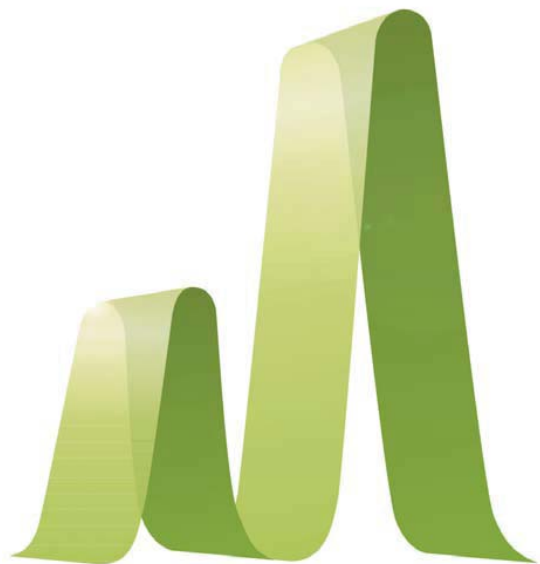


GE Healthcare



凝胶过滤

原理和方法



通用电气医疗集团公司出版的各种手册



蛋白纯化
手册
18-1132-29

凝胶过滤
原理和方法
18-1022-18

亲和层析
原理和方法
18-1022-29

抗体纯化
手册
18-1037-46

Percoll
方法和应用
18-1115-69

离子交换层析
原理和方法
11-0004-21

GST基因融合系统
手册
18-1157-58

疏水相互作用和反相层析
原理和方法
11-0012-69

双向电泳
固相等电点梯度
原理和方法
80-6429-60

微载体细胞培养
原理和方法
18-1140-62

挑战蛋白纯化
手册
28-9095-31

重组蛋白纯化手册
原理和方法
18-1142-75

凝胶过滤

原理和方法

目 录

前言.....	8
符号.....	9
常用缩写.....	10
第一章	
凝胶过滤实践.....	11
前言.....	11
凝胶过滤分离.....	11
凝胶过滤分辨率.....	15
柱料选择.....	18
样品制备.....	22
缓冲液组成和制备.....	23
变性剂(离液剂)和去污剂.....	24
柱子和柱料的准备.....	25
样品进样.....	25
洗脱和流速.....	25
高分辨率组分收集的方法研发.....	28
凝胶过滤柱料的维护.....	28
仪器选择.....	29
按比例放大.....	29
大规模生产的BioProcess柱料.....	31
故障排除.....	31
第二章	
凝胶过滤柱料.....	37
凝胶过滤柱料的组成.....	37
Superdex: 高分辨率、省时和高回收率的第一选择.....	38
分离选择.....	40
分离样品.....	41
运行分离.....	44
清洗.....	45
柱料特性.....	46
化学稳定性.....	46
储存.....	46
Sephacryl: 实验室和工业规模的快速、高回收率分离.....	47
分离选择.....	50
分离样品.....	50
运行分离.....	51

清洗	52
柱料特性	53
化学稳定性	53
储存	53
Superose: 广泛的分离范围, 但不适合工业规模的分离	54
分离选择	55
分离样品	56
运行分离	56
清洗	57
柱料特性	58
化学稳定性	58
储存	58
Sephadex: 高或低分子量物质的快速组群分离, 如除盐、缓冲液交换和样品净化	59
分离选择	61
分离样品	63
运行分离	63
扩大规模处理大体积样品	68
柱料特性	70
装柱	70
清洗	70
化学稳定性	71
储存	71

第三章

凝胶过滤理论	72
定义过程	72
选择性曲线和柱料的选择	75
分辨率	76

第四章

分子量判定和分子量分布分析	79
---------------------	----

第五章

Sephadex LH-20	81
分离选择	82
分离样品	82
装柱	83
运行分离	84
清洗	84
柱料参数	84
化学稳定性	85

储存	85
在有机溶剂之间转移Sephadex LH-20	85

第六章

纯化策略中的凝胶过滤 (CIPP)	87
应用CIPP	87
纯化技术的选择和组合	88
精制步骤中的凝胶过滤	91

附录1

装柱和准备	93
用来凝胶过滤柱料装柱的柱子	93
检测柱效	95
使用Superdex制备级和Sephacryl高分辨率进行高分辨率组分装柱	95
使用Sephadex进行组群分离装柱	98

附录2

Sephadex和Darcy法则	102
-------------------------------	------------

附录3

样品制备	103
样品稳定性	103
样品的澄清	104
特殊样品的制备步骤	105
脂蛋白的去除	108
酚红的去除	108
低分子量污染物的去除	108

附录4

纯化设备的选择	109
----------------------	------------

附录5

线性流速 (cm/h) 与体积流速 (ml/min) 之间的相互转换	110
---	------------

附录6

数据转化: 蛋白, 柱压	111
---------------------------	------------

附录7	
氨基酸一览表.....	112
附录8	
纯化过程中的分析实验.....	114
附录9	
生物学样品的储存.....	116
补充读物和参考资料.....	117
订货信息.....	118

前言

表1总结了根据生物分子的不同特性应用色谱技术进行纯化的常用方法。

性质	技术
大小	凝胶过滤（GF），也叫分子筛
电荷	离子交换色谱（IEX）
疏水性	疏水相互作用色谱（HIC） 反相色谱（RPC）
生物识别（配基特异性）	亲和色谱（AC）

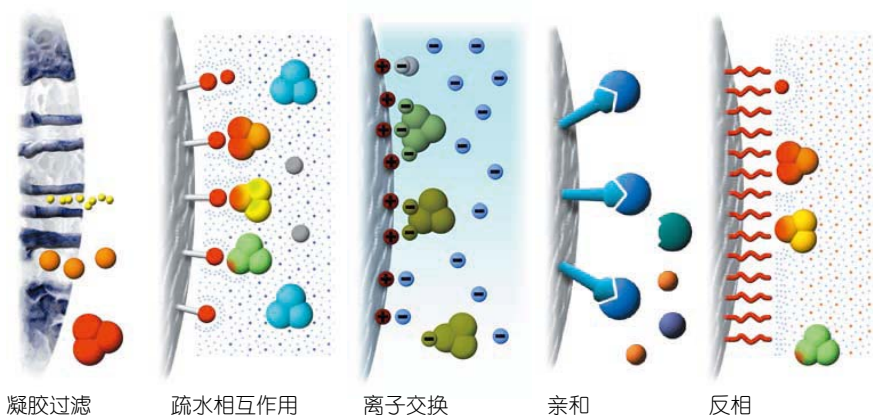


图1 色谱纯化的分离原则

自从Sephadex™投入应用，已经40多年，凝胶过滤在酶、多糖、核酸、蛋白和其它生物大分子的纯化方面发挥了重要作用。凝胶过滤是最简单和温和的色谱技术，根据分子的大小差异进行分离。凝胶过滤主要可以应用在两个领域：

1. 组群分离：根据大小范围将样品的成分分离为两个主要组群。组群分离可以用来去除高分子或低分子污染物（如细胞培养液中的酚红），或者进行除盐和缓冲液交换。
2. 生物分子高分辨率组分收集：根据生物分子的分子量差异将样品成分进行分离。高分辨率组分收集可以用来分离一种或多种组分，从聚合物中分离单体，测定分子量或进行分子量分布分析。

通过小心控制改变缓冲液条件，凝胶过滤也可以用来促进变性蛋白的重新折叠。

凝胶过滤非常适合处理对pH变化、金属离子或辅助因子浓度以及大环境情况敏感的生物分子，可以根据实验需要在存在必需离子或辅助因子、去污剂、尿素、盐酸胍、高或低离子强度、37摄氏度或寒冷的房间进行生物分子的分离。

本手册描述了使用凝胶过滤进行纯化和分离生物分子，重点在于如何获得最佳结果的实际使用信息。本手册包含了可供选择的柱料、选择策略、最经常使用的具有详细指导的实例，技术后面也有理论和原则。成功分离的第一步是选择正确的柱料，本手册重点介绍了最新的凝胶过滤柱料和预装柱。

通用电气医疗集团凝胶过滤柱料的生物兼容性、稳定性和实用性，使这些产品成为实际使用此技术的每个实验室的标准选择。多种多样的可随时使用的预装柱产品可供选择。

内页中展示的通用电气医疗集团提供的各种手册保证了色谱和其它的分离技术在任何规模、任一实验室、任何应用能够得到容易和有效的使用。

符号



这个符号给出一般能改善方法的建议，并提供关于在特定情况下操作的推荐值。



这个符号指出的建议应当认为是必须遵循的，并且在操作中应该特别注意时，它会给出警告。



这个符号给出排除故障提示，以帮助分析和解决有可能发生的任何困难。



化学品、缓冲液和设备。



实验操作规程。

常用缩写

色谱

GF: 凝胶过滤 (有时写作SEC: 分子筛色谱)

IEX: 离子交换色谱 (也写作IEC)

AC: 亲和色谱

RPC: 反相色谱

HIC: 疏水相互作用色谱

CIPP: 捕获、中度纯化、精制

MPa: 兆帕

psi: 每平方英寸磅

SDS: 十二烷基硫酸钠

CIP: 原位清洗

A_{280nm} , A_{214nm} : 特定波长的紫外吸收

M_r : 相对分子量

N: 柱效, 以每米理论塔板数表示

V_e : 色谱测量的洗脱体积, 与生物分子的分子量相关

V_o : 无效体积, 即无法进入凝胶过滤柱料的分子的洗脱体积, 由于它们比柱料中最大的孔都要大, 所以直接从柱床中流过

V_i : , 相当于装柱柱床体积 (也写作CV)

R_s : 分辨率, 峰之间分离程度

K_{av} 和 $\log M_r$: 分配系数和对数分子量, 定义凝胶过滤柱料选择的术语

产品名

HMW: 高分子量

LMW: 低分子量

HR: 高分辨率

pg: 制备级

PC: 精密柱

第一章

凝胶过滤实践

前言

凝胶过滤根据分子通过已装柱凝胶柱料大小不同而对其进行分离。不像离子交换或者亲和层析，分子不与层析柱料结合，因此，缓冲液成分不直接影响分辨率（峰之间的分离程度）。因而，凝胶过滤的显著优势在于，分离条件可因不同样品类型或进一步纯化、分析以及储存的需要而不同，而无需修改分离条件。

凝胶过滤非常适合对pH变化、金属离子或辅助因子浓度以及大环境情况敏感的生物分子。可以根据实验需要在存在必需离子或辅助因子、去污剂、尿素、盐酸胍、高或低离子强度、37摄氏度或寒冷的房间进行生物分子的分离。纯化的蛋白可以在任何选定的缓冲液中进行收集。

本章提供了关于凝胶过滤分离的常规指导。成功分离的第一步是选择正确的柱料，因此本章包含了对于最新的凝胶过滤柱料和预装柱的介绍。其它应用实例和产品特异性在第二章予以介绍。

凝胶过滤分离

为了进行分离，凝胶柱料被装柱形成柱床。柱料是球状颗粒的多孔柱料，根据其化学和物理稳定性以及惰性（没有反应性和吸附性）进行的选择。柱床用填充柱料的孔和颗粒之间空隙的缓冲液进行了平衡。孔间的液体有时被称作固定相，颗粒之外的用来平衡的液体被称作流动相。值得强调的是，样品是进行同溶剂洗脱，即，在分离过程中不需要使用不同的缓冲液。然而，在分离的后期通常需要使用流动的缓冲液，以便移除柱中残余的分子，使柱子可以用于下一次分离。图2显示了用来描述分离的最常用术语。图3显示了凝胶过滤的分离过程。

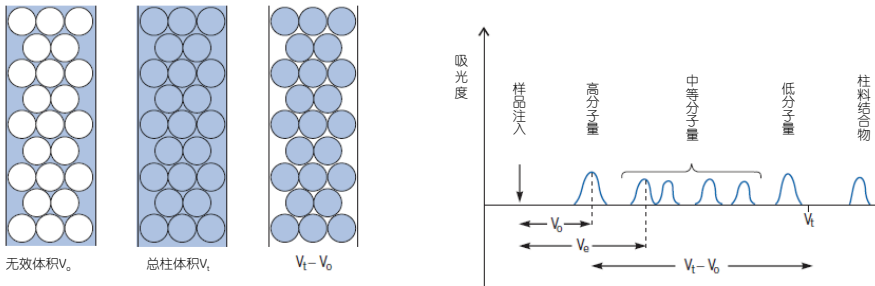


图2 凝胶过滤常用术语



1. 球状的凝胶过滤柱料颗粒。



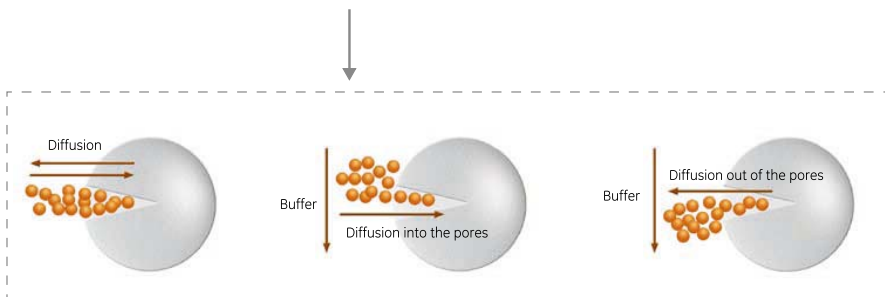
2. 样品上柱。



3. 缓冲液（流动相）和样品流过柱子。分子进入或不进入柱料的孔中（也被描述成样品在移动相和固定相中进行分离）。小一些的分子移动得更远进入柱料，在柱子中停留时间更长。



4. 当缓冲液持续流过柱子，大于柱料孔的分子不能进入孔中，流过柱子。小分子进入孔中，延时流过柱子。



5. 大分子首先离开柱子，紧接着依次是小一些分子。全部分离过程需要一个全柱体积（相当于柱床体积）的缓冲液通过凝胶过滤柱料。

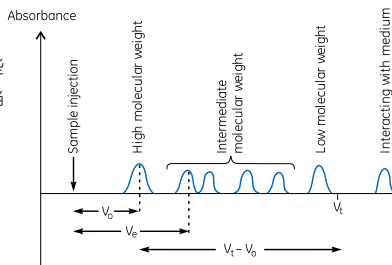


图3 凝胶过滤的过程

组群分离

凝胶过滤组群分离模式可以用来从一组较大的分子中去除小分子，或者快速、简单的进行缓冲液的交换。小分子如过多的盐（除盐）或游离的标记物很容易被分离。样品可以制备来进行储存或其它的色谱技术和实验。凝胶过滤组群分离模式经常用来进行蛋白纯化设备的除盐或缓冲液交换。更多详细信息参见第二章57页，以及通用电气医疗集团的蛋白质纯化手册。

Sephadex G-10, G-25和G-50用来进行组群分离。高达30%总柱体积（柱床）的大样品体积可以高流速用在宽广短柱上。图4显示了典型组群分离的洗脱图谱（色谱）。大分子随着缓冲液流动以相同速度通过柱子时，在无效体积 V_0 或刚刚在无效体积之后被洗脱。对于一个装的非常好的柱子，无效体积近似于30%的总柱体积。小分子如盐已经完全进入柱孔中，彼此没有分离。这些分子通常在一个总柱体积 V_t 缓冲液经过柱子之前被洗脱。在这个例子中，蛋白通过监测它们的紫外吸收被检测，通常在 A_{280nm} ，而盐通过监测缓冲液的电导率被检测。

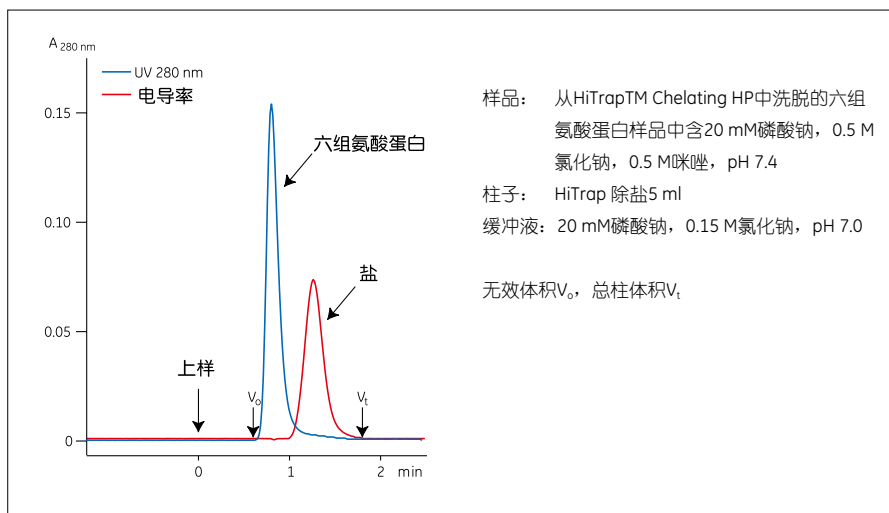


图4 组群分离的典型图谱。紫外UV（蛋白）和电导率（盐）轨迹能够同时进行除盐组分收集和方便进行分离优化。

参考第二章57页获得高分子量和低分子量底物组群分离的详细信息，包括使用Sephadex进行除盐、缓冲液交换和样品净化。

参考第三章获得凝胶过滤理论的详细信息。

高分辨率组分收集

凝胶过滤组分收集模式根据大小用来分离样品中多种组分。实验目的可以用来分离一种或多种成分，确定分子量，或分析样品中分子量的分布（参考第四章获取分子量测定或分布分析的详细信息）。仅具有少量组分或已经用其它色谱技术进行部分纯化的样品（为了去除具有相似大小分子量，却不是感兴趣的蛋白）可以获得高分辨率组分收集的最好结果。

凝胶过滤高分辨率组分收集最适合应用于纯化策略的最后精制步骤。单体可以与聚合体分开（其它的技术很难完成），样品也可转换到合适的缓冲液来进行实验或者储存。凝胶过滤可以直接应用于其它的色谱技术，如离子交换、色谱聚焦、疏水相互作用或亲和，由于任何洗脱缓冲液的成分都不会影响最终的分离。为了更多的了解凝胶过滤在纯化策略中的应用细节，参考第六章和通用电气医疗集团的蛋白纯化手册。

图5显示了高分辨率组分收集的理论洗脱图谱（色谱图）。没有进入柱料的分子随着缓冲液流动以相同速度通过柱子时，在无效体积 V_0 被洗脱。对于一个装的非常好的柱子，无效体积近似于30%的总柱体积（柱床）。部分进入柱料孔中的分子按照递减的大小从柱子中洗脱。小分子（如盐）全部进入孔中向下流出柱子，彼此之间不能进行分离。这些分子通常在一个总柱体积 V_t 的缓冲液经过柱子前被洗脱。

