有的国外专利授权一个免费的限制性许可证, 可单独使用购买的产品进行病毒颗粒的分离纯化。

-  使用HiTrap预装柱 (1ml或5ml) 进行填料选择, 方法筛选, 分组分离, 小规模分离纯化, 样品浓缩或清洗。可连接多达3根HiTrap系列分离柱用于规模扩大。
-  使用HiLoad预装柱 (20ml) 进行方法建立, 分组分离, 更大规模分离纯化, 或样品浓缩或清洗。可同时连接几根HiPrep分离柱以增加结合能力。
-  分离柱填充信息

分离柱	最大体积	柱床高度
Tricorn 10/100	up to 8 ml	up to 10 cm
Tricorn 10/150	up to 12 ml	up to 15 cm
Tricorn 10/200	up to 16 ml	up to 20 cm
XK 16/20	up to 30 ml	up to 15 cm
XK 26/20	up to 80 ml	up to 15 cm
XK 26/40	up to 196 ml	> 15 cm
XK 50/20	up to 274 ml	up to 14 cm
XK 50/30	up to 559 ml	up to 28.5 cm

更大体积请选用生产级别的分离柱, 如BPG或Chromaflo。

纯化举例

填料选择

在进行分离条件优化及规模放大前，使用1 ml HiTrap分离柱可快速轻松的为分离纯化过程选定最佳填料及带电基团。图63比较了相同样品相同条件下使用三种不同填料的洗脱模式，表明电荷基团及颗粒尺寸的不同可导致选择性及分辨率的差异。可根据分离纯化的具体需要来选择最合适的填料以及最佳分离条件。在本例中，使用Sepharose XL对三种组分进行分离，对洗脱条件的优化可进一步提高分辨率。然而，如果目的是分离第一个主峰（ribonuclease A），则任何一种填料都比较合适。

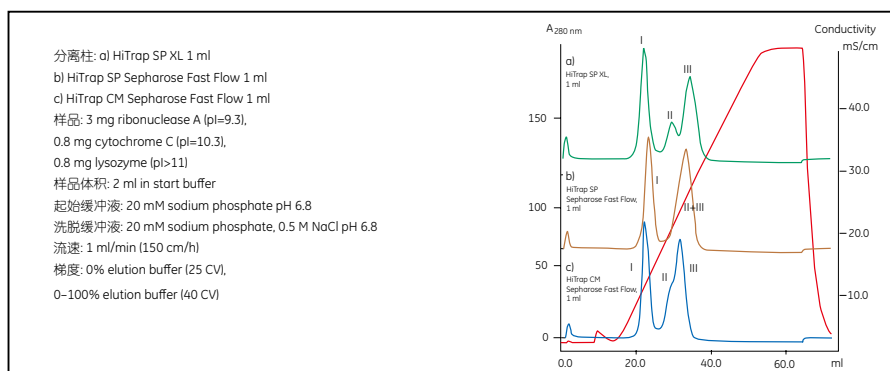


图63，填料筛选：ribonuclease A (I), cytochrome c (II)及 lysozyme (III)通过一系列阴离子交换层析的HiTrap分离柱进行分离纯化。

蛋白获取

图64展示的是使用HiTrap Q XL 1ml分离柱，从净化后的大肠杆菌裂解液中获得碱性磷酸酶。分离过程由紫外A280nm检测，而磷酸酶活性则通过分光光度法在A405nm检测。

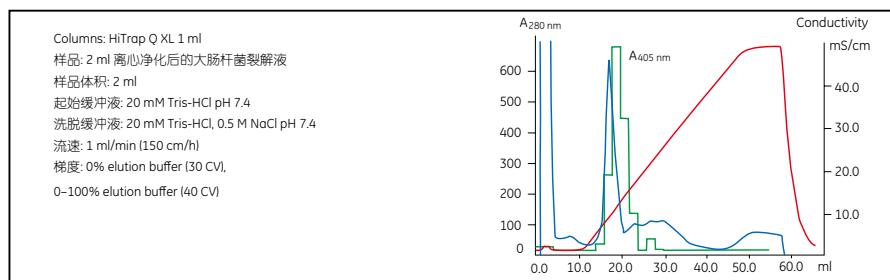


图64，用HiTrap Q XL对净化后的大肠杆菌裂解液进行分离纯化，洗脱组分的磷酸酶活力通过450nm光吸收进行检测。

蛋白获取及分离规模扩大

图65展示了使用Sepharose XL离子交换剂进行的中试规模的分离纯化。分离纯化在天从了Q Sepharose XL填料的 XK 16/20分离柱上进行，已选择最佳pH并确定可获得的最大结合能力。向样品中加入CaCl₂以沉淀DNA,增加目的蛋白的结合能力。最终加载量减少至最大结合能力的75%，并且在使用更大的分离柱进行规模放大前对结合能力进行了证实。

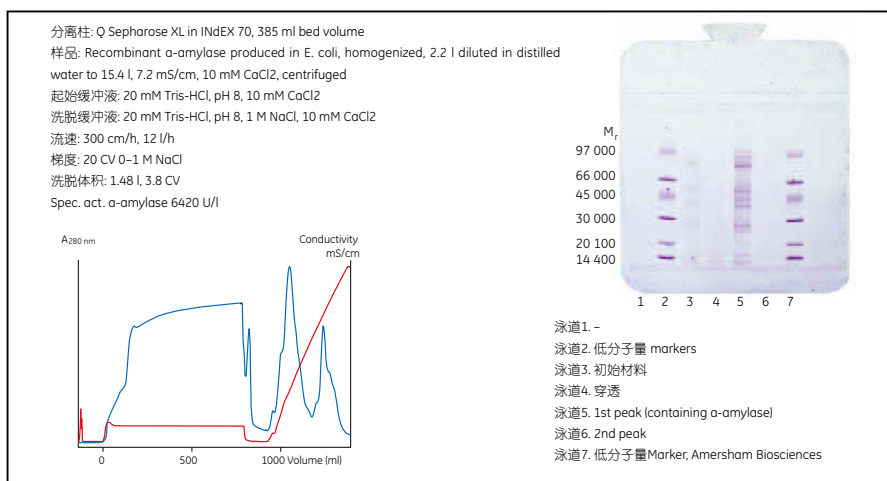


图65, 大肠杆菌重组 α 淀粉酶利用Q Sepharose XL中试规模的分离柱进行蛋白获取, 同时用SDS-PAGE (Phast System, 考马斯亮蓝染色)进行初始材料及洗脱组分的检测。

病毒的分离纯化

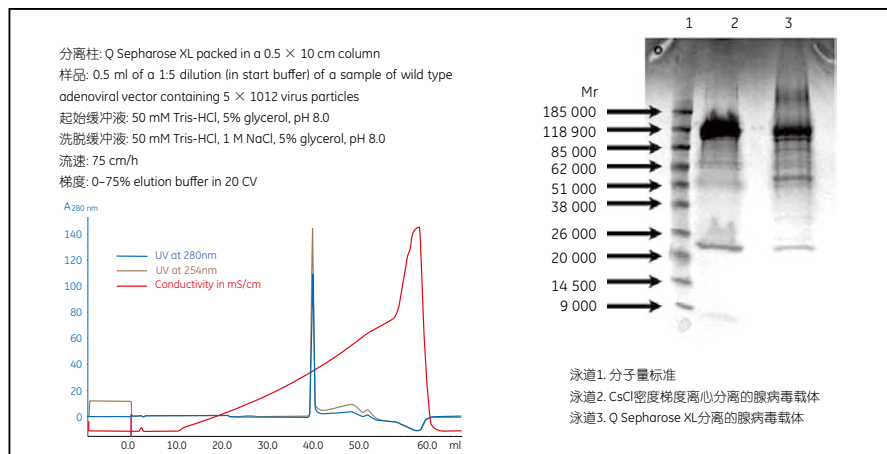





图66, 许可的可用于病毒操作的Q Sepharose XL可替代传统的采用氯化铯密度梯度离心的方式对病毒及病毒载体进行分离纯化。

样品浓度

在进行凝胶排阻层析前对样品进行浓缩，使其体积最小有利于快速，高分辨率的进行大小分离纯化。HiTrap分离柱可为样品浓缩提供方便即用的溶液。第89页的表7给出了利用预装Sephacrose HP填料的HiTrap分离柱对非常稀的样品进行浓缩的高浓缩倍数。使用预装Sephacrose Fast Flow或Sephacrose XL填料的HiTrap分离柱可获得与此相似的结果。

运行分离过程

有关填料，缓冲液，pH及离子强度的选择和方法优化方面的指导参见第二章。本节所给出的说明可用于分离过程的优化。

-  正确的样品及缓冲液准备工作对于获得最佳分辨效果，避免分离柱工作能力受损至关重要。样品必须完全溶解，并且没有颗粒或其他干扰分离纯化效果的物质。有关样品准备方面的推荐以及建议参见第二章及附录1。
-  在所有盐及添加剂加入后，过滤缓冲液。使用高质量的水及化学试剂。用0.22 μm或0.45 μm孔径的过滤器过滤溶液。为避免装好的分离柱中气泡的产生，确保准备运行时分离柱与缓冲液处在相同的温度。
-  使用阴离子交换剂（Q）时，起始缓冲液的pH应至少高于目标蛋白等电点0.5-1个pH单位；使用阳离子交换剂（S）时，起始缓冲液的pH应至少低于目标蛋白等电点0.5-1个pH单位。有关阴阳离子交换剂所使用的挥发性或非挥发性缓冲液系统的建议，参见附录2。

对于电性未知样品，尝试以下方案：

——阴离子交换（Q）

起始缓冲液：pH 8.0

洗脱缓冲液：起始缓冲液中包含1M NaCl，pH8.0

——阳离子交换（S）

起始缓冲液：pH 6.0

洗脱缓冲液：起始缓冲液中包含1M NaCl，pH 6.0

带有BufferPrep功能的AKTAdesign系统的使用者可选用系统所推荐的阴阳离子色谱层析缓冲液配方，pH分别为8和6。

第一次使用或长期储存后

1. 用五个柱体积的蒸馏水将分离柱中的乙醇冲洗出，流速如下：1ml/min（HiTrap 1ml分离柱），5ml/min（HiTrap 5ml分离柱），5ml/min（HiPrep 20ml分离柱），或50cm/h（用Sepharose XL填料填充的更大分离柱）。该步骤可保证乙醇的去除，从而避免缓冲液中的盐与乙醇相遇时产生沉淀的风险。如果沉淀不是问题，则该步骤可省略。
2. 用起始缓冲液冲洗五个柱体积，流速如下：1ml/min（HiTrap 1ml分离柱），5ml/min（HiTrap 5ml分离柱），5ml/min（HiPrep 20ml分离柱），或150cm/h（用Sepharose XL填料填充的更大分离柱）。
3. 用洗脱缓冲液冲洗五个柱体积，流速同步步骤2。
4. 用起始缓冲液冲洗五个柱体积，流速同步步骤2。
5. 加载样品前空运行一次洗脱过程。

梯度洗脱进行分离


流速: 1ml/min（HiTrap 1ml分离柱），5ml/min（HiTrap 5ml分离柱），5ml/min（HiPrep 20ml分离柱），或50cm/h（用Sepharose XL填料填充的更大分离柱）。收集分离过程的所有组分。


1. 用5-10柱体积的起始缓冲液平衡分离柱，直到基线，洗脱pH及电导稳定。
2. 将样品调节至选定起始pH及离子强度，加载到分离柱上。
3. 用5-10柱体积的起始缓冲液平衡分离柱，直到基线，洗脱pH及电导稳定，即所有未结合物质都被冲洗出了分离柱
4. 用10-20个柱体积的梯度进行洗脱，同时盐离子浓度逐渐增加至0.5M NaCl（50%B）。
5. 用5个柱体积的1M NaCl（100%B）冲洗分离柱以洗脱任何残留的离子性结合物质。
6. 用5-10柱体积的起始缓冲液再平衡分离柱，直到基线，洗脱pH及电导到达所需值。

分步洗脱进行分离纯化

流速: 1ml/min（HiTrap 1ml分离柱），5ml/min（HiTrap 5ml分离柱），5ml/min（HiPrep 20ml分离柱），或150cm/h（用Sepharose XL填料填充的更大分离柱）。收集分离过程的所有组分。

1. 用5-10柱体积的起始缓冲液平衡分离柱，直到基线，洗脱pH及电导稳定。
2. 将样品调节至选定起始pH及离子强度，加载到分离柱上。
3. 用5-10柱体积的起始缓冲液平衡分离柱，直到基线，洗脱pH及电导稳定，即所有未结合物质都被冲洗出了分离柱
4. 用5个柱体积的加入选定离子强度NaCl的起始缓冲液进行洗脱。
5. 重复步骤4，使用更高的离子强度知道目的蛋白都被洗脱下来。
6. 用5个柱体积的1M NaCl（100%B）冲洗分离柱以洗脱任何残留的离子性结合物质。
7. 用5-10柱体积的起始缓冲液再平衡分离柱，直到基线，洗脱pH及电导到达所需值。

 在高盐冲洗及再平衡过程中可使用更高流速以节约时间。但不要超过分离柱的推荐最大流速。


 如果使用了离子性去污剂，用5个柱体积的蒸馏水冲洗分离柱后，用2个柱体积的2M NaCl冲洗。用至少10柱体积的起始缓冲液再平衡分离柱，直到基线，洗脱pH及电导稳定。

有机溶剂如乙醇可用于去除非离子型去污剂。当选用有机溶剂时，检查填料的化学稳定性以确定一个合适的浓度。

 定期通过确定柱效及峰的对称性检查分离柱的工作能力，见附录3。

清洗

样品及缓冲液的正确准备，以及每次分离过程后用高盐溶液（1M NaCl）冲洗回使分离柱处于良好的状态。然而，工作能力的下降，流速的变慢，背景压力的增加以及完全的堵塞都表明分离柱需要使用剧烈的操作来进行清洗以出去污染物。

 清洗分离柱时建议采用反向液流，这样污染物就不用穿越整根分离柱而被冲洗出来。根据污染程度的不同清洗所用的缓冲液体积数及清洗时间也有所不同。如果去除普通污染物的操作不能使分离柱柱效恢复，在使用其他清洗方法前更换分离柱顶部滤膜。更换滤膜时应多加小心，防止影响到分离柱的填充质量，干扰分离柱效。

以下步骤足以满足对普通污染物的清除：

1. 用2M的NaCl至少清洗2个柱体积，流速如下：1ml/min（HiTrap 1ml分离柱），5ml/min（HiTrap 5ml分离柱），5ml/min（HiPrep 20ml分离柱），或40cm/h处理时间为1-2小时（用Sepharose XL填料填充的更大分离柱）。
2. 用1M的NaOH至少清洗4个柱体积，流速同步骤一。
3. 用2M的NaCl至少清洗2个柱体积，流速同步骤一。
4. 用至少2个柱体积的蒸馏水润洗分离柱，流速同步骤一，直到基线，洗脱pH及电导稳定。
5. 用至少4个柱体积的起始缓冲液或储存缓冲液冲洗分离柱，流速同步骤一，直到基线，洗脱pH及电导稳定

如需去除沉淀的蛋白，脂类，疏水结合蛋白或脂蛋白，参见附录1。

填料特性

组成：磺丙基（SP）或季铵（Q）基团通过化学稳定的醚键偶联在6%琼脂糖上的长而具有柔性的右旋糖苷链上。

产品	功能团	pH稳定性*	平均颗粒尺寸
Q Sepharose XL	$-\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	长期: 2-12 短期: 2-14	90 μm
SP Sepharose XL	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$	长期: 4-13 短期: 3-14	90 μm (单一尺寸)


* 长期pH稳定性是指填料在长期储存后保持稳定，没有色谱分离效果降低的pH区间。

短期pH是指再生，原位清洗以及净化操作时的pH区间。所有的区间都是通过Amersham Biosciences内部试验确定。

化学稳定性


对于日常应用，Sephacryl XL填料在所有通常水溶液条件下，如1 M NaOH, 变性剂（8M尿素或6M盐酸胍），以及存在添加剂条件下，如非离子型去污剂70%乙醇，1M乙酸，30%的异丙醇条件下都保持稳定。

Sephacryl XL填料可在有机溶剂条件下使用，如二甲亚砜，二甲基甲酰胺，四氢呋喃，丙酮，氯仿，二氯甲烷，二氯乙烷，二氯乙烷/吡啶（50：50）以及极性溶剂和水/有机溶剂。填料中的水可以被与基架内孔有微弱效应的溶剂替换掉。

 避免SP Sephacryl XL使用阳离子离子去污剂。避免Q Sephacryl XL 中使用阴离子去污剂。
避免氧化性试剂。

储存

分离柱储存时，用5个柱体积的蒸馏水冲洗，随后用5个柱体积的20%乙醇冲洗。对于Sephacryl High Performance填料填充的分离柱，在20%乙醇中添加0.2M 的醋酸钠。对乙醇/水的混合物充分脱气，并在较低流速下使用以避免分离柱超压。室温储存，或者在4°C - 8°C之间长期储存。确保分离柱密封严实以避免干掉。如有可能，尽量使用制造商提供的储存及运输装备。不用的填料储存于20%乙醇中，4°C - 8°C，不能使分离柱冰冻。

 为避免填充好的分离柱内产生气泡，请确保准备运行时，分离柱与缓冲液温度相同。

Sepharose Big Beads: 大规模从粘性粗提样品中进行分离纯化

- 使用Sepharose Big Beads填料从粘性的粗提样品中纯化蛋白质。
- Sepharose Big Beads适用于需要处理大体积的粗提或粘性样品，且样品必须被迅速处理，而分辨率不是很重要。
- 当黏度及背景压力限制了小颗粒尺寸的离子交换剂的使用时，可选用Sepharose Big Beads用于获取步骤的纯化。
- 在ÅKTAdesign, FPLC 系统, HPLC或带有蠕动泵的系统上运行SOURCE。有关如何选择最合适的ÅKTAdesign 系统的指导，参见附录4。

Sepharose Big Beads离子交换剂用于大规模工业级别的应用。填料为基于6%的交联琼脂糖颗粒，尺寸为100-300 μm ，表面由季铵（Q）或磺丙基（SP）基团所取代。大尺寸的颗粒，量筒高度交联所带来的极端物理及化学稳定性，保证了在处理非常粘稠的样品时的高流速。例如，在工业级别的分离过程中，样品黏度为水的2.5倍时，系统仍可维持500cm/h的流速。更大稀释倍数的样品流速可达1000cm/h。尽管离子强度和pH值会改变，但颗粒尺寸和柱床体积会保持不变。强离子交换基团（Q及SP）可在宽pH范围内保持带电性，从而可使每个应用过程中选定最合适的pH值。

图67和68展示了Big Beads填料出色的液力。

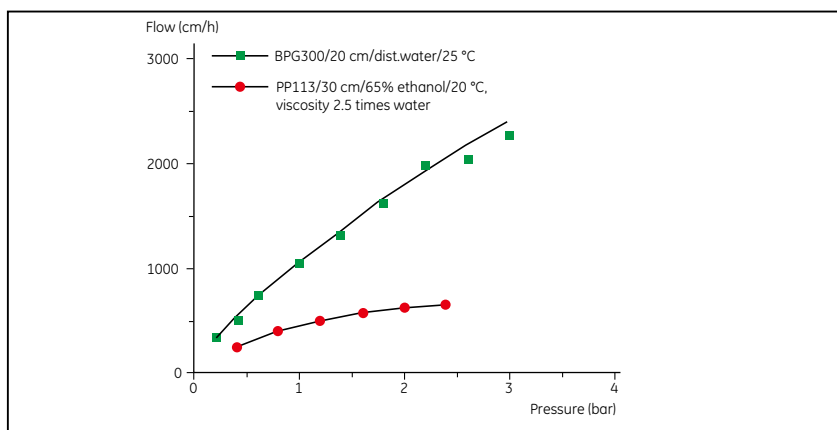


图67, Sepharose Big Beads 可使用高流速处理高粘度的样品。

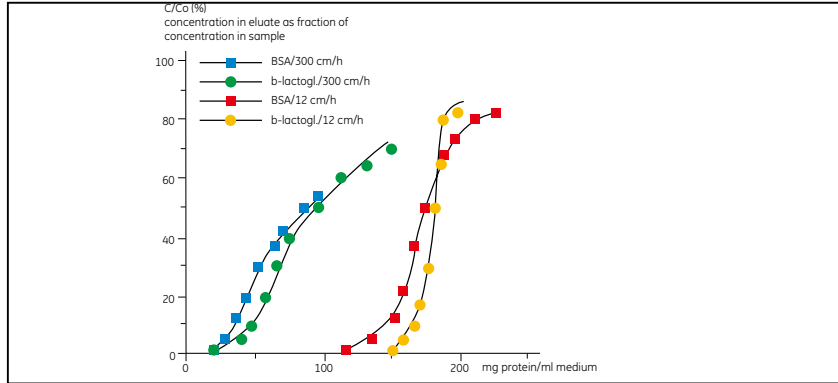


图68, Sepharose Big Beads典型的结合能力。结合能力测试条件: BSA, pH 5的醋酸盐; β 乳球蛋白, 甲酸盐pH4.1.线性流速分别为12及300cm/h。


纯化选项

产品, 柱床体积	每分离柱的结合能力	推荐工作流速*	最大流速*	工作pH区间**	最大运行背景压力*** (MPa/psi) 1 MPa=10 bar
Strong anion exchangers					
Q Sepharose Big Beads	tested for each specific application	up to 300 cm/h	1800 cm/h	2-12	0.3/43
Strong cation exchanger					
SP Sepharose Big Beads	tested for each specific application	up to 300 cm/h	1800 cm/h	4-13	0.3/43

* 线性流速 (cm/hour) 与体积流速 (ml/min) 之间的互相转换参见附录5。

** 工作pH是指填料结合蛋白的pH间隔或洗脱所需要的pH, 而不是产生不利的长期效应的pH值。

*** 最大工作背景压力是指高于此压力时, 填料会被压缩。

 方法建立过程中的分离柱填充信息, 特别是处理粗提, 高粘度的样品时:


XK 16/20	up to 30 ml	up to 15 cm
XK 26/20	up to 80 ml	up to 15 cm
XK 26/40	up to 196 ml	> 15 cm
XK 50/20	up to 274 ml	up to 14 cm
XK 50/30	up to 559 ml	up to 28.5 cm


更大体积, 请选用生产级别的分离柱, 如BPG或Chromaflo.