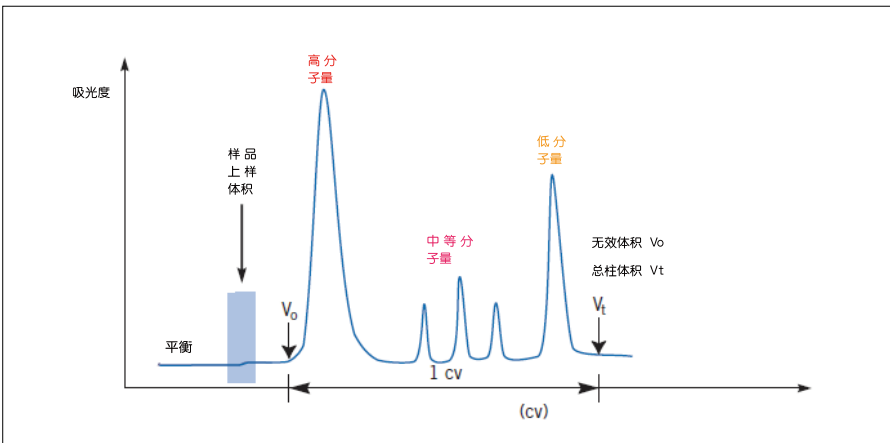


图5 高分辨率组分收集的理论色谱图（紫外吸光度）

凝胶过滤分辨率

许多因素影响最终的分辨率（凝胶过滤分离峰之间的分离程度）：样品体积，样品体积和柱子体积之间的比例，柱子的直径，颗粒大小，颗粒大小分布，装柱密度，颗粒孔的大小，流速以及样品和缓冲液的粘度。选择柱料时，可以参考凝胶过滤柱料可以分离的分子量范围（参见第18页凝胶过滤柱料选择指导）。如图6显示，分辨率具有柱料选择性和柱料产生窄峰效率性（最小峰宽）的作用。在分离过程中，凝胶过滤成功主要依赖于选择能够产生足够的选择性和较窄峰宽的条件。

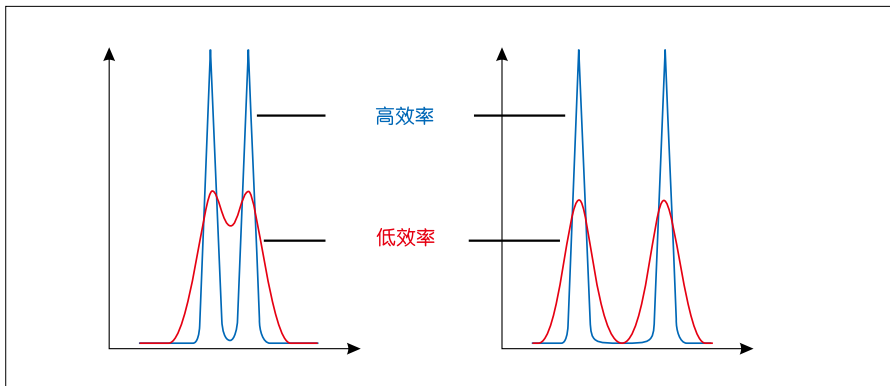


图6 分辨率取决于选择性和较窄峰宽

在根据正确选择性选择凝胶过滤柱料后，样品体积和柱子的直径成为影响分离时分辨率的两个最关键参数。

样品体积和柱子直径

样品体积用总柱体积（柱床）的百分率来表示。如果相距较近一些的空间峰被洗脱，使用更小的样品体积可以帮助避免这些峰之间的相互重叠。图7显示了样品体积如何影响高分辨率的组分收集。

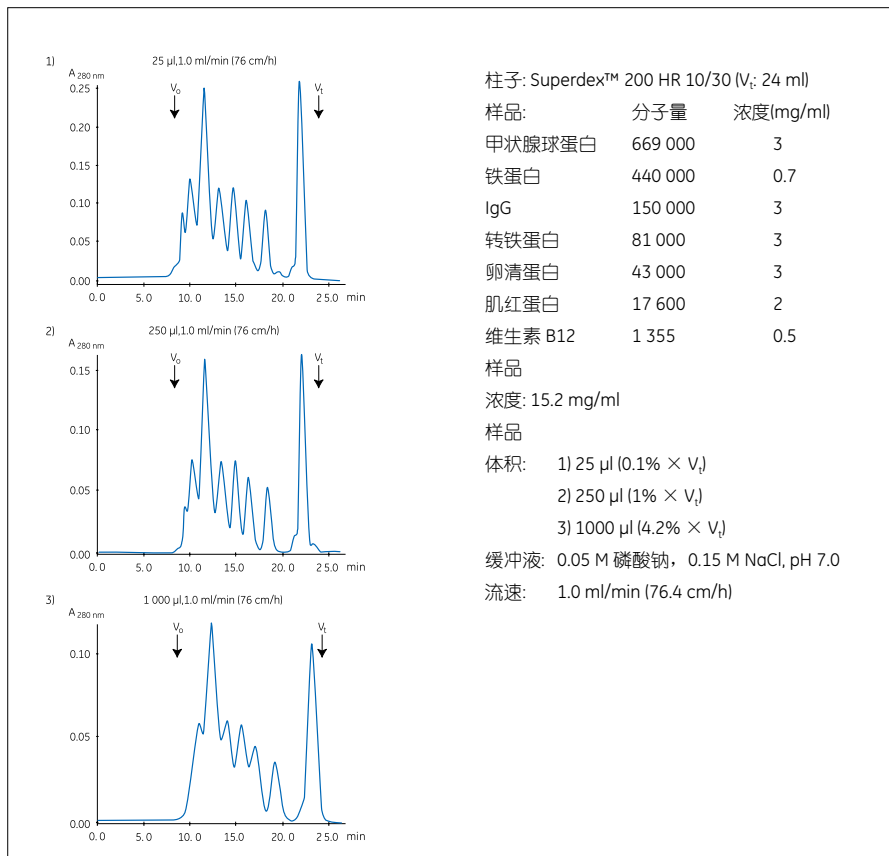


图7 样品体积对分辨率的影响



对于组群分离，可以使用高达总柱体积30%的样品体积。



对于高分辨率组分收集，推荐使用总柱体积0.5-4%的样品体积，不同比例取决于柱子的类型。对于大多数应用来说，为了获得最大的分辨率，样品体积不应当超过2%。根据特殊样品的自然特性，可能允许上更大的样品体积，尤其是感兴趣的峰可以有很好的分辨率。这些都取决于实验。

- 对于分析分离和复杂样品分离，起始用相当于0.5 %总柱体积的样品体积。低于0.5 %总柱体积的样品体积通常不能提高分辨率。
- 为了增加凝胶过滤分辨能力，样品可以浓缩。避免浓度高于70 mg/ml蛋白，因为粘度效应会干扰分离。
- 样品的稀释是不可避免发生的，因为样品经过柱子时会发生稀释。为了尽量减少样品稀释，使用可以区分感兴趣峰所需分辨率的最大样品体积。
- 样品体积和柱体积比影响分辨率，如图8a和8b所示，越高的样品体积和柱体积比，越低的分辨率。柱体积通常根据需要处理的样品体积进行选择。然而，由于越大的样品体积可能需要非常大的柱体积，我们有理由相信，用小柱子重复分离数次，把这几次的感兴趣的组分合并，或者进行浓缩，会更有利（参见附录3样品制备）。

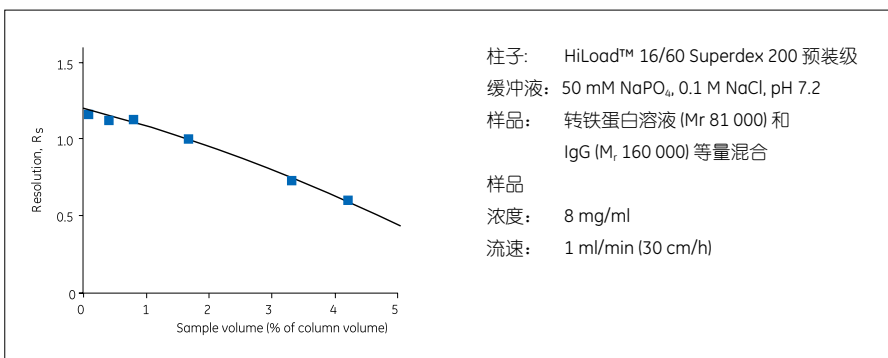


图8a 样品体积对HiLoad™ 16/60 Superdex 200 预装级预装柱分离转铁蛋白和IgG分辨率的影响

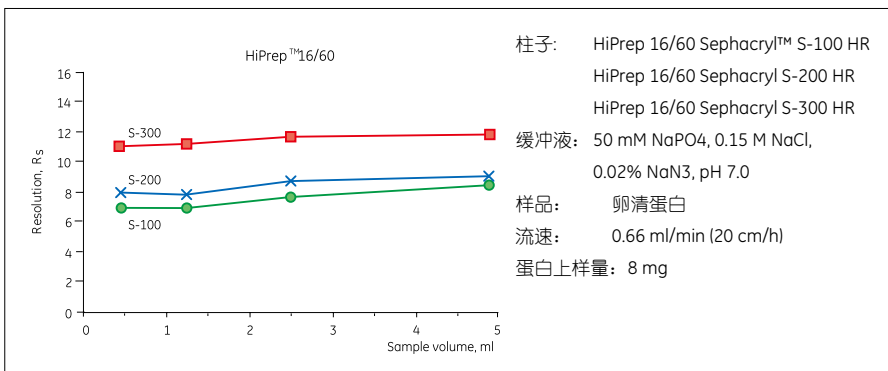



图8b样品体积对不同HiPrep 16/60 Sephacryl高分辨率预装柱分离卵清蛋白和IgG分辨率的影响

柱床的高度不仅影响分辨率还影响洗脱花费的时间。凝胶过滤分辨率随着柱床高度平方英尺而增加。柱床高度增加一倍，分辨率增加 $\sqrt{2}=1.4$ （40%）。对于高分辨率组分收集，长柱子会有最好的结果。30-60厘米的柱床会是令人满意的。足够的柱床高度和低流速为所有的“中等”分子进入或移出柱料孔提供了充分的时间，可以有足够的分辨率。

 如果确定必须需要一个非常长的柱子，可以使用多根柱子，装有相同的柱料，两两相连，增加有效柱床的高度。

参考第三章关于凝胶过滤理论的详细信息。

柱料选择

凝胶过滤色谱柱料是选用惰性和化学及物理稳定多孔柱料制造的。颗粒内孔的大小和颗粒大小的分布严格控制，以便生产适应不同应用需要的柱料供选择。现有的凝胶过滤柱料覆盖的分子量范围从100到80 000 000，从肽段到非常大的蛋白质和蛋白复合物。

凝胶过滤的柱料选择仅仅取决于它的孔大小分布，可以用选择性曲线描述。凝胶过滤柱料提供选择性的相关信息，如图9显示的Superdex。通过测量分配系数 K_{av} 相对于一套标准蛋白的分子量的对数的变化描点作图，可以获得选择性曲线（参见第三章凝胶过滤理论中 K_{av} 的计算）。

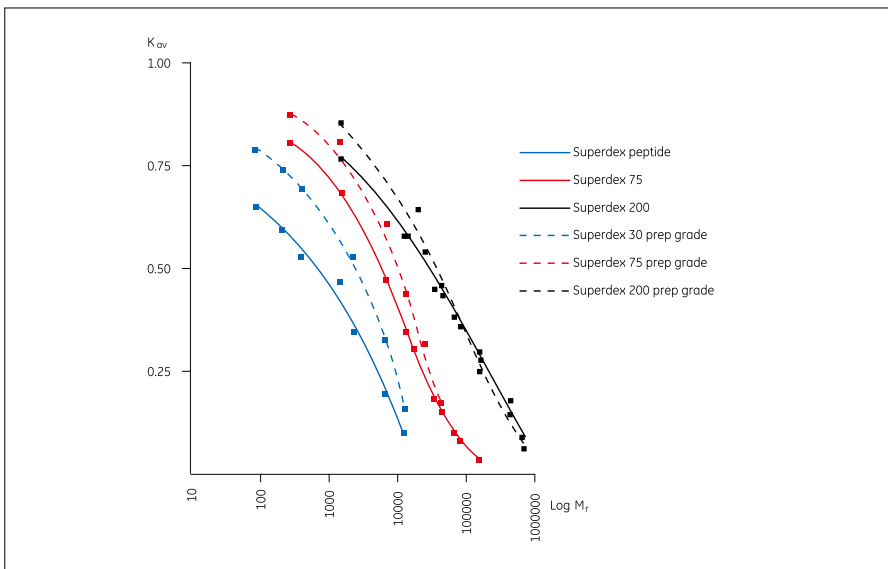


图9 Superdex的选择性曲线

选择性曲线通常在 $K_{av} = 0.1$ 到 $K_{av} = 0.7$ 之间线性关系非常好，这部分曲线通常经常用来决定凝胶过滤柱料的组分分离范围（图10）。

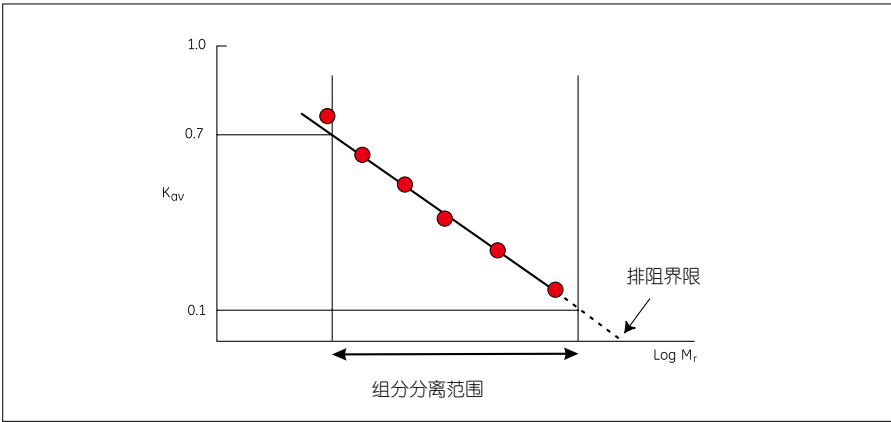


图10 应用选择性曲线定义组分分离范围和排阻界限

组分分离范围决定了可以部分进入柱料孔中的分子量范围，就是说这个范围的分子可以进行高分辨率的组分分离。凝胶过滤柱料的排阻界限，也由选择性曲线决定，显示了被排除在柱料孔之外的分子大小，因而在无效体积被洗脱。



选择性曲线越陡峭，获得的分辨率越高。

当选择合适的柱料时，主要考虑两个因素：

1. 实验目的（高分辨率或者组群分离）。
2. 将要分离目标蛋白和污染物的分子量范围。

最终的纯化规模也要考虑。

下页的图11一步步给出了柱料的选择指导。

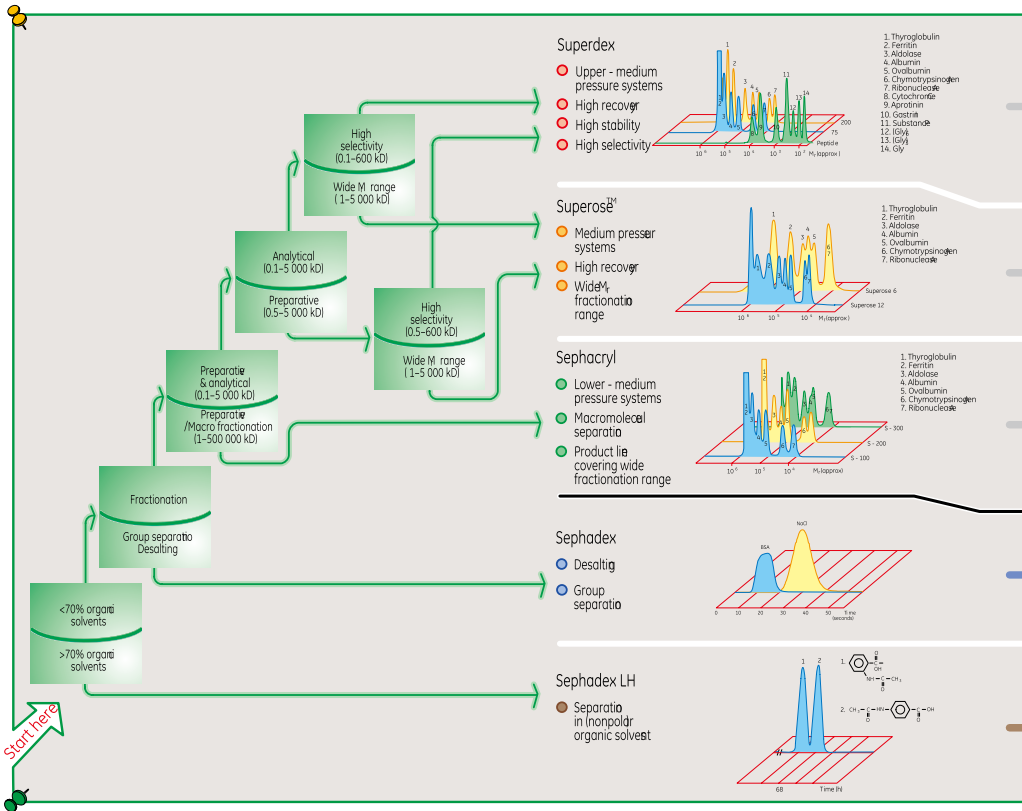
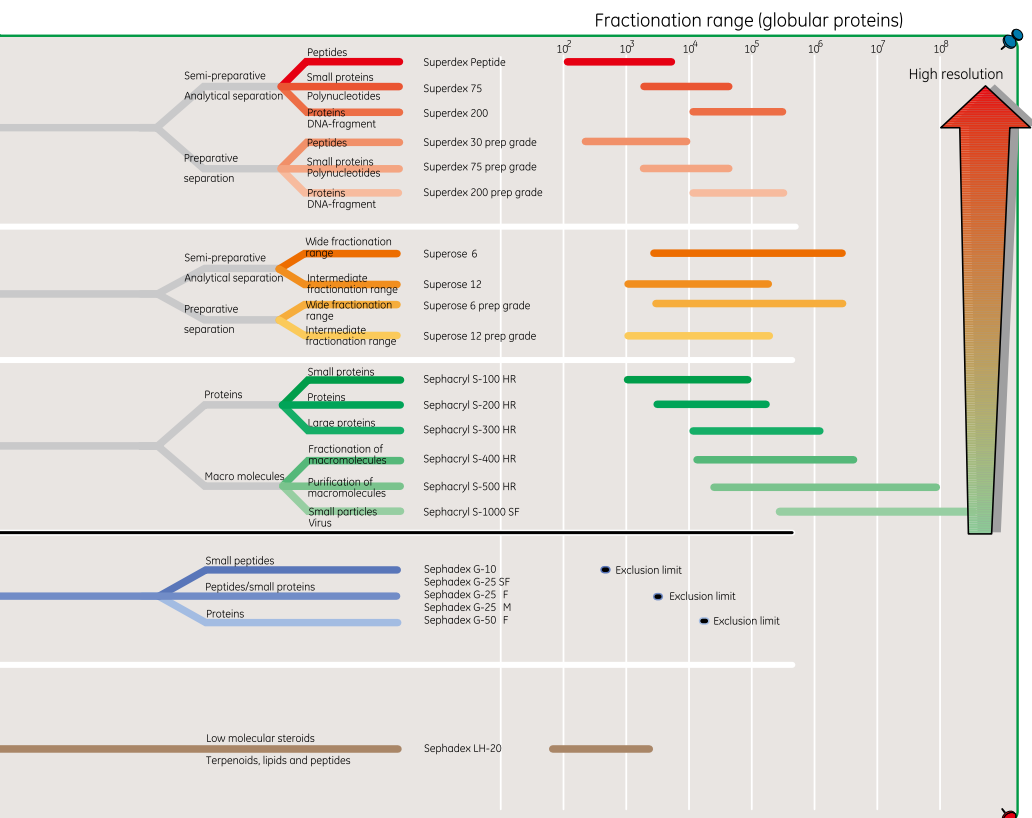


图11 凝胶过滤柱料选择指导

- Superdex是高分辨率、短运行时间和高回收率的第一选择。
- Sephacryl适合实验室和工业规模的快速、高回收率分离。
- Superose提供了广泛的组分分离范围，但是不适合大规模或者工业规模的分离。

选定Superdex、Sephacryl或者Superose后，选择组分分离范围涵盖你的样品感兴趣的分子量的柱料。当两个柱料有相似的组分分离范围：选择样品中所有成分都有最好分辨率的最陡峭的选择性曲线的柱料。如果你对特殊的成分感兴趣，选择目标成分的对数分子量落在选择性曲线中间的柱料。



Sephadex对于快速组群分离非常适合，如除盐或者缓冲液交换。Sephadex可以在实验室或者生产规模使用，也可用于其它色谱纯化技术之前、之中或者之后。

- Sephadex G-25主要在涉及球蛋白组群分离时推荐使用。此柱料尤其适合分子量大于5000分子的除盐和其它小分子污染物的去除。
- Sephadex G-10非常适合分离生物分子，如从小分子（分子量大于100）中分离肽段（分子量大于700）。
- Sephadex G-50非常适合从小分子（分子量小于1 500）中分离大分子（分子量大于30 000），如从游离的标记物中分离标记的蛋白或DNA。

对于组群分离，选择凝胶过滤柱料，大分子量分子在无效体积被洗脱，有最小的峰宽或稀释以及最少的过柱时间。最小的分子量底物在一个柱体积缓冲液经过柱料时被洗脱出现。

样品制备

正确的样品制备对于凝胶过滤非常重要。在样品上柱之前简单几步净化就可以避免柱子阻塞、减少严格的清洗步骤，并且延长已经装柱料的使用时间。



样品必须澄清，没有颗粒状物，尤其使用34微米及以下大小柱料时必须注意。



附录3含有样品制备技术概述。小体积样品使用醋酸纤维素膜或PVDF膜注射器过滤器会有效。

样品缓冲液组成

样品缓冲液的pH、离子强度和组成不会显著性的影响分辨率，只要这些参数不改变被分离蛋白质的大小和稳定性，也不超出凝胶过滤柱料的稳定范围。样品不需要在用来平衡和流过柱子的相同缓冲液中。样品在分离过程中交换为流动相缓冲液，这是凝胶过滤分离的一个附加优势。

样品浓度

凝胶过滤与样品质量无关，因此与样品浓度也没有关系，这可以从图12中看出来。因此，只要选用了合适的柱料，尽管使用高样品浓度和高流速，仍然可以获得高分辨率。

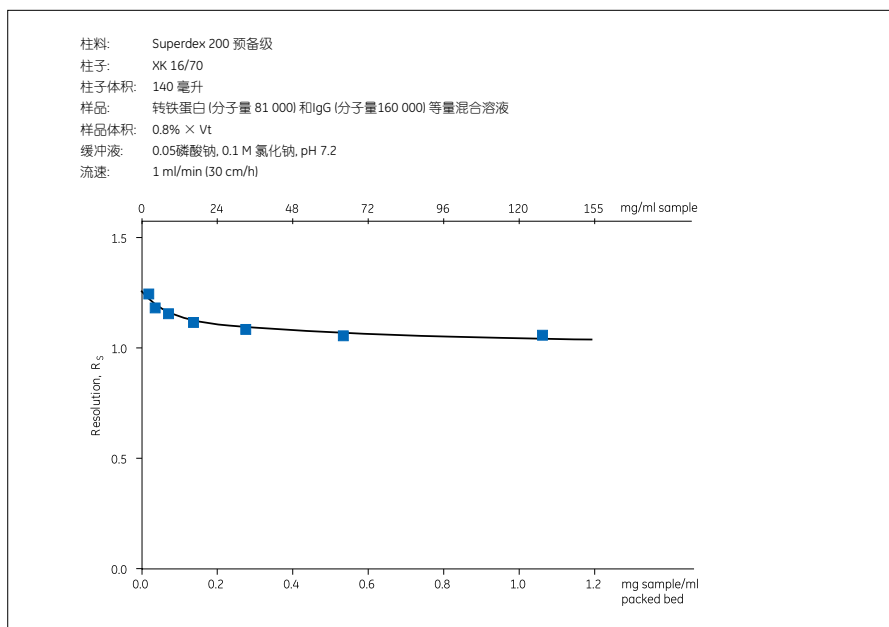


图12 样品浓度对Superdex 200 预备级柱料分离转铁蛋白和IgG的分辨率的影响

然而，样品的溶解性和粘度能够限制可以使用的样品浓度。关键的变量是样品相对于流动相的粘度，图13显示了血红蛋白和氯化钠在不同样品粘度时洗脱谱的变化。

太高的样品粘度引起分离的不稳定和规则的流动形式。这将导致非常宽和成串的峰形，反压也会增加。

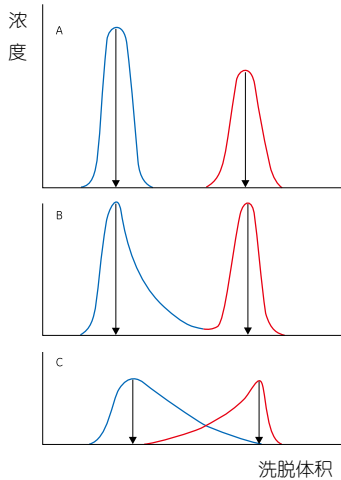


图13 血红蛋白（蓝色）和氯化钠（红色）分离获得的洗脱图谱。除了通过加入逐渐增量的葡聚糖引起粘度的变化外，其它实验条件完全相同。分离结果的恶化程度是显而易见的。（即使减慢流速也无法改善分离情况。）

样品通常不要超过70 mg/ml蛋白浓度。可以稀释黏性样品，但是要注意样品体积（参考14页获取更多关于样品体积重要性的信息）。记住粘度会随着温度而变化。




样品体积

在凝胶过滤中，样品体积是最重要的参数之一。参考14页获取更多信息。

缓冲液组成和制备

在凝胶过滤中，缓冲液的组成不直接影响获得的分辨率，由于分离应该只依赖于不同分子的大小。关于缓冲液的最重要的考虑是，缓冲液组成对感兴趣的分子的形状和生物学活性的影响。例如，缓冲液pH和离子强度的变化，变性剂或去污剂的出现，可以引起构象的变化，蛋白解聚为亚单位，酶或辅助因子的解离，激素与载体蛋白的分离等。

选择缓冲液和pH可以使蛋白保持稳定性和活性，并且感兴趣的产品可以在其中能够收集。使用缓冲液浓度足够维持缓冲能力和恒定pH。使用高达0.15M 氯化钠以避免与柱料的非特异离子相互作用（显示为洗脱峰延时）。注意一些蛋白在低离子强度溶液中可能沉淀。如果分离产物需要进行冷冻干燥，使用挥发性溶液，如乙酸胺，乙二胺或者乙二胺酸。


-  使用高质量的水和化学试剂。溶液应当使用0.45微米或者0.22微米的膜过滤。在进行任何凝胶过滤之前，必须去除缓冲液中的气体，因为气泡可以显著的影响过滤过程。如果缓冲液经过真空过滤，就可以除去其中的气体。
-  如果要处理新的样品，首先试着使用下列条件：0.05 M磷酸钠，0.15 M氯化钠，pH 7.0或者选择样品进行下一步处理如纯化、分析或储存时需要的缓冲液进行洗脱。
-  避免pH或其它条件的极端变化，可能引起失活甚至沉淀。如果样品在凝胶过滤柱中发生沉淀，柱子会被堵塞，可能是不可逆转的，这样会造成样品丢失。

变性剂（离液剂）和去污剂


变性剂如盐酸胍或尿素可以用来进行样品的最初溶解，以及在凝胶过滤缓冲液中维持样品的可溶性。然而，因为它们可以使蛋白变性，除非需要进行变性，应当避免使用。


一般来讲，现在的柱料，如Superdex, Sephacryl和Superose，比经典的柱料，如Sephacryl™或Sephadex，更适合在解离或变性的条件以及极端pH值时工作。


去污剂作为助溶剂在增进低水溶性蛋白（如膜组分）的可溶性时非常有效，而且不影响分离。

-  如果变性剂或去污剂必须使用来维持样品的溶解性，它们必须在流动相和样品缓冲液中同时存在。注意高浓度的去污剂会增加缓冲液的粘度，因此，必须使用低流速避免已装柱柱压过大。

如果已经溶解在变性剂或去污剂中的蛋白见到了沉淀，比预计的晚些洗脱，或者发现在凝胶过滤中溶解性很差，在流动相重新加入适量浓度的变性剂或去污剂。

-  尿素或盐酸胍对于分子量测定非常有帮助。流动相中变性剂的出现维护蛋白或多肽处在延伸的构象。对于精确的分子量测定，校准蛋白必须在相同的缓冲液中过柱。

-  注意选择性曲线通常使用球蛋白确定，因此不能反映变性样品的情况。

-  凝胶过滤可以用来改变蛋白的起始溶解条件，例如，溶解在SDS中的样品，改变到更加温和的去污剂如Triton™ X-100中，而不丢失溶解性。

柱子和柱料的准备

凝胶过滤柱料被装入30到60厘米高的柱子进行高分辨率组分收集分离，或者装入10厘米高的柱子进行组群分离。装柱柱床体积取决于要进行分离的样品体积。

高效的装柱是必要的，尤其对于高分辨率组分收集。装柱的效率决定了在洗脱过程中产生狭窄对称峰的能力。在凝胶过滤中柱效尤其重要，由于此分离过程中只有一个柱体积的缓冲液流过柱子。装柱柱床和颗粒的均一性影响流过柱子的一致性，因此影响峰形和最终的峰宽。高度均一的凝胶过滤柱料（较低的颗粒大小分布）有助于分子的窄峰洗脱。参考第三章凝胶过滤理论和附录1获取关于柱效和装柱的更多信息。

通过降低柱料的颗粒大小可以提高柱效。然而，使用越小的柱料颗粒会增加反压，因此流速需要降低，延长运行时间。



为了确保获得最好的效果和重复的结果，强烈推荐预装柱。一个均匀装好的柱子可以确保，当样品流过柱子时，成分峰不会不必要的加宽。非均匀装柱引起峰变宽，获得高分辨率成为不可能的。



在开始分离前，将缓冲液、柱料或预装柱维持在相同的温度。温度的快速交换，例如从冷的房间移出预装柱，而使用室温的缓冲液，会引起装柱中的气泡产生，影响分离。

在使用任何凝胶过滤柱料前，储存溶液和储存剂应当被彻底洗去。开始进行分离之前，使用1到2个柱体积的缓冲液平衡柱子。

样品进样

样品进样方法的选择极大的取决于进样的体积和进样使用的设备。确保样品在此柱子进样方法中不被稀释，在样品进样中柱床顶端不被破坏。样品可以自动或者手工进样。

样品可以通过色谱系统、蠕动泵、或注射器直接上柱。设备的选择极大的取决于柱子的大小，凝胶过滤柱料的类型以及样品的体积。例如，色谱系统需要Superdex柱，而注射器可以和小的预装柱如HiTrap除盐柱一起使用。注意有些预装柱如PD-10除盐柱，样品依赖重力作用进样。

洗脱和流速

使用单缓冲液系统，样品从凝胶过滤柱子中同溶剂洗脱。进样之后，在一个柱体积（相当于一个装柱柱床的体积）的缓冲液流过柱子后，全部分离完成。

为了获得分离，使用适当的流速，确保有足够的时间允许分子可以弥散进入或流出柱料（划分流动相和固定相）。

分离的目的是在尽可能短的时间里获得最高可能的分辨率。图14a, 14b和14c显示随着流速增加分辨率降低，每个分离必须进行条件优化，获得这两个参数的最佳平衡。简单的讲，最高分辨率可以通过使用能够一个长柱子和低流速获得；而通过使用短柱子和高流速可以获得最快的分离运行。一般情况，每个产品都提供了进行高分辨率组分收集或组群分离的适合流速。

高流速（因而可以更快的进行分离）的优势可能比分离分辨率的丢失更有价值。

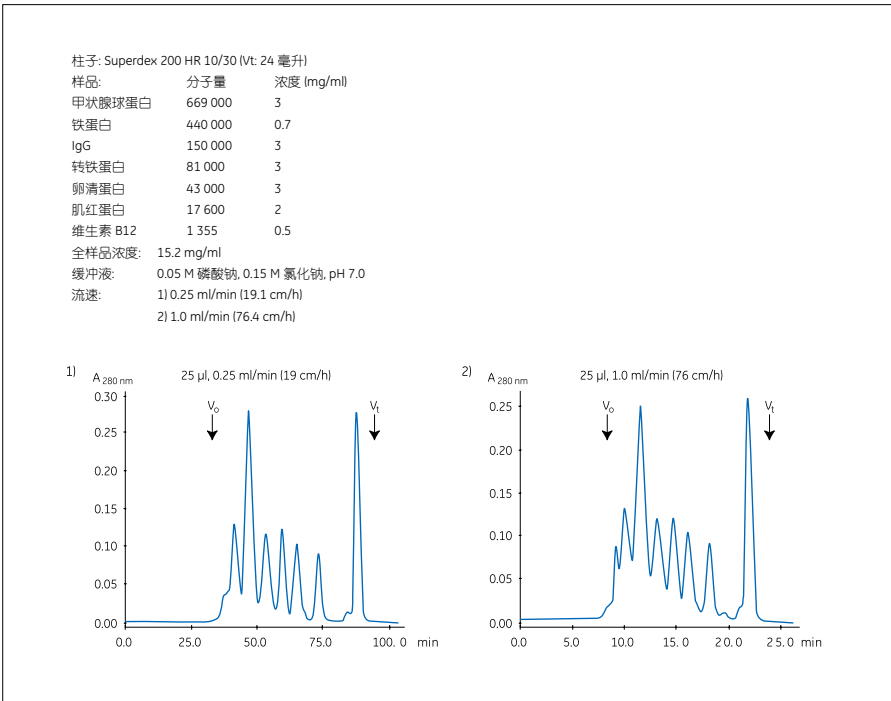


图14a 流速对分辨率的影响

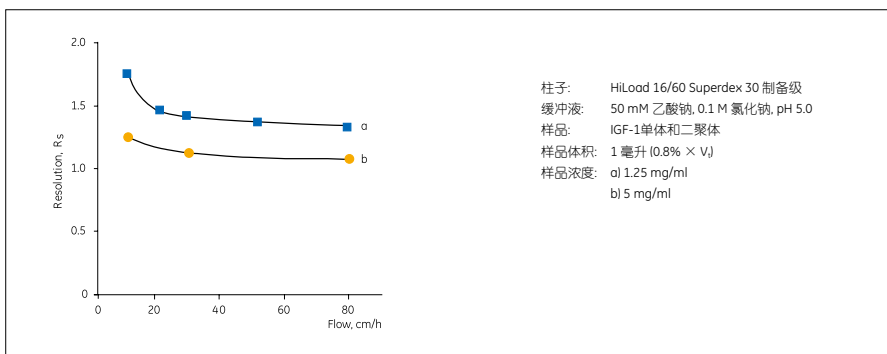


图14b 两个不同浓度IGF-1单体和二聚体的混合物在不同流速时的分辨率

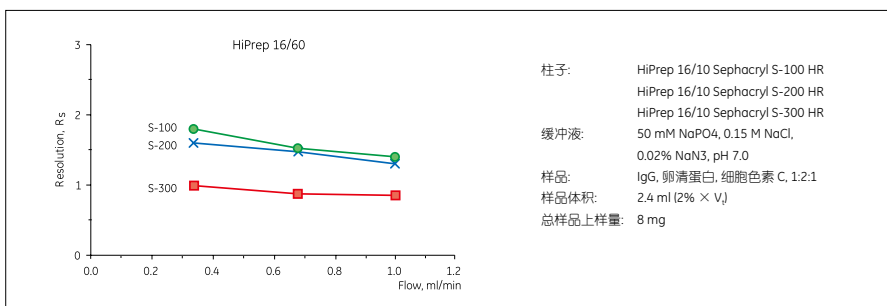


图14c IgG, 卵清蛋白和细胞色素C在不同流速时的分辨率

如果在低流速时峰形分离良好，增加流速或者缩短柱子可以节省时间。此外，增加样品体积可以在不丢失分辨率的情况下增加柱子容积而获利。

对于组群分离，如除盐，在A280检测蛋白洗脱，接着利用电导监测器观察盐峰的流出。调整流速和样品体积平衡分离速度和最终的样品中可接受的盐离子的程度。每种产品在用户手册中提供了推荐的流速。

流速使用简单的体积术语来判断，如ml/min，但是，当比较不同大小柱子的结果时，需要使用线性流速，cm/h（参见附录5）。当考虑流速效应时，不同大小柱子在相同线性流速下获得的结果具有可比性。

如果可能，相同柱料选择小一些的颗粒有助于获得流速和分辨率之间的正确平衡。相同柱料越小的颗粒能够增加柱效，提高分辨率，也有助于使用更高的流速。然而，小的颗粒也会导致反压力的增加，如果目的是要扩大分离规模，这个因素会有影响。

每一次运行分离最后都需要一个洗涤步骤，便于移除任何可能残留在柱子上的分子，阻止交叉污染，为下一次分离做好准备。

控制流量

精确、可重复性的控制流速不仅是获得好的分辨率的需要，也是为了常规制备工作和重复实验的可靠性。尽管过去经常使用重力柱，现在大多数凝胶过滤分离使用泵控制液体流量（参见附录1）。



使用带有色谱系统的泵（而不是蠕动泵或重力填充）充分利用Sephacryl、Superose或Superdex的高硬度和良好的流动性来获得高分辨率。总是将缓冲液泵入柱子（而不是在柱子下面用泵将缓冲液吸出柱子）。这个措施减少了由于吸入造成气泡生成的危险。如果你自己装柱，在分离时使用的流速应当总是低于装柱流速。



小样品体积的组群分离可以使用注射器或泵与小的预装柱如HiTrap除盐，或者重力作用填充如PD-10除盐。



凝胶过滤的柱子一定不要流干。确保有足够的缓冲液来进行长时间、无分离作用的运行，或者在合适的时间设定程序使泵停止缓冲液流动。流干的柱子必须重新装柱，因为装好的柱床已经被破坏。



凝胶过滤柱子的反向回流只有在严重污染的情况下才可以考虑。反向回流有引起已经装好的柱床中产生槽路的危险，导致很差的分辨率、低效以及需要重新装柱。专业的装柱可能不太受影响，但是一定要十分小心。

高分辨率组分收集的方法研发

按照优先的次序推荐步骤。

1. 选择可以给出靶蛋白最佳分辨率的柱料，参见18页柱料选择指导。
2. 确保重复性和高分辨率，选择最适合需要处理的样品体积的预装柱（参见第二章Superdex、Sephacryl或Superose的预装柱详细信息）。
3. 选择保证达到所需分辨率和最小分离时间的最高流速。检查特定的柱料和柱子的用户手册提供的推荐流速。
4. 确定不降低分辨率的情况下允许的最大上样体积。

越高的流速和粘稠的缓冲液产生越高的操作压（记住在4摄氏度运行时缓冲液的粘度增加）。检查已装柱子的最大操作压力，依照此最大压力在色谱系统上设置压力上限。



如果需要更好的分辨率，依次连接两根含有相同柱料的柱子，这样可以增加柱床高度。此外，试用相同或相似组分收集范围但是颗粒更小的柱料。

为了处理更大的样品体积，参见本页规模放大。

凝胶过滤柱料的维护

一旦凝胶过滤柱料已经被使用一段时间，就有必要去除柱料上积累的沉淀蛋白，或其它的污染物。需要清洗的表现可能是，柱子的顶端出现出现有色的条带，在上部的接头和柱床表面之间有空隙，分辨率的丢失，或者反压力的显著增加。第二章给出了每种凝胶过滤柱料详细的清洗流程。在所有的实例中，预防比更正处理更好，常规清洁是值得推荐的。