Sepharose Big Beads可通过以下几种方式填充入大规模的分离柱: 通过1-3bar之间的恒压; 通过混合物沉淀后通过接头压缩的方式, 或通过抽气填充。请遵循分离填料所提供的说明书。

运行分离过程

有关填料，缓冲液，pH及离子强度的选择和方法优化方面的指导参见第二章。附录2给出了有关挥发性及非挥发性缓冲液系统的推荐。

 正确的样品及缓冲液准备工作对于获得最佳分辨效果，避免分离柱工作能力受损至关重要。样品必须完全溶解，并且没有颗粒或其他干扰分离纯化效果的物质。有关样品准备方面的推荐以及建议参见第二章及附录1。


 在所有盐及添加剂加入后，过滤缓冲液。使用高质量的水及化学试剂。用0.22 μm或0.45 μm孔径的过滤器过滤溶液。为避免装好的分离柱中气泡的产生，确保准备运行前后分离柱与缓冲液处在相同的温度。

第一次使用或长期储存后

1. 用五个柱体积的蒸馏水将分离柱中的乙醇冲洗出，流速为300cm/h。
2. 用起始缓冲液冲洗五个柱体积，速度同步骤1。
3. 用洗脱缓冲液冲洗五个柱体积，流速同步骤1。
4. 用起始缓冲液冲洗五个柱体积，流速同步骤1。
5. 加载样品前空运行一次洗脱过程。

梯度或分步洗脱进行分离


利用Sepharose Big Beads进行大规模分离纯化的条件将在方法建立中确定，并同特定的应用过程相联系。有关分离纯化条件优化方面的建议，参见第二章。典型的分离流速为200-500cm/h。

 如果使用了离子性去污剂，用5个柱体积的蒸馏水冲洗分离柱后，用2个柱体积的2M NaCl冲洗。用至少10柱体积的起始缓冲液再平衡分离柱，直到基线，洗脱pH及电导稳定。有机溶剂如乙醇可用来去除非离子型去污剂。当选用有机溶剂时，检查填料的化学稳定性以确定一个合适的浓度。有关优化分离过程的建议，参见第二章。

 定期通过确定柱效及峰的对称性检查分离柱的工作能力，见附录3。

清洗

样品及缓冲液的正确准备，以及每次分离过程后用高盐溶液（1M NaCl）冲洗回使分离柱处于良好的状态。然而，工作能力的下降，流速的变慢，背景压力的增加以及完全的堵塞都表明分离柱需要使用剧烈的操作来进行清洗以出去污染物。

 清洗分离柱时建议采用反向液流，这样污染物就不用穿越整根分离柱而被冲洗出来。根据污染程度的不同清洗所用的缓冲液体积数及清洗时间也有所不同。如果去除普通污染物的操作不能使分离柱柱效恢复，在使用其他清洗方法前更换分离柱顶部滤膜。更换滤膜时应多加小心，防止影响到分离柱的填充质量，干扰分离柱效。

以下步骤足以满足对普通污染物的清除：

1. 用2M 的NaCl至少清洗2个柱体积，40cm/h处理时间为1-2小时。
2. 用1M 的NaOH至少清洗4个柱体积，流速同步骤一。
3. 用2M 的NaCl至少清洗2个柱体积，流速同步骤一。
4. 用至少2个柱体积的蒸馏水润洗分离柱，流速同步骤一，直到基线，洗脱pH及电导稳定。
5. 用至少4个柱体积的起始缓冲液或储存缓冲液冲洗分离柱，流速同步骤一，直到基线，洗脱pH及电导稳定

如需去除沉淀的蛋白，脂类，疏水结合蛋白或脂蛋白，参见附录1。

填料特性

组成：

- 磺丙基（SP），季铵（Q）基团通过化学稳定的醚键同高度交联的6%的琼脂糖连接。

产品	功能团	pH稳定性*	平均颗粒尺寸
Q Sepharose Big Beads	$-\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	Long term: 2-12 Short term: 2-14	200 μm
SP Sepharose Big Beads	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$	Long term: 4-13 Short term: 3-14	200 μm


* 长期pH稳定性是指填料在长期储存后保持稳定，没有色谱分离效果降低的pH区间。

短期pH是指再生，原位清洗以及净化操作时的pH区间。所有的区间都是通过Amersham Biosciences内部试验确定。

化学稳定性

对于日常应用，Sephacrose Big Beads填料在所有通常水溶液条件下，如1 M NaOH, 变性剂（8M 尿素或6M盐酸胍），以及存在添加剂条件下，如非离子型去污剂，70%乙醇，1M乙酸，30%的乙腈及30%异丙醇条件下都保持稳定。

Sephacrose Big Beads填料可在有机溶剂条件下使用，如二甲亚砜，二甲基甲酰胺，四氢呋喃，丙酮，氯仿，二氯甲烷，二氯乙烷，二氯乙烷/噁啉（50：50）以及极性溶剂和水/有机溶剂。填料中的水可以被与基架内孔有微弱效应的溶剂替换掉。

 避免Sephacrose Big Beads SP使用阳离子离子去污剂。避免Sephacrose Big BeadsQ使用阴离子去污剂。避免氧化性试剂。

储存

分离柱储存时，用5个柱体积的蒸馏水冲洗，随后用5个柱体积的20%乙醇冲洗。对于Sephacrose Big Beads填料填充的分离柱，在20%乙醇中添加0.2M 的醋酸钠。对于小规模的分选柱，将乙醇/水的混合物充分脱气；对大规模的分选柱，确保分选柱前有气泡捕获器。在较低流速下添加储存液，并在分选柱平衡时检测背景压力。可选择将分选柱储存于含有20%乙醇的中性pH缓冲液中，或0.01M NaOH中。

室温储存，或者在4°C – 8°C之间长期储存。确保分选柱密封严实以避免干掉。不用的填料储存于20%乙醇中，4°C – 8°C，不能使分选柱冰冻。

第四章

分离纯化策略中的离子交换（CIPP）

为保证高效、可重复性并达到所需纯度要求的分离纯化过程，可通过使用获取、中间纯化和精细纯化（CIPP）的策略建立多步骤分离过程，如图69所示。

CIPP策略应用于医药工业及实验室的研究中，保证了更快的建立方法，更短的产品纯化时间及良好的经济效益。本章简略概述该策略，它适用于任何一种多步骤蛋白纯化的过程。Amersham Biosciences的蛋白分离纯化手册是计划高效有效的蛋白分离纯化策略的理想指导。任何一个纯化过程最重要的第一步是正确的进行样品准备，这在附录1及第二章中有详细介绍。

离子交换层析谱（IEX）在大多数多步骤纯化过程中扮演着重要而又高度灵活的角色。对于任何一种纯化过程，如果特定的亲和填料不可获得，或对目的分子知之甚少，推荐采用IEX作为第一步纯化步骤。根据特定应用中需要的不同，该技术可用于目的分子的获取、中间步骤纯化和精细纯化。由于IEX可提供不同的选择性（阴/阳离子交换剂），且可通过调整纯化过程的pH来改变样品组份的带电特性，因此在同一纯化流程中可多次使用该技术。另外，IEX可在快速获取步骤中使用分步洗脱，或在精细纯化过程中通过梯度洗脱来获得最高分辨率。

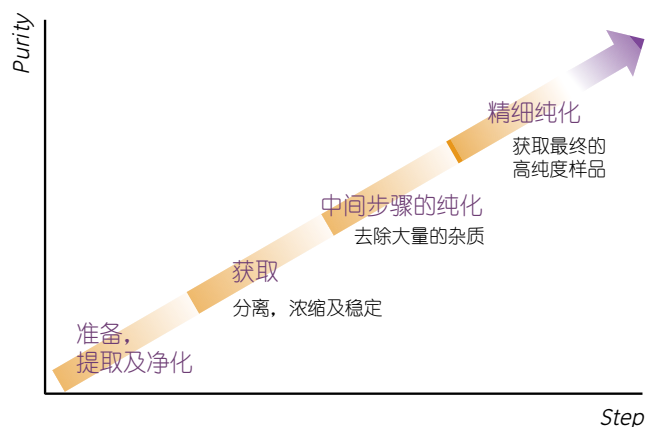


图69，准备及CIPP。

CIPP的应用

设想分离纯化过程有三个阶段：获取，中度纯化以及精细纯化。

在纯化过程中，为每步分配一个特定的目标。

分离过程中，特定步骤相关的问题很大程度上依赖于初始材料的性质。因此，纯化的目的根据他们在整个流程中位置的不同而改变。

在获取阶段，目的是分离，浓缩并稳定目的产物。产物应该被富集，并转移至可保存期活力的环境中。

在中度纯化阶段，目的是去除绝大多数的大量杂质，如其他蛋白与核酸，内毒素与病毒。

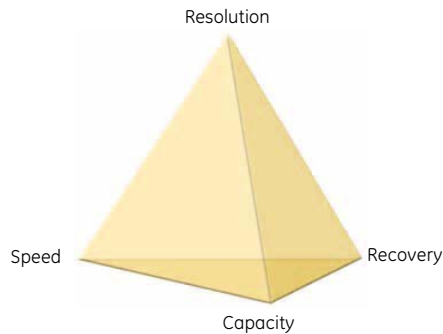
在精细纯化阶段，大多数的杂质都已被去除。该步骤的目的是通过去除一些残留的痕量杂质，或紧密相关的物质来达到最终的纯度。

获取，中度纯化 以及精细纯化三步中，纯化技术的最优化选择及结合对有效的分离纯化至关重要。

纯化技术的选择及结合 蛋白可通过不同的纯化技术，利用它们特定性质的不同达到分离的目的，如表8所示：

表8， 分离纯化中使用到的蛋白的性质。

蛋白性质	分离纯化技术
大小	凝胶排阻层析 (GF)
电性	离子交换层析 (IEX)
疏水性	疏水相互作用 (HIC)， 反相 (RPC)
生物识别 (配体特异性)	亲和层析 (AC)



每种分离纯化技术都是在分辨率，结合能力，速度及回收率之间的一种平衡。

结合能力：如上简略模型所示，是指分离纯化中所能加载的目的蛋白量。在某些情况下，所能加载的样品量受限于体积（如凝胶排阻层析），或大量的杂质分子而不是目的蛋白的量。

速度：在纯化之初最重要的因素，一些污染分子如蛋白酶必须尽可能快的除去。

回收率：回收率会随着分离流程的进行而变得越发重要，因为纯化后产品的价值在增加。回收率会受到样品经历的破坏性过程以及分离柱上不适当的条件的影响。

分辨率：分辨率由分离技术的选择性，以及所选的色谱层析填料产生较窄样品峰的效率及选择性所决定。通常，在最后阶段的纯化中最难获得好的分辨率，因为此时杂质与目的蛋白性质非常相似。




-  选用能满足纯化步骤目的分离技术。
 -  在每步的开始或末尾，根据技术的特长及样品条件，对分离技术进行逻辑组合。
- 表9展示了每种分离技术在CIPP不同阶段的适合程度。

表9，CIPP中不同纯化技术的适合程度。

分离技术	主要特征	获取步骤	中间纯化	精细纯化	样品起始条件	样品最终条件
<i>IEX</i>	高分辨率 高结合能力 高速度	★★★	★★★	★★★	低离子强度，样品体积不限	高离子强度或pH改变，浓缩后的样品
<i>HC</i>	良好的分辨率 良好的结合能力 高速	★★	★★★	★	高离子强度，样品条件不限	低离子强度，浓缩后的样品
<i>AC</i>	高分辨率 高结合能力 高速	★★★	★★★	★★	特定的结合条件，样品提及不限	特定的洗脱条件，浓缩后的样品
<i>GF</i>	高分辨率 使用Superdex™ 填料		★	★★★	样品体积 (<柱床体积的5%) 及流速范围受限	缓冲液更换 (如有必要)，样品被稀释
<i>RPC</i>	高分辨率		★	★★★	样品体积通常不受限，但可能需要添加剂	有机溶剂中，存在丧失生物活性的风险

-  通过纯化步骤之间不同技术的结合，可是对样品的操作降至最低，从而避免需要对样品状态进行的调整。从第一个分离柱中洗脱出来的样品应该满足下一分离柱的起始条件（见表9）。

- 硫酸铵常用于样品的净化及浓缩（见附录1），但却使样品处于高盐环境中。因此需要高盐浓度来促进蛋白与填料结合的HIC是获取步骤的理想选择。从HIC分离柱洗脱后，样品中盐浓度及样品总体积将会显著减少。对分步收集的组分进行稀释，或使用脱盐柱进行快速缓冲液更换后，可是样品进入后续的IEX或AC步骤中。
- 凝胶排阻层析是一种非结核性的分离技术，不受缓冲液条件的影响，但样品体积受限。GF适合于任何一种浓缩技术（IEX,HIC,AC）之后，因为小体积的目的蛋白会被稀释，且前一过程的缓冲液不会影响凝胶排阻层析过程。

最后分离策略的选择总是依赖于特定样品的性质，以及所需的纯化水平。不同技术的逻辑组合如图70所示：

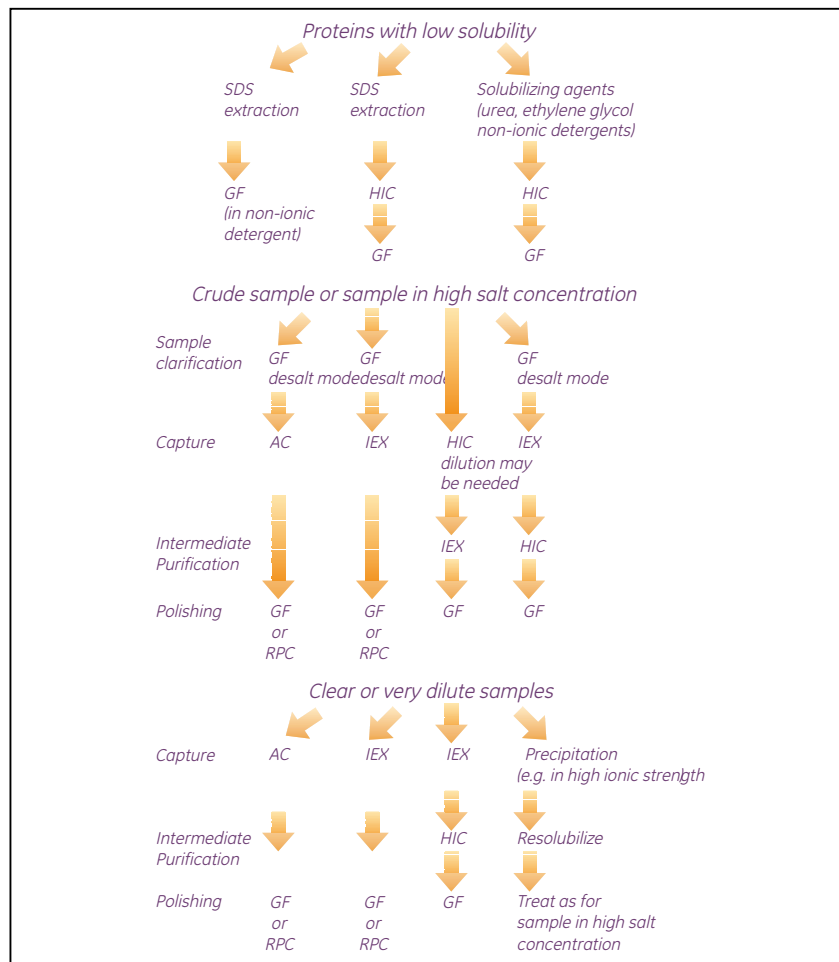


图70 色谱层析技术的逻辑组合。

- 对于任何获取步骤，选用结合目的蛋白效率最高且尽可能少结合污染分子的技术，即所选技术应对目的蛋白具有最高的选择性和/或结合能力。

样品通过不同技术的组合以及不同的选择性来进行分离纯化。例如，在 IEX-HIC-GF 分离纯化策略中，获取步骤根据电荷的不同使用 IEX，中度纯化步骤中根据疏水性的不同使用 HIC，而最终精细纯化步骤中根据分子大小不同使用凝胶排阻层析。

- 如果目的蛋白任何信息都未知，使用在 IEX-HIC-GF 分离纯化策略。这些技术的结合使用看看做是标准分离方案。

- 在同一分离纯化策略中，考虑使用阴/阳离子交换色谱层析以获得不同的选择性。

离子交换作为获取步骤

当离子交换色谱层析作为获取步骤时，分离目的为快速从样品粗提物中吸附目的蛋白，并帮助他们从一些关键的污染分子如蛋白酶和糖苷酶中分离出来。目的蛋白被富集，并转移至可保持活性的环境中。对于其他一些关键性污染分子的去除还可通过小心地对 pH 和洗脱条件优化除去。

获取步骤的重点是获取能力及分离速度。为将第一步的结合能力及分离速度最大化，建议此时应妥协于 IEX 潜在的分辨率。

用于获取步骤的 IEX 填料应具有高速度及高结合能力。

1. Sepharose Fast Flow (90 μm 尺寸颗粒)——在任何规模的粗提混合物的纯化中具有良好的分辨率，流速可达 300cm/h，并且具有宽范围的选择性。
2. Sepharose XL (90 μm 尺寸颗粒)——在实验室及生产规模，高结合能力，良好分辨率的获取选定蛋白，流速可达 300cm/h。
3. Sepharose Big Beads (200 μm 尺寸颗粒)——适用于粘性的，不能使用 IEX 填料等小颗粒填料的样品，流速可达 300cm/h；或在分辨率不是很重要时，对非常大体积的样品进行快速分离，流速可达 1000cm/h。

如果只需要毫克级别的目的产物，且获取步骤不需要进行规模放大，可根据所需吸附能力选用高效填料如 MonoBeads 或 MiniBeads。另外，如果起始材料相当洁净，单独使用 MonoBeads 实验室规模的分离步骤就足以获得所需纯度。

- 选用的起始条件应避免污染分子的吸附，从而帮助目的蛋白的吸附达到最大化；这有利于富集的目的蛋白的快速，简单的分步洗脱。

图71展示了重组DAOCS酶获取步骤的条件优化。由于该酶具有氧敏感性，因此从相对不稳定的目的蛋白中快速出去大量的有害污染分子比较重要。DAOCS的等电点 (pI=4.8) 决定了阳离子交换剂为最佳选择。在使用更大的HiPrep 16/10 Q XL分离柱进行分离优化之前，对HiTrap IEX选择试剂盒中的分离柱进行筛选已选定最合适的填料（结果未展示）。有关DAOCS的整个分离过程的详细描述，见应用手册18-1128-91，可从Amersham Biosciences公司获得。

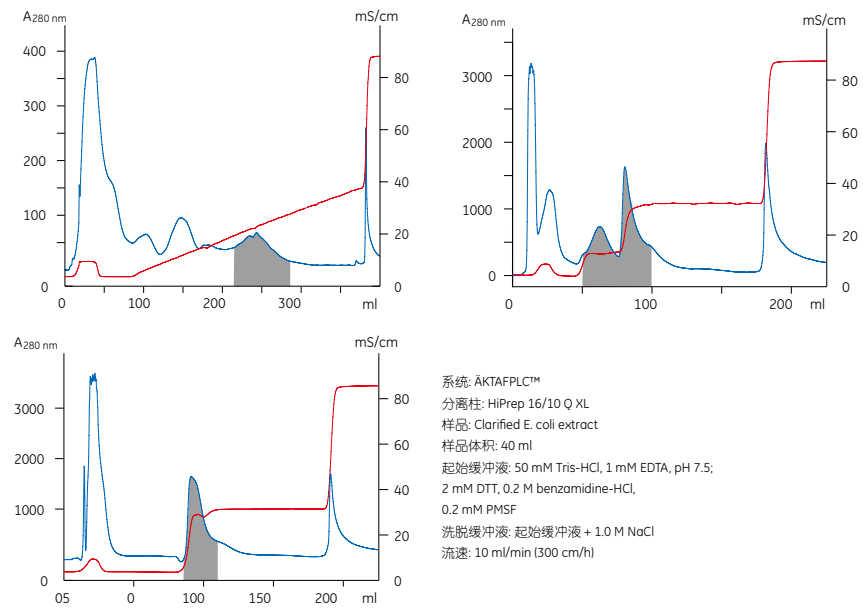


图71. 利用IEX的获取步骤及条件优化。DAOCS的洗脱位置用阴影表示。

离子交换用于中间步骤分离纯化

当IEX用于中度纯化时，目的是去除绝大部分的重要杂质，如蛋白质，核酸，内毒素及病毒等。

在典型的中间步骤纯化中，由于样品体积已被减小，且在获取过程中已去除有害污染分子，速度不是那么重要了。纯化的目的在于结合能力与分辨率，以维持生产能力（单位时间内每根分离柱所处理的目的蛋白量）及获得尽可能高的选择性（纯度）。因此，通常需要采用梯度洗脱的方式。

使用与获取步骤中选择性互补的技术。中度纯化中使用的IEX填料应该具有高结合能力，高分辨率以及一系列互补的选择性：

1. Sepharose High Performance (34 μ m 尺寸的颗粒)——高分辨率的纯化，流速可达150cm/h。
2. SOURCE 15 (15 μ m 尺寸的颗粒)——实验室或大规模应用中高通量高分辨率的纯化，流速可达1800cm/h。
3. SOURCE 30 (30 μ m 尺寸的颗粒)——大规模应用中，当流速高达2000cm/h时，作为SOURCE 15的替代。
4. Sepharose Fast Flow (90 μ m 尺寸的颗粒)——快速分离纯化，良好的分辨率，流速可达300cm/h，广泛的选择性。

如果只需要纯化毫克级别的蛋白，且中度纯化过程不需规模扩大，可根据结合能力的需要选用MonoBeads或MiniBeads填料。

对填料的选择性进行优化以保证高结合能力，使分辨率最大化。使用连续的梯度洗脱或多步的分步洗脱。

图72展示了由酿酒酵母表达为胞外蛋白的EGF的纯化流程图。如图所示，在纯化过程转入大规模生产之前，在实验室规模进行了方法建立及优化。当纯化流程进行规模放大后（图73），纯度及产量维持不变。起始材料为Chiron-Cetus Corp., Emeryville, CA, USA公司提供的净化后的上清。在利用HIC进行获取步骤之后，用Superdex 75制备级别的分离柱进行精细纯化前，使用Q Sepharose High Performance进行高分辨率的中间步骤纯化。注意，当获取步骤中从Sepharose Fast Flowers填料转至Sepharose High Performance填料时，颗粒尺寸的减小进一步提高了纯化的分辨率。

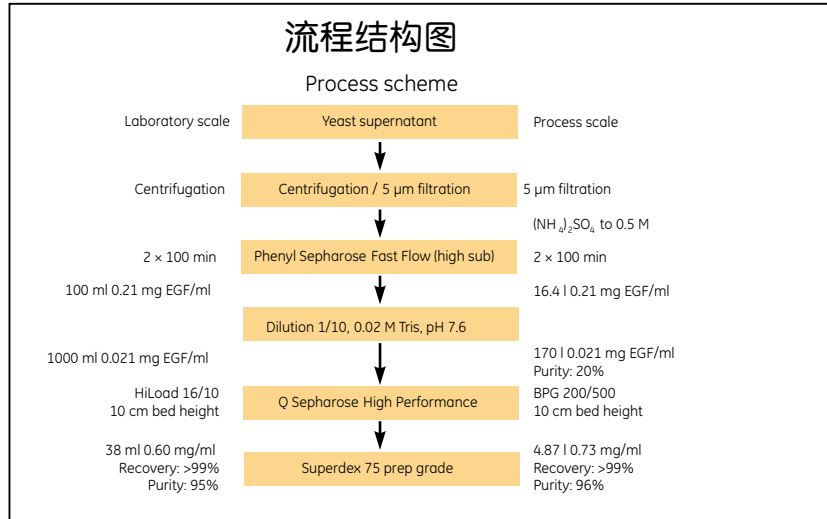


图72, EGF纯化的流程结构图。

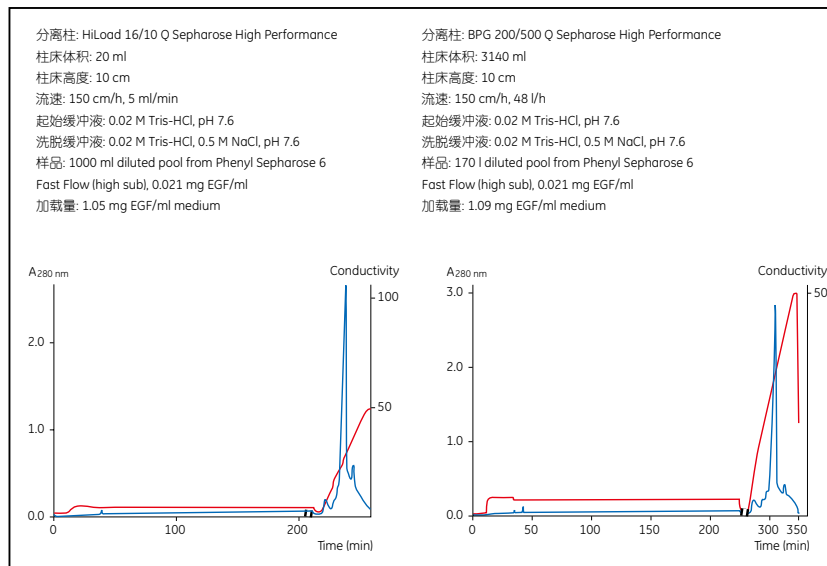


图73, 当纯化过程从HiLoad分离柱放大至BPG分离柱时, 洗脱模式, 纯度及常量维持不变。

离子交换作为精细纯化步骤

当用IEX作为精细纯化步骤时，绝对对数的杂质已被去除了痕迹量或十分相近的物质，如目的蛋白结构上的不同体，核酸，病毒或内毒素。纯化的目的是减少这些蛋白的不同体及痕量杂质分子到可接受的水平。同通常使用快速，高结合能力，分步洗脱的获取纯化步骤相反，精细纯化步骤集中在获得可能的最高分辨率。图74展示了该方法的一个实例，用Mono S 5/50 GL将重组DNA结合蛋白 transposase TniA从经过离子交换及肝磷脂亲和层析部分纯化后仍残留的少量污染分子中分离出来。最终的产物纯度>90%。

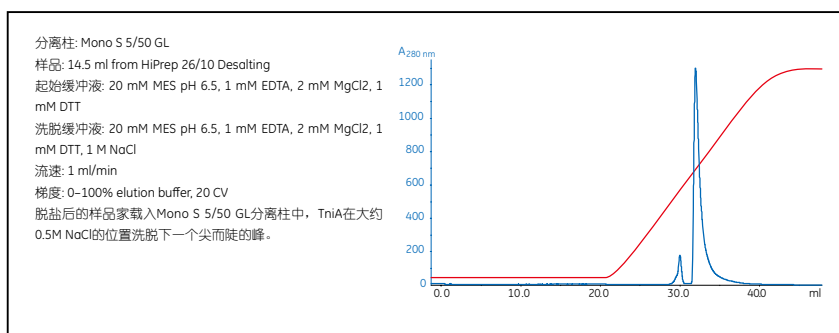



图74, Mono S 5/50 GL上进行的高分辨率离子交换层析色谱。

作为最终精细纯化步骤的IEX填料应该能够提供最高的分辨率:

1. MiniBeads (3 μ m尺寸颗粒) ——当最高分辨率为关键因素时, 用于微小规模的精细纯化。
2. MonoBeads (10 μ m尺寸颗粒) ——当最高分辨率为关键因素, 且需要比MiniBeads更高的结合能力时, 用于实验室规模的精细纯化步骤。
3. SOURCE 15 (15 μ m尺寸颗粒) ——用于实验室过大规模应用中快速高分辨率的精细纯化, 流速可达1800cm/h。
4. SOURCE 30 (30 μ m尺寸颗粒) ——在大规模应用中, 当流速可达2000cm/h时, 作为SOURCE 15的替代。

 优化梯度洗脱条件以使选择性最大化。使用高分辨率而又颗粒尺寸小的填料以提高分辨率。

精细纯化步骤的其他可选用技术

通常境况下，根据电荷，疏水性或亲和性进行的分离纯化回用于纯化策略的早期阶段，因此高分辨率的凝胶排阻层析是最终精细纯化步骤的理想选择。产物可在同一步骤中得到纯化并转移至所需缓冲液中，同时还可出去二聚体及其他聚集体，如图75所示。

凝胶排阻层析也是色谱层析技术中最慢的，且分离柱的体积尺寸决定了可加载的样品体积。因此最合理的方式为在减少样品体积的纯化技术后使用凝胶排阻层析，这样可以使用更小的分离柱。精细纯化步骤的分离填料应能提供可能的最高分辨率。Superdex为实验室规模的首选，而Superdex制备级别分离柱则是用于大规模的应用。

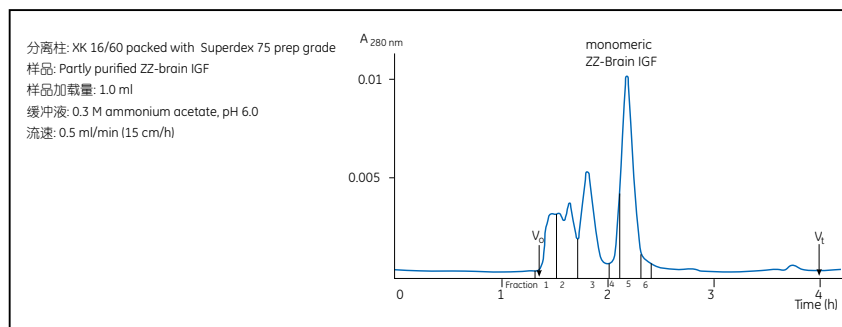


图75. 最终精细纯化步骤：在Superdex 75制备级别分离柱上分离双体及多聚体。

RPC同样可作为精细纯化步骤，前提是目的蛋白可以忍受运行条件。反相色谱层析（RPC）根据疏水性分离蛋白质和多肽。RPC为高选择性（高分辨率）技术，通常需要使用有机溶剂。当活性的回收及三维结构不是很重要时，该技术广泛应用于纯度监测分析。由于许多蛋白会被有机溶剂变形，所以通常不推荐RPC用于蛋白质的分离纯化，因为活性的回收及重新回到正确的三维结构往往效果不是很理想。然而在精细纯化阶段，当大多数的蛋白杂质被除去后，RPC是一种非常出色的纯化技术特别是对于通常不被有机溶剂变性的小目的蛋白。

CIPP并不意味着不许进行三步骤的纯化过程。例如，获取及中度纯化步骤可在同一步骤中实现，如同中度纯化步骤可同精细纯化步骤同时完成。类似的，当纯度要求很低时，快速的获取步骤就足以获得所需的结果。对于治疗所用的蛋白的纯化，或许会需要第四个或第五个纯化步骤以满足对于最高纯度及安全需要的要求。纯化所需的步骤数通常取决于所需蛋白的纯度及蛋白的使用目的。

第五章

色谱聚焦：原理与方法

简介

本章将介绍色谱聚焦技术的原理与方法，一种根据蛋白质等电点的不同将他们分离纯化的技术。

- 色谱聚焦可作为部分纯化后样品的精细纯化步骤。样品中组份越少，获得单独某蛋白高分辨率分离的机会越大。在特定的应用中，色谱聚焦可分离等电点差异小至0.02pH单位的分子。高分辨能力特别适用于分离非常相似的物质。
- 色谱聚焦用于高分辨率，分析性的分离纯化。
- 当蛋白利用其他色谱层析技术，如电荷（使用离子交换），分子大小或疏水性等不能分离时，可使用色谱聚焦作为补充技术。

如在第一章中的解释，每个蛋白具有独特的pH相对于净电荷的关系，可从滴定曲线中看到。该曲线反映了蛋白的净电荷如何随着周围环境的pH而改变。等电点是指蛋白含有的表面净电荷为零时的pH值。具有不同等电点的蛋白质可通过穿过色谱聚焦分离柱（填充有特别设计的填料）而得到纯化，而分离柱中通过特别设计及相适应的两性缓冲液产生一个pH梯度。蛋白按照它们等电点的顺序洗脱下来，如图76所示。

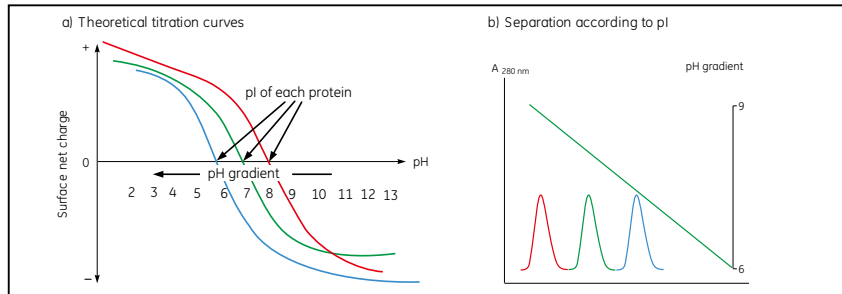


图76，通过色谱聚焦技术，根据蛋白等电点的不同而将它们分离。

为获得稳定的高分辨率，线性pH梯度的产生需要与分离过程所用整个pH范围相当的缓冲能力。因此需要特别设计的缓冲液（Polybuffer 74, Polybuffer 96 或Pharmalyte™ 8-10.5），且填料被替代为带电的缓冲胶（Mono P™, PBE 118 或 PBE 94）。

- 👉 尽管色谱聚焦为高分辨率分离技术，但他并不适用于在等电点或接近等电点时不可逆沉淀的蛋白，因为如果达到足够高的浓度，它们会沉淀于分离柱上。

分离机制：分离柱上pH梯度的产生及蛋白行为

为了根据蛋白等电点的不同而将它们分离，将色谱聚焦填料用pH值稍高于所需最高pH的起始缓冲液平衡。洗脱缓冲液（调整至所需最低pH值）穿过分离柱，并开始滴定填料上的胺和蛋白。随着缓冲液穿越分离柱，pH逐渐变低并移动，产生了逐步降低的pH梯度（图77）。

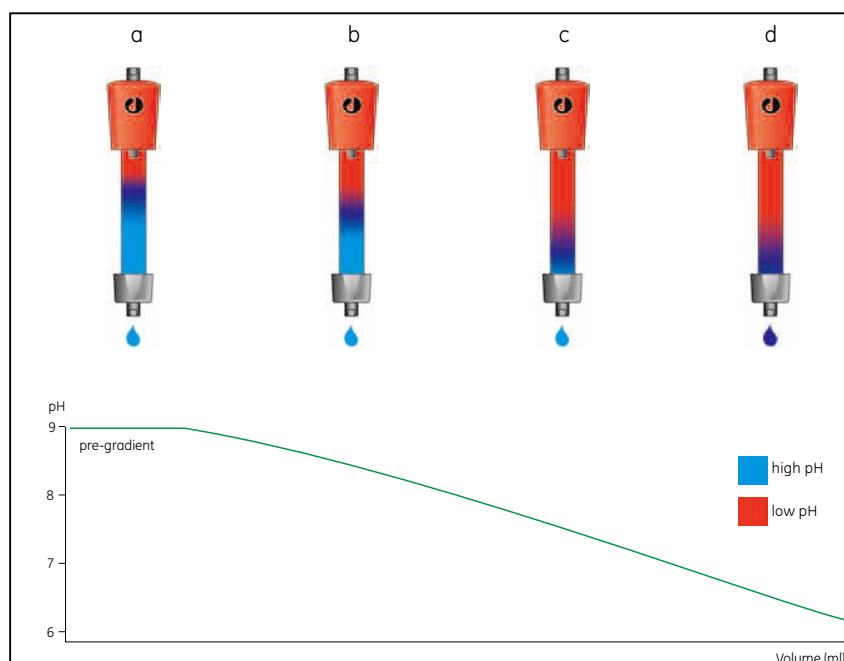


图77，色谱聚焦分离柱中pH梯度的产生。分离柱用高pH起始缓冲液预平衡（a），随后用低pH的Polybuffer洗脱（b,c,d）并产生逐渐降低的线性pH梯度。

梯度的洗脱缓冲液穿过分离柱后，样品在起始缓冲液中被加载至分离柱。样品中的蛋白一进入分离柱便被滴定（pH调整）。样品中pH高于它们等电点的蛋白会带有负电荷，保留在分离柱的顶部（同正电荷胺基团相结合）。而pH低于等电点的任何蛋白都会沿着分离柱向下移动且不会结合，知道他们到达pH高于它们等电点的位置。这就是分离过程的开始，如图78所示。

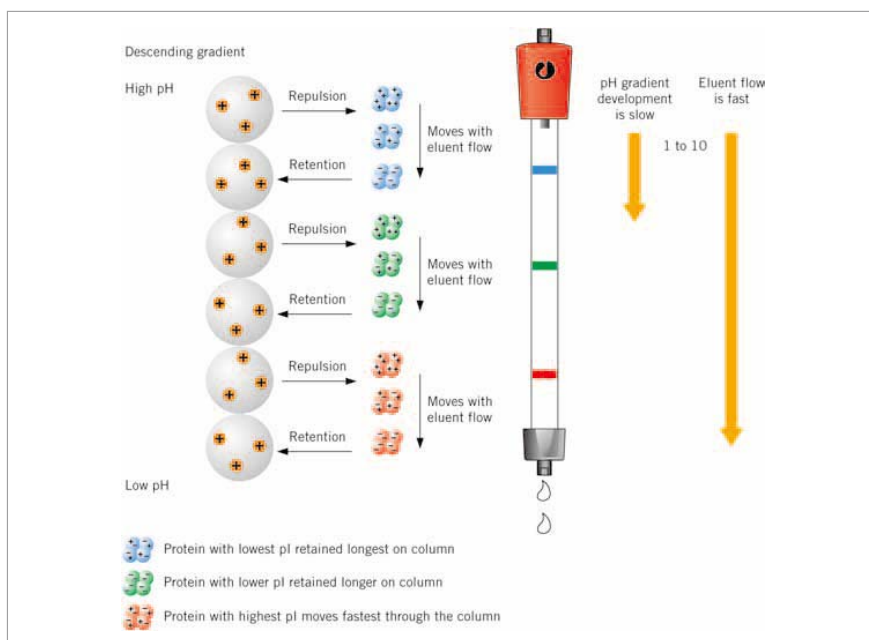


图78，等电点不同的蛋白在穿过分离柱后被分离开来。在分离中，带有相同等电点的分子被集中于一条窄带上。

随着分离柱顶端pH的持续下降，任何蛋白在环境pH低于等电点时会带有正电荷而被正电性的胺基团所排斥，从而开始随着缓冲液向分离柱下方移动，且穿行速度快于pH梯度移动的速度。然而，随着蛋白在分离柱中向下迁移，环境pH逐渐增加。当蛋白到达pH高于其等电点的区域时，蛋白重新带有负电荷并同分离柱再次结合。蛋白会保持结合状态直到pH梯度将周围pH降低至蛋白等电点之下，蛋白重新带正电而开始向下迁移，以于梯度同步。该过程会持续进行知道蛋白在等电点附近的某个pH（蛋白几乎不带净电荷）被从分离柱中洗脱下来。

图78展示了分离过程中的聚集效应，它对于色谱聚焦中高分辨率的获得十分重要。在一个逐渐下降的pH梯度中，蛋白可能有三种带点状态：正点，负电或中性；蛋白会随着pH梯度的改变以及所处的分离柱的不同pH区域而不断的改变其带点状态。该区域后端的蛋白迁移速率要高于前部的，并逐渐形成较窄的蛋白区带，每个区带由一种或多种具有相同等电点的蛋白组成。

因此，在色谱聚焦过程中，随着pH梯度的改变，具有不同等电点的蛋白会以不同的速率向分离柱下方迁移，持续性的结合解离并集中于较窄的区带内，最终洗脱下来。等电点最高的蛋白首先被洗脱下来，而等电点最低的蛋白则最后被洗脱下来。

填料选择

- 使用预装的Mono P填料进行快速分离纯化（比PBE快十倍）。
- 使用Mono P 5/200 GL进行最高分辨率的分离纯化。
- 使用Mono P 5/50 GL进行快速洗脱条件（pH梯度）筛选，或用于不需要最高分辨率的分离纯化。
- PBE 94用作Mono P的规模放大用。注意，在相同的分离纯化条件下，由于更大颗粒内更长的扩散时间，纯化的分辨率会低些。重新对梯度及流速进行优化会获得相似的分辨率。
- 当需要pH9以上的pH梯度时，选用PBE118。

Mono P基于与Mono Q和Mono S相同的填料（见第三章）。10 μ m的MonoBeads颗粒由叔铵及季铵基团取代，颗粒的小尺寸对于获得的高分辨率至关重要。

Polybuffer 交换剂PBE118和PBE 94基于交联琼脂糖填料Sephacrose CL-6B而成。带电的仲铵，叔铵，季铵基团通过醚键与90 μ m的Sephacrose CL-6B上的单糖交联。所有色谱聚焦填料所选用的带电基团都能在广泛的pH范围内具有相同的缓冲能力。PBE118, PBE94及Mono P的缓冲能力及滴定曲线见图79及80。

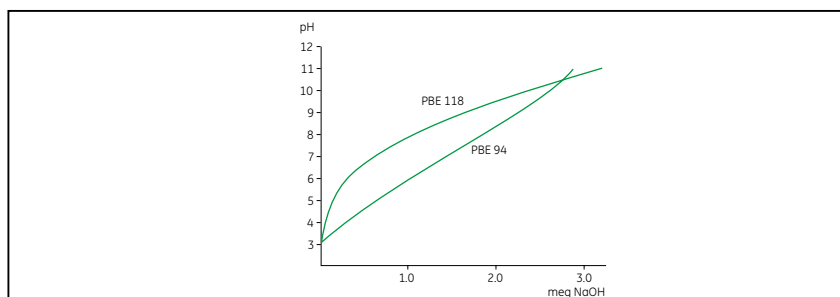


图79, 10ml PBE118及PBE94在1M KCl中对NaOH的滴定曲线，展示了在广泛的pH范围内，这些填料具有平滑的缓冲能力。

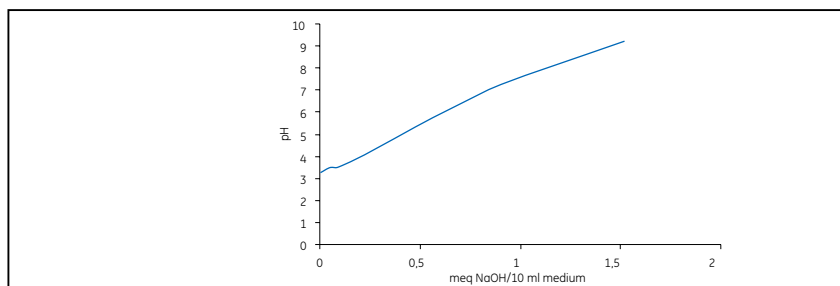


图80, Mono P 分离柱的滴定曲线表明具有平滑的缓冲能力。

缓冲液选择

- 对于7到4间的任何pH梯度，使用Polybuffer 74。对于等电点未知的蛋白，开始分离时选用7-4的pH梯度。
- 对于开始时高于7的pH梯度，选用Polybuffer 96，如当目的蛋白的等电点高于或接近于7时。
- 当需要更高的pH值时，选用Pharmalyte pH 8-10.5。
- 更多详细信息，参见“pH梯度及缓冲液的选择”一节。

Polybuffer为特别设计的缓冲液，通过滴定PBE118, PBE94及Mono P填料上的带电基团而形成pH梯度。Polybuffer由所选用的具有不同等电点和pKa的两性缓冲物质混合而成。每种混合物具有广泛pH范围内的平稳缓冲能力，从而可产生所需的线性pH梯度。Polybuffer 96及Polybuffer 74的滴定曲线如图81所示。

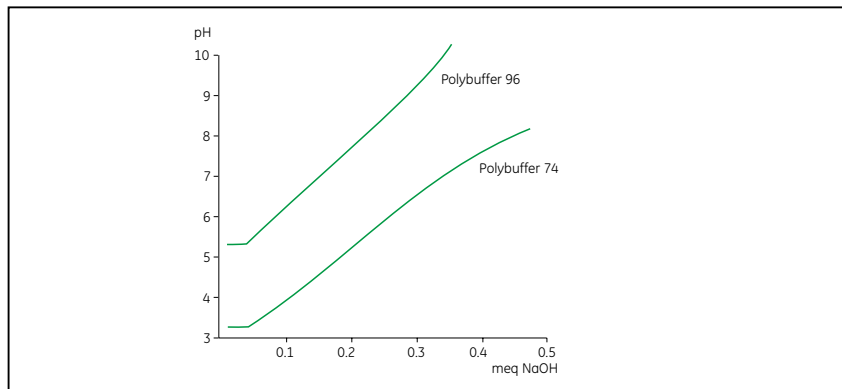


图81，用0.1M NaOH对2ml的Polybuffer进行滴定的滴定曲线。

纯化选项

产品, 柱床体积	每分离柱的结合能力	推荐工作流速*	最大流速*	工作pH区间**	最大运行背景压力*** (MPa/psi) 1 MPa=10 bar
Mono P 5/50 GL	10 mg/column	0.5–1.5 ml/min (305–450 cm/h)	3.0 ml/min	4–9	4/580
Mono P 5/200 GL	40 mg/column	0.5–1.5 ml/min (305–450 cm/h)	2.0 ml/min	4–9	4/580
PBE 118	1–20 mg/ml medium	30–40 cm/h	115 cm/h	8–11	0.015/2
PBE 94	1–20 mg/ml medium	30–40 cm/h	115 cm/h	4–9	0.015/2

* 线性流速 (cm/hour) 与体积流速 (ml/min) 之间的互相转换参见附录5。

** 工作pH是指填料结合蛋白的pH间隔或洗脱所需要的pH, 而不是产生不利的长期效应的pH值。

*** 最大工作背景压力是指高于此压力时, 填料会被压缩。

缓冲液选项

缓冲液	pH范围	兼容的填料
Polybuffer 74	7–4	PBE 94 Mono P
Polybuffer 96	9–6	PBE 94 Mono P
Pharmalyte pH 8–10.5	11–8	PBE 118

纯化举例

高分辨率

对于性质相似蛋白的潜在高分辨率分离能力使得色谱聚焦成为研究蛋白不同异形体的出色技术。例如, 血红蛋白可被分为四种不同的亚型, 每种都具有不同的等电点 (图82)。亚型A和F的等电点相差进0.05个pH单位, 但峰仍然能够分开。线性pH梯度的聚焦效应同样品峰完美的峰形 (可通过使用小颗粒, 均一的颗粒, 良好填充的分离柱获得) 相结合, 可以获得很高分辨率的分离纯化。