如果发觉反压力增加，不管是压力监视器或者柱料表面向下移动，开始清洁流程前，检查问题是否确实由于柱子引起。一次断开仪器的一段（从组分收集器开始），每次断开仪器的一段都打开泵，检查泵。在线过滤器变脏通常是引起反压力增大的原因。每次运行过程中，在相同的阶段检查反压力，由于运行中在样品上样或者更换到不同缓冲液时，反压力值会发生变化。

- 总是使用过滤的缓冲液和样品可以减少不必要的柱子维护需求。参见附录3进一步获取样品制备的详细信息。
- 总是使用很好去气泡的缓冲液，避免运行过程中在已经装好的柱子中形成气泡。
- 缓冲液、预装柱和样品应当保持在相同温度，避免在柱子中形成气泡。
- 在使用前过滤清洁溶液，下次分离前总是使用2到3倍柱体积的缓冲液重新平衡柱子。

仪器选择

附录4提供了凝胶过滤分离推荐系统的选择指导。


规模放大

在小柱子上建立了高分辨率或组群分离的方法后，为了一次处理更多的样品体积，最好是装一个更大的柱子。规模放大的一般指导方针如下。

保持	增加
柱床高度	柱子直径
线性流速	体积流速
样品构成	样品体积

当规模放大凝胶过滤柱子时，注意下列要点：

1. 在小规模优化分离条件（参见第26页方法研发）。
2. 保持样品体积：柱子体积比例和样品浓度不变。
3. 通过增加柱子的横截面积增加柱子体积。
4. 保持柱床高度不变。
5. 使用与小柱子相同的线性流速进行分离。（参见附录5）

 参见附录1 柱子的选择和装柱。

规模放大后不同的仪器因素可能会影响选择性能。如果大规模柱子有更小效率的流动分配系统，或者大规模系统引入了大的死体积，可能会造成峰宽增加。如果该应用对于效率的变化敏感的话，这会引起产品组分的过度稀释，甚至是分辨率缺失。

对于特定的柱料，如Superdex、Superose或Sephadex，通常推荐选择更大颗粒的柱料。对于高分辨率组分收集，为了在更大的柱子上获得相似的分辨率，可能需要装一个含有更大颗粒的小柱子，重复分离进行优化。

Sephadex G-25的规模放大，甚至到生产规模，都是没有阻碍，非常容易建立的过程。在商业应用中非常著名的例子包括从白蛋白中去除内毒素过程中的缓冲液交换，以及疫苗生成过程中的制备步骤。图15显示了从人血浆中生产白蛋白和IgG的过程中使用大规模缓冲液交换步骤的例子。

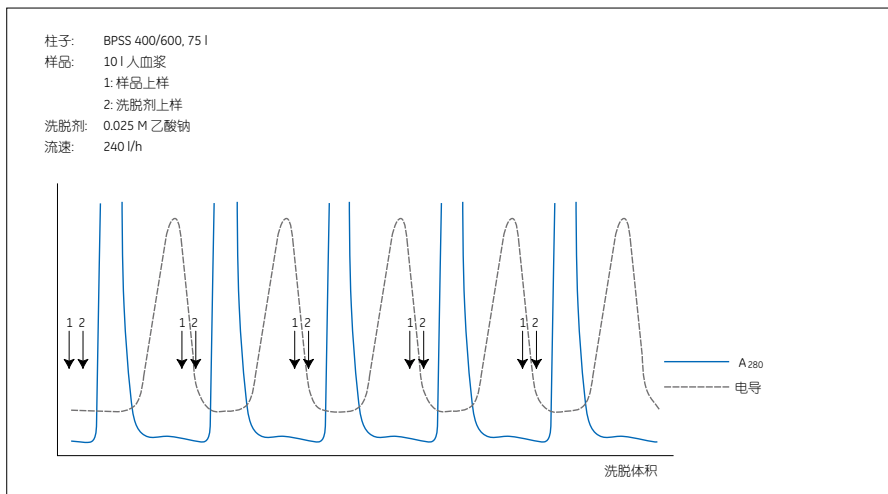


图15 应用Sephadex G-25 Coarse从人血浆中生产白蛋白和IgG过程中缓冲液交换步骤的色谱图。

大规模生产的BioProcess柱料

从捕获到精制的各个过程，对应于每个色谱阶段的特定的BioProcess™柱料已经被设计出来。大容量生产整合清晰的订购和运输流程确保BioProcess柱料可以在合适的数量、适当的地点和合适的时间提供。通用电气医疗集团可以确保今后BioProcess柱料的供应，使之成为长期生产的安全投资。柱料依据经过验证的方法生产制造，在严格的控制下测试，保证高性能特性。每个订单都可以提供分析认证。



常规的支持文件（RSF）包含性能、稳定性、提取混合物和分析方法的细节。这些文件中的必要信息为生产过程确认提供了无价的起点，也为向管理部门递交提供了支持。使用BioProcess柱料为每个阶段的结果提供了很容易认证的过程。高流速、大容量和高回收率有助于整个工业过程的总体节约。

所有的BioProcess柱料都具有化学稳定性，确保高效清洁和卫生处理过程。不同规模的装柱方法已经摸索建立，适合大规模生产的柱子和设备也可提供。

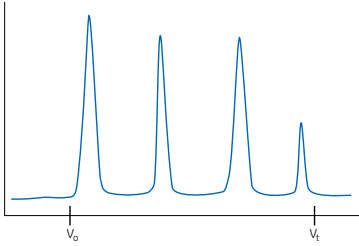
故障排除



这一章节集中在运行色谱柱时可能出现的实践问题。图谱显示了在凝胶过滤分离的过程中，色谱如何偏离了理想的图谱。下面几页介绍了可能的原因和对应的补救方法的建议。

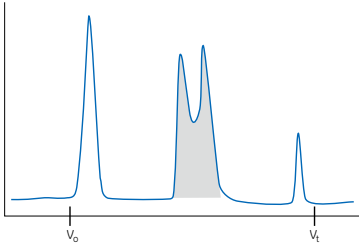


在凝胶过滤过程中，低离子强度或芳香材料中强酸或强碱的物质与柱料的相互作用会有不同。对于某些应用，这可能是个优势。例如，芳香肽和分子量仅有轻微差别的其它物质可以在Sephadex中进行分离。然而，这不是真正的凝胶过滤分离。



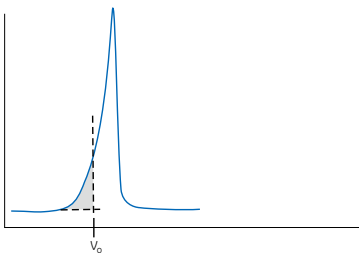
满意的分离

分离良好，对称峰。



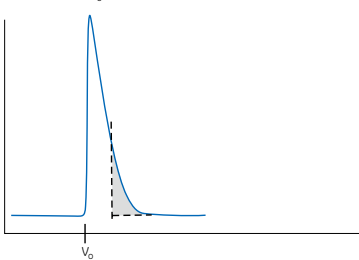
差的分离

回顾影响分辨率的因素（参见第13页），包括柱料选择、颗粒大小、样品体积：柱子体积以及流速。



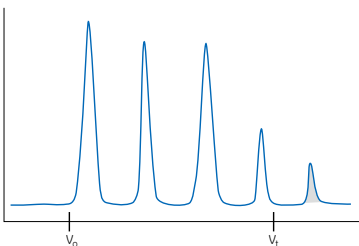
峰形前移

不对称峰：样品在无效体积前洗脱显示柱床中有开缝。峰形前移也可能由于柱子过装柱（太高的压力或流速下装柱）。柱子可能需要重新装柱。



峰形脱尾

不对称峰形：样品上样不均匀。如果可能检查柱子顶端。确保柱料平稳装柱，样品上样没有搅起柱床。峰形脱尾也可能由于柱子低装柱（太低的压力或流速下装柱）。



洗脱延时

一个柱体缓冲液流过柱子时峰形出现。为了确保移除延时洗脱的分子，在不同的运行中总是要包含一个洗脱步骤。

分子可能与凝胶过滤柱料发生非特异结合。如果这种相互作用是自然状态下的离子化的，增加氯化钠的浓度（高达150 mM）可能会有帮助。如果这种相互作用是自然状态下疏水作用的，降低盐浓度、增加pH、加入去污剂或有机溶剂可能会有帮助。

情况	原因	补救措施
感兴趣的峰与其它主要峰分辨率很差。	样品体积太大或样品上样方法不正确。	减少样品体积，认真仔细上样。检查柱床表面和上端滤膜有无污染。
	样品太粘稠。	用缓冲液稀释，但是注意允许的最大样品体积。蛋白浓度维持在70 mg/ml以下。
	样品过滤方法不正确。	重新平衡柱子，过滤样品，重复实验。
	柱子没有垂直安装。	调整柱子位置。可能需要重新装柱。
	柱子装的不好。	检查柱效（参见附录1）。如果需要的话，重新装柱。使用预装柱。
	柱子很脏。	清洁柱子，重新平衡后使用。
	使用的柱料不正确。	检查选择性曲线。察看吸附效率。如果使用变型剂或去污剂，请考虑其影响。
	死体积过大。	最小化管子和接头的死体积。
	柱子太短。	参见附录1推荐的柱床高度。
	流速太快。	检查推荐的流速，降低流速。
蛋白没有如预期的洗脱。	温度不均一。	使用有水套的柱子。
	样品体积和先前实验不同。	保持样品体积恒定。分辨率取决于样品体积。
	蛋白和柱料之间有离子相互作用。	保持缓冲液离子强度大于0.05M（最好含0.15M氯化钠）。
	蛋白和柱料之间有疏水相互作用。	降低盐离子浓度会最小化疏水相互作用。增加pH。加入适合的去污剂或有机溶剂，如5% 异丙醇。
	样品过滤方法不合适。	清洁柱子，过滤样品，重复实验。
	样品在储存过程中发生改变。	制备新鲜的样品。
	柱子没有充分平衡。	重复或延长平衡步骤
	蛋白或脂类在柱子上沉淀。	清洗柱子或使用一根新的柱子。
	柱子的上样量过大。	减少上样量。
	柱子中有微生物生长。	使用中柱子很少长菌。为了防止已装好的柱子长菌，可能的话，在20%的乙醇中保存。
分子量或形状和预期的不同。	蛋白在储存过程中发生改变。	制备新鲜的样品
	蛋白和柱料之间有离子相互作用。	保持缓冲液离子强度大于0.05 M（最好含0.15M 氯化钠）。
	蛋白和柱料之间有疏水相互作用。	降低盐离子浓度会最小化疏水相互作用。增加pH。加入适合的去污剂或有机溶剂，如5% 异丙醇。
	蛋白在柱子滤膜和/或柱床顶部沉淀。	如果可能，清洗柱子，更换或清洗滤膜，或者使用一根新柱子。
蛋白较期望的洗脱延迟或者在运行一个总柱体积之后洗脱	蛋白和柱料之间有离子和/或疏水相互作用。	降低盐离子浓度会最小化疏水相互作用。加入适合的去污剂或有机溶剂，如5% 异丙醇。 增加盐浓度（高达150 mM）最小化离子相互作用。
洗脱峰延迟并且非常宽。	柱子很脏。	清洁，重新平衡柱子。
蛋白比预期的提前洗脱（在无效体积之前）。	柱子中有空道。	使用更细的柱料浆重新装柱。避免空气气泡的引入。

情况	原因	补救措施
色谱峰前倾或非常圆。	柱子的上样量过大。	减少上样量，重复实验。
色谱峰脱尾。	柱子的装柱过松。	检查柱效（参见附录1）。高流速重新装柱。使用预装柱。
色谱峰前倾。	柱子的装柱过紧。	检查柱效（参见附录1）。低流速重新装柱。使用预装柱。
洗脱液中出现柱料。	柱床支持物末端设备松弛或损坏。	替换新的或拧紧。
	柱子的操作压力太高。	不要超出推荐的柱子或柱料操作压力。
低回收活性，但是蛋白回收正常。	蛋白不稳定或在缓冲液中失活。	判定蛋白的pH和盐稳定性。
	酶从辅因子或类似物中分离。	将组分收集的液体混合检测活性，重复实验。
比预期的产量低	蛋白可能被蛋白酶降解。	在样品和缓冲液中加入蛋白酶抑制剂，阻止蛋白酶降解作用。 使用柱料如Benzamidine 4 Fast Flow (high sub)处理样品，去除胰蛋白酶样的丝氨酸蛋白酶。
	样品分离过程中吸附到滤器。	使用另一个滤器。
	样品沉淀。	可能由于除盐或不合适的缓冲液条件引起。
	疏水蛋白。	使用变性剂、降低极性的试剂或去污剂。
	非特异吸附。	降低盐离子浓度会最小化疏水相互作用。增加pH。加入适合的去污剂或有机溶剂，如5% 异丙醇。如果必要，在流动相中加入10% 乙烯乙二醇。
峰太小。	在选定的波长样品吸附不好	检查监控器的吸收范围。如果可能，使用不同的波长，如214纳米代替218纳米。
	多余的条带扩宽。	检查装柱情况。如果必要的话，重新装柱。
比预计的样品回收率高。	蛋白和别的物质共洗脱。	优化条件提高分辨率。运行前后检查实验使用的缓冲液条件。检查选择的柱料。
回收的蛋白活性比上样高。	在色谱步骤前后使用了不同的实验条件。	在纯化流程中对所有的实验使用相同的实验条件。
	分离过程中去除了活性抑制剂。	
柱子的流速减少或很差	出现了脂蛋白或蛋白聚集物。	在样品制备过程中去掉脂蛋白和聚集物（参见附录3）。
	在分离过程中由于稳定剂的去除，蛋白在柱子中沉淀。	修改洗脱剂，维护稳定性。
	柱子的滤器发生了堵塞。	如果可能，更换滤器或者使用新的柱子。每次实验前总是过滤样品和缓冲液。
	设备末端或接收器或管子堵塞。	如果可能，移走堵塞部分，进行清洁或者使用一根新柱子。
	蛋白沉淀。	使用推荐的方法清洁柱子或者使用一根新柱子。
	柱床压缩。	如果可能，重新装柱，或者使用一根新柱子。
	柱子中有微生物生长。	使用中柱子很少长菌。为了防止已装好的柱子长菌，可能的话，在20%的乙醇中保存。
	柱料没有完全溶胀（Sephadex）。	参见附录1 重新溶胀条件。

情况	原因	补救措施
	细粉（Sephadex）。	装柱前轻轻倒出细粉。避免使用磁力搅拌，会破坏柱料颗粒。
在运行或接连的运行过程中反压力增加。	样品混浊。	改进样品制备（参见附录3）。加入乙二醇、去污剂或有机溶剂增加样品的溶解性。
	柱子的滤器和/或柱床顶端有蛋白沉淀。	使用推荐的方法进行清洗。如果可能，更换或清洗滤器，或者使用一根新的柱子。在流动相中加入用来溶解起始样品的所有添加物。
柱床中出现气泡。	装柱后在冷的温度下储存，然后加热。	通过柱子中加入去除气泡的缓冲液移除小的气泡。如果缓冲液在冰箱或冷库储存后使用，要多加小心。不要用阳光暴晒或加热系统加热柱子。如果可能，重新装柱（参见附录1）。
	缓冲液没有合适的脱气。	缓冲液必须彻底脱气。
柱床中有裂缝。	柱子中有大量的空气泄漏。	检查所有连接有无泄漏。如果可能，重新装柱（参见附录1）。
当样品流入柱床时条带扭曲。	柱子顶部或插入的接头中有气泡。	如果可能，重新安装接头，小心避免气泡。
	缓冲液或样品中有颗粒。	过滤或者离心样品。避免缓冲液污染灰尘。
	在上部接头有堵塞或损坏的网。	如果可能，拆下接头，清洁或者更换网子。去除样品和洗脱剂中的颗粒。
当样品流出柱床时条带扭曲	柱子装的很差。	柱料悬浮的太厚或太薄。装柱温度和运行温度不同。 装柱不充分（太低的装柱压力，太短的平衡）。在太高的压力下装柱。

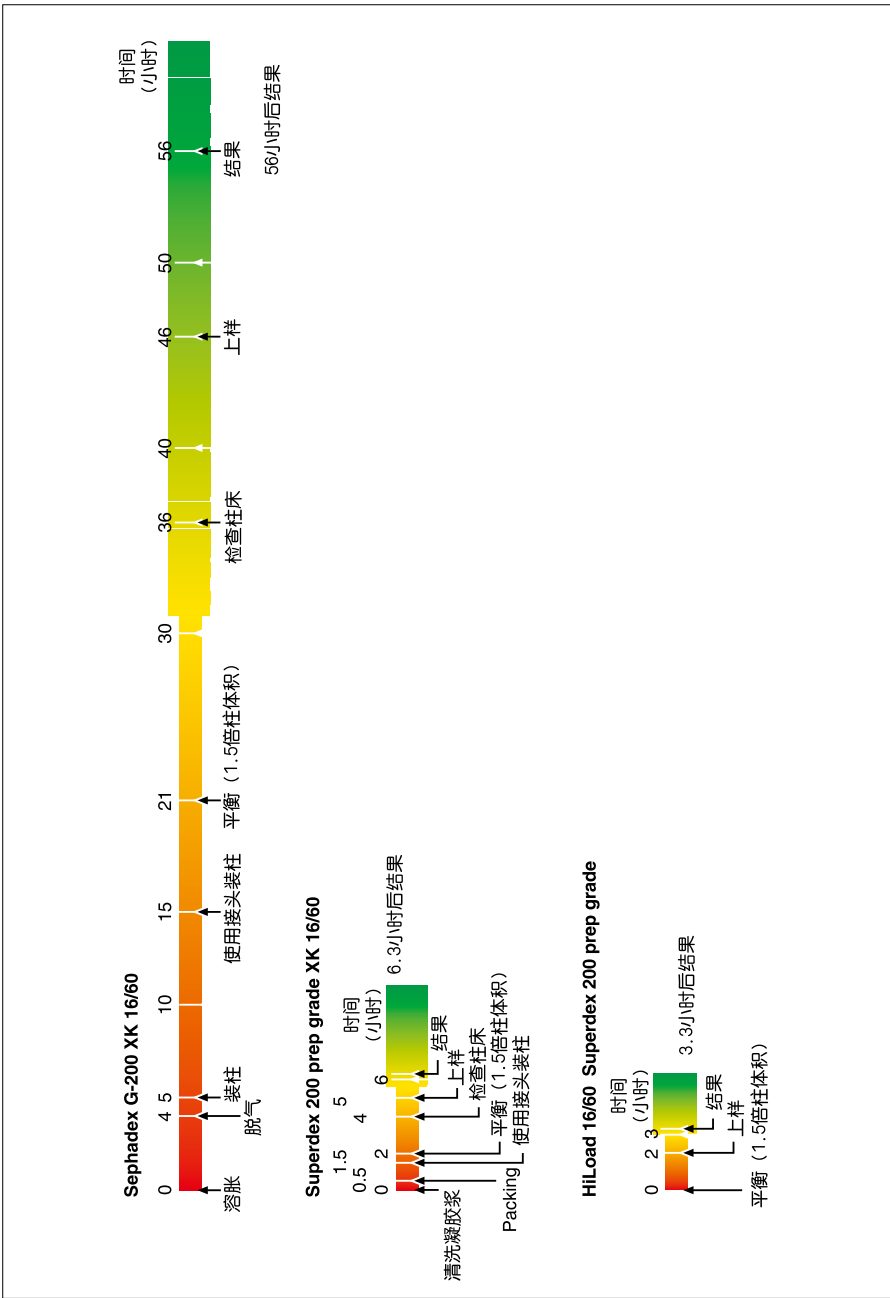


图16 Sephadex G-200与最新的Superdex 200制备级（已经替代了Sephadex G-200）和预装的HiLoad 16/60 Superdex制备级柱子上凝胶过滤分离时间流程图的比较。

第二章

凝胶过滤柱料

凝胶过滤柱料的组成

维持最高分辨率的同时还需要获得最高流速的需求推动了凝胶过滤柱料的发展。当样品流经凝胶过滤柱子时，不同组分的分离或分辨率受到数个参数的影响：流速、颗粒大小、颗粒大小的分布、装柱密度、颗粒孔隙度和运动相的粘性。试图优化每个参数的努力促进了一系列凝胶过滤柱料的研发。

最早的凝胶过滤柱料通过交联多聚体三位网络结构，例如，Sephadex通过交联葡聚糖产生。控制交联程度和颗粒大小，使产生柱料的广泛范围成为可能，每一个都可以在窄的分子量值范围内具有高选择性。

然而，为了增加分离的速度，柱料必须经得起更高的流速，因此，其它的多聚体如琼脂糖被引入。这就导致凝胶过滤基于Sephacryl，后来，更高交联程度的Superose。一般来讲，基于琼脂糖的柱料比基于葡聚糖的柱料更加多孔，因此，尽管分离速度增加，与Sephadex相比较，选择性却降低了。Sephacryl的多孔特性使之非常适合结合技术，如亲和色谱，由于多孔有助于高结合能力。

当能够通过移植第二个聚合体到预制的柱料制备合成凝胶时，凝胶过滤的主要优势得以体现，例如，Sephacryl（将烯丙基葡聚糖和N,N'-methylene bisacrylamide进行交联）和最近的Superdex。以Superdex为例，将葡聚糖链共价结合到高交联的琼脂糖柱料，这样就使一系列柱料的产生成为可能，它们不但具有与Sephadex相似的高选择性，而且具有基于高度交联琼脂糖柱料的机械强度。在接下来的章节中，显示的Superose、Sephacryl和Superdex的选择性曲线和压力-流速关系曲线，展示了凝胶过滤柱料的性能是如何发展的。图16清楚地论述了Superdex的发展使速度显著增加，而性能并没有丧失成功的获得。至于Superose和Superdex，控制颗粒大小（Superose制备级和Superdex制备级）的使用也允许在运行更大体积时使用更高的流速。

Superdex: 高分辨率、省时和高回收率的第一选择

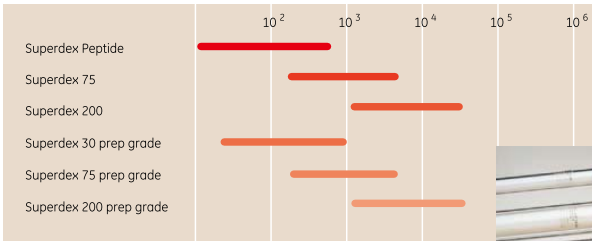


图17 Superdex的组分分离范围



图18 预装的HiLoad Superdex制备级柱子

从实验室到生产规模应用，Superdex是短运行时间、高回收率的高分辨率组分收集首选。Superdex的成功已经被成百上千的科学文献清楚的证实，这些文献中都描述了Superdex的使用。使用HiLoad Superdex 200制备级，HiLoad Superdex 75制备级和HiLoad Superdex 30制备级预装柱的文献列表可以从www.gelifsciences.com/protein-purification中获得。

Superdex的选择性曲线和压力-流速相互关系显示在图19a和19b。代表性的线性流速高达75cm/h。

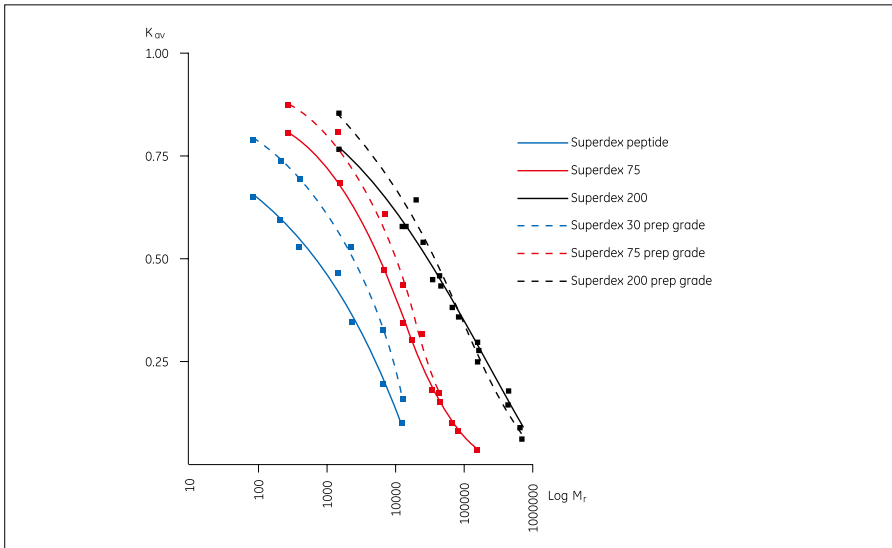


图19a Superdex(13 μm)和Superdex制备级(34 μm) 柱料的选择性曲线

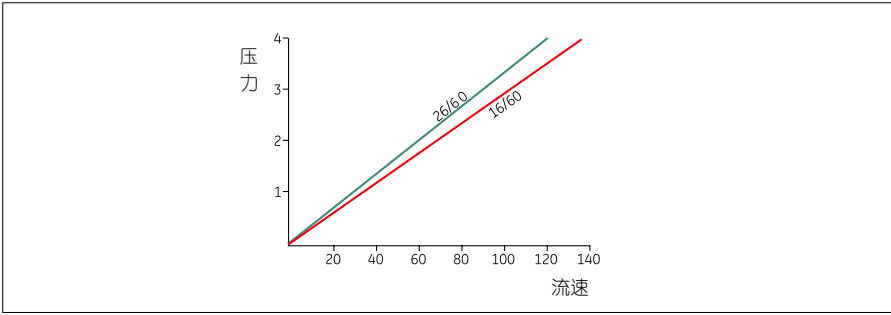


图19b 装有Superdex制备级柱料的HiLoad柱子的压力相对于流速的函数。在25摄氏度蒸馏水中床高大约60厘米。为了计算体积流速，线性流速乘以柱子的横截面积（XK16为2 cm²，XK26为5.3 cm²）。参见附录5获取关于流速计算的更多信息。

如图20所示，Superdex是基于已经共价结合了葡聚糖的高交联多孔琼脂糖颗粒的合成柱料。柱料具有高物理和化学稳定性，主要由于高交联的琼脂糖柱料，而良好的凝胶过滤特性主要取决于葡聚糖链。Superdex的机械强度允许使用甚至有些粘的洗脱剂，如8 M尿素，在实际流速中运行。柱料可以在平衡或清洗过程中耐受高流速，因此缩短总的循环时间。这种稳定性使Superdex制备级非常适合在工业过程中使用，工业过程需要高流速、快速和高效的在位清洁规程。通常的色谱条件下，当使用的缓冲液离子强度在0.15 M到1.5 M范围时，蛋白和Superdex的非特异性相互作用是微不足道的。

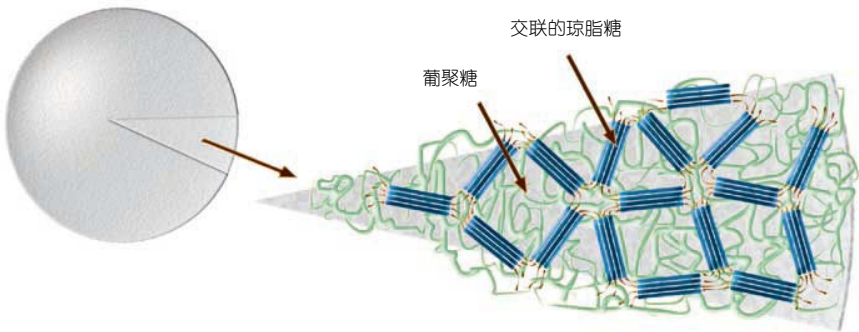


图20 Superdex中葡聚糖链共价结合到高交联多孔琼脂糖柱料。该图是Superdex颗粒的横截面示意图。

分离选择

Superdex有两种不同平均大小的颗粒生产（13微米和34微米），4种不同型号的选择（Superdex Peptide, Superdex 30, Superdex 75和Superdex 200）。

- 使用13微米Superdex Peptide, Superdex 75和Superdex 200的颗粒预装柱可以用少量的样品体积进行最高分辨率分析分离。
- 使用34微米Superdex制备级颗粒（有预装柱和散装的柱料可供选择）可以进行大规模应用。

产品†	组分收集范围 分子量（球蛋白）	样品上样量‡	最大操作反压力	推荐操作流速¶
Superdex Peptide PC 3.2/30	$1 \times 10^2 - 7 \times 10^3$	25–250 μ l	1.8 MPa, 18 bar, 260 psi	<0.15 ml/min
Superdex Peptide HR 10/30	$1 \times 10^2 - 7 \times 10^3$	25–250 μ l	1.8 MPa, 18 bar, 260 psi	<1.2 ml/min
HiLoad 16/60 Superdex 30 pg*	$<1 \times 10^4$	≤ 5 ml	0.3 MPa, 3 bar, 42 psi	≤ 1.6 ml/min
HiLoad 26/60 Superdex 30 pg*	$<1 \times 10^4$	≤ 13 ml	0.3 MPa, 3 bar, 42 psi	≤ 4.4 ml/min
Superdex 30 pg*	$<1 \times 10^4$	0.5–4% 总柱体积	0.5 MPa, 5 bar, 70 psi	10–50 cm/h
Superdex 75 PC 3.2/30	$3 \times 10^3 - 7 \times 10^6$	<50 μ l	2.4 MPa, 24 bar, 350 psi	<0.1 ml/min
Superdex 75 HR 10/30	$3 \times 10^3 - 7 \times 10^6$	25–250 μ l	1.8 MPa, 18 bar, 260 psi	<1.5 ml/min
HiLoad 16/60 Superdex 75 pg*	$3 \times 10^3 - 7 \times 10^6$	≤ 5 ml	0.3 MPa, 3 bar, 42 psi	≤ 1.6 ml/min
HiLoad 26/60 Superdex 75 pg*	$3 \times 10^3 - 7 \times 10^6$	≤ 13 ml	0.3 MPa, 3 bar, 42 psi	≤ 4.4 ml/min
Superdex 75 pg*	$3 \times 10^3 - 7 \times 10^6$	0.5–4%总柱体积	0.5 MPa, 5 bar, 70 psi	10–50 cm/h
Superdex 200 PC 3.2/30	$1 \times 10^6 - 6 \times 10^5$	<50 μ l	1.5 MPa, 15 bar, 220 psi	<0.1 ml/min
Superdex 200 HR 10/30	$1 \times 10^6 - 6 \times 10^5$	25–250 μ l	1.5 MPa, 15 bar, 220 psi	0.25–0.75 ml/min
HiLoad 16/60 Superdex 200 pg*	$1 \times 10^6 - 6 \times 10^5$	≤ 5 ml	0.3 MPa, 3 bar, 42 psi	≤ 1.6 ml/min
HiLoad 26/60 Superdex 200 pg*	$1 \times 10^6 - 6 \times 10^5$	≤ 13 ml	0.3 MPa, 3 bar, 42 psi	≤ 4.4 ml/min
Superdex 200 pg*	$1 \times 10^6 - 6 \times 10^5$	0.5–4%总柱体积	0.5 MPa, 5 bar, 70 psi	10–50 cm/h

* 制备级

† HR和PC柱装有Superdex，而HiLoad柱装有Superdex制备级。

‡ 为了获得最大的分辨率，使用尽可能少的样品体积，但是注意样品体积少于0.5%通常不可以提高分辨率

¶ 参见附录5获取线性流速（cm/h）和体积流速（毫升每小时）的相互转换信息。



当感兴趣蛋白的分子量未知的时候，从Superdex 200开始使用。Superdex 200或Superdex 200制备级（皮克）特别适合从二聚体中分离单克隆抗体，以及从低分子量污染物中进行分离，例如白蛋白和转铁蛋白。



分离肽段、寡核苷酸和分子量低于一万的小蛋白时，从Superdex Peptide或Superdex 30制备级开始使用。



已经装好的柱床暴露在4至40摄氏度温度范围时，会破坏柱效，柱子需要重新装柱。

分离样品

下面的图显示了Superdex Peptide, Superdex 75和Superdex 200分离样品的情况。

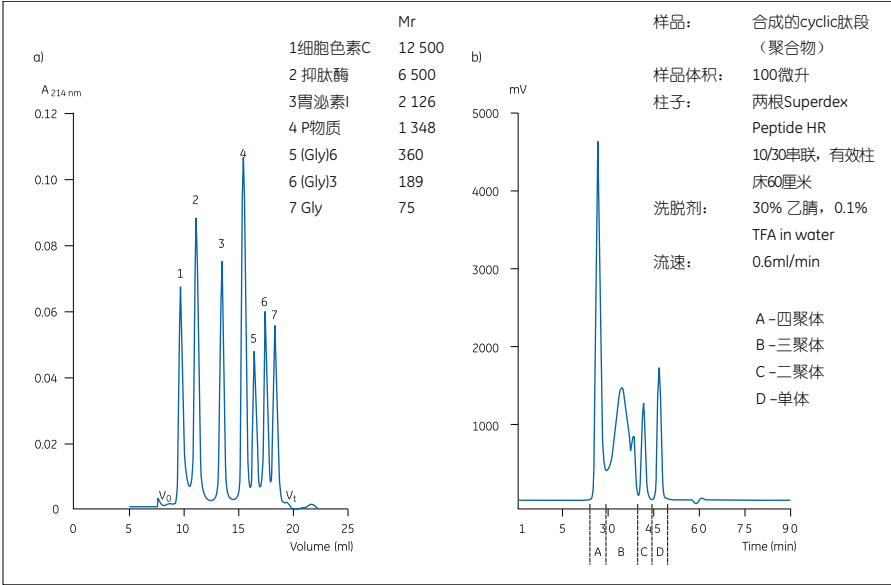


图21 a) Superdex Peptide HR 10/30分离标准肽段。b) 分离肽段聚合物 (单体的分子量大约为1000)。标示的组分分离应用质谱仪进行离线分离。由瑞士Ferring研究所K. Walhagen惠赠。

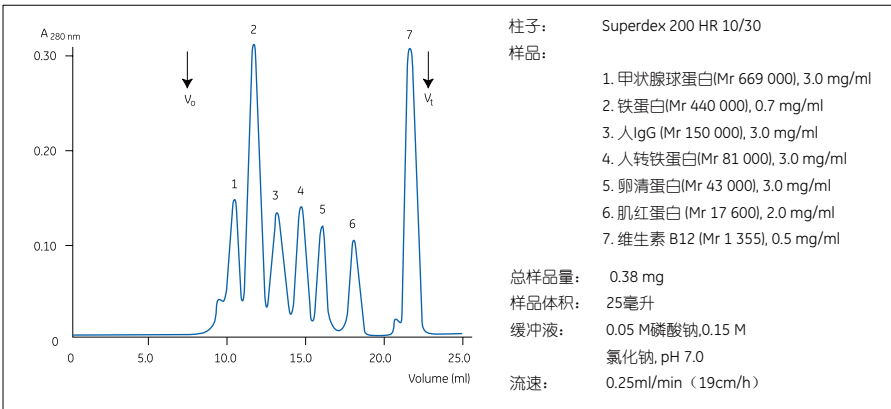


图22 Superdex 200 HR 10/30分离标准蛋白。

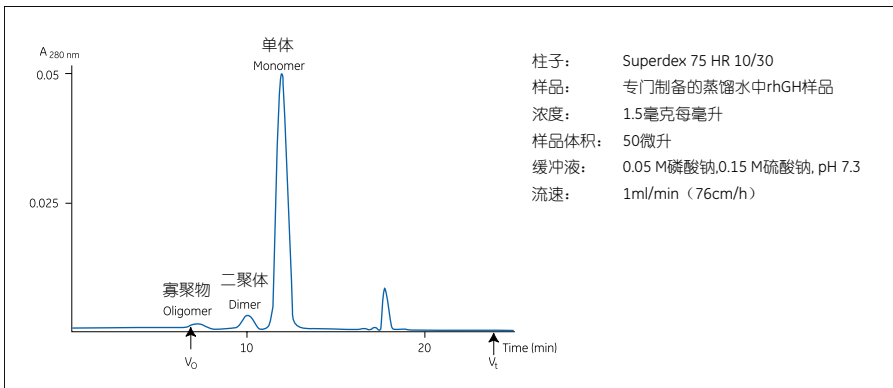


图23 Superdex 75 HR 10/30分离生长因子寡聚物。

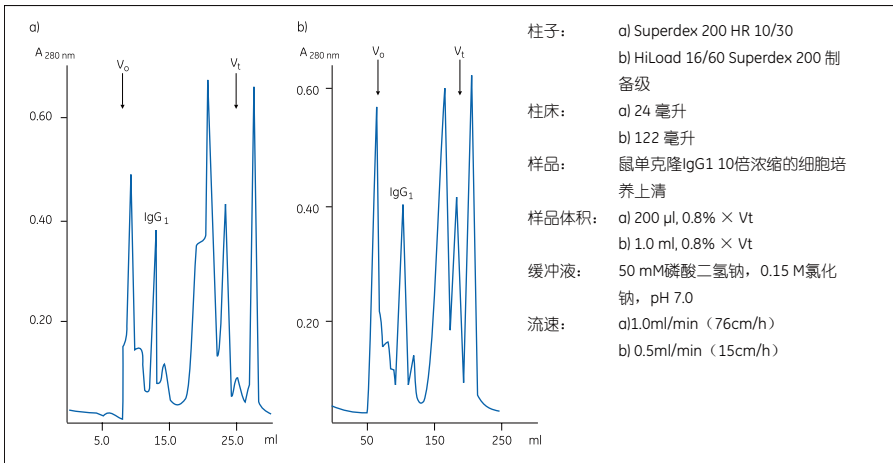


图24鼠单克隆Ig₁纯化从a)Superdex 200 HR 10/30到b)HiLoad 16/60 Superdex 200 制备级的规模放大(五倍)。

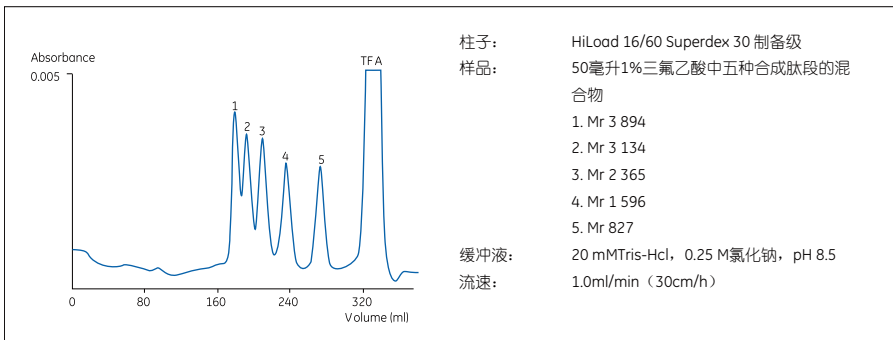


图25 HiLoad 16/60 Superdex 30 制备级分离测试物质。

柱子: a) HiLoad 16/60 Superdex 75 制备级
 b) HiLoad 16/60 Superdex 200 制备级

样品: 1. 肌红蛋白, 1.5 mg/ml, 分子量17 000
 2. 卵清蛋白, 4 mg/ml, 分子量43 000
 3. 白蛋白, 5 mg/ml, 分子量67 000
 4. IgG, 0.2 mg/ml, 分子量158 000
 5. 铁蛋白, 0.24 mg/ml, 分子量440 000