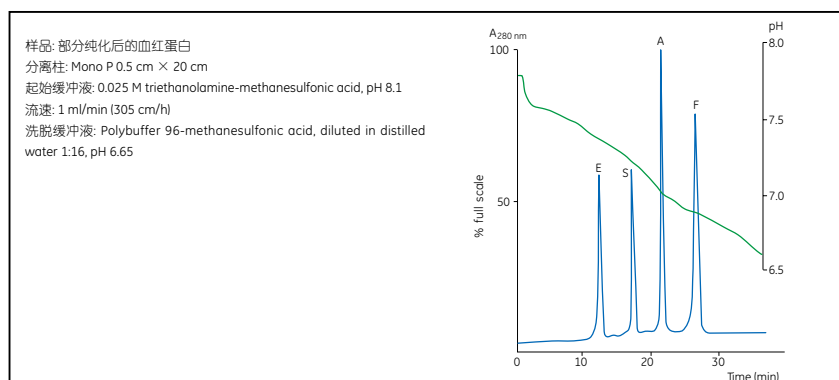


图82, 色谱聚焦分离血红蛋白的不同形式。

在理想条件下使用填充的非常好的分离柱，Polybuffer 交换可获得几乎同Mono P一样高分辨率的纯化效果。图83的例子中，等电点相差仅0.02pH单位 模式蛋白可在Polybuffer交换剂中得到很好的分离。

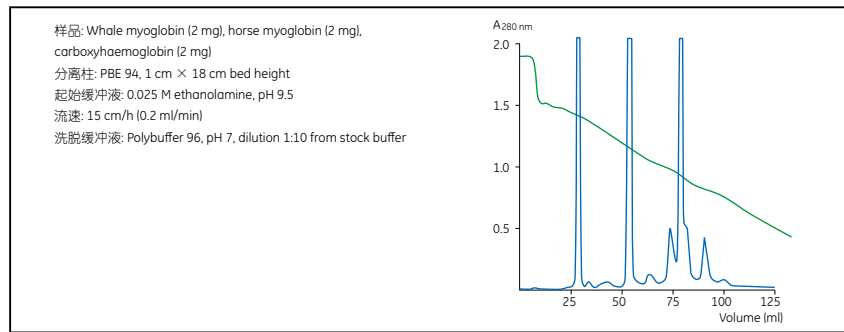


图83，标准蛋白混合物的色谱聚焦分离。

高选择性

图84展示了色谱聚焦的高度选择性，可检测单独蛋白的细微变化。在这类应用中，研究者可以追踪神经氨酸酶对铁转运蛋白的去唾液酸化。

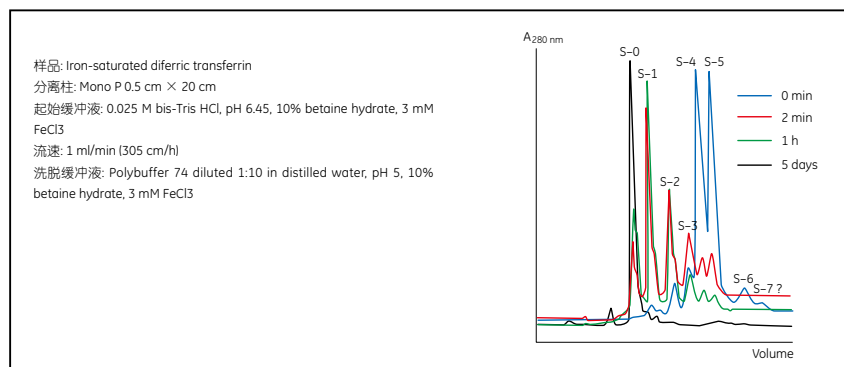


图84，对铁转运蛋白去唾液酸化的追踪。

精细纯化步骤

图85展示了用色谱聚焦作为纯化策略的精细纯化步骤的离子（在精细纯化步骤中，绝大多数的杂质都已被除去，纯化的目的是通过去除任何痕量杂质或十分相近的物质来获得最终的纯度）。在本例中，需要高纯度的leukotriene A4 水解酶以做功能及结构研究。该酶带有His 标签在大肠杆菌中表达。在收获细胞并去除核算后，使用镍柱亲和层析作为特定的蛋白获取步骤，洗脱组份在Mono P上进行精细纯化。

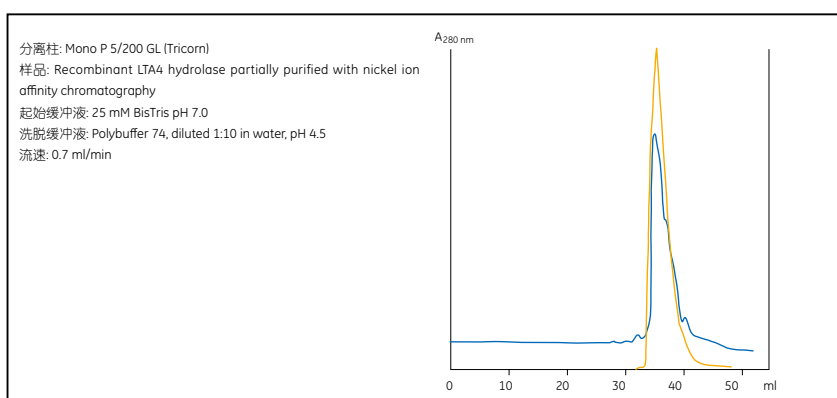


图85, leukotriene A4 hydrolase的纯化。结果由Eva Ohlson, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden授权。

填充分离柱

预装柱通常会获得最高分辨率以及最具有重复性的结果，特别是使用MonoBead填料的Mono P 5/50 GL及 Mono P 5/200分离柱。




色谱聚焦分离柱的有效填充对于获得最好的结果至关重要。当填充PBE94及PBE118分离柱时，请根据附录3中的说明小心进行。

- 用分离中将要用到的起始缓冲液（见表10, 11, 12, 13）将填料填充至长而细的分离柱中，如Tricorn 10/300。所需填料量依赖于样品的数量，样品性质，杂质及所需的分辨率。对于大多数的分离而言，20-30ml的Polybuffer交换剂就足以分离1-200mg 蛋白/pH单位梯度。
- 将起始缓冲液及填料悬液除气以避免气泡的产生而干扰分离过程。
- 根据附录3中的描述检查柱效。推荐使用有色marker进行检测。使用牛细胞色素c，由于具有很高的等电点（10.5）而会被填料强烈的排斥。蛋白带穿越分离柱的进程可清楚的观察到，以检测由不好的填充或气泡造成的任何扰动。

pH梯度及缓冲液的选择

色谱聚焦不需要任何梯度制备设备，因为梯度通过分离柱中缓冲液与填料的相互作用而成。梯度的最高限度有起始缓冲液的pH定义，而下不限度则由洗脱缓冲液定义。Polybuffers在三个或更少的pH单位内分离效果最好，且最窄的pH间隔将获得最高的分辨率。

梯度体积由洗脱缓冲液的强度决定（低缓冲液浓度会获得逐步的pH改变，以及峰之间良好的分离效果）。最佳的梯度体积需要试验来确定。推荐的梯度体积及缓冲液如表10，11，12和13所示。前梯度体积是指pH开始下降前通过分离柱的洗脱缓冲液体积，因此所需的缓冲液总体积总是大于梯度体积。

-  起始缓冲液：避免使用多价缓冲液。使用单价或两性缓冲液，净电荷 >0 且 $\leq +1$ ，离子强度为25mM。将起始缓冲液的pH设定在高于所需pH以上 0.4个pH单位处，以补偿在运行之初pH的波动。这些波动由起始缓冲液与洗脱缓冲液之间电导的微小差异造成。
-  避免使用离子强度在25mM以下的缓冲液，因为它们需要更大的梯度体积，更长的洗脱时间，并且会得到更宽且较低浓缩程度的蛋白峰。浓度更大的缓冲液会获得更陡的梯度，但会使分辨率受损，因为样品峰会意更近的位置被洗脱下来。
-  当使用Mono P时，不推荐使用终止于pH9的梯度，因为该机制在pH9至上缓冲能力较低。

已知等电点的蛋白使用的梯度

选定pH间隔使得目的蛋白在pH梯度运行了30-50%后被洗脱下来。窄的pH间隔会获得最佳分辨率。

未知等电点的蛋白使用的梯度

由于绝大多数蛋白的等电点范围为7-4，因此开始时在PBE94或Mono P上使用的pH间隔为7-4。等电点在7至上的蛋白会穿透分离柱，如有必要可将它们收集起来并重新在更高的pH运行。一旦确定了合适的pH范围后，选定最合适的pH梯度及相兼容的填料以获得最佳分辨率。


-  在转移至Mono P 5/200 GL分离柱以获得最高分辨率前，可通过使用较短的Mono P 5/50 GL分离柱进行合适pH梯度的测试以节约时间。如果最高分辨率的分离不是很重要，在Mono P 5/50 GL上的常规分离即可满足需要。

表10, 使用Mono P 5/50 GL或 Mono P 5/200 GL分离柱时, 推荐的宽pH间隔的缓冲液系统。

pH	起始缓冲液	洗脱缓冲液 (100 ml)	最大体积ml			
			Mono P 5/200 GL		Mono P 5/50 GL	
			总体积	前梯度 体积	总体积	前梯度 体积
9-7	0.025 M diethanolamine, pH 9.5, HCl	1.0 ml Pharmalyte 8-10.5, 5.2 ml Polybuffer 96, pH 7.0, HCl	34	7	11	2
9-6	0.025 M diethanolamine, pH 9.5, HCl	10 ml Polybuffer 96, pH 6.0, HCl	34	9	19	2
9-6	0.075 M Tris, pH 9.3, CH ₃ COOH	10 ml Polybuffer 96, pH 6.0, CH ₃ COOH	30	3	17	2
8-6	0.025 M triethanolamine, pH 8.3, CH ₃ COOH	0.21 ml Pharmalyte 8-10.5, 9.0 ml Polybuffer 96, pH 6.0, CH ₃ COOH	37	7	15	4
8-5	0.025 M triethanolamine, pH 8.3, iminodiacetic acid*	3.0 ml Polybuffer 96, 7.0 ml Polybuffer 74, pH 5.0, iminodiacetic acid*	47	6	15	3
7-5	0.025 M bis-Tris, pH 7.1, HCl	10 ml Polybuffer 74, pH 5.0, HCl	26	3	13	3
7-4	0.025 M bis-Tris, pH 7.1, iminodiacetic acid*	10 ml Polybuffer 74, pH 4.0, iminodiacetic acid*	46	3	19	3
6-4	0.025 M bis-Tris, pH 6.3, HCl	10 ml Polybuffer 74, pH 4.0, HCl	39	3	16	3

*使用亚氨基二乙酸的饱和溶液来调整缓冲液的pH。

表11, 使用Mono P 5/50 GL或 Mono P 5/200 GL分离柱时, 推荐的窄pH间隔的缓冲液系统。

pH	起始缓冲液	洗脱缓冲液 (100 ml)	最大体积ml			
			Mono P 5/200 GL		Mono P 5/50 GL	
			总体积	前梯度 体积	总体积	前梯度 体积
9-8	0.025 M diethanolamine, pH 9.4, HCl	1.0 ml Pharmalyte 8-10.5, 5.2 ml Polybuffer 96, pH 8.0, HCl	28	3	10	3
8.5-7.5	0.025 M Tris, pH 8.8, CH ₃ COOH	0.11 ml Pharmalyte 8-10.5, 9.5 ml Polybuffer 96, pH 7.5, CH ₃ COOH	29	4	10	4
8-7	0.025 M triethanolamine, pH 8.3, HCl	10 ml Polybuffer 96, pH 7.0, HCl	29	5	10	4
7.5-6.5	0.025 M methylimidazole, pH 7.6, CH ₃ COOH	10 ml Polybuffer 96, pH 6.5, CH ₃ COOH	27	9	11	6
7-6	0.025 M bis-Tris, pH 7.0, CH ₃ COOH	9.5 ml Polybuffer 96, 0.5 ml Polybuffer 74, pH 6.0, CH ₃ COOH	28	10	12	5
6.5-5.5	0.025 M bis-Tris, pH 6.7, CH ₃ COOH	4.0 ml Polybuffer 96, 6.0 ml Polybuffer 74, pH 5.5, CH ₃ COOH	23	5	9	3
6-5	0.025 M bis-Tris, pH 6.4, HCl	10 ml Polybuffer 74, pH 5.0, HCl	25	3	10	3
5.5-4.5	0.025 M piperazine, pH 6.3, HCl or iminodiacetic acid*	10 ml Polybuffer 74, pH 4.5, HCl or iminodiacetic acid*	24	3	10	3
5-4	0.025 M N-methylpiperazine, pH 5.7, HCl or iminodiacetic acid*	10 ml Polybuffer 74, pH 4.0, HCl or iminodiacetic acid*	27	7	11	3

*使用亚氨基二乙酸的饱和溶液来调整缓冲液的pH。

表12, PBE118 推荐使用的梯度缓冲液系统。

pH*	起始缓冲液	洗脱缓冲液	稀释倍数	最大体积 (柱体积数)	
				总体积	前梯度体积
10.5-9	0.025 M triethylamine, pH 11, HCl	Pharmalyte 8-10.5, pH 9	1:45	-	-
10.5-8	0.025 M triethylamine, pH 11, HCl	Pharmalyte 8-10.5, pH 8, HCl	1:45	13	1.5
10.5-7	0.025 M triethylamine, pH 11, HCl	Pharmalyte 8-10.5, pH 7, HCl	1:45	13.5	2


表13, PBE94 推荐使用的梯度缓冲液系统。

pH	起始缓冲液	洗脱缓冲液	稀释倍数	最大体积 (柱体积数)	
				总体积	前梯度体积
9-8	0.025 M ethanolamine, pH 9.4, HCl	Pharmalyte 8-10.5, pH 8.0, HCl	1:45	12	1.5
9-7	0.025 M ethanolamine, pH 9.4, HCl	Polybuffer 96, pH 7.0, HCl	1:10	14	2
9-6	0.025 M ethanolamine, pH 9.4, CH ₃ COOH	Polybuffer 96, pH 6.0, CH ₃ COOH	1:10	12	1.5
8-7	0.025 M Tris, pH 8.3, HCl	Polybuffer 96, pH 7.0, HCl	1:13	10.5	1.5
8-6	0.025 M Tris, pH 8.3, CH ₃ COOH	Polybuffer 96, pH 6.0, CH ₃ COOH	1:13	12	3
8-5	0.025 M Tris, pH 8.3, CH ₃ COOH	Polybuffer 74 (70%) + Polybuffer 96 (30%) pH 5.0, CH ₃ COOH	1:10	10.5	2
7-6	0.025 M imidazole, pH 7.4, CH ₃ COOH	Polybuffer 96, pH 6.0, CH ₃ COOH	1:13	10	3
7-5	0.025 M imidazole, pH 7.4, HCl	Polybuffer 74 pH 5.0, HCl	1:8	14	2.5
7-4	0.025 M imidazole, pH 7.4, HCl	Polybuffer 74, pH 4.0, HCl	1:8	14	2.5
6-5	0.025 M histidine, pH 6.2, HCl	Polybuffer 74, pH 5.0, HCl	1:10	10	2
6-4	0.025 M histidine, pH 6.2, HCl	Polybuffer 74, pH 4.0, HCl	1:8	9	2
5-4	0.025 M piperazine, pH 5.5, HCl	Polybuffer 74, pH 4.0, HCl	1:10	12	3

抗衡离子的选择


如在缓冲液表中所示，最常用的抗衡离子为氯离子。其他单价抗衡离子也可使用，但关键是它们的pKa要至少比选定梯度的最低点低2个pH单位。


不推荐使用醋酸盐最为Polybuffer 74的抗衡离子，因为它具有较高的pKa值。净电荷在-1以下的多价抗衡离子也不推荐使用。注意，亚氨基二乙酸为多价离子。


 重碳酸盐离子可来自于大气中的二氧化碳，或者储存不当的缓冲液。所有的高pH，含有胺的缓冲液都会吸收大气中的二氧化碳而产生重碳酸盐，他们会根据条件的不同，在pH 5.5-6.5的区域引起波动或高平台，从而干扰pH梯度的形成。


这些效应更显著的见于pH梯度结束于6的Polybuffer 96中；可通过使用醋酸盐作为抗衡离子或将下限设定为6.5而使其最小化。可通过将缓冲液在密封的瓶中充氮气，3-8摄氏度保存于黑暗处来将二氧化碳的吸收减至最低。

缓冲液准备


 使用高质量的水和化学试剂。在真空下讲话采用通过0.45 μm或0.22 μm的膜进行过滤，以保证溶液被彻底除气。分离柱中气泡的存在会显著的干扰分辨率。

 确保所有的缓冲液组分都被正确的储存以避免二氧化碳的吸收，特别是含有胺的物质。如有可能，使用从未开口的新鲜Polybuffer。将以前开口过的缓冲液在密封的瓶中充氮气，4摄氏度保存于黑暗处来将二氧化碳的吸收减至最低。

 小心的在相同温度下准备和使用所有的缓冲液，以保证正确的pH和离子强度。如有可能，使用新鲜的缓冲液。储存于冰箱中的缓冲液在进行分离运行前，必须达到所需要准备的温度。


 当工作于低离子强度，微环境的改变可至1个pH单位时，起始缓冲液的浓度特别重要。当缓冲液用酸过滴定时，如果重新调整pH，则离子强度也会相应改变。确保起始缓冲液及洗脱缓冲液在相同的低离子强度下，以避免pH梯度的起始或末尾时大的pH改变。


1. 根据所需的pH梯度及将要使用的填料，从表10，11，12，13中选择起始缓冲液及洗脱缓冲液。
2. 根据所使用的柱体积计算所需的缓冲液体积。对于洗脱缓冲液，将Polybuffer或Pharmalyte用蒸馏水稀释至最终所需体积的大约95%。
3. 用所列的酸将缓冲液滴定至正确的pH（如1-2M饱和的亚氨基二乙酸）。在添加几毫升水到达最终体积前，始终在最大体积上进行滴定。
4. 当pH调整至最终值后，加入蒸馏水使总体积达到100ml。

 如需在相同的pH间隔内获得更平缓的梯度，正常准备洗脱缓冲液但将它们稀释至更大的体积。注意当使用稀释后的洗脱缓冲液时，蛋白需要用增大的体积来洗脱，因此前梯度及总体积都需相应的增大。

样品准备

正确的样品准备极为重要。在将样品加载至分离柱上前进行简单的样品净化，可以避免分离柱的堵塞，减少剧烈条件冲洗分离柱的操作，并能延长填充分离柱的使用寿命。附录1为样品处理技术概述。


 样品必须洁净且没有颗粒状物质，特别是使用Mono P填料时。对小体积样品，可使用注射器通过醋酸纤维素膜或PVDF膜进行样品过滤。

 如果样品的pH太低，或使用不同的缓冲液，有可能会影响到梯度及分辨率。根据样品体积的不同，使用HiTrap 脱盐柱或HiPrep 26/10脱盐柱以除去高浓度的盐离子，并将样品转至起始缓冲液中，见第156页。如果样品的缓冲液浓度很低，则样品的pH不是很重要。如果pH及最终体积不是很重要，可以简单的稀释一下样品。

色谱聚焦为结合性技术，因此样品的体积并不重要，只要在目的蛋白被洗脱下来之前所有样品能够加载并聚焦于分离柱上。通常的规则为，不要使样品加载量大于总分离柱体积的一半。

运行分离过程

推荐流速: 0.5–1.5 ml/min, 305–450 cm/h (Mono P 5/50 GL, Mono P 5/200 GL), 30–40 cm/h (PBE 118, PBE 94).
起始缓冲液及洗脱缓冲液: 见表10, 11, 12及13。

 由于Polybuffer吸收波长在280nm之下，因此用280nm检测洗脱液。整个过程都需检测pH，因为pH的波动或许会影响分离效果，如由于缓冲液中二氧化碳的存在。


第一次使用分离柱或长期储存后使用:


1. 注入0.5柱体积的5M NaOH。
2. 用起始缓冲液平衡分离柱直到离开分离柱的缓冲液pH同起始缓冲液相同。
3. 加入0.5柱体积的2M 盐溶液，包含有同pH滴定缓冲液中相同的阴离子。
4. 用起始缓冲液再平衡分离柱直到离开分离柱的缓冲液pH同起始缓冲液相同。

为了检测由于不正确的缓冲液条件或污染物造成的pH波动，可以考虑使用洗脱缓冲液空运行一次（总体积如表10, 11, 12或13所示）。

使用分离柱进行重复性运行：

1. 用起始缓冲液平衡分离柱直到离开分离柱的缓冲液pH同起始缓冲液相同。推荐的前梯度体积见表10, 11, 12或13。
2. 将样品pH调整至起始缓冲液pH值, 或使用如HiTrap脱盐柱将缓冲液更换为起始缓冲液, 见低156页。
3. 加入洗脱缓冲液。注意, 在pH梯度开始洗脱前, 会存在一个前梯度体积(典型的前梯度体积见表10, 11, 12或13)。
4. 假如样品。
5. 根据表10, 11, 12或13中的指示用梯度体积加入洗脱缓冲液。在洗脱过程中, 检测pH的波动或其他扰动。
6. 用2个柱体积的2M NaCl冲洗以洗脱任何结合在分离柱上的物质。
7. 用五个柱体积的起始缓冲液再平衡分离柱, 直到紫外吸收或pH/电导值稳定。

 为保持分离柱的洁净, 每十个运行过程后注入0.5个柱体积的1M NaOH(如有需要, 可更频繁些)。注入NaOH后可加入0.5柱体积的75% 乙酸。

 如果分离的组分将要使用反相色谱层析进行分析, 则Polybuffer或许会在运行过程中同配对离子相互作用。如果配对离子为非疏水性, 则Polybuffer会在无效体积处洗脱下来, 而滞留的蛋白则会通过有机溶剂梯度洗脱下来。然而如果配对离子非常疏水, 则Polybuffer会滞留于分离柱上, 且在洗脱过程中会现出280nm下波长的吸收峰。

如果必须使用有机溶剂, 注意以下几点:

- 运行分离前, 检查样品及所有缓冲液的溶解性。
- pH间隔或许会被改变, 因为缓冲液, Polybuffer及色谱聚焦填料中的带电基团的pKa值会增加。
- 空运行梯度一次以确保系统能够维持线性pH梯度。pH梯度的线性在9-4的高低两端会变化很大。将起始缓冲液pH调整至所需缓冲范围的最高值, 将洗脱缓冲液的pH调整至高出缓冲液列表10, 11, 12或13中推荐缓冲液大约0.5个pH单位。

优化

- 如果结果表明分离过程中或许存在样品溶解性的问题（见问题及解决方案），在起始缓冲液及洗脱缓冲液中加入添加剂，如甜菜碱 (10% w/v), 牛磺酸 (4% w/v) 或甘油 (1-2%) 以增加溶解性。添加剂应该不影响分离效果，但需要在后续步骤中出去，因而在纯化策略中增加了额外的一步骤。
- 改善分辨率：
 - 稀释Polybuffer（可达1: 20），但注意这样做会增加前梯度体积及总梯度体积，因此组份洗脱的时间会改变，并且洗脱峰的体积会增加。
 - 减少样品加载量。
 - 降低流速（在MonoP分离柱上，最低可成功的使用0.25ml/min的流速。）
- 为增加选择性，可使用平缓的梯度（增加梯度体积），但注意这样会导致更宽的样品峰，因为在分离柱上每个pH间隔会占据更大的空间。然而，每个pH间隔内的分辨率会增加。
- 为改变选择性，可使用不同的缓冲液，盐或抗衡离子。