样品体积: 0.5毫升

缓冲液: 0.05 M磷酸缓冲液, 0.15 M氯化钠, 0.01%叠氮钠, pH 7.0

流速: 1.5ml/min (45cm/h)

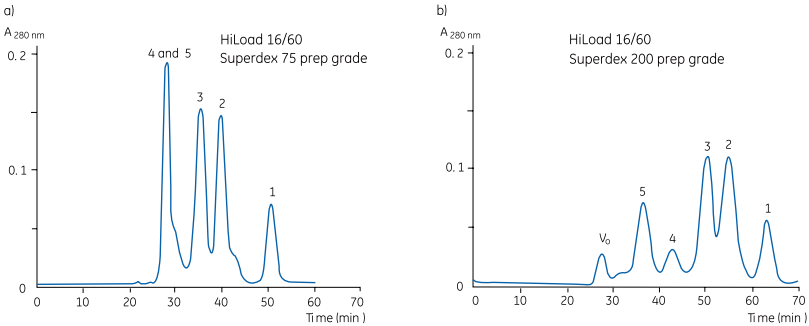


图26 Superdex 75 制备级和Superdex 200 制备级分离模式蛋白选择性比较。(a) Superdex 75 制备级对于17000到67000分子量范围的三个蛋白有很好的分辨率, 而两个最大的蛋白质在无效体积被洗脱。(b) Superdex 200制备级完全分离了两个最大的蛋白质。三个小一些的蛋白不如这两个大蛋白或(a)中分离的好。图(b)中28分钟的无效体积(V_0)峰是由于蛋白凝集引起的。

柱子: HiLoad Superdex 200制备级

柱子体积, V_i : a) \approx 120 毫升 (16/60)
 b) \approx 320 毫升 (26/60)

样品: 1%胎牛血清中鼠单克隆细胞培养上清, IgG_{2b}

样品预处理: 约40倍浓缩

样品体积: a) 1.2 毫升 ($1\% \times V_i$)
 b) 3.2 毫升 ($1\% \times V_i$)

缓冲液: 50 mM 磷酸二氢钠, 0.15 氯化钠, pH 7.0

流速: a) 1.6 ml/min (50 cm/h)
 b) 4.4ml/min(50cm/h) (推荐的最大流速)

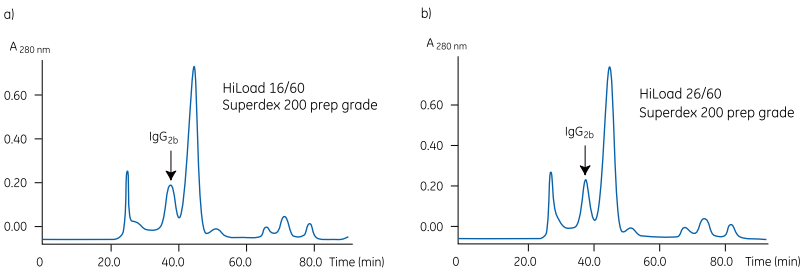


图27 从细胞上清中纯化鼠单克隆IgG_{2b}。a) HiLoad Superdex 200 制备级, 柱体积120毫升, b) HiLoad 26/60 Superdex 200制备级, 柱体积320毫升。分离效果几乎相同, 虽然使用了不同大小的预装柱。

蛋白的重折叠


溶解之后，重组蛋白必须适当的重折叠来恢复功能。为了蛋白重新折叠，必须去除变性剂，形成正确的分子间联系。重新折叠的关键参数包括pH值、硫醇试剂的存在、变性剂去除的速度、宿主蛋白和重组蛋白的相对浓度。下面的表比较了重组蛋白重新折叠的不同方法的优点和缺点。不同蛋白成功重新折叠需要不同的条件。如果亲和层析不能在柱上重新折叠的话，可以尝试一下凝胶过滤方法。关于使用亲和层析进行柱上重新折叠的更多详细信息，参考通用电气医疗集团的重组蛋白手册，扩增和简单纯化以及Febs Letters 345 (1994) 125-130。


重新折叠技术	优点/缺点
逐步透析	花费数天时间。 使用大体积的缓冲液。
稀释至中性pH	稀释了感兴趣的蛋白质。
在柱子上凝胶过滤	比亲和层析柱上重新折叠慢。 需要第二根柱子运行。 每根柱子只能处理很小体积。
在柱子上亲和层析	快速而且简单。 没有样品体积的限制。

运行分离

缓冲液：0.05 M磷酸钠，0.15 M氯化钠，pH 7或选择样品储存或下一步溶解的缓冲液。

使用0.15 M氯化钠，或者等离子强度的缓冲液，避免与柱料的pH依赖的非离子相互作用。在非常低的离子强度，柱料上少量阴离子电荷基团的出现可以引起碱性蛋白的反应迟钝。

 样品要充分溶解。通过离心或者过滤去除颗粒物（参见附录3）。运行过程中，总是使用脱气的缓冲液，维持恒定的温度，避免在柱子中引入气泡。

 在色谱系统上设置合适的压力界限，避免损坏已经装好的柱子。

1. 第一次使用，或者长期储存后，使用一个柱子体积的缓冲液进行柱子平衡，但是需要包含0.05 M氯化钠，流速为30 cm/h (HR 10/30流速为0.4 ml/min, XK 16/60流速为1 ml/min，或者XK 26/60流速为2.6 ml/min)。
2. 两个柱子体积的缓冲液进行柱子平衡，需要包含0.15 M氯化钠，流速为50 cm/h (HR 10/30流速为0.65 ml/min, XK 16/60流速为1.6 ml/min，或者XK 26/60流速为4.3 ml/min)。
3. 降低线性流速至30 cm/h。使用相当于0.5-4%柱体积的样品体积（HR 10/30高达0.25 ml, XK 16/60高达1.2 ml，或者XK 26/60高达3.2 ml）。注意样品体积越小，分辨率越好。
4. 使用一个柱子体积的缓冲液进行洗脱。
5. 使用一个新的样品之前，使用一个柱子体积的缓冲液，流速50 cm/h进行柱子重新平衡，直到A₂₈₀监控的基线稳定。

通过测定每米理论塔板数和峰的对称性，在每次间隔检测柱子的性能。预装柱提供了推荐值。

参见95页如何检测柱子的效率。

参见26页获取分离优化的建议。



已经装好的柱床暴露在4至40摄氏度温度范围时，会破坏柱效，柱子需要重新装柱。

清洗

1. 使用一个柱子体积的0.5 M NaOH进行清洗，流速为25 cm/h (HR 10/30流速为0.33 ml/min, XK 16/60流速为0.8 ml/min, 或者XK 26/60流速为2.2 ml/min)，以去除绝大多数非特异吸附的蛋白质。
2. 一个柱子体积的蒸馏水流速为25 cm/h进行清洗。
3. 两个柱子体积的缓冲液流速为50 cm/h进行再平衡（HR 10/30流速为0.4 ml/min, XK 16/60流速为1.6 ml/min, 或者XK 26/60流速为4.3 ml/min），或直到A280监控的基线和洗脱剂的pH稳定。如果缓冲液含有去污剂，可能必须进行进一步的平衡。



每10到20次分离后推荐运行常规清洗，但是清洗的频率也取决于上样样品的自然特性。

去除严重的污染物

1. 室温线性流速为25 cm/h反向清洗。
2. 使用四个柱子体积的1 M NaOH进行清洗（为了去除疏水蛋白或脂蛋白），接着使用四个柱子体积的蒸馏水进行清洗。
3. 使用0.5个柱体积的30% 异丙醇进行清洗（为了去除脂类和非常疏水的蛋白质），接着使用两个柱子体积的蒸馏水进行清洗。
4. 使用至少五个柱体积的缓冲液平衡柱子，或者直到在开始新的分离前，A280监控的基线和洗脱剂的pH稳定。

对于污染的极端例子，请参考产品提供的用户手册。



只有在严重污染的情况下，才可以考虑反向清洗凝胶过滤柱子。反向清洗操作，有使已经装好的柱子中产生柱槽的危险，导致分辨率低下，效率缺失，需要重新装柱。专业的装柱似乎不太受影响，但是必须考虑极端情况。

柱料特性

构成：Superdex是葡聚糖共价结合到高度交联的琼脂糖上形成的。

产品	效率：每米理论塔板数（仅预装柱）	pH稳定性*	颗粒大小	平均颗粒大小
Superdex Peptide	$\geq 30\,000\text{ m}^{-1}$	长期: 1-14 短期: 1-14	13-15 μm	13 μm
Superdex 75	$\geq 30\,000\text{ m}^{-1}$	长期: 3-12 短期: 1-14	13-15 μm	13 μm
Superdex 200	$\geq 30\,000\text{ m}^{-1}$	长期: 3-12 短期: 1-14	13-15 μm	13 μm
Superdex 30 prep grade	$> 13\,000\text{ m}^{-1}$	长期: 3-12 短期: 1-14	22-44 μm	34 μm
Superdex 75 prep grade	$> 13\,000\text{ m}^{-1}$	长期: 3-12 短期: 1-14	22-44 μm	34 μm
Superdex 200 prep grade	$> 13\,000\text{ m}^{-1}$	长期: 3-12 短期: 1-14	22-44 μm	34 μm

*长期稳定性指的是柱料在长时间处于该pH范围保持稳定，对于色谱性能没有不利的副作用。

短期稳定性指的是再生、在位清洗和卫生处理过程中的pH范围。所有的范围都是基于通用电气医疗集团的经验和知识估计的。

化学稳定性

Superdex在所有通常使用的液体缓冲液中保持稳定，pH 3-12，以及添加剂如去污剂（1%SDS）、变性剂（8 M尿素或6 M盐酸胍啶）。

下列溶液可以用来清洗：高达30%的乙腈，高达1 M的氢氧化钠，高达70%的乙醇（Superdex 30制备级），高达24%的乙醇（Superdex 75制备级和Superdex 200制备级），高达1 M的乙酸，高达30%的异丙醇，或者高达0.1 M的盐酸（Superdex 30制备级）。

储存

没有使用的柱料保存在4至25摄氏度20%乙醇中，不要冰冻。

柱子可以低流速（0.01 ml/min）连接在色谱系统中保存，缓冲液持续流过柱子，防止细菌生长，或者气泡进入，保护已经装好的柱床不受破坏。

对于长期储存，使用四倍柱体积的蒸馏水清洗后，接着使用四倍体积的20%的乙醇清洗。储存在4至25摄氏度。

彻底去除乙醇/水混合物中的气体，使用低流速，检测柱子平衡时的反压力。

避免温度变化引起已装柱床中气泡的产生。

Sephacryl: 实验室和工业规模的快速、高回收率分离

如图28显示，Sephacryl高分辨率（HR）柱料为Superdex制备级需要稍微扩大组分收集范围的应用，提供了有用的替代品。高化学稳定性和高流速耐受性使Sephacryl非常适合工业使用。

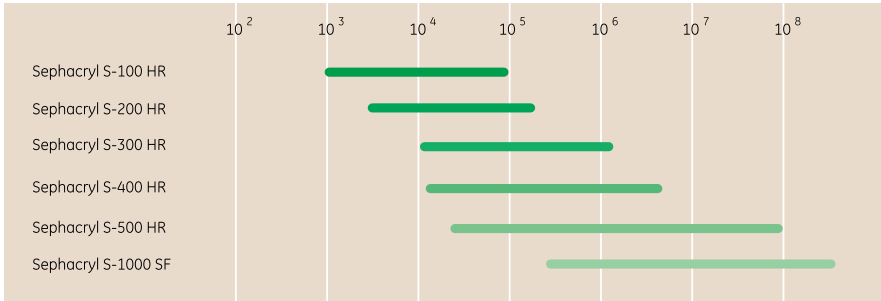


图28 Sephacryl高分辨率（HR）的组分收集范围。



图29 Sephacryl可提供零售的柱料和预装柱。

HiPrep Sephacryl S-300 HR, HiPrep Sephacryl S-200 HR和HiPrep Sephacryl S-300 HR使用的参考文献列表可以从网址www.gelifsciences.com/protein-purification获得。

图30显示了不同Sephacryl高分辨率选择性的比较。

Sephacryl代表性的选择性和压力-流速关系曲线显示在图31a和31b。

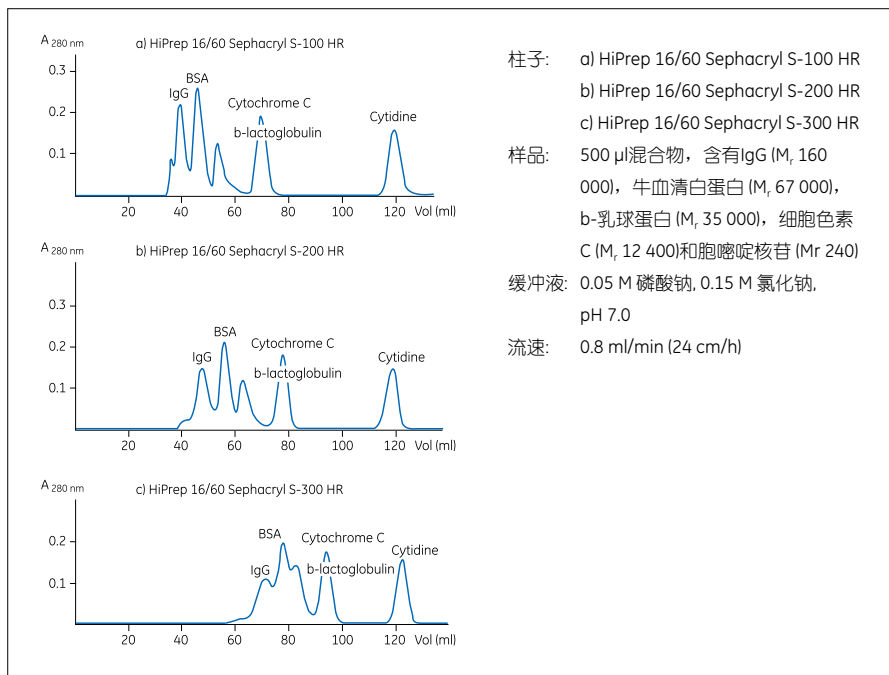


图30 HiPrep 16/60 Sephacryl S-100 HR, HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 HR和HiPrep 16/60 Sephacryl S-300 HR柱子选择性的比较。

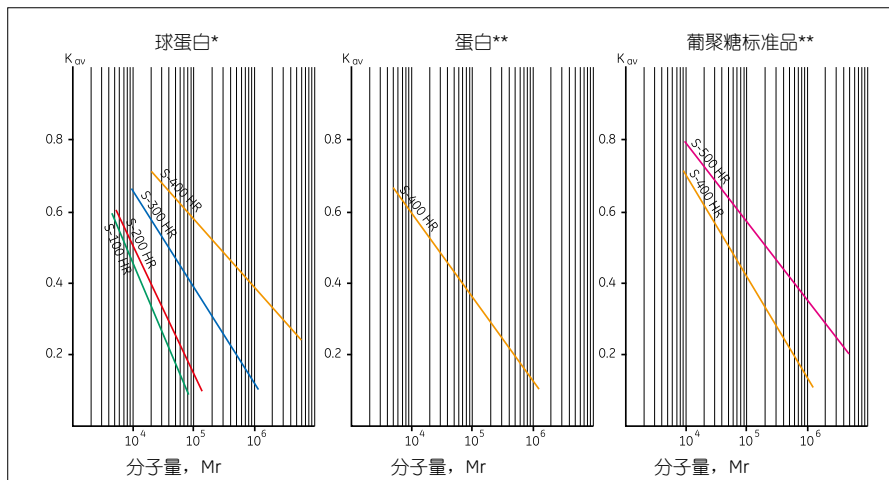


图31a 不同Sephacryl高分辨率柱料的选择性曲线。

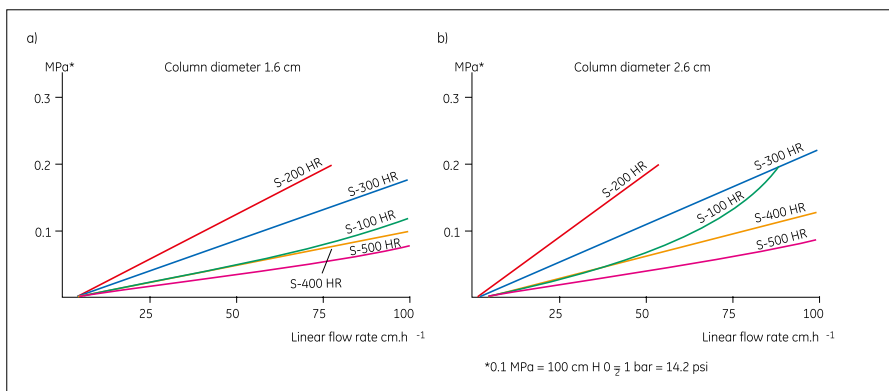


图31b 应用Sephacryl高分辨率柱料，压力随着流速变化的函数曲线。柱床高度近似60厘米，蒸馏水，温度25摄氏度。为了计算体积流速，使用线性流速乘以柱子的横截面（XK 16是2平方厘米，而XK 26是5.3平方厘米）。

Sephacryl高分辨率（HR）是一种合成柱料，是由烯丙基葡聚糖与N,N'-甲亚二丙烯酰胺共价交联形成高机械强度的疏水性柱料，图32给出了结构图示。通过控制葡聚糖的组成比例，柱料的孔洞不同，生产出了五种不同分离特性的产品。Sephacryl HR的机械硬度甚至允许使用相对粘稠的洗涤剂，如8 M尿素，按照实际需要的流速使用。在常规的色谱条件（A280，0.05 M磷酸，0.15 M氯化钠，pH 7.0）下，Sephacryl HR可以得到下列物质至少96%的产率：蓝色葡聚糖 2000，铁蛋白，过氧化氢酶，醛缩酶，牛血清白蛋白，卵白蛋白，b-乳球蛋白 A+B，凝乳蛋白酶原 A，肌球蛋白，溶菌酶，核糖核酸酶 A和细胞色素 C。为了获得最好的结果，推荐使用至少0.15 M的离子强度。

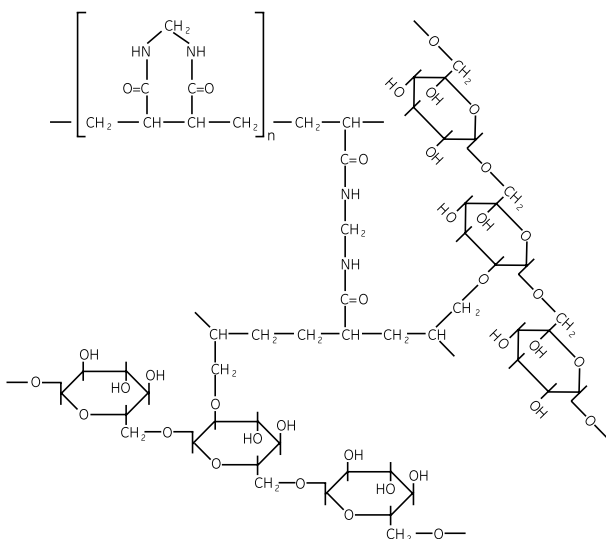


图32 Sephacryl HR的部分结构

分离选择

产品	组分收集范围 分子量 (球蛋白)	样品上样量	最大操作反压力	推荐操作流速 ‡
HiPrep 16/60 Sephacryl S-100 HR†	$1 \times 10^3 - 1 \times 10^5$	≤ 5 ml	0.15 MPa, 5 bar, 21 psi	0.5 ml/min
HiPrep 26/60 Sephacryl S-100 HR†	$1 \times 10^3 - 1 \times 10^5$	≤ 13 ml	0.15 MPa, 5 bar, 21 psi	1.3 ml/min
Sephacryl S-100 HR†	$1 \times 10^3 - 1 \times 10^5$	0.5-4%总柱体积	0.2 MPa, 2 bar, 28 psi	10-35 cm/h
HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 HR†	$5 \times 10^3 - 2.5 \times 10^5$	≤ 5 ml	0.15 MPa, 5 bar, 21 psi	0.5 ml/min
HiPrep 26/60 Sephacryl S-200 HR†	$5 \times 10^3 - 2.5 \times 10^5$	≤ 13 ml	0.15 MPa, 5 bar, 21 psi	1.3 ml/min
Sephacryl S-200 HR†	$5 \times 10^3 - 2.5 \times 10^5$	0.5-4%总柱体积	0.2 MPa, 2 bar, 28 psi	10-35 cm/h
HiPrep 16/60 Sephacryl S-300 HR†	$1 \times 10^3 - 1.5 \times 10^6$	≤ 5 ml	0.15 MPa, 5 bar, 21 psi	0.5 ml/min
HiPrep 26/60 Sephacryl S-300 HR†	$1 \times 10^3 - 1.5 \times 10^6$	≤ 13 ml	0.15 MPa, 5 bar, 21 psi	1.3 ml/min
Sephacryl S-300 HR†	$1 \times 10^3 - 1.5 \times 10^6$	0.5-4%总柱体积	0.2 MPa, 2 bar, 28 psi	10-35 cm/h
Sephacryl S-400 HR†	$2 \times 10^3 - 8 \times 10^6$	0.5-4%总柱体积	0.2 MPa, 2 bar, 28 psi	10-35 cm/h
Sephacryl S-500 HR†	-	0.5-4%总柱体积	0.2 MPa, 2 bar, 28 psi	10-35 cm/h
Sephacryl S-1000 SF (Superfine)	-	0.5-4%总柱体积	不确定	2-30 cm/h

* 高分辨率。

† 为了获得最大的分辨率，使用尽可能少的样品体积，但是注意样品体积少于0.5%通常不可以提高分辨率。

‡ 参见附录5获取线性流速 (cm/h) 和体积流速 (毫升每小时) 的相互转换信息。

分离样品

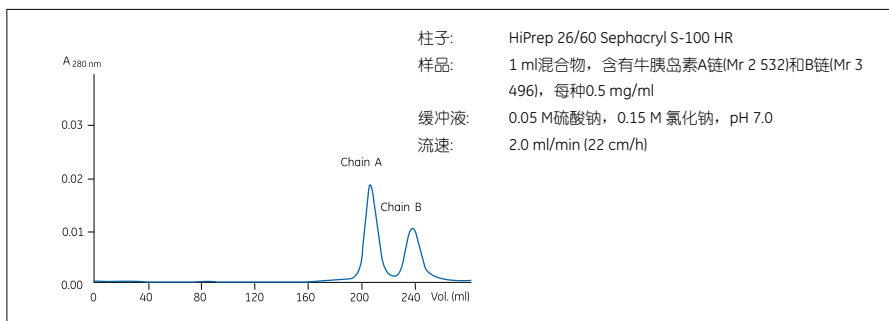


图33 应用HiPrep 26/60 Sephacryl S-100 HR进行胰岛素链的分离。

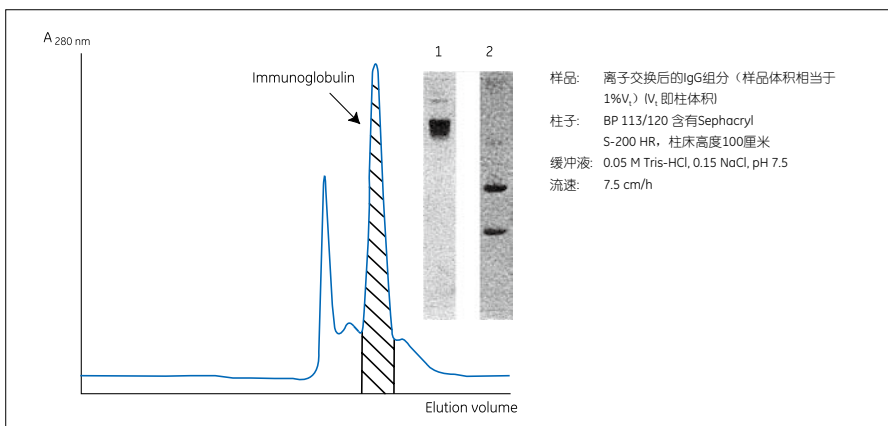


图34 Sephacryl S-200 HR进行单克隆抗体的纯化。插入的图显示了免疫球蛋白混合物经梯度SDS-PAGE分离的分析结果。条带1是自然状态的样品；条带2是经过2-巯基乙醇还原的样品。

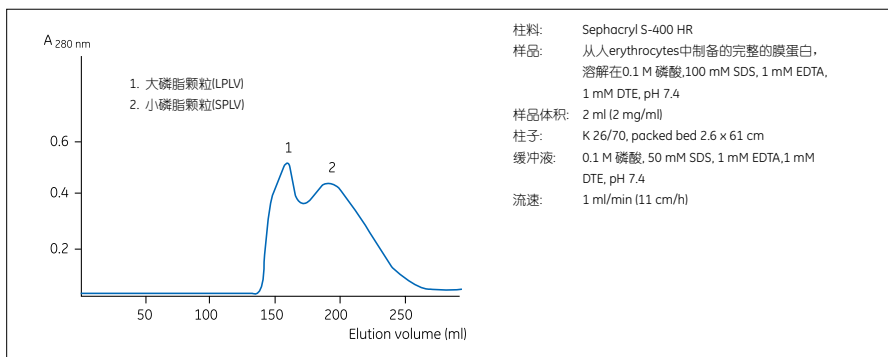


图35 应用Sephacryl S-400 HR凝胶过滤很快的将磷脂颗粒（liposomes）分离成为大磷脂颗粒(LPLV)和小磷脂颗粒(SPLV)。（数据由瑞典Uppsala大学生物医学中心生化系E. Greijer和P. Lundahl提供）。

运行分离

缓冲液：0.05 M磷酸钠，0.15 M氯化钠，pH 7或选择样品储存或下一步溶解的缓冲液。

使用0.15 M氯化钠，或者等离子强度的缓冲液，避免与柱料的pH依赖的非离子相互作用。在非常低的离子强度，柱料上少量阴离子电荷基团的出现可以引起碱性蛋白的反应迟滞或酸性蛋白的排除。

样品要充分溶解。通过离心或者过滤去除颗粒物（参见附录3）。运行过程中，总是使用脱气的缓冲液，维持恒定的温度，避免在柱子中引入气泡。

在色谱系统上设置合适的压力界限，避免损坏已经装好的柱子。

1. 第一次使用，或者长期储存后，使用至少0.5倍柱子体积的蒸馏水进行柱子平衡，流速为15 cm/h (16/60柱子流速为0.5 ml/min，或者26/60流速为1.3 ml/min)。
2. 两个柱子体积的缓冲液进行柱子平衡，流速为30 cm/h (16/60柱子流速为1.0 ml/min，或者26/60流速为2.6 ml/min)。
3. 降低线性流速至15 cm/h。为了获得最好的分辨率，使用相当于1%柱体积的样品体积 (16/60柱子为1.2毫升，或者26/60为3.2毫升)。可以使用0.5-4%柱体积的样品体积。
4. 使用一个柱子体积的缓冲液进行洗脱。
5. 使用一个新的样品之前，使用一个柱子体积的缓冲液，流速30 cm/h进行柱子重新平衡，直到A₂₈₀监控的基线稳定。



通过测定每米理论塔板数和峰的对称性，在每次间隔检测柱子的性能。预装柱提供了推荐值。参见95页如何检测柱子的效率。

参见26页获取分离优化的建议。



已经装好的柱床暴露在4至40摄氏度温度范围时，会破坏柱效，柱子需要重新装柱。

清洗

1. 使用0.5倍柱子体积的0.2 M NaOH进行清洗，流速为15 cm/h (16/60柱子流速为0.5 ml/min，或者26/60流速为1.3 ml/min)，以去除绝大多数非特异吸附的蛋白质。
2. 立即使用两个柱子体积的缓冲液进行再平衡，或直到A₂₈₀监控的基线和洗脱剂的pH稳定。如果缓冲液含有去污剂，可能必须进行进一步的平衡。



每10到20次分离后推荐运行常规清洗，但是清洗的频率也取决于上样样品的自然特性。

如果需要，Sephacryl高分辨率柱料可以在重复121摄氏度、pH 7条件下30分钟进行自剪切，而不会显著地影响其色谱特性。在进行自剪切之前，柱料必须从柱子中移出，因为柱子中的某些成分不能耐受这么高的温度。

去除严重的污染物

使用下面的溶液在室温进行反向洗脱，流速为10 cm/h (16/60柱子为0.3 ml/min，而26/60为0.8 ml/min)：

1. 使用0.25倍柱子体积的0.5 M NaOH进行清洗 (为了去除疏水蛋白或脂蛋白)，接着使用四个柱子体积的蒸馏水进行清洗。
2. 使用0.5倍柱体积的30% 异丙醇进行清洗 (为了去除脂类和非常疏水的蛋白质)，接着使用两个柱子体积的蒸馏水进行清洗。

对于污染的极端例子，请参考产品提供的用户手册。



只有在严重污染的情况下，才可以考虑反向清洗凝胶过滤柱子。反向清洗操作，有使已经装好的柱子中产生柱槽的危险，导致分辨率低下，效率缺失，需要重新装柱。专业的装柱似乎不太受影响，但是必须考虑极端情况。

柱料特性

构成：Sephacryl是一种合成柱料，是由烯丙基葡聚糖与N,N'-甲叉二丙烯酰胺共价交联形成高机械强度的疏水性柱料。葡聚糖的组成比例决定了柱料的孔洞不同。

产品	效率：每米理论塔板数（仅预装柱）	pH稳定性†	颗粒大小	平均颗粒大小
Sephacryl S-100 HR*	>5 000 m ⁻¹	长期: 3-11 短期: 2-13	25-75 μm	47 μm
Sephacryl S-200 HR*	>5 000 m ⁻¹	长期: 3-11 短期: 2-13	25-75 μm	47 μm
Sephacryl S-300 HR*	>5 000 m ⁻¹	长期: 3-11 短期: 2-13	25-75 μm	47 μm
Sephacryl S-400 HR*	‡	长期: 3-11 短期: 2-13	25-75 μm	47 μm
Sephacryl S-500 HR*	‡	长期: 3-11 短期: 2-13	25-75 μm	47 μm
Sephacryl S-1000 SF(Superfine)	‡	长期: 3-11 短期: 2-13	40-105 μm	65 μm

*高分辨率。

†长期稳定性指的是柱料在长时间处于该pH范围保持稳定，对于色谱性能没有不利的副作用。短期稳定性指的是再生、在位清洗和卫生处理过程中的pH范围。所有的范围都是基于通用电气医疗集团的经验和知识估计的。

‡每米9000的效率已经获得，但是极大的取决于柱子装是如何。

化学稳定性

Sephacryl高分辨柱料在所有通常使用的液体缓冲液中保持稳定，以及添加剂如去污剂（1%SDS）、变性剂（8 M尿素或6 M 盐酸胍啶）。柱料在30%的乙腈，0.5 M的氢氧化钠，高达24%的乙醇，高达1 M的乙酸，高达30%的异丙醇中也保持稳定。

储存

没有使用的柱料保存在4至25摄氏度20%乙醇中，不要冰冻。

柱子可以低流速（0.01 ml/min）连接在色谱系统中保存，缓冲液持续流过柱子，防止细菌生长，或者气泡进入，保护已经装好的柱床不受破坏。

对于长期储存，使用四倍柱体积的蒸馏水清洗后，接着使用四倍体积的20%的乙醇清洗。储存在4至25摄氏度。

彻底去除乙醇/水混合物中的气体，使用低流速，检测柱子平衡时的反压力。

避免温度变化引起已装柱床中气泡的产生。

Superose: 广泛的分离范围，但是不适合工业规模的分离

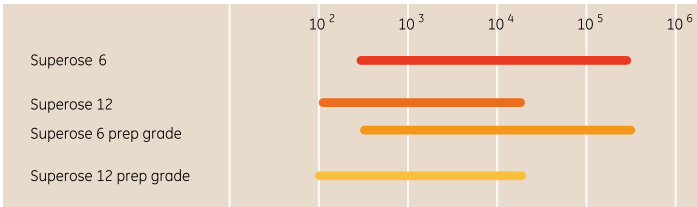


图36 Superose的组分分离范围

Superose是基于高交联的多孔琼脂糖的柱料，具有高物理和化学稳定性。图36给出了Superose的代表性的组分分离范围。

Superose的机械强度甚至允许在实际流速中使用相对粘稠的洗脱剂，如8 M尿素。在常规的色谱条件下，当使用离子强度在0.15 M到1.5 M范围的缓冲液时，蛋白和Superose之间的非特异相互作用可以忽略不计。

有些疏水相互作用已经引起了注意，尤其是一些复合物，如小一些的疏水和/或芳香肽段、膜蛋白和/或脂蛋白，比预计的晚些洗脱。然而，在有些应用中，这些相互作用可以被用来作为增加分离分辨率的优势。

图37 显示了Superose的代表性选择性曲线。

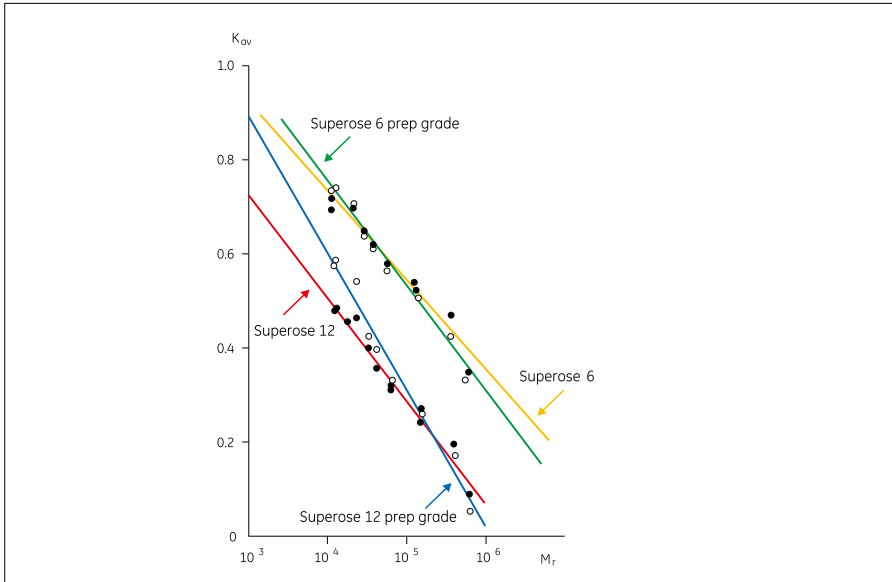


图37 Superose分离球蛋白的选择性曲线。

图38 显示了Superose 6和Superose 12预装柱的不同选择性的比较。

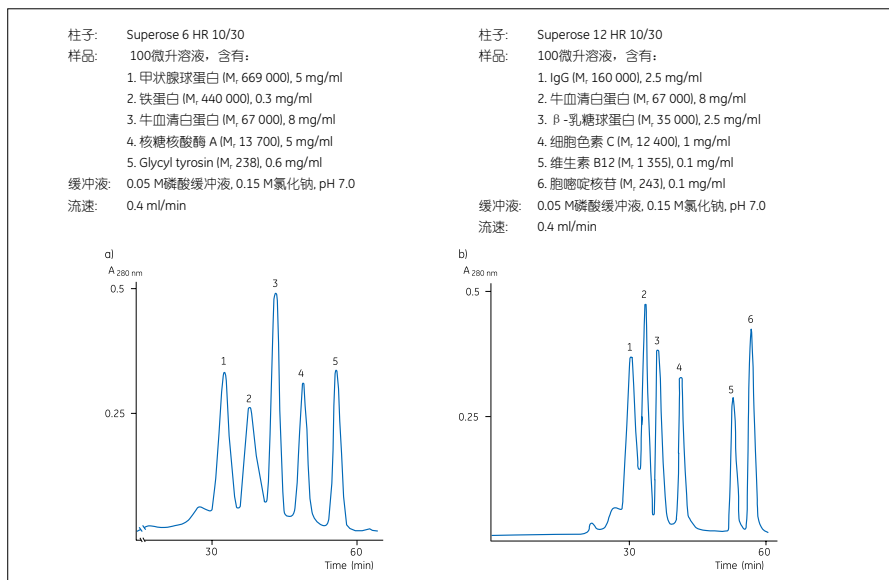



图38 a) Superose 6 HR 10/30分离标准蛋白, 分子量范围: 5 000-5 000 000。b) Superose 12 HR 10/30分离标准蛋白, 分子量范围: 1 000-300 000。

分离选择

Superose有不同的颗粒大小 (11 μm, 13 μm和30 μm) 和两种不同的选择性 (Superose 6和Superose 12) 可供选择。

 11 μm和13 μm颗粒适合分析分离, 30 μm颗粒适合制备性分离。

产品	组分收集范围 分子量 (球蛋白)	样品上样量*	最大操作反压力	推荐操作流速†
Superose 6 PC 3.2/30	$5 \times 10^3 - 5 \times 10^6$	200 μl	1.2 MPa, 12 bar, 175 psi	<0.1 ml/min
Superose 6 HR 10/30	$5 \times 10^3 - 5 \times 10^6$	25-250 μl	1.5 MPa, 15 bar, 220 psi	0.3-0.5 ml/min
Superose 6 prep grade	$5 \times 10^3 - 5 \times 10^6$	0.5-4% 总柱体积	0.4 MPa, 4 bar, 58 psi	<40 cm/h
Superose 12 PC 3.2/30	$1 \times 10^3 - 3 \times 10^6$	200 μl	2.4 MPa, 24 bar, 350 psi	<0.1 ml/min
Superose 12 HR 10/30	$1 \times 10^3 - 3 \times 10^6$	25-250 μl	3 MPa, 30 bar, 435 psi	0.5-1.0 ml/min
Superose 12 prep grade	$1 \times 10^3 - 3 \times 10^6$	0.5-4%总柱体积	0.7 MPa, 7 bar, 101 psi	<40 cm/h