如果分辨率达到要求，可通过增加流速来提高分离速度。在Mono P分离柱上可成功的使用高达1.5ml/min的流速而不损失分辨率。图86展示了利用PBE118分离测试蛋白混合物时增加流速对分离效果的影响。

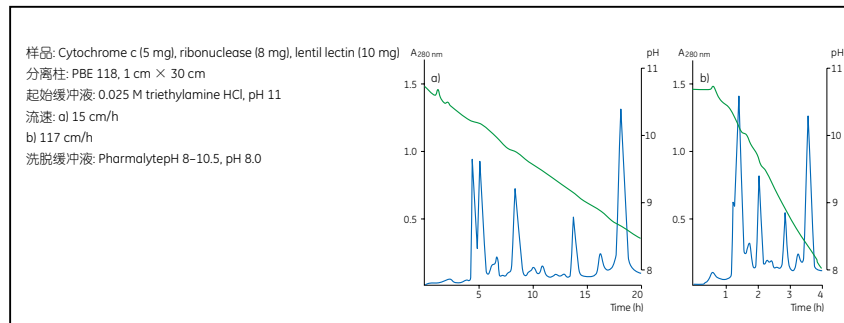




图86，色谱聚焦中流速对分辨率的影响。

问题及解决方案

 色谱聚焦常见的困难是一些蛋白在达到高浓度或接近等电点时沉淀。柱上沉淀会导致一些症状，如背景压力的增加，样品的明显损失甚至分离柱的堵塞。

 为避免沉淀，可减少样品加载量使蛋白不足以到达高浓度，可以加入添加剂如甜菜碱以改善样品的溶解性，或改变分离的pH范围以避免蛋白沉淀。还可在色谱聚焦前通过其他色谱层析技术来将引起问题的蛋白除去。

 如果目的蛋白可逆性的沉淀，则其洗脱时间比预想会晚些。如果目的蛋白在等电点不可逆沉淀，则等点聚焦不是合适的分离技术。

另一个可轻易影响结果的因素为pH梯度的线性度。二氧化碳的存在特别似乎在起始缓冲液中，会扰动pH梯度的形成从而干扰分离过程。因此在整个分离过程中对pH梯度的检测十分重要，以保证线性pH梯度的形成，获得满意的分离效果。图87展示了过量二氧化碳的存在对于pH梯度形成的显著影响。将缓冲液储存于氮气或氩气中（将高pH溶液中二氧化碳的吸收减至最低），并在使用前坚持脱气过程。

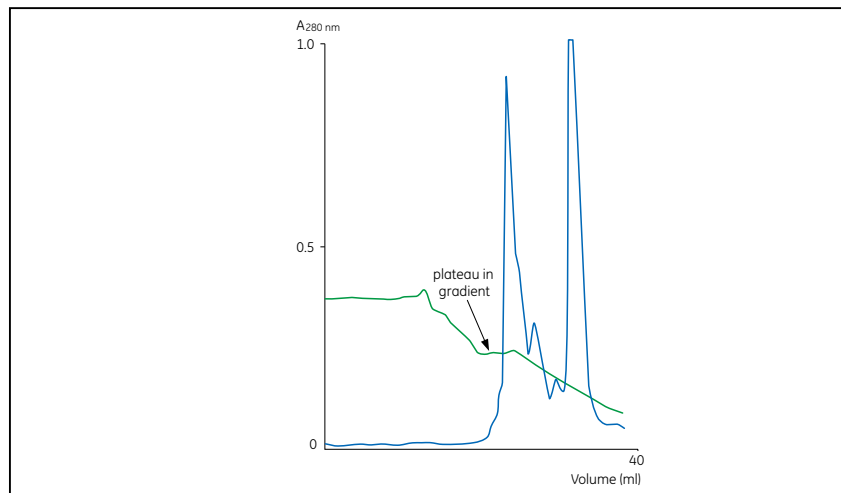


图87，起始缓冲液中过量的二氧化碳在色谱聚焦的pH梯度中形成的平台。

色谱聚焦中可能会遇见的困难及问题列于下述的问题及解决方案中。

表14, 问题及解决方案。

问题	原因	解决方案
液流减小或没有液流通过分离柱	输出口关闭, 或泵不工作。	打开输出口。检查泵是否有渗漏迹象 (使用蠕动泵时, 还需检查管路)
	滤膜, 管道末端, 转换器或管道堵塞。	去除杂质, 清除或更换。
	聚集的脂蛋白或蛋白发生沉淀	在样品准备过程中 (附录1) 去除脂蛋白及其他聚集物。执行附录10中的清洁操作。
	蛋白质在等电点沉淀	执行附录10中的清洁操作。向缓冲液中添加甜菜碱 (10% w/v), 牛磺酸 (4% w/v) or 甘油 (1-2%)。改变pH范围以避免沉淀产生。如果蛋白污染物沉淀, 则在色谱聚焦前使用别的技术除去该污染分子。
	分离柱中微生物的生长	分离柱不用时储存于20%乙醇中以阻止微生物的生长。坚持过滤缓冲液。执行附录10中的清洁操作。
平衡中分离柱达不到起始pH		注入4体积的 2M NaOH, 或更高浓度的起始缓冲液。用起始缓冲液进行再平衡。
空运行梯度时达不到所需pH	不正确的洗脱液组成	检查洗脱液的pH, 制备新的洗脱液。
	洗脱液含有二氧化碳	将所有缓冲液除气, 使用新的Polybuffer, 重新运行。
样品峰分离效果很差	梯度波动, 洗脱液含有二氧化碳	将所有缓冲液除气, 使用新的Polybuffer, 重新运行。
	梯度波动, 不正确的抗衡离子。	使用推荐的抗衡离子。
	蛋白沉淀	分离过程中执行附录10推荐的清洁操作。减少样品的加载量。向缓冲液中加入甜菜碱 (10% w/v), 牛磺酸 (4% w/v) 或甘油 (1-2%)。改变pH范围以避免沉淀产生, 或在色谱聚焦分离前使用别的技术去除易产生沉淀的污染蛋白分子。
	非最佳洗脱条件	见低143页优化操作
	分离柱前后大的混合空间	减少所有分离柱外体积
	分离柱填充不好	检测柱效 (附录1)。如有必要, 重新填充, 或使用预装柱。
	脂蛋白或聚集的蛋白发生沉淀	在样品准备过程中去除脂蛋白及聚集物 (见附录3)。执行附录10推荐的清洁操作。
	分离柱中微生物的生长	分离柱不用时储存于20%乙醇中以阻止微生物的生长。坚持过滤缓冲液。执行附录10中的清洁操作。
蛋白不结合	分离柱未用起始缓冲液充分平衡	检查洗脱液的pH是否同起始缓冲液匹配。如有必要, 延长平衡过程。
	起始pH太低	增加起始缓冲液的pH
	洗脱液的离子强度太高	根据推荐的缓冲液组成成分检查洗脱液条件。
	样品的离子强度太高	使用脱盐柱, 如HiTrap脱盐柱去除样品中多余的盐离子 (见第156页)。也可在所需的pH及体积限度内对样品进行稀释。

问题	原因	解决方案
	分离柱被脂蛋白或蛋白所污染。	更换或清洗滤膜。执行附录10中的清洁操作。
蛋白未按预想的结合或洗脱	存贮过程中样品发生了改变	制备新鲜的样品
	样品或缓冲液的条件同前一次运行过程不同	检查样品及缓冲液的条件
	分离柱中微生物的生长	分离柱不用时储存于20%乙醇中以阻止微生物的生长。坚持过滤缓冲液。执行附录10中的清洁操作。
蛋白洗脱pH比预想的低	分离过程中样品发生了沉淀	向缓冲液中加入甜菜碱(10% w/v)、牛磺酸(4% w/v)或甘油(1-2%)。改变pH范围以避免沉淀产生。
目的蛋白同分离柱结合,但不能洗脱下来。	洗脱液成分不正确	运行后检查洗脱液的pH值
	分离中蛋白发生沉淀	执行附录10中的清洁操作。如果洗脱缓冲液的pH太高,使用低一些的pH范围。减少样品加载量。向缓冲液中加入甜菜碱(10% w/v)、牛磺酸(4% w/v)或甘油(1-2%)。
蛋白回收量正常,但活力回收率低	蛋白在缓冲液中不稳定或失活	确定蛋白质的pH及盐浓度稳定性
	酶同辅因子或其他分子分离	通过合并组分,并重复活力测试
蛋白产量比预想低	蛋白或许被蛋白酶所降解	向样品或缓冲液中加入蛋白酶抑制剂以阻止蛋白酶的降解作用。将样品通过如Benzamidine 4 Fast Flow (high sub)的填料以除去类似胰蛋白酶的丝氨酸蛋白酶
	样品准备中滤膜对蛋白吸收	使用另一种类型的滤膜
	样品发生沉淀	分离过程中执行附录10推荐的清洁操作。减少样品的加载量。向缓冲液中加入甜菜碱(10% w/v)、牛磺酸(4% w/v)或甘油(1-2%)。
	Polybuffer干扰洛瑞法蛋白定量试验	去除Polybuffer, 低148页或使用Bradford方法
蛋白回收量高于预计值	色谱层析步骤前后使用了不同的试验条件	所有的检测试验采用相同的实验条件
	Polybuffer干扰洛瑞法蛋白定量试验	去除Polybuffer, 低148页或使用Bradford方法。
	蛋白质同其他物质共同洗脱下来	优化条件以改善分辨率。运行前后,检测测试所用的缓冲液体积。
蛋白活力的回收量高于加载量	色谱层析步骤前后使用了不同的试验条件	所有的检测试验采用相同的实验条件
	分离过程中去除了活性抑制剂	

问题	原因	解决方案
运行过程中，或持续运行中背景压力增加。	蛋白在滤膜或分离柱顶部沉淀	分离过程中执行附录10推荐的清洁操作。减少样品的加载量。向缓冲液中加入甜菜碱(10% w/v), 牛磺酸(4% w/v) 或甘油 (1-2%)。改变pH范围以避免沉淀产生，或在色谱聚焦分离前使用别的技术去除易产生沉淀的污染蛋白分子。
	柱床压缩	如有可能，重新填充分离柱或使用新的分离柱。
	分离柱中微生物的生长	分离柱不用时储存于20%乙醇中以阻止微生物的生长。坚持过滤缓冲液。执行附录10中的清洁操作。
	样品浑浊	改善样品准备过程（附录1）。改善样品的溶解性：加入甜菜碱(250最大浓度为10% w/v), 牛磺酸(250最大浓度为4% w/v) 或甘油 (1-2%)。对于疏水样品，加入乙烯基乙二醇，尿素，去污剂或有机溶剂*。
分离柱中有空气	缓冲液脱气不适当。分离柱在低温下填充或储存，随后环境温度升高。	如果缓冲液在冰箱或冷室中储存后使用，则应更加小心。不要使分离柱因阳光或加热系统而变热。缓冲液充分脱气。用蒸馏水冲洗分离柱，并用20%乙醇冲洗。
柱床有裂纹	分离柱严重漏气	检查所有连接处，找到漏气点所在。如有可能，重新填充分离柱（见附录3）。
预料之外的峰，或色谱曲线的尖峰。缓冲液不纯		使用前分离柱净化缓冲液。使用高质量的试剂
	气泡滞留于紫外检测器的液池中	使用脱气后的缓冲液
样品峰出现于空的梯度中	前一样品的不完全洗脱	根据推荐方法冲洗分离柱
扭曲的样品峰	分离柱中温度分布不均衡	消除任何热源，如透过窗户的阳光。

*极性有机溶剂，如甲醇，乙醇和乙腈可使用0-20%的浓度，但有可能引起蛋白丧失其生物活性。有机溶剂的存在还有可能影响线性pH梯度的低端。

去除Polybuffer

大多数实际应用中，没有必要去除Polybuffer，因为任何样品洗脱后的Polybuffer含量都很低。Polybuffer不影响酶活测定或氨基酸分析，但会干扰特定的蛋白试验，如洛瑞法测蛋白含量。

在合适的组分分离范围 i_{enei} ，Polybuffer可通过使用凝胶排阻层析填料从蛋白样品中去除。图88展示了使用Sephacryl™ S-100 HR 或 Superdex 75将Polybuffer和蛋白进行分离的效果。在本例中，通过Sephacryl™ S-100可使肌球蛋白和Polybuffer最好的分离。推荐在任何分离过程中，检测Polybuffer的吸收（A_{215nm}）的同时也检测洗脱蛋白的紫外吸收（A_{280 nm}, A_{254 nm} 或A_{215 nm}）以优化运行条件，并保证有效的分离。有关凝胶排阻色谱层析的应用及理论信息，参见Amersham Biosciences的“凝胶排阻层析——原理与方法”手册。

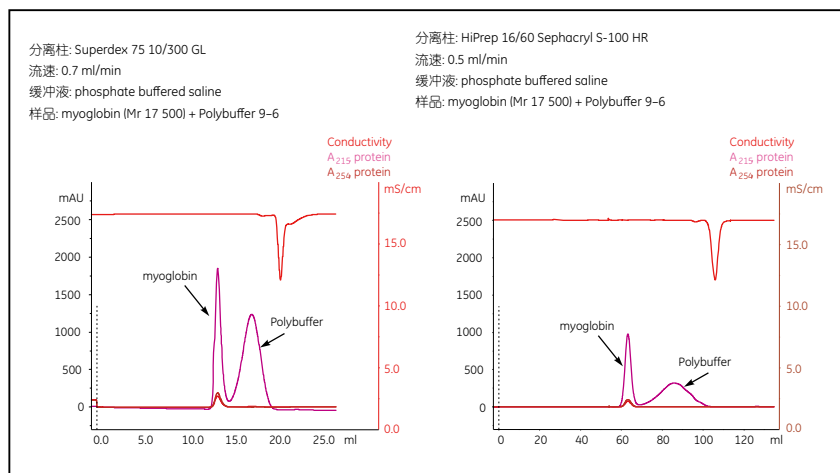


图88，通过凝胶排阻层析将Polybuffer与蛋白质分离。

清洗

Mono P 5/50 GL, Mono P 5/200 GL, PBE 94, PBE 118

由于某些特定蛋白在等电点或接近等电点时会发生沉淀，因此色谱聚焦分离柱顶部滤器的堵塞是背景压力增大的最常见原因。使用逆向液流，用洗脱缓冲液冲洗两个柱体积，流速为0.5 ml/min (Mono P) 或30 cm/h (PBE)。返回正常液流方向，用洗脱缓冲液冲洗五个柱体积。

如需除去严重的污染物（通常特征为分离柱背景压力的增加），流程如下：

逆向液流，以0.25–0.50 ml/min的流速运行如下溶液：

1. 用1M NaCl冲洗4个柱体积。
2. 用蒸馏水润洗2个柱体积。
3. 用1M NaOH冲洗4个柱体积。
4. 用蒸馏水润洗2个柱体积。
5. 用 0.1M HCl (PBE) 或1M HCl (Mono P) 冲洗0.5个柱体积，然后用蒸馏水冲洗两个柱体积直到洗脱曲线走平。
6. 用1M NaCl冲洗4个柱体积。
7. 逆向液流用起始缓冲液再平衡分离柱。

如果背景压力还高，更换顶部滤器。

可通过检测任何清洗过程以查看污染物的洗脱来节约时间。根据污染物分子的性质，也可使用如下清洗溶剂：100%异丙醇，20%乙腈，2M NaOH，75%的乙酸，20%的乙醇，100%的甲醇或高至6M 盐酸胍，离子或非离子型去污剂。使用以上任何清洗溶剂后，坚持使用至少两个柱体积的蒸馏水润洗。当使用有机溶剂时，采用锯齿形梯度冲洗分离柱，如在5个柱体积内浓度从0至100%，再在5个柱体积内浓度从100%至0，在水及有机溶剂中加入1%的三氟乙酸。

如果柱效仍未恢复，注入溶于0.1M乙酸，0.5M NaCl的1mg/ml的胃蛋白酶中，室温过夜或37°C作用一小时。根据污染分子的不同，还可使用其他酶，如DNase。使用任何酶处理后，重复前述的去除严重污染物的步骤。

填料特性

产品	功能团	pH稳定性*	平均颗粒尺寸
Mono P 5/50 GL	Tertiary and quarternary amines	Long term: 2–12 Short term: 2–14	10 µm (monosized)
Mono P 5/200 GL	Tertiary and quarternary amines	Long term: 2–12 Short term: 2–14	10 µm (monosized)
PBE 118	Tertiary and quarternary amines	Long term: 3–13 Short term: 2–14	90 µm
PBE 94	Tertiary and quarternary amines	Long term: 2–12 Short term: 1–14	90 µm

* 长期pH稳定性是指填料在长期储存后保持稳定，没有色谱分离效果降低的pH区间。

短期pH是指再生，原位清洗以及净化操作时的pH区间。所有的区间都是通过Amersham Biosciences内部试验确定

化学稳定性

Mono P 5/50 GL, Mono P 5/200 GL

Mono P在pH2-12, 所有常用的水溶液中, 以及存在添加剂如变性剂(8M尿素, 6M盐酸胍)和非离子型或阳离子去污剂时都稳定。

 避免氧化性物质及阴离子去污剂。

PBE94, PBE118

Polybuffer交换剂在pH3-12范围内的所有常用水溶液中都稳定存在, 且同尿素和其他强解离性试剂兼容。

 避免氧化性物质及阴离子去污剂。

储存

Mono P 5/50 GL, Mono P 5/200 GL, PBE 94, PBE pH 8-10.5

如果使用分离柱需要储存两天以上, 用5个柱体积的蒸馏水冲洗后, 再用5个柱体积的20%乙醇冲洗。

Polybuffer 96, Polybuffer 74, Pharmalyte 118

3-8 °C黑暗中储存, 最好储存于氮气环境中。避免微生物的污染。为使二氧化碳的吸收达到最小, 使用后的溶液充氮气储存于密封的瓶中。

 不可将色谱聚焦填料储存于1M HCl或1M NaOH中。避免带电基团的溶液。

色谱聚焦及CIPP

色谱聚焦对于相当复杂的混合物可获得高分辨率分离, 但对于组分少些的样品才能获得最好的分辨率。

因此色谱聚焦最适合于分离纯化策略的精细纯化步骤(见图85), 此时相似的组分需要高分辨率的分离, 且大部分的污染分子已被除去。CIPP的细节详见第五章, 纯化的策略性方法。

附录1

样品准备

使用色谱层析进行分离纯化的样品应该是洁净的，且没有任何颗粒状物质。在纯化开始前通过简单的步骤净化样品会避免分离柱的堵塞，静安少用剧烈操作清洗分离柱的需要，并延长色谱分离填料的使用寿命。

样品提取操作，缓冲液、添加剂及去污剂的选择很大程度上取决于材料的来源，目的蛋白的稳定性，所要使用的色谱层析技术以及纯化产品的用途。这些问题在Amersham Biosciences的蛋白纯化手册，特别是根据目的分子的不同，在重组蛋白手册，蛋白扩增与简单纯化及抗体纯化手册中以通用的名词加以介绍。

样品稳定性

在大多数情况下，纯化后的蛋白需要保持生物活性。目的蛋白保持活力的另一个好处是，随着分离纯化过程的进行，可以通过检测生物活性来表征目的蛋白。样品组份的变形通常会导致沉淀，或增加了非特异性的结合，二者都会使分离柱功能受损。因此很有必要检测样品的稳定限度，在这些限度内进行蛋白的分离纯化。

通常蛋白通过范德华力，离子键及疏水相互作用和氢键包此而形成的四级结构。任何能够破坏这些作用的条件都可能导致蛋白变性或沉淀。与此相反，小肽分子包含有较少的三级结构。他们的天然态表征为主要通过氢键稳定的二级结构。因此，小肽比蛋白质所能忍受的条件范围要宽的多。天然态结构的不同还表现在：蛋白质不易复性，而小肽通常会自发复性。

 在建立纯化流程之前，建议进行稳定性测试。如下列表可作为这列测试的基础：

- 在pH2-9之间，每隔1个pH单位测定蛋白的pH稳定性。
- 每隔0.5M 浓度，测试在0-2M NaCl及0-2M (NH₄)₂SO₄ 之间的盐离子稳定性。
- 每隔10%浓度，测试对于0-50%的乙腈及甲醇的稳定性。
- 每隔+10 ° C，测试蛋白在+4 to +40 ° C的温度稳定性。
- 将一份样品室温放置过夜，测试其稳定性及蛋白酶切的发生与否。对每个样品离心，测定上清活力及在280nm的紫外吸收。

样品净化

离心和过滤是样品净化的标准实验室技术，常规性的用于处理小量样品。

 强烈推荐在即将进行色谱层析分离纯化前对任何样品进行离心或过滤。

离心

离心可去除脂类和颗粒状物质，如细胞碎片。如果样品离心后仍不清洁，使用滤纸或5微米孔径的滤膜作为第一步，以下滤膜作为第二步过滤用。


- 对于小体积样品或吸附于滤膜的蛋白，10000g离心15分钟。
- 对于细胞裂解液，40000-50000g离心30分钟。
- 血清样品离心后可通过玻璃丝滤膜过滤一出去任何残留的脂类。

过滤

过滤可出去颗粒状物质。具有最小的非特异性蛋白吸附的滤膜为醋酸纤维素膜或PVDF膜。

在色谱层析前的样品准备中，选用同色谱层析填料颗粒尺寸相关的滤膜孔径。


滤膜的标称孔径	色谱层析填料的颗粒尺寸
1 μm	90 μm 或更大
0.45 μm	30 or 34 μm
0.22 μm	3, 10, 15 μm 或需要特别清洁的样品或过滤除菌时。

 在测试运行中检查目的蛋白的回收量。一些蛋白或许会非特异性的吸附于滤膜表面。

脱盐

脱盐柱适合于任何体积的样品，能够一步快速地除去低分子量的杂质分子同时，将样品转移至合适的缓冲液条件中。同样推荐在脱盐前对样品进行离心或过滤。有关更换缓冲液及脱盐操作，详见第156页。

在实验室规模纯化中，如果样品在过滤或离心后相当洁净，可不需进行缓冲液更换及脱盐步骤。对于亲和层析或疏水相互作用色谱层析，调整样品的pH，如有必要对样品进行稀释以减少溶液的离子强度足以满足要求。

 可快速处理量少或量多的样品。如有必要（切记每个额外的步骤都会降低产量，且脱盐过程会稀释样品），可在纯化前或纯化步骤之间使用。

去除分子量>5000的蛋白中的盐。

如需挥发性缓冲液，使用100mM 醋酸铵或100mM碳酸氢铵。

特殊的样品准备步骤

如果已知粗品中含有某些会堵塞分离柱的污染分子，如脂类，脂蛋白或酚红；或特定的杂质如大量的蛋白需要在任何色谱分析步骤前出去，此时需要特殊的样品准备步骤。

部分沉淀法

部分沉淀法常用语实验室规模纯化已从小体积样品中除去大量的杂质，有时也用于小规模的商业化生产。沉淀技术根据不同物质的溶解性不同而将他们分离开来。由于蛋白质的疏水性程度不同，因此增加盐浓度可提高它们的疏水相互作用，并引起沉淀。部分沉淀法可通过三种不同的形式去除大量的杂质，如图89所示：

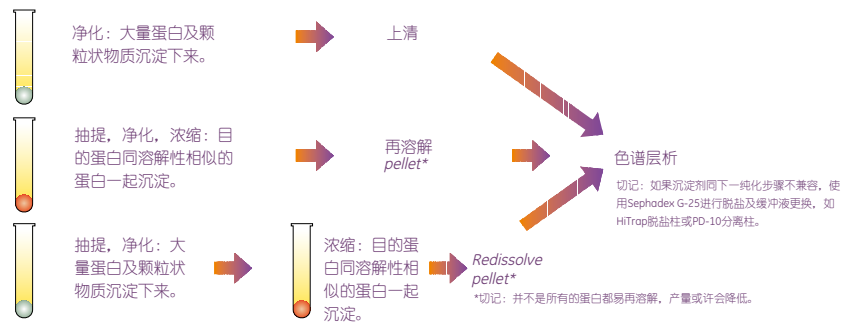


图89，三种应用沉淀法的方式。（从上至下，从左至右）

沉淀剂概括于表15中，并对常用的硫酸铵沉淀法详细介绍。

表15，沉淀技术举例。


沉淀剂	典型的使用条件	样品类型	注释
硫酸铵	如下所述	>1mg/ml 的蛋白，特别是免疫球蛋白	稳定蛋白，不变形，上清可直接进行HIC分离。帮助减少脂质成分。
硫酸右旋糖苷	如下所述 每毫升样品加入0.04ml 10% 的硫酸右旋糖苷，1ml的1M CaCl ₂ ，混合15分钟后10000g离心，去沉淀。	含有大量脂蛋白的样品，如腹水。	沉淀脂蛋白。
聚乙烯基吡咯烷酮	加入3% (w/v)，搅拌四小时后，17000g离心，去沉淀。	含有大量脂蛋白的样品，如腹水。	可替换硫酸右旋糖苷
聚乙二醇 (PEG,分子量大于4000)	最高浓度20% (w/v)	血浆蛋白质。	无变性，上清可直接进行IEX或AC分离，完全去除有困难。可稳定蛋白。
丙酮（冷的）	零度时最多可用80% (v/v)。用Eppendorf TM全速离心后收集沉淀。		可能会使蛋白不可逆变性。可用于小肽的沉淀，或电泳样品的浓缩。
聚乙烯亚胺	0.1% w/v		沉淀聚集的核蛋白。
硫酸精蛋白	1% w/v		沉淀聚集的核蛋白。
硫酸链霉素	1% w/v		沉淀核酸。
羊脂酸	X/15 g X为样品体积数	抗体浓度应大于1mg/ml	血清或腹水中大量蛋白的沉淀，将免疫球蛋白留在溶液中。


信息来源：


Scopes R.K., Protein Purification, Principles and Practice, Springer, (1994), J.C. Janson and L. Rydén, Protein Purification, Principles, High Resolution Methods and Applications, 2nd ed. Wiley Inc, (1998).

Personal communications

硫酸铵沉淀法

 有些蛋白或许会受到硫酸铵的伤害。添加硫酸铵晶体时需多加小心：局部浓度过高会导致不需要的蛋白污染沉淀下来的蛋白。

 日常使用中，为便于进行色谱层析，避免使用硫酸铵进行可再生的纯化及沉淀。

 通常，沉淀法对于浓度在1mg/ml以下的蛋白很少有效。

沉淀所需的溶液：

饱和硫酸铵溶液（将100g硫酸铵加入到100ml蒸馏水中，搅拌以溶解）。

1M Tris-HCl, pH 8.0。

用于第一个纯化步骤的缓冲液。

1. 过滤（0.45微米孔径）或离心（10 000 g, +4 ° C）样品。
 2. 向10份样品中加入1份1M Tris-HCl, pH 8.0以维持pH。
 3. 轻柔的搅拌。一滴一滴的加入硫酸铵溶液，至50%饱和度*。搅拌1小时。
 4. 10000g离心20分钟。
 5. 去除上清。将沉淀用同样体积同样浓度的硫酸铵溶液（该溶液不会使沉淀重新溶解，或引起进一步的沉淀）重悬，洗涤两次。再次离心。
 6. 用少量下一步骤即将使用的缓冲液重溶沉淀。
 7. 硫酸铵在使用Sephadex G-25进行净化或更换缓冲液的过程中被除去，使用脱盐柱（见第156页）。
- *可调整饱和度沉淀目的蛋白分子，或沉淀污染物分子。

根据温度的不同，达到特定饱和度的硫酸铵量也有所不同。表16列出了20℃时所需硫酸铵的量。

表16, 20℃时达到给定程度的饱和度所需硫酸铵的量。

		最终所要达到的饱和度																
		20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
起始饱和百分比	20℃时每升溶液所需添加硫酸铵的量（克）																	
0		113	144	176	208	242	277	314	351	390	430	472	516	561	608	657	708	761
5		85	115	146	179	212	246	282	319	358	397	439	481	526	572	621	671	723
10		57	86	117	149	182	216	251	287	325	364	405	447	491	537	584	634	685
15		28	58	88	119	151	185	219	255	293	331	371	413	456	501	548	596	647
20		0	29	59	89	121	154	188	223	260	298	337	378	421	465	511	559	609
25			0	29	60	91	123	157	191	228	265	304	344	386	429	475	522	571
30				0	30	61	92	125	160	195	232	270	309	351	393	438	485	533
35					0	30	62	94	128	163	199	236	275	316	358	402	447	495
40						0	31	63	96	130	166	202	241	281	322	365	410	457
45							0	31	64	98	132	169	206	245	286	329	373	419
50								0	32	65	99	135	172	210	250	292	335	381
55									0	33	66	101	138	175	215	256	298	343
60										0	33	67	103	140	179	219	261	305
65											0	34	69	105	143	183	224	267
70												0	34	70	107	146	186	228
75													0	35	72	110	149	190
80														0	36	73	112	152
85															0	37	75	114
90																0	37	76
95																	0	38

沉淀的蛋白的重溶

很多沉淀下的蛋白用少量下一步骤即将使用的缓冲液很容易实现重溶。然而，溶解度不好的蛋白或许会需要变性剂的使用。特殊条件的使用依赖于特殊的蛋白。这些试剂最终必须被出去，以保证蛋白的完全复兴，以及最大程度的回收蛋白及其活力。在分离过程中，通常色谱层析步骤会除去变性剂。表17给出了通常使用的变性剂的例子。

表17

变性剂	典型的使用条件	去除方式/注释
尿素	2M-8M	用Sephadex G25除去
盐酸胍	3M-6M	用Sephadex G25或离子交换过程中除去
Triton X-100	2%	用Sephadex G25或离子交换过程中除去
Sarcosyl	1.5%	用Sephadex G25或离子交换过程中除去
N-octyl glucoside	2%	用Sephadex G25或离子交换过程中除去
十二烷基磺酸钠	0.1%-0.5%	在第一步色谱层析时用非离子型去污剂除去，避免使用阴离子交换层析。
碱性pH	>pH 9, NaOH	在色谱层析过程中调整pH以维持蛋白的溶解性。

信息来源:

Scopes R.K., Protein Purification, Principles and Practice, Springer, (1994), J.C. Janson and L. Rydén, Protein Purification, Principles, High Resolution Methods and Applications, 2nd ed. Wiley Inc, (1998) and other sources.

缓冲液更换及脱盐

在文献中，经常提到的除盐或其他小分子物质，或更换样品缓冲液组分的方法为透析。然而，透析通常为非常缓慢的技术，且需要大量的缓冲液。在操作过程中，或者因为蛋白酶解，或同透析膜的非特异性结合，都会有损失样品的风险。更为简单快捷的技术为使用填充有Sephadex G-25的脱盐柱，对高分子量和低分子量的物质进行组份分离。蛋白可同盐及其他小分子物质分离开来。

在快速的一步分离中，样品被脱盐，转移至新的缓冲液中且低分子量的物质被除去。

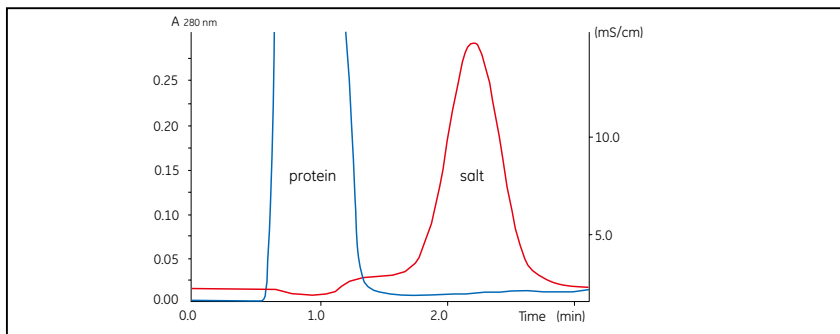
脱盐柱不仅用来除去低分子量的污染物，如盐离子，还可在不同的色谱层析纯化步骤前后更换缓冲液，并快速出去某些试剂以终止反应。

脱盐柱可处理样品体积最大为自身体积的30%。样品浓度不会影响分离效果，只要在正常的水溶性缓冲液中蛋白浓度不超过70mg/ml。样品应充分溶解，并通过离心或过滤出去颗粒状物质。

- 对于小体积样品，可以使用色谱层析分离的起始缓冲液将样品稀释，但细胞碎片及颗粒状物质必须出去。
- 为避免可能的离子相互作用，推荐在除盐及最终的样品缓冲液中加入低浓度的盐（25mM NaCl）。
- 如果必须避免NaCl的使用，可使用挥发性的缓冲液，如100mM的醋酸铵或100mM的碳酸氢铵。

图90展示了典型的缓冲液更换及脱盐分离过程。该过程可通过紫外吸收及电导的改变来检测。

图90，鼠血浆（10ml）通过HiPrep 26/10脱盐柱进行缓冲液更换。



对于实验室规模的纯化，表18列出了预装的脱盐及缓冲液更换分离柱选择指导。

表18，拖延及缓冲液更换的选择指南。

分离柱	样品体积	样品洗脱体积
MicroSpin™ G-25	0.1-0.15 ml	0.1-0.15 ml
PD-10 (gravity feed column)	1.5-2.5 ml	2.5-3.5 ml
HiTrap Desalting 5 ml	0.25-1.5 ml	1.0-2.0 ml
HiPrep 26/10 Desalting	2.5-15 ml	7.5-20 ml

如需对更大体积样品进行处理：

- 可串联多达5根5ml的分离柱以增加样品处理能力，如2根分离柱：样品体积3ml；5根分离柱：7.5ml样品。
- 可串联多达4根HiPrep 26/10 脱盐柱分离柱以增加样品处理能力，如2根分离柱：样品体积4ml；4根分离柱：60ml样品。在室温及水溶性缓冲液条件下，及时使用多大4根分离柱，样品也可在20-30分钟内处理完毕。

每根分离柱都提供有说明书。脱盐及缓冲液更换每样品所需时间少于5分钟，且对绝大多数蛋白可获得高于95%的回收率。

选择1: 使用注射器, 通过5ml HiTrap脱盐柱进行手动脱盐

1. 将注射器吸入缓冲液, 去除停止活塞。为避免气泡进入分离柱, 采用液滴对液滴的方式将注射器连接在分离柱上(通过所提供的接口)。
2. 去除拧下的末端。
3. 用25ml缓冲液5ml/min流速冲洗分离柱以彻底除去20%的乙醇(作为储存溶液)。如果分离柱中有气泡滞留, 用脱气后的缓冲液冲洗直至气泡消失。样品加载时偶然进入分离柱的气泡不影响分离效果。
4. 用2-5ml的注射器将样品加入分离柱, 流速为1-10ml/min。丢弃分离柱出来的洗脱液。
5. 如果样品体积小于1.5ml, 更换为缓冲液, 继续加注至1.5ml液体洗出分离柱, 丢弃洗脱液。
6. 根据表19, 用适当体积缓冲液洗脱蛋白。

按说明的体积收集脱盐后的蛋白。

注意: 当使用5ml HiTrap分离柱时, 5ml/min大致相当于120滴/min。简单的蠕动泵也可用于样品及缓冲液的加注。

推荐最大样品体积为1.5ml。减少样品体积的影响见表19。

表19, 使用注射器或Multipipette™时推荐的样品及洗脱体积。

样品加载量 ml	加入缓冲液量 ml	洗脱及收集 ml	产率 %	剩余盐浓度 %	稀释倍数
0.25	1.25	1.0	> 95	0.0	4.0
0.50	1.0	1.5	> 95	< 0.1	3.0
1.00	0.5	2.0	> 95	< 0.2	2.0
1.50	0	2.0	> 95	< 0.2	1.3

简单的蠕动泵也可用于样品及缓冲液的加载。

选择2: 用ÄKTAprime 进行简单脱盐

对于单个的5ml HiTrap 脱盐柱及HiPrep 26/10脱盐柱, ÄKTAprime™系统都含有预设的程序模板。



缓冲液准备

准备至少500ml所需缓冲液:

1. 根据ÄKTAprime™系统提示卡的说明连接分离柱, 并向系统加载缓冲液。
2. 选择应用模板。
3. 启动方法。
4. 输入样品体积, 点击OK。

图91，展示了ÅKTAprime的典型结果。根据紫外吸收（表征蛋白）和电导（表征盐离子）可合并脱盐后的组分。

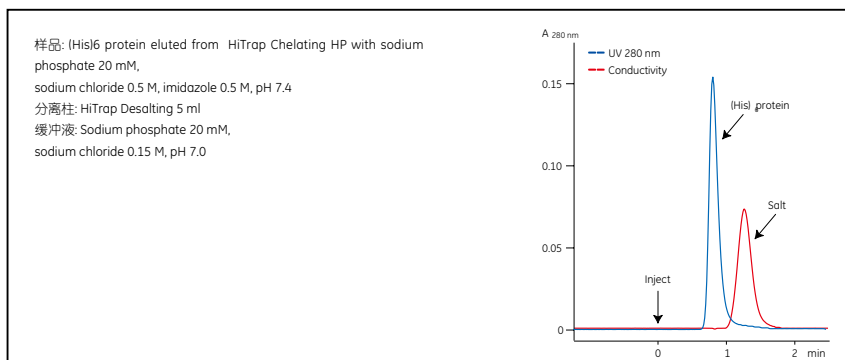


图91，使用ÅKTAprime对His融合蛋白进行脱盐。

脂蛋白的去除

脂蛋白及其他脂类物质会迅速的堵塞色谱层析柱，因此建议在分离纯化前去除它们。如部分沉淀一节所述，推荐使用沉淀剂，如硫酸右旋糖苷和polyvinylpyrrolidone来除去样品如腹水中的大量脂蛋白。

- 对样品离心以避免目的蛋白同滤膜的非特异性结合。
- 一些样品，如血清可通过玻璃绒滤膜过滤一出去残留的脂类物质。

酚红的去除

在细胞培养中，酚红常作为pH指示剂。尽管不会直接干扰纯化过程，但酚红可能会同某些纯化填料相结合，所以应尽早出去以避免污染的风险。现已知酚红可同pH在7以上的阴离子交换填料相结合。

- 根据缓冲液交换及脱盐一节所述，使用脱盐柱可在出去酚红(低分子量分子)的同时，将样品转移至后续纯化所需的缓冲液条件中。

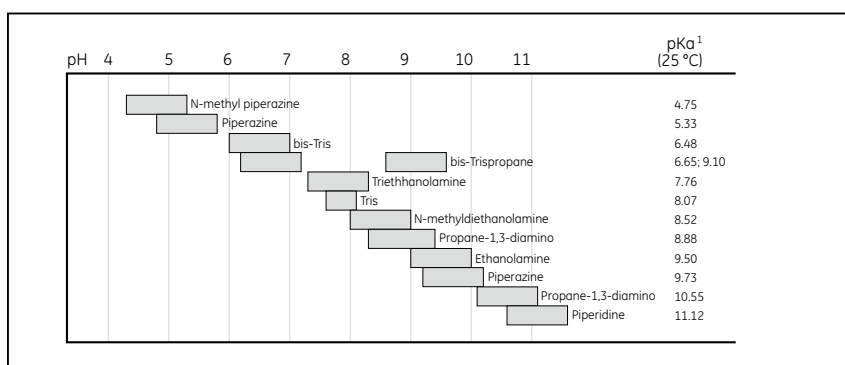
低分子量污染物的去除

- 如缓冲液更换及脱盐一节所述，如果样品含有大量的低分子量污染物，在进行第一步色谱层析纯化步骤前使用脱盐柱将其除去。

附录2

非挥发性及挥发性缓冲液系统

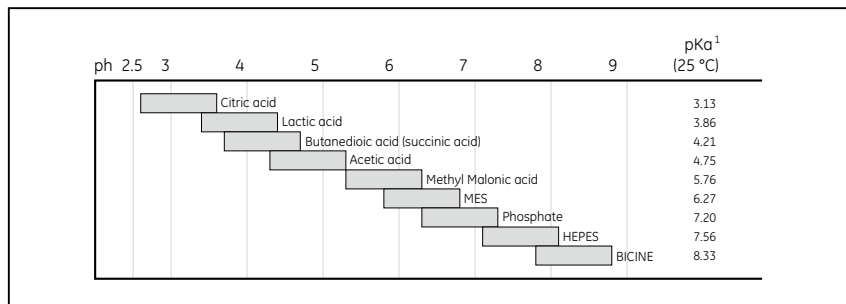
阴离子交换色谱层析所用的非挥发性缓冲液



pH间隔	物质	浓度mM	抗衡离子	pKa (25 °C) ¹	d(pKa)/dT(°C)
4.3-5.3	N-Methylpiperazine	20	Cl ⁻	4.75	-0.015
4.8-5.8	Piperazine	20	Cl ⁻ or HCOO ⁻	5.33	-0.015
5.5-6.5	L-Histidine	20	Cl ⁻	6.04	
6.0-7.0	bis-Tris	20	Cl ⁻	6.48	-0.017
6.2-7.2; 8.6-9.6	bis-Tris propane	20	Cl ⁻	6.65; 9.10	
7.3-8.3	Triethanolamine	20	Cl ⁻ or CH ₃ COO ⁻	7.76	-0.020
7.6-8.6	Tris	20	Cl ⁻	8.07	-0.028
8.0-9.0	N-Methyldiethanolamine	20	SO ₄ ²⁻	8.52	-0.028
8.0-9.0	N-Methyldiethanolamine	50	Cl ⁻ or CH ₃ COO ⁻	8.52	-0.028
8.4-9.4	Diethanolamine	20 at pH 8.4 50 at pH 8.8	Cl ⁻	8.88	-0.025
8.4-9.4	Propane 1,3-Diamino	20	Cl ⁻	8.88	-0.031
9.0-10.0	Ethanolamine	20	Cl ⁻	9.50	-0.029
9.2-10.2	Piperazine	20	Cl ⁻	9.73	-0.026
10.0-11.0	Propane 1,3-Diamino	20	Cl ⁻	10.55	-0.026
10.6-11.6	Piperidine	20	Cl ⁻	11.12	-0.031

1 参考: 化学及物理手册, 83版, CRC,2002-2003。

阳离子交换色谱层析所用的非挥发性缓冲液



pH间隔	物质	浓度mM	抗衡离子	pKa (25 °C) ¹	d(pKa)/dT(°C)
1.4-2.4	Maleic acid	20	Na ⁺	1.92	
2.6-3.6	Methyl malonic acid	20	Na ⁺ or Li ⁺	3.07	
2.6-3.6	Citric acid	20	Na ⁺	3.13	-0.0024
3.3-4.3	Lactic acid	50	Na ⁺	3.86	
3.3-4.3	Formic acid	50	Na ⁺ or Li ⁺	3.75	+0.0002
3.7-4.7; 5.1-6.1	Succinic acid	50	Na ⁺	4.21; 5.64	-0.0018
4.3-5.3	Acetic acid	50	Na ⁺ or Li ⁺	4.75	+0.0002
5.2-6.2	Methyl malonic acid	50	Na ⁺ or Li ⁺	5.76	
5.6-6.6	MES	50	Na ⁺ or Li ⁺	6.27	-0.0110
6.7-7.7	Phosphate	50	Na ⁺	7.20	-0.0028
7.0-8.0	HEPES	50	Na ⁺ or Li ⁺	7.56	-0.0140
7.8-8.8	BICINE	50	Na ⁺	8.33	-0.0180

1 参考: 化学及物理手册, 83版, CRC,2002-2003。

挥发性缓冲液系统

pH范围	缓冲液系统	抗衡离子	缓冲液离子的pKa ¹
3.3-4.3	Formic acid	H ⁺	3.75
3.3-4.3; 4.8-5.8	Pyridine/formic acid	HCOO ⁻	3.75; 5.25
3.3-4.3; 9.3-10.3	Trimethylamine/formic acid	HCOO ⁻	4.75; 9.81
4.3-5.8	Pyridine/acetic acid	CH ₃ COO ⁻	4.75; 5.25
4.3-5.3; 9.3-10.3	Trimethylamine/acetic acid	CH ₃ COO ⁻	4.75; 9.81
3.3-4.3; 8.8-9.8	Ammonia/formic acid	HCOO ⁻	3.75; 9.25
4.3-5.3; 8.8-9.8	Ammonia/acetic acid	CH ₃ COO ⁻	4.75; 9.25
5.9-6.9; 9.3-10.3	Trimethylamine/carbonate	CO ₃ ²⁻	6.35; 9.81
5.9-6.9; 8.8-9.8	Ammonium bicarbonate	HCO ₃ ⁻	6.35; 9.25
5.9-6.9; 8.8-9.8	Ammonium carbonate/ammonia	CO ₃ ²⁻	6.35; 9.25
5.9-6.9; 8.8-9.8	Ammonium carbonate	CO ₃ ²⁻	6.35; 9.25
4.3-5.3; 7.2-8.2	N-ethylmorpholine/acetate	HCOO ⁻	4.75; 7.72

1 参考: 化学及物理手册, 83版, CRC,2002-2003。

附录3

分离柱填充及准备

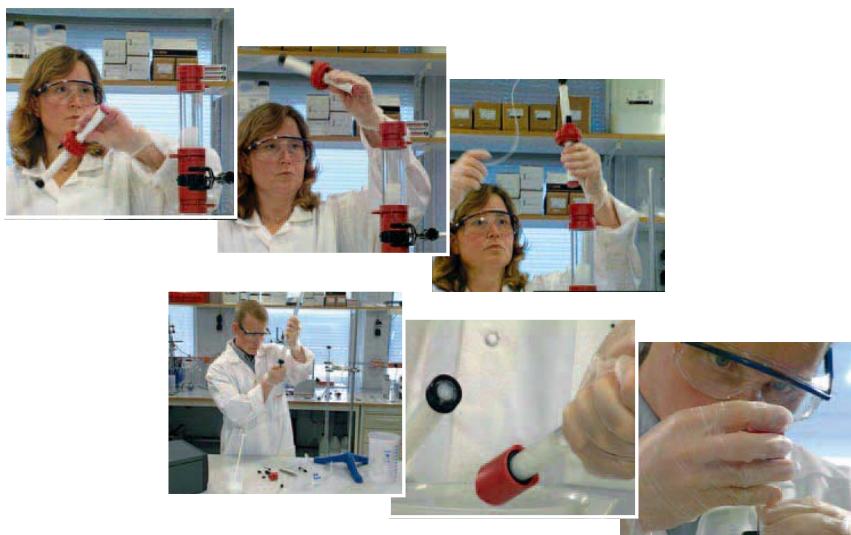
Amersham Biosciences 所提供的预装柱会保证可重复性的结果及最好的分离效果。

 在方法建立过程中，使用小的预装柱，如HiTrap IEX筛选试剂盒进行填料筛选和方法优化以提高效率。


有效地分离柱填充对于离子交换层析分离过程至关重要，特别是对于梯度洗脱。填充不好的分离柱会使液流变得不平稳，条带变宽及分辨率的损失。如需对分离柱进行填充，以下指导适用于所有规模的纯化：

- 对于高结合能力的分离柱，使用粗而宽的分离柱（通常柱床高度为5-15cm）用于快速纯化，即使使用低的线性流速。
- 所需离子交换层析填料的量取决于与填料的结合能力及样品的量。每种填料的结合能力在本手册中给出，并在产品说明书中也有介绍。估计结合目的样品所需的戒指量，然后用五倍于此量的填料装柱。如果分辨率达到要求，可减少所需的填料量。
- 一旦分离纯化的参数确定后，可通过增加分离柱的直径来增加柱床体积，对分离规模进行放大。避免增加分离柱的长度，这样会改变分离的条件。

离子交换层析填料可填充于Amersham Biosciences公司的Tricorn或XK分离柱中。分离柱的逐步填充过程展示于CD上的电影中（见订购信息）。





1. 将所有材料平衡至分离过程所需的温度。
2. 通过使用推荐的缓冲液冲洗分离柱消除气泡。确保没有气泡滞留于分离柱过滤网中。关闭分离柱出口，剩余1-2cm缓冲液于分离柱中。
3. 轻柔的悬浮填料。


 注意，Amersham biosciences 的 IEX 填料为即用型，因此没有必要进行去除可能堵塞分离柱的小颗粒的操作。

避免使用磁力搅拌器，它们会损害填料。


4. 根据推荐用量，估计所需的悬浮液量（悬浮后的填料）。
5. 将所需体积的悬液导入分离柱中。将填料沿玻璃棒导入分离柱管壁会使气泡的进入达到最少。
6. 迅速将缓冲液注入分离柱。
7. 装上分离柱顶部接口，连接至泵上。
8. 打开分离柱的下部出口，将泵设定至所需流速。

 如果填料悬液体积与分离柱的总体积，可连接上另一根玻璃柱作为储存池（详细信息见订购信息）。这样可保证填料悬液在填充过程中具有恒定的直径，将扰动降至最低而改善分离柱的填充条件。


 如果推荐流速不能获得，使用泵所能提供的最大流速。


 不能超过填料或分离柱的最大运行压力。

9. 维持填充的流速至少三个柱体积，直到柱床高度保持恒定。在分离柱上标出柱床高度。

 任何纯化步骤的流速不能超过装柱流速的75%。

10. 停止泵的运行并关闭分离柱出口。去除顶部部分，小心的将分离柱的其他部分充满缓冲液以在顶部形成一个半月形区域。
11. 以一定角度将转换头放入分离柱中，确保网中没有气泡滞留。
12. 将转换头缓慢的沿着分离柱滑下（转换器的出口应该保持打开状态），知道到达标记处。将转换器锁定在标记位置。
13. 将分离柱连接在泵上并开始平衡。如有必要，对转换器重新定位。

 必须充分洗涤填料一出去储存溶液，通常是20%的乙醇。残存的乙醇或许会干扰后续的操作过程。

 许多填料保存于灭菌后且含有抗菌剂的PBS中可在4℃储存达1月，但最好按照产品的特定储存说明书来进行操作。

分离柱选择

Tricorn及XK系列分离柱对于现代填料的高流速完全兼容，且有不同尺寸范围的分离柱可获得。最适合填充IEX填料的分离柱列于分离柱填充信息一节（第三章）。大多数情况下，IEX填料的结合能力及所需纯化样品的量决定了所需的分离柱尺寸。更完全的信息列表参见Amersham Biosciences BioDirectory™ 或网页目录(www.chromatography.amershambiosciences.com)，或浏览www.tricorncolumns.com上有关Tricorn分离柱的更多信息。

分离柱填充及柱效

柱效可用每米色谱分离柱床的理论塔板数（N）或H（等同于理论塔板数的高度，HETP）来表示，用柱床高度L初一塔板数。由于分离柱柱效同其所分离样品条带的宽化现象有关，因此可由一下公式计算：

$$N = 5.54 \times \left(\frac{V_R}{w_h} \right)^2$$


VR = 从样品开始加载至样品最大峰的洗脱体积

wh = 在记录到样品峰半峰高位置的峰宽度

H由以下公式计算得来：

$$= H \frac{L}{N}$$

L=填充的柱床高度

 VR及wh的测量可用距离（毫米）或体积（毫升）来表示，但两个参数必须用同样的单位。

在规律性的时间间隔时，通过注入丙酮来确定柱效（N）及峰的对称性（对称因子，As）以检查柱效。由于N的观测值依赖于试验因子的不同如流速及样品加载，因此必须在相同条件下进行比较。对于离子交换层析柱，柱效通过在相同条件下注入丙酮（不同填料发生相互作用），并测量洗脱峰来检测，如图92所示。

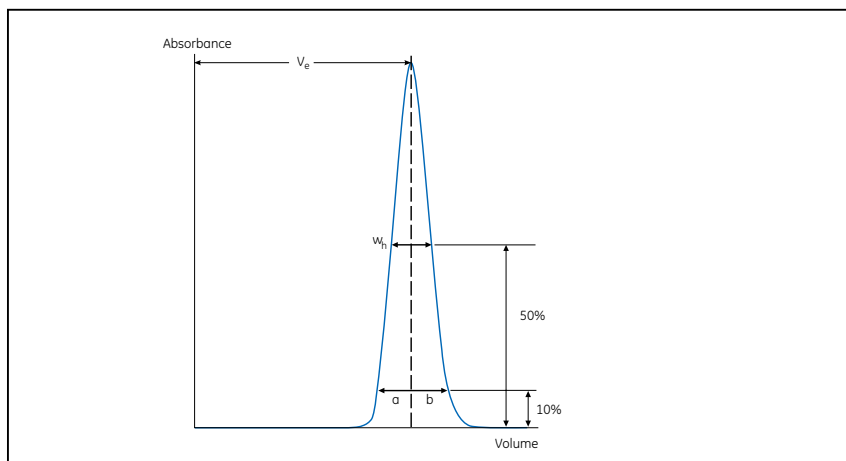


图92

作为通用的原则，好的H值应该大约2到3倍于所填充填料的颗粒平均直径。对于90微米直径颗粒，这意味着H值在0.018-0.027cm。

$$A_s = \frac{b}{a}$$

对称因子 A_s 可表示为：

其中，

a =10%峰高时前半部分峰宽

b =10%峰高时后半部分峰宽

A_s 应该尽可能接近1。IEX中的短分离柱可接受的 A_s 值通常为0.80-1.80。

- 🟡 样品峰前端延伸较长表明填料填充的太紧，而拖尾现象则表明填料填充的太松。
- 🟡 对于新填充的分离柱，运行至少两个柱体积的缓冲液以确保填料用缓冲液进行了平衡。使用pH计检测洗脱液的pH值。

附录4

纯化设备的选择

对于简单的离子交换色谱层析，如分步梯度洗脱，可用注射器或蠕动泵在预装的HiTrap分离柱上进行。为了使用精确控制的线性梯度获得高分辨率的分离，充分利用现代分离填料的高流速特性，或同一分离柱用于多个运行过程，需要一个色谱层析系统。

工作模式	标准ÄKTA design参数					注射器或蠕动泵+HiTrap分离柱
	Pilot	Explorer 100	Purifier 10	FPLC	Prime	
简单，分步梯度洗脱	✓	✓	✓	✓	✓	✓
常规分离的可重复性运行	✓	✓	✓	✓	✓	
一步纯化的优化以提高纯度	✓	✓	✓	✓	✓	
调整所需的系统控制及数据处理，如GLP	✓	✓	✓	✓		
自动方法建立及优化	✓	✓	✓	✓		
自动缓冲液准备	✓	✓	✓			
自动pH筛选	✓	✓	✓			
自动填料及分离柱筛选	✓	✓				
自动进行多步骤纯化	✓	✓				
规模放大，流程建立及转至生产	✓	✓				
Proven sanitary design for cGMP with easily exchanged wetted parts	✓					



附录5

线性流速 (cm/hour) 及体积流速 (ml/min) 之间的相互转换

当比较不同尺寸的分离柱结果时, 用线性流速 (cm/hour) 表示流速会很方便。然而, 流速通常用体积流速 (ml/min) 来表示。可使用下面公式中的一种进行线性流速与体积流速之间的相互转换。

从线性流速至体积流速

$$\begin{aligned}\text{体积流速 (ml/min)} &= \frac{\text{线性流速 (cm/h)}}{60} \times \text{分离柱截面积 (cm}^2\text{)} \\ &= \frac{Y}{60} \times \frac{\pi \times d^2}{4}\end{aligned}$$

其中

Y=线性流速cm/h

d=分离柱内径, 单位为cm

举例:

在XK 16/17分离柱 (内径为1.6cm) 中, 当线性流速为150cm/hour时, 体积流速为多少?

Y=线性流速=150cm/h

d=分离柱内径=1.6cm

$$\begin{aligned}\text{体积流速} &= \frac{150 \times \pi \times 1.6 \times 1.6}{60 \times 4} \text{ ml/min} \\ &= 5.03 \text{ ml/min}\end{aligned}$$

从体积流速至线性流速

$$\text{线性流速} = \frac{\text{体积流速} \times 60}{\text{分离柱内截面积 (cm}^2\text{)}}$$

$$\text{其中,} \quad = Z \times 60 \times \frac{4}{\pi \times d^2}$$

Z=体积流速, 单位ml/min

d=分离柱内径, 单位cm

举例:

对于HR 5/5分离柱 (内径0.5cm), 当体积流速为1ml/min时, 线性流速为多少?

Z=体积流速=1ml/min

d=分离柱内径=0.5cm

$$\begin{aligned}\text{线性流速} &= 1 \times 60 \times \frac{4}{\pi \times 0.5 \times 0.5} \text{ cm/h} \\ &= 305.6 \text{ cm/h}\end{aligned}$$

从ml/min到使用注射器

1ml/min=在1ml的HiTrap分离柱上, 大约30滴/min

5ml/min=在5ml的HiTrap分离柱上, 大约120滴/min

附录6

数据转换：蛋白质，柱压

Mass (g/mol)	1 µg	1 nmol
10 000	100 pmol; 6×10^{13} molecules	10 µg
50 000	20 pmol; 1.2×10^{13} molecules	50 µg
100 000	10 pmol; 6.0×10^{12} molecules	100 µg
150 000	6.7 pmol; 4.0×10^{12} molecules	150 µg
1 kb of DNA	= 333 amino acids of coding capacity = 37 000 g/mol	
270 bp DNA	= 10 000 g/mol	
1.35 kb DNA	= 50 000 g/mol	
2.70 kb DNA	= 100 000 g/mol	

Protein	A ₂₈₀ for 1 mg/ml
IgG	1.35
IgM	1.20
IgA	1.30
Protein A	0.17
Avidin	1.50
Streptavidin	3.40
Bovine Serum Albumin	0.70

氨基酸的平均分子量=120g/mol

柱压


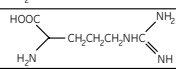
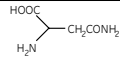
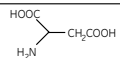
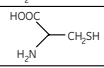
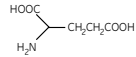
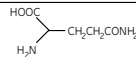

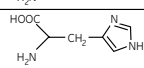
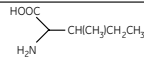
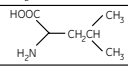
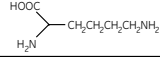
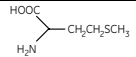
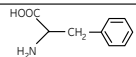

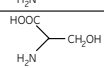
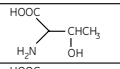
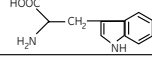
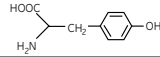
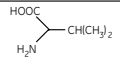
最大运行背景压力是指超过此压力时柱床会被压缩的压力值。

压力单位可表示为MPa, bar或psi, 它们的换算关系如下:

$$1\text{MPa} = 10\text{ bar} = 145\text{ psi}$$

附录7

氨基酸列表


氨基酸	三字母简写	单字母简写	结构式
Alanine	Ala	A	
Arginine	Arg	R	
Asparagine	Asn	N	
Aspartic Acid	Asp	D	
Cysteine	Cys	C	
Glutamic Acid	Glu	E	
Glutamine	Gln	Q	
Glycine	Gly	G	
Histidine	His	H	
Isoleucine	Ile	I	
Leucine	Leu	L	
Lysine	Lys	K	
Methionine	Met	M	
Phenylalanine	Phe	F	
Proline	Pro	P	
Serine	Ser	S	
Threonine	Thr	T	
Tryptophan	Trp	W	
Tyrosine	Tyr	Y	
Valine	Val	V	

分子式	分子量	中间残基的分子式	分子量	pH6-7间电性	疏水性 (非极性)	不带电性 (极性)	亲水性 (极性)
C ₃ H ₇ NQ ₂	89.1	C ₃ H ₅ NO	71.1	Neutral	■		
C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	174.2	C ₆ H ₁₂ N ₄ O	156.2	Basic (+ve)			■
C ₄ H ₈ N ₂ O ₃	132.1	C ₄ H ₆ N ₂ O ₂	114.1	Neutral		■	
C ₄ H ₇ NQ ₃	133.1	C ₄ H ₅ NQ ₃	115.1	Acidic(-ve)			■
C ₃ H ₇ NQS	121.2	C ₃ H ₅ NOS	103.2	Neutral		■	
C ₃ H ₅ NQ ₄	147.1	C ₃ H ₃ NQ ₄	129.1	Acidic (-ve)			■
C ₃ H ₁₀ N ₂ O ₃	146.1	C ₃ H ₈ N ₂ O ₂	128.1	Neutral		■	
C ₂ H ₅ NQ ₂	75.1	C ₂ H ₃ NO	57.1	Neutral		■	
C ₆ H ₉ N ₃ O ₂	155.2	C ₆ H ₇ N ₃ O	137.2	Basic (+ve)			■
C ₆ H ₁₃ NQ ₂	131.2	C ₆ H ₁₁ NO	113.2	Neutral	■		
C ₆ H ₁₃ NQ ₂	131.2	C ₆ H ₁₁ NO	113.2	Neutral	■		
C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂	146.2	C ₆ H ₁₂ N ₂ O	128.2	Basic(+ve)			■
C ₉ H ₁₁ NQS	149.2	C ₉ H ₉ NOS	131.2	Neutral	■		
C ₉ H ₁₁ NQ ₂	165.2	C ₉ H ₉ NO	147.2	Neutral	■		
C ₃ H ₅ NQ ₃	115.1	C ₃ H ₃ NO	97.1	Neutral	■		
C ₃ H ₇ NQ ₃	105.1	C ₃ H ₅ NQ ₂	87.1	Neutral		■	
C ₄ H ₉ NQ ₃	119.1	C ₄ H ₇ NQ ₂	101.1	Neutral		■	
C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	204.2	C ₁₁ H ₁₀ N ₂ O	186.2	Neutral	■		
C ₉ H ₁₁ NQ ₃	181.2	C ₉ H ₉ NQ ₂	163.2	Neutral		■	
C ₃ H ₁₁ NQ ₂	117.1	C ₃ H ₉ NO	99.1	Neutral	■		

附录8

纯化中的分析实验

分析实验对于追踪纯化进程至关重要。它们用于获知每步骤的效果，如产量，生物活性，回收率，并帮助进行实验条件优化。目的蛋白分子可信赖的检测方式再重要不过。

 当检测色谱层析的组分时，确保纯化的缓冲液不会干扰试验进行。

总蛋白确定

测定总蛋白量最常用的两种方法为Lowry法及Bradford法。Bradford试验特别适合于含有高脂的样品，因为后者会干扰Lowry法的测定。

纯度测定

蛋白纯度通常通过SDS-PAGE进行评估。另外还可使用等点聚焦，毛细管电泳，反相色谱层析或质谱进行确定。

SDS-PAGE分析

所需试剂:

6X SDS loading buffer: 0.35 M Tris-HCl (pH 6.8), 10.28% (w/v) SDS, 36% (v/v) glycerol, 0.6 M dithiothreitol (or 5% 2-mercaptoethanol), 0.012% (w/v) bromophenol blue.

分装为 0.5 ml 冻存于 -80 ° C.

1. 将2 μl 6 X SDS loading buffer加入到5-10 μl的蛋白粗体液上清，细胞裂解液或适当的纯化组分。
2. 短暂震荡后+90 至 +100 ° C加热5分钟。
3. 将样品加至SDS-PAGE胶上。
4. 跑胶，并用考马斯亮蓝染色（Coomassie Blue R Tablets）或银染（PlusOne™ Silver Staining Kit, Protein）。


 SDS胶中丙烯酰胺的百分比应根据目的蛋白的预期分子量选择，如表20.

表20

胶溶液中丙烯酰胺百分比	分离大小范围
Single percentage: 5%	36 000-200 000
7.5%	24 000-200 000
10%	14 000-200 000
12.5%	14 000-100 000
15%	14 000-60 000*
Gradient: 5-15%	14 000-200 000
5-20%	10 000-200 000
10-20%	10 000-150 000

*更大的蛋白质将不能显著的迁移至胶内

 有关电泳技术的信息和建议，请参阅“附加阅读及参考材料”一节。

功能实验

在免疫特异性的基础上，发展出了许多检测活性目的蛋白浓度的可选实验体系。

- 当用考马斯亮蓝染色或银染的SDS-PAGE敏感度不够时，使用Western blot进行分析。

1. 用SDS-PAGE分离样品。
2. 将分离后的样品转至适当的膜上，如Hybond™ ECL™ (适用于后续的林检测) 或Hybond P (适用于后续的林 Plus™检测)。
3. 用合适的特异性试剂冲洗膜。

电泳及蛋白转膜可通过许多不同的设备及试剂来完成。进一步信息，参阅蛋白电泳技术手册及Hybond ECL说明手册，均可从Amersham Biosciences或www.amershambiosciences.com获得。


- ELISAs最常用于活性检测。
- 使用表面等离子共振现象检测免疫特异性相互作用（如，使用BIACORE™系统）的功能性实验，可用于确定活性浓度，抗原决定簇的确定及反应动力学的研究。

标签融合蛋白的检测及试验方法

SDS-PAGE, Western blotting 及ELISAs还可用来检测通过基因操作加入特定标签的蛋白分子。在一些情况下，可建立一些根据标签本身的特征来实现的检测方法，如GST检测模块用来检测GST融合蛋白的酶活及定量。有关（GST及His）₆融合蛋白的检测及定量的细节，参见Amersham Biosciences公司的“重组蛋白手册：蛋白扩增及简单纯化”和“GST基因融合系统手册”。


附录9

生物样品的储存

 此处所给建议为通用原则，并不适用于每种生物样品。在使用一下任何一条推荐前，必须考虑样品特殊的性质及所需的目的。


通用建议：


- 如果很重要，加入稳定试剂。纯化后蛋白的储存通常需要稳定剂。
- 血清，培养物上清及腹水应在小量分装后冻存于-20——-70℃。
- 避免反复的动溶或冻干/重溶，这样很有可能会降低生物活性。
- 避免接近稳定性限度的pH或盐浓度，还原剂或螯合剂。
- 将蛋白在+4 ° C储存于密封容器中以使细菌生长及蛋白酶解降至最低。如果超过24小时，如果有可能加入防腐剂（如merthiolate 0.01%）。

 叠氮化钠会干扰许多偶联的方法及生物活性检测，且危害健康；可通过脱盐柱除去（第156页）。

纯化后蛋白的通用推荐方法：

- 在高浓度硫酸铵条件下以沉淀形式储存，如4M。
- 冻存于50% 甘油中，特别适合于酶。
- 如果样品即将用于生物活性试验，避免加入防腐剂。如果需要进行体内试验，则也不应该添加防腐剂。可以小量分装样品后冻存。
- 将滤膜灭菌以延长储存时间。
- 加入稳定剂，如5-20%的甘油，10mg/ml的血清蛋白，配体（浓度根据活性蛋白的浓度确定）以维持蛋白的生物活性。切记任何添加剂都会降低蛋白的纯度，且有可能需要在后续阶段除去。
- 避免反复的动溶或冻干/重溶，这样很有可能会降低生物活性。

 叠氮化钠会干扰许多偶联的方法及生物活性检测，且危害健康；可通过脱盐柱除去（第156页）。

 冷沉淀蛋白，包括一些IgG3家族的鼠抗体，不能储存于+4 ° C，因为他们会在此温度下沉淀。在防腐剂存在条件下，保存于室温。

附录10

分离柱清洗

正确的样品及缓冲液准备，并在每次分离纯化运行结束后用高浓度盐（1M NaCl）来冲洗，会使绝大多数分离柱保持良好状态。然而，变差的柱效，慢流速，背景压力的增加或分离柱的完全堵塞都表明分离柱需要剧烈条件的清洗以去除污染分子。

清洗分离柱时建议采用反向液流，这样污染物就不用穿越整根分离柱而被冲洗出来。根据污染程度的不同清洗所用的缓冲液体积数及清洗时间也有所不同。如果去除普通污染物的操作不能是分离柱柱效恢复，在使用其他清洗方法前更换分离柱顶部滤膜。更换滤膜时应多加小心，防止影响到分离柱的填充质量，干扰分离柱效。

普通污染分子的去除

以下步骤足以满足对普通污染物的清除：

1. 用2M的NaCl至少清洗2个柱体积，流速见表21。
2. 用1M的NaOH至少清洗4个柱体积，流速同步骤一。
3. 用2M的NaCl至少清洗2个柱体积，流速同步骤一。
4. 用至少2个柱体积的蒸馏水润洗分离柱，流速同步骤一，直到基线，洗脱pH及电导稳定。
5. 用至少4个柱体积的起始缓冲液或储存缓冲液冲洗分离柱，流速同步骤一，直到基线，洗脱pH及电导稳定。

沉淀蛋白质，脂类，疏水结合蛋白或脂蛋白的去除

1. 去除沉淀的蛋白质：
2. 注入一个柱体积的胃蛋白酶(1 mg/ml in 0.5 M NaCl, 0.1 M acetic acid)。室温过夜或37℃作用1小时。
3. 用至少2个柱体积的蒸馏水润洗分离柱（推荐流速见表21）直到紫外基线及洗脱液的pH恒定。
4. 用至少4个柱体积的起始缓冲液或储存缓冲液冲洗，流速同步骤2，直到洗脱pH及电导到达所需值。

还可选用如下操作：

1. 用6M盐酸胍冲洗2个柱体积,推荐流速见表21。
2. 立即用pH7-8的缓冲液冲洗至少5个柱体积，推荐流速见表21。
3. 用至少2个柱体积的蒸馏水润洗分离柱（推荐流速见表21）直到紫外基线及洗脱液的pH恒定。
4. 用至少4个柱体积的起始缓冲液或储存缓冲液冲洗，流速同步骤2，直到洗脱pH及电导到达所需值。

表21, 不同填料, 分离柱尺寸及洗脱液的推荐流速。


分离柱体积及填料	水, 缓冲液, 2M NaCl或1M NaOH	6M 盐酸胍	70%乙醇或30%异丙醇
MiniBeads (0.24 ml)	0.2 ml/min	0.1 ml/min	0.1 ml/min
MiniBeads (0.8 ml)	0.2 ml/min	0.1 ml/min	0.1 ml/min
MonoBeads (1.7 ml)	0.2 ml/min	0.1 ml/min	0.1 ml/min
MonoBeads (1 ml)	0.5 ml/min	0.25 ml/min	0.25 ml/min
MonoBeads (8 ml)	2 ml/min	1 ml/min	1 ml/min
MonoBeads (20 ml)	5 ml/min	2.5 ml/min	2.5 ml/min
SOURCE 15 4.6/100 PE	0.2 ml/min	0.1 ml/min	0.1 ml/min
RESOURCE 1 ml	1 ml/min	0.5 ml/min	0.5 ml/min
RESOURCE 6 ml	6 ml/min	3 ml/min	3 ml/min
SOURCE in larger columns**	40 cm/h	20 cm/h	20 cm/h
HiTrap (1 ml)	1 ml/min	0.5 ml/min	0.5 ml/min
HiTrap (5 ml)	5 ml/min	2.5 ml/min	2.5 ml/min
HiPrep (20 ml)	5 ml/min	2.5 ml/min	2.5 ml/min
HiLoad (20 ml)	3 ml/min	2.5 ml/min	2.5 ml/min
HiLoad (53 ml)	8 ml/min	5 ml/min	5 ml/min
Sepharose High Performance in larger columns**	40 cm/h	20 cm/h	20 cm/h
Sepharose Fast Flow in larger columns**	40 cm/h	20 cm/h	40 cm/h
Sepharose XL in larger columns**	40 cm/h	20 cm/h	40 cm/h
Sepharose Big Beads**	40 cm/h	40 cm/h	40 cm/h


*如果认为污染比较重要, 当使用1M NaOH时, 可使用较低流速以增加接触时间。

**当清洁较大的分离柱时, 对于初始清洗步骤的任何溶液, 使其接触时间为1-2小时。

去除脂类, 疏水结合蛋白或脂蛋白


如需彻底出去此类污染物, 可使用有机溶剂或去污剂。

 在用有机溶剂前, 用蒸馏水冲洗填料至少4个柱体积以避免盐类沉淀于分离柱中。

 在使用有机溶剂或溶液时, 需要减小流速以避免分离柱超压。

使用清洗溶液的最大浓度如下: 100%的异丙醇, 100%的甲醇, 100%的己烷, 2M NaOH, 75%的乙酸, 100%的乙醇, 离子性或非离子型去污剂。

 坚持检查填料或分离柱所提供说明书中的溶液兼容性。

 对Q,DEAE及ANX带电基团的填料, 避免使用阴离子去污剂。对于S,SP及CM带电基团的填料, 避免使用阳离子去污剂。

清洗操作举例：

1. 用70%的乙醇或30%异丙醇冲洗4个柱体积，推荐流速见表21。
2. 用至少2个柱体积的蒸馏水润洗分离柱（推荐流速见表21）直到紫外基线及洗脱液的pH恒定。
3. 立即用3个柱体积的起始缓冲液冲洗，流速同步骤2。

还可采用如下操作：

1. 用碱性或酸性溶液的去污剂冲洗2个柱体积，如溶解于0.1M 醋酸中的0.1-0.5%的非离子型去污剂，推荐流速见表21。
2. 用5个柱体积的70%的乙醇冲洗以除去残留的去污剂，推荐流速见表21。
3. 用至少2个柱体积的蒸馏水润洗分离柱（推荐流速见表21）直到紫外基线及洗脱液的pH恒定。
4. 立即用3个柱体积的起始缓冲液冲洗，流速同步骤1。

补充阅读材料

编号

分离纯化

抗体纯化手册	18-1037-46
蛋白纯化手册	18-1132-29
重组蛋白手册：蛋白扩增及简单纯化	18-1142-75
GST基因融合系统手册	18-1157-58
亲和层析手册：原理与方法	18-1022-29
凝胶排阻层析手册：原理与方法	18-1022-18
疏水相互作用色谱层析手册：原理与方法	18-1020-90
反相色谱层析手册：原理与方法	18-1112-93
膨胀床吸附手册：原理与方法	18-1124-26
蛋白及肽类纯化技术选择	18-1128-63
蛋白质及小肽快速脱盐及缓冲液更换	18-1128-62
凝胶排阻层析柱及填料选择指导	18-1124-19
离子交换柱及填料选择指导	18-1127-31
HIC分离柱及填料产品总览	18-1121-86
亲和柱及填料产品总览	18-1121-86
方便的蛋白纯化，HiTrap分离柱指导	18-1128-81
ÅKTAdesign手册	18-1158-77
ÅKTA 3D Kit手册	18-1160-45
GST融合系统手册	18-1159-30
蛋白纯化软件	18-1155-49
蛋白纯化：原理，高分辨率方法及应用，J-C. Jansson and L.Rydén	18-1128-68
分离柱填充视频PAL	17-0893-01
分离柱填充视频NTSC	17-0894-01

分析

蛋白分析——使用二维电泳	18-1124-82
二维电泳手册	80-6429-60
蛋白电泳技术手册	80-6013-88
ECL Western and ECL Plus Western Blotting使用注释	18-1139-13

以上内容许多可从如下网址下载：www.chromatography.amershambiosciences.com.
其他有用网址链接包括www.hitrap.com和www.tricorncolumns.com.

参考文献

		编号
参考文献列表可从 www.chromatography.amershambiosciences.com 获取。		
HiTrap Desalting	参考文献列表	18-1156-70
HiPrep 26/10 Desalting	参考文献列表	18-1156-89
HiLoad Q Sepharose HP and HiLoad Q Sepharose FF	参考文献列表	18-1156-98
HiLoad SP Sepharose HP and HiLoad SP Sepharose FF	参考文献列表	18-1156-99
HiPrep 16/10 CM FF	参考文献列表	18-1156-91
HiPrep 16/10 DEAE FF	参考文献列表	18-1156-90
HiPrep 16/10 Q FF	参考文献列表	18-1156-92
HiTrap Q HP and HiTrap Q FF	参考文献列表	18-1156-82
HiTrap SP HP and HiTrap SP F	F参考文献列表	18-1156-83
HiTrap CM FF	参考文献列表	18-1156-84
HiTrap DEAE FF	参考文献列表	18-1156-85
Mono Q (2000–2002)	参考文献列表	18-1166-18
Mono S (1998–2002)	参考文献列表	18-1166-16
MiniBeads (1998–2002)	参考文献列表	18-1166-17

订购信息

离子交换

SOURCE, Sepharose High Performance, Sepharose Fast Flow, Sepharose XL及 Sepharose Big Beads均可以BioProcess填料形式获得并用于大规模的纯化生产。详细信息请联系Amersham Biosciences的当地代理商。

产品	数量	代码
MiniBeads		
Mini Q PC 3.2/3*	1 × 0.24 ml	17-0686-01
Mini S PC 3.2/3*	1 × 0.24 ml	17-0687-01
Mini Q 4.6/50 PE	1 × 0.8 ml	17-5177-01
Mini S 4.6/50 PE	1 × 0.8 ml	17-5178-01
MonoBeads		
Mono Q 5/50 GL	1 × 1 ml	17-5166-01
Mono Q 10/100 GL	1 × 8 ml	17-5167-01
Mono Q 4.6/100 PE	1 × 1.7 ml	17-5179-01
Mono Q HR 16/10	1 × 20 ml	17-0506-01
Mono S 5/50 GL	1 × 1 ml	17-5168-01
Mono S 10/100 GL	1 × 8 ml	17-5169-01
Mono S 4.6/100 PE	1 × 1.7 ml	17-5180-01
Mono S HR 16/10	1 × 20 ml	17-0507-01
SOURCE		
RESOURCE Q	1 × 1 ml	17-1177-01
RESOURCE Q	1 × 6 ml	17-1179-01
SOURCE 15Q 4.6/100 PE	1 × 1.7 ml	17-5181-01
SOURCE 15Q	10 ml	17-0947-20
SOURCE 15Q	50 ml	17-0947-01
SOURCE 15Q	200 ml	17-0947-05
SOURCE 30Q	10 ml	17-1275-10
SOURCE 30Q	50 ml	17-1275-01
SOURCE 30Q	200 ml	17-1275-05
RESOURCE S	1 × 1 ml	17-1178-01
RESOURCE S	1 × 6 ml	17-1180-01
SOURCE 15S 4.6/100 PE	1 × 1.7 ml	17-5182-01
SOURCE 15S	10 ml	17-0944-10
SOURCE 15S	50 ml	17-0944-01
SOURCE 15S	200 ml	17-0944-05
SOURCE 30S	10 ml	17-1273-20
SOURCE 30S	50 ml	17-1273-01
SOURCE 30S	200 ml	17-1273-02
Sepharose High Performance		
HiTrap Q HP	5 × 1 ml	17-1153-01
HiTrap Q HP	5 × 5 ml	17-1154-01
HiLoad 16/10 Q Sepharose High Performance	1 × 20 ml	17-1064-01
HiLoad 26/10 Q Sepharose High Performance	1 × 53 ml	17-1066-01
Q Sepharose High Performance	75 ml	17-1014-01

产品	数量	代码
Sepharose High Performance (continued)		
HiTrap SP HP	5 × 1 ml	17-1151-01
HiTrap SP HP	5 × 5 ml	17-1152-01
HiLoad 16/10 SP Sepharose High Performance	1 × 20 ml	17-1137-01
HiLoad 26/10 SP Sepharose High Performance	1 × 53 ml	17-1138-01
SP Sepharose High Performance	75 ml	17-1087-01
HiTrap IEX Selection Kit**	7 × 1 ml	17-6002-33
** Q Sepharose Fast Flow, DEAE Sepharose Fast Flow, SP Sepharose Fast Flow, CM Sepharose Fast Flow, ANX Sepharose 4 Fast Flow (high sub), Q Sepharose XL and SP Sepharose XL		
Sepharose Fast Flow		
HiTrap Q FF	5 × 1 ml	17-5053-01
HiTrap Q FF	5 × 5 ml	17-5156-01
HiPrep 16/10 Q FF	1 × 20 ml	17-5190-01
Q Sepharose Fast Flow	25 ml	17-0510-10
Q Sepharose Fast Flow	300 ml	17-0510-01
HiTrap SP FF	5 × 1 ml	17-5054-01
HiTrap SP FF	5 × 5 ml	17-5157-01
HiPrep 16/10 SP FF	1 × 20 ml	17-5192-01
SP Sepharose Fast Flow	25 ml	17-0729-10
SP Sepharose Fast Flow	300 ml	17-0729-01
HiTrap DEAE FF	5 × 1 ml	17-5055-01
HiTrap DEAE FF	5 × 5 ml	17-5154-01
HiPrep 16/10 DEAE FF	1 × 20 ml	17-5090-01
DEAE Sepharose Fast Flow	25 ml	17-0709-10
DEAE Sepharose Fast Flow	500 ml	17-0709-01
HiTrap CM FF	5 × 1 ml	17-5056-01
HiTrap CM FF	5 × 5 ml	17-5155-01
HiPrep 16/10 CM FF	1 × 20 ml	17-5091-01
CM Sepharose Fast Flow	25 ml	17-0719-10
CM Sepharose Fast Flow	500 ml	17-0719-01
HiTrap ANX FF (high sub)	5 × 1 ml	17-5162-01
HiTrap ANX FF (high sub)	5 × 5 ml	17-5163-01
HiPrep 16/10 ANX FF (high sub)	1 × 20 ml	17-5191-01
ANX Sepharose 4 Fast Flow (high sub)	25 ml	17-1287-10
ANX Sepharose 4 Fast Flow (high sub)	500 ml	17-1287-01
Sepharose XL		
HiTrap Q XL	5 × 1 ml	17-5158-01
HiTrap Q XL	5 × 5 ml	17-5159-01
HiPrep 16/10 Q XL	1 × 20 ml	17-5092-01
Q Sepharose XL	300 ml	17-5072-01
Q Sepharose XL virus licensed	25 ml	17-5437-10
HiTrap SP XL	5 × 1 ml	17-5160-01
HiTrap SP XL	5 × 5 ml	17-5161-01
HiPrep 16/10 SP XL	1 × 20 ml	17-5093-01
SP Sepharose XL	300 ml	17-5073-01

产品	数量	代码
Sepharose Big Beads		
Q Sepharose Big Beads	1 l	17-0989-03
SP Sepharose Big Beads	1 l	17-0657-03
Desalting columns		
HiTrap Desalting	5 × 5 ml	17-1408-01
HiTrap Desalting	100 × 5 ml	11-0003-29
HiPrep 26/10 D esalting	1 × 20 ml	17-5087-01
HiPrep 26/10 D esalting	4 × 20 ml	17-5087-02
PD-10 Desalting columns	30	17-0857-01
PD-10 Desalting columns	50	17-0735-01
Column Packing CD		
The Movie	1	18-1165-33

空分离柱

Tricorn 分离柱系列的完全信息可从www.tricorncolumns.com获得。

Tricorn 10/100 column	1	18-1163-15
-----------------------	---	------------

Tricorn分离柱包括分离柱管，转换器组件，一个滤膜试剂盒（包括转换器，底部滤膜及O形圈，两个终止活塞，转换器锁和滤膜固定器，如有必要还有两个M6 型同FPLC连接器的连接器。

XK分离柱包括一个AK转换器，TEFZEL管（0.8mm内径用于XK16及XK26分离柱，1.2mm 内径用于XK50分离柱），M6连接器，温度调节外套，支持snap-on网套，拆卸工具（进XK16和XK26提供），及说明书。

附件及备用部分

完全列表请参阅Amersham Biosciences Biodirectory或www.chromatography.amershambiosciences.com

Packing Connector XK 16	1	18-1153-44
-------------------------	---	------------

Packing Connector XK 26	1	18-1153-45
-------------------------	---	------------

Tricorn 填充设备10/100

包括Tricorn填充连接器10-10，

Tricorn 10/100玻璃管，底部器件及终止活塞。1		18-1153-25
-------------------------------	--	------------

Tricorn填充连接器10-10*

将额外的分离柱连接在Tricorn10分离柱上

作为填充用液池，有利于高效的填充。	1	18-1153-23
-------------------	---	------------

色谱聚焦

产品	数量	代码
Mono P 5/50 GL	1 × 1 ml	17-5170-01
Mono P 5/200 GL	1 × 4 ml	17-5171-01
PBE 118 Polybuffer exchanger	200 ml	17-0711-01
PBE 94 Polybuffer exchanger	200 ml	17-0712-01
Polybuffer 74	250 ml	17-0713-01
Polybuffer 96	250 ml	17-0714-01
Pharmalyte pH 8-10.5	25 ml	17-0455-01

产品索引

A			
ANX Sepharose 4 Fast Flow (high sub)	24, 93, 94, 96, 103, 181		
C			
CM Sepharose Fast Flow	24, 96, 97, 100, 103, 104, 107, 181		
D			
DEAE Sepharose Fast Flow	24, 94, 96, 98, 99, 103, 181		
H			
HiLoad	84-87, 90, 91, 126, 176, 179, 181		
HiLoad 16/10 Q Sepharose High Performance	85, 86, 126, 181		
HiLoad 16/10 SP Sepharose High Performance	85, 87, 181		
HiLoad 26/10 Q Sepharose High Performance	85, 86, 181		
HiLoad 26/10 SP Sepharose High Performance	85, 87, 181		
HiPrep	39, 94-96, 98-103, 105, 106, 110, 111, 124, 127, 141, 148, 157, 158, 176, 179, 181, 182		
HiPrep 16/10 ANX FF (high sub)	96, 181		
HiPrep 16/10 CM FF	96, 100, 179, 181		
HiPrep 16/10 DEAE FF	96, 179, 181		
HiPrep 16/10 Q FF	95, 98, 179, 181		
HiPrep 16/10 Q XL	106, 124, 181		
HiPrep 16/10 SP FF	95, 181		
HiPrep 16/10 SP XL	106, 182		
HiPrep 26/10 Desalting	127, 141, 157, 158, 179, 182		
HiTrap	29-32, 39, 45, 69, 84, 85, 87-91, 93-103, 105-107, 109-111, 124, 141, 142, 145, 153, 157-159, 162, 167, 168, 176, 178, 179, 181, 182		
HiTrap ANX FF (high sub)	96, 181		
HiTrap CM FF	96, 179, 181		
HiTrap DEAE FF	95, 96, 179, 181		
HiTrap Desalting	141, 142, 145, 153, 157-159, 179, 182		
HiTrap IEX Selection Kit	30, 124, 162, 181		
HiTrap Q FF	93, 95, 98, 179, 181		
HiTrap Q HP	45, 85, 88, 89, 179, 181		
HiTrap Q XL	94, 106, 107, 181		
HiTrap SP FF	95, 179, 181		
HiTrap SP HP	85, 87, 88, 89, 179, 181		
HiTrap SP XL	97, 106, 107, 182		
L			
LabMate PD-10 Buffer Reservoir	182		
M			
Mini Q	16, 29, 61-63, 65, 66, 180		
Mini Q 4.6/50 PE	61, 62, 180		
Mini Q PC 3.2/3	61, 63, 180		
Mini S	61-63, 65, 66, 180		
Mini S 4.6/50 PE	61, 62, 180		
Mini S PC 3.2/3	61, 62, 63, 180		
MiniBeads	21, 26, 27, 29, 47, 60, 63, 64, 66, 67, 123, 125, 127, 176, 179, 180		
Mono P	129, 132-138, 141, 143, 148-150, 183		
Mono P 5/200 GL	132, 134, 136-138, 141, 148-150, 183		
Mono P 5/50 GL	132, 134, 136-138, 141, 148-150, 183		
Mono Q	16, 29, 38, 43, 67-70, 73, 132, 179, 180		
Mono Q 10/100 GL	68, 180		
Mono Q 4.6/100 PE	68, 180		
Mono Q 5/50 GL	38, 68-70, 180		
Mono Q HR 16/10	68, 180		
Mono S	67-70, 73, 127, 132, 179, 180		
Mono S 10/100 GL	68, 180		
Mono S 4.6/100 PE	68, 180		
Mono S 5/50 GL	68-70, 127, 180		
Mono S HR 16/10	68, 180		
MonoBeads	21, 22, 25-27, 29, 47, 60, 67, 68, 71-73, 123, 125, 127, 132, 176, 180		
P			
PBE 118 Polybuffer exchanger	129, 132-134, 136, 139, 141, 143, 148-150, 183		
PBE 94 Polybuffer exchanger	129, 132-137, 139, 141, 148-150, 183		
PD-10 Desalting column	88, 182		
Pharmalyte pH 8-10.5	133, 134, 138, 139, 143, 183		
Polybuffer 74	133-136, 138-140, 150, 183		
Polybuffer 96	129, 133-135, 138-140, 150, 183		
Q			
Q Sepharose Big Beads	114, 116, 117, 182		
Q Sepharose Fast Flow	16, 23, 29, 93-95, 98, 103, 181		
Q Sepharose High Performance	16, 29, 85, 86, 92, 125, 126, 181		
Q Sepharose XL	16, 29, 105, 106, 108, 111, 112, 181, 182		
Q Sepharose XL virus licensed	105, 106, 108, 182		
R			
RESOURCE	16, 29, 31, 62, 74-76, 78, 80-82, 176, 180		
RESOURCE Q	16, 29, 74-76, 78, 180		
RESOURCE S	31, 75, 76, 78, 180		
S			
SOURCE	21, 22, 25, 27, 29, 41, 47, 51, 69, 74-83, 125, 127, 147, 151, 176, 180		
SOURCE 15Q	69, 75, 76, 79, 82, 180		
SOURCE 15Q 4.6/100 PE	69, 75, 180		
SOURCE 15S	75, 77, 82, 180		
SOURCE 15S 4.6/100 PE	75, 180		
SOURCE 30Q	29, 47, 75, 77, 82, 180		
SOURCE 30S	41, 75, 79, 82, 180		
SP Sepharose Big Beads	114, 116, 117, 182		
SP Sepharose Fast Flow	23, 95, 97, 103, 104, 107, 181		
SP Sepharose High Performance	85, 87, 92, 181		
SP Sepharose XL	106, 111, 112, 181, 182		
T			
The Movie	162, 182		
Tricom	9, 61, 68, 70, 75, 76, 85, 97, 106, 136, 162, 164, 182		

Mini Q, Mini S, Mono Q, Mono S, Mono P, RESOURCE, SOURCE, Sepharose, BioProcess, HiTrap, HiLoad, HiPrep, Tricorn, FPLC, MiniBeads, MonoBeads, ÄKTA, ÄKTAexplorer, ÄKTApurifier, Sephadex, Sephacel, Sephacryl, BPG, Pharmalyte, ÄKTAprime, ÄKTApilot, STREAMLINE, Hybond, ECL, ECL Plus, Superdex, PhastGel, PlusOne, PhastSystem, BioDirectory, FineLINE and Drop Design are trademarks of Amersham Biosciences Limited.

Amersham and Amersham Biosciences are trademarks of Amersham plc.

Multipipette is a trademark of Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH.

Tween is a trademark of ICI Americas Inc.

Coomassie is a trademark of ICI plc.

Tris and Triton X-100 are trademarks of Rohm & Haas.

MicroSpin is a trademark of Lida Manufacturing Corp.

All goods and services are sold subject to the terms and conditions of sale of the company within the Amersham Biosciences group, which supplies them. A copy of these terms and conditions is available on request. © Amersham Biosciences Limited 2004 - All rights reserved.

Amersham Biosciences AB, Björkgatan 30, SE-751 84 Uppsala, Sweden

Amersham Biosciences UK Limited, Amersham Place, Little Chalfont, Buckinghamshire HP7 9NA, England

Amersham Biosciences Corp., 800 Centennial Avenue, PO Box 1327, Piscataway NJ 08855, USA

Amersham Biosciences Europe GmbH, Munzinger Strasse 9, D-79111 Freiburg, Germany

Amersham Biosciences K.K., Sanken Bldg. 3-25-1, Hyakunincho Amersham Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan

www.gehealthcare.com
www.chromatography.amershambiosciences.com