*为了获得最大的分辨率, 使用尽可能少的样品体积, 但是注意样品体积少于0.5%通常不可以提高分辨率。

†参见附录5获取线性流速 (cm/h) 和体积流速 (毫升每小时) 的相互转换信息。

分离样品

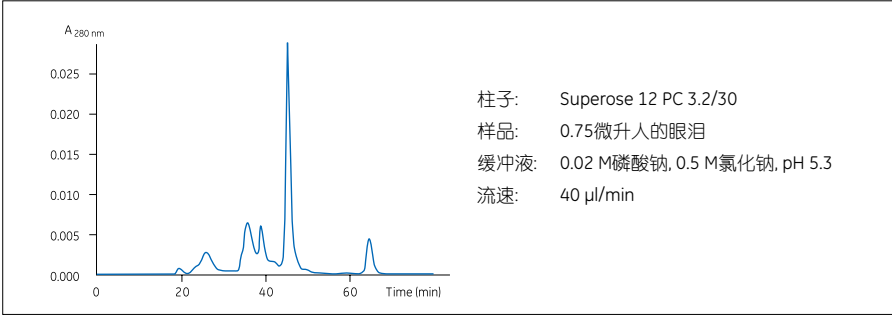


图39 0.75微升人眼泪的微组分分离。

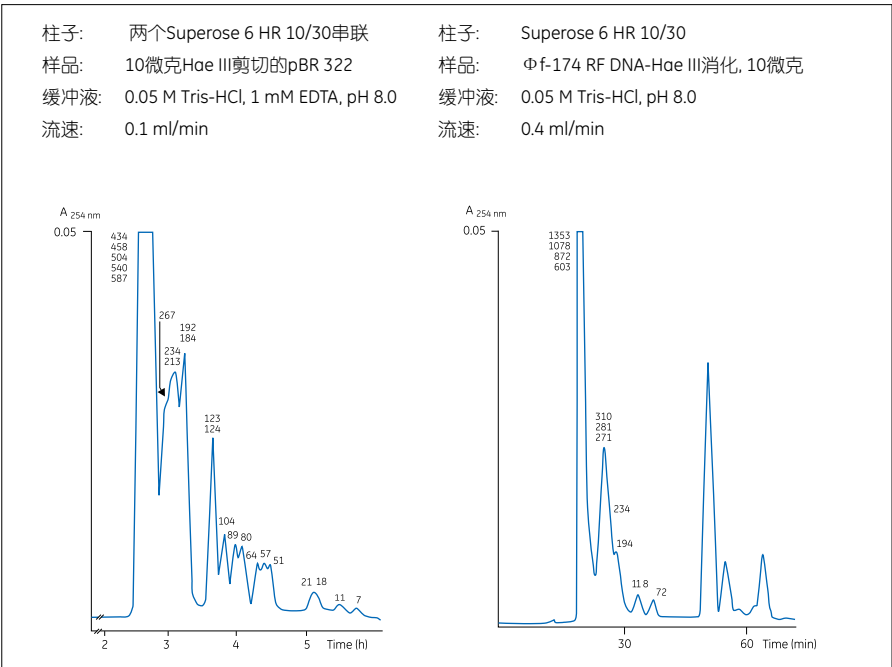




图40 Superose 6 HR 10/30分离DNA片段。峰上的数字对应碱基对数目。

运行分离

缓冲液: 0.05 M磷酸钠, 0.15 M氯化钠, pH 7, 或者选择样品储存或下一步溶解的缓冲液。

使用0.15 M氯化钠, 或者等离子强度的缓冲液, 避免与柱料的pH依赖的非离子相互作用。在非常低的离子强度, 柱料上少量阴离子电荷基团的出现可以引起碱性蛋白的反应迟钝或酸性蛋白的排除。

 样品要充分溶解。通过离心或者过滤去除颗粒物质（参见附录3）。运行过程中，总是使用脱气的缓冲液，维持恒定的温度，避免在柱子中引入气泡。

 在色谱系统上设置合适的压力界限，避免损坏已经装好的柱子。

通过测定每米理论塔板数和峰的对称性，在每次间隔检测柱子的性能。预装柱提供了推荐值。参见96页如何检测柱子的效率。

参见26页获取分离优化的建议。



已经装好的柱床暴露在4至40摄氏度温度范围时，会破坏柱效，柱子需要重新装柱。

清洁

1. 使用1倍柱子体积的0.5 M 氢氧化钠进行清洗，流速为40 cm/h（HR 10/30柱子流速为0.5 ml/min）。
2. 立即使用一个柱子体积的蒸馏水或缓冲液流速为40 cm/h进行清洗。
3. 继续使用两个柱子体积的缓冲液进行再平衡，或直到基线和洗脱剂的pH稳定。

对于污染的极端例子，请参考产品提供的用户手册。

在特定的情况下，可能需要更换底部的滤网或者移走并丢弃凝胶顶部2到3毫米。这些操作必须进行的极其小心，以避免严重的分辨率的丢失。



只有在严重污染的情况下，才可以考虑反向清洗凝胶过滤柱子。反向清洗操作，有使已经装好的柱子中产生柱槽的危险，导致分辨率低下，效率缺失，需要重新装柱。专业的装柱似乎不太受影响，但是必须考虑极端情况。

Superose制备级柱料可以在重复121摄氏度、pH 7条件下30分钟进行自剪切，而不会显著地影响其色谱特性。在进行自剪切之前，柱料必须从柱子中移出，因为柱子中的某些成分不能耐受这么高的温度。

柱料特性

构成：Superose是由高度交联的琼脂糖形成的。

Superose制备级比Superose预装柱有更低的疏水相互作用。Superose 6较Superose 12有更低的疏水相互作用。

产品	效率：每米理论塔板数*（仅预装柱）	pH稳定性†	颗粒大小	平均颗粒大小
Superose 6	>30 000 m ⁻¹	长期: 3-12 短期: 1-14	11-15 μm	13 μm
Superose 6 prep grade	*	长期: 3-12 短期: 1-14	20-40 μm	30 μm
Superose 12	>40 000 m ⁻¹	长期: 3-12 短期: 1-14	9-13 μm	11 μm
Superose 12 prep grade	*	长期: 3-12 短期: 1-14	20-40 μm	30 μm

*每米10 000的最小柱效适合于装的非常好的柱子。

†长期稳定性指的是柱料在长时间处于该pH范围保持稳定，对于色谱性能没有不利的副作用。短期稳定性指的是再生、在位清洗和卫生处理过程中的pH范围。所有的范围都是基于通用电气医疗集团的经验和知识估计的。

化学稳定性

在所有通常使用的液体缓冲液中保持稳定，以及添加剂如去污剂（1%SDS）、变性剂（8 M尿素或6 M 盐酸胍啶），以及30%的乙醇。

储存

没有使用的柱料保存在4至25摄氏度20%乙醇中，不要冰冻。

柱子可以低流速（0.01 ml/min）连接在色谱系统中保存，缓冲液持续流过柱子，防止细菌生长，或者气泡进入，保护已经装好的柱床不受破坏。

对于长期储存，使用两倍柱体积的蒸馏水清洗后，接着使用两倍体积的20%的乙醇清洗。储存在4至25摄氏度。

彻底去除乙醇/水混合物中的气体，使用低流速，检测柱子平衡时的反压力。

避免温度变化引起已装柱床中气泡的产生。

Sephadex: 高或低分子量物质的快速组群分离，如除盐、缓冲液交换和样品净化

图41显示了Sephadex是由环氧氯丙烷和葡聚糖交联而制备的。

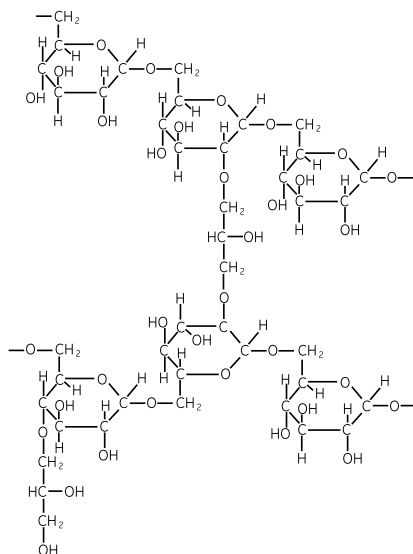


图41 Sephadex的部分结构。

Sephadex由于交联程度的不同而有不同的种类，因此，它们的溶胀程度和特定分子大小的选择性也有不同，后面68页显示了不同柱料的特性。

- Sephadex G-10非常适合从小分子（分子量小于100）中分离生物分子，如肽段（分子量大于700）。
- Sephadex G-50非常适合从分子量小于1 500的分子中分离分子量大于30 000的分子，如从未标记的染料中分离标记的蛋白或DNA。这个柱料经常用于从长链核酸中去除小的核苷酸。
- Sephadex G-25主要被推荐用于含有球蛋白的组群分离。这个柱料用于从分子量大于5 000的分子中去除盐和其它小污染物非常有效。参见下面，根据不同应用的需要，使用不同的颗粒大小的柱料进行装柱。颗粒大小决定了流速和可以上样的最大样品体积。例如，越小的颗粒，柱效越高（峰形狭窄而对称），但是由于产生了更高的操作压力，需要运行的更加缓慢。

Sephadex G-25	应用
超级粉末	用于最高的柱效（最高的分辨率），但是操作压力增加
粉末	实验室规模分离
中等粗	当必须使用高流速和低操作压时，如大规模
粗	用于实验室处理

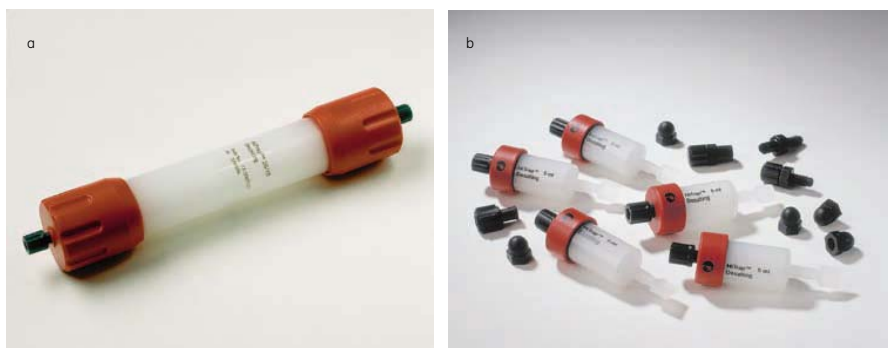


图42 预装柱: a) HiPrep 26/10 除盐, b) HiTrap 除盐 5毫升。

文献中经常提到透析是除盐和其它小分子来更换样品缓冲液构成的有效技术。然而，透析技术通常非常缓慢，需要大体积的缓冲液。在处理过程中，或由于蛋白裂解作用，与透析膜的非特异结合，都可能造成样品的丢失。使用Sephadex G-25的除盐柱，是一种更加简单和快速的除盐技术，可以用来高分子量和低分子量物质的组群分离。

在快速简单的过程中，样品进行了除盐，更换到了新的缓冲液，低分子量物质被去掉了。分离的快速和高体积容积使得大样品体积的快速和高效处理成为可能。图43显示，高达除盐柱30%总柱体积的样品体积可以上样，而且比高分辨率组分收集的流速更高的情况下进行分离。

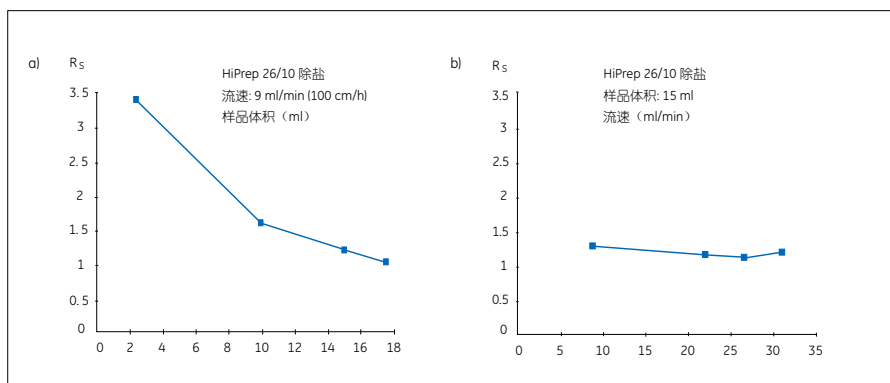


图43 a) 样品体积对分辨率的影响。 b) 流速对分辨率的影响。

除盐柱不仅用来去除低分子量的污染物，如盐，也可以用来进行在不同的色谱技术之前或之后进行缓冲液的更换，用来快速的去除试剂，终止反应。组群分离的例子包括：

- 从用来进行阴离子交换色谱或者核酸制备的培养液中去除酚红
- 在DNA测序时去除没有结合的核苷酸
- 去除游离的低分子量标记物
- 终止大分子和低分子量反应物的反应
- 从酶中去除产物、辅因子或抑制物
- 从核酸标记反应中去除没有反应的放射性标记物，如[α - 32 P] ATP。

分离选择

对于组群分离来讲，应当选择的柱料是高分子量分子在无效体积被洗脱，而且居于最小峰宽，或者在柱时间最短。最低分子量物质应当在一个柱体积缓冲液流过柱子时出现洗脱。

产品	洗脱限制	样品上样 容积	样品洗脱体积 (相对于最大 上样量)	最大操作反压力 (MPa, bar, psi)	推荐流速
HiTrap Desalting 5 ml (Sephadex G-25 Superfine)	$>5 \times 10^3$	0.25-1.5 ml	1.0-2.0 ml	0.3 MPa, 3 bar, 42 psi	1-10 ml/min
HiPrep 26/10 Desalting (Sephadex G-25 Fine)	$>5 \times 10^3$	2.5-15 ml	7.5-20 ml	0.15 MPa, 1.5 bar, 22 psi	9-31 ml/min
PD-10 (Sephadex G-25 Medium)	$>5 \times 10^3$	1.5-2.5 ml	2.5-3.5 ml	重力下运行	重力下运行
NICK*	$>3 \times 10^4$	<0.1 ml	0.4 ml	重力下运行	重力下运行
MicroSpin™ G-25†	$>5 \times 10^3$	10-100 μ l	-	离心	离心
NAP-5*	$>5 \times 10^3$	<0.5 ml	1.0 ml	重力下运行	重力下运行
NAP-10*	$>5 \times 10^3$	<1.0 ml	1.5 ml	重力下运行	重力下运行
NAP-25*	$>5 \times 10^3$	<2.5 ml	3.5 ml	重力下运行	重力下运行
Sephadex G-25 Superfine	$>5 \times 10^3$	n.a.	n.a.	Darcy法则应用‡	Darcy法则应用‡
Sephadex G-25 Fine	$>5 \times 10^3$	n.a.	n.a.	Darcy法则应用‡	Darcy法则应用‡
Sephadex G-25 Medium	$>5 \times 10^3$	n.a.	n.a.	Darcy法则应用‡	Darcy法则应用‡
Sephadex G-25 Coarse	$>5 \times 10^3$	n.a.	n.a.	Darcy法则应用‡	Darcy法则应用‡
Sephadex G-50 Fine	$>3 \times 10^4$	n.a.	n.a.	Darcy法则应用‡	Darcy法则应用‡
Sephadex G-10	> 700	n.a.	n.a.	Darcy法则应用‡	Darcy法则应用‡

* NICK柱子装有Sephadex G-50 Fine DNA Grade，NAP columns柱子装有Sephadex G-25 Medium DNA Grade。

† 一系列微离心柱可用来蛋白除盐以及标记的DNA 片断和PCR产物的纯化。参考通用电气医疗集团的生物学产品目录来获取更多信息。

‡ 在实际应用中，这意味着当使用非Sephadex的其它凝胶过滤柱料时，必须考虑压力/流速。流速加倍则柱压加倍。参见附录2 Darcy法则的解释。

为了获得方便可靠的性能，使用预装的Sephadex柱子，如HiTrap除盐5毫升和HiPrep 26/10除盐。标出使用HiPrep 26/10除盐和HiTrap除盐的文献列表可以从网址www.gelifsciences.com/protein-purification-labresearch获得。

如果有生物或放射性污染的危险，或者样品之间的任何残留都是不可接受的情况下，总是使用一次性的柱子。

图44显示了可以使用的仪器类型和可以处理的样品体积，也包括预装柱的选择。

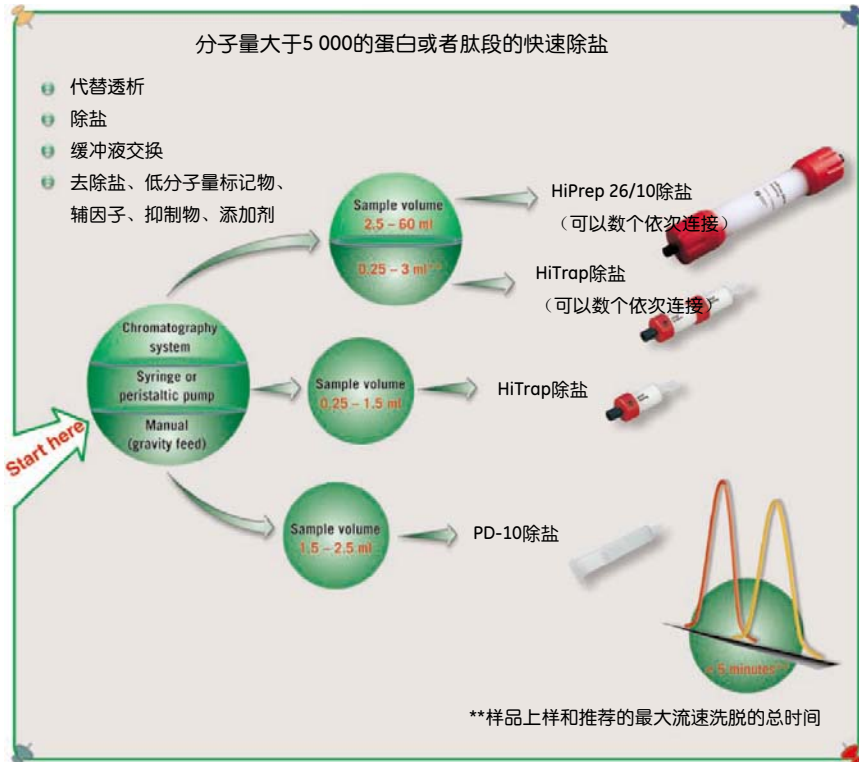


图44 除盐和缓冲液交换预装柱的选择

分离样品

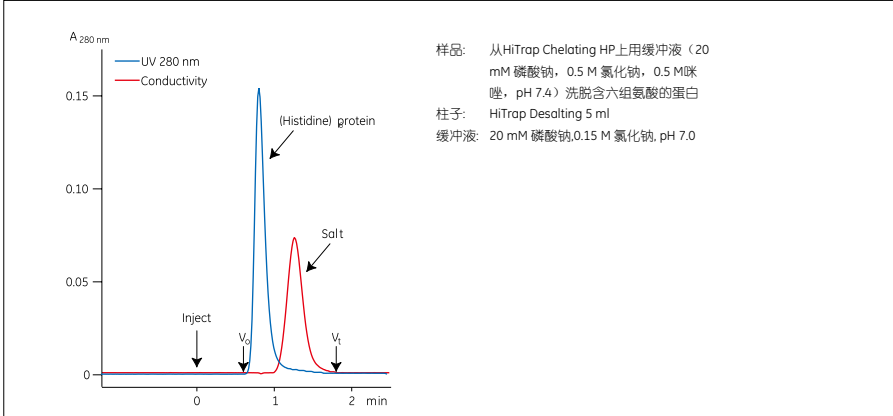


图45 在ÅKTA™prime 上使用HiTrap Desalting 5 ml进行含六组氨酸的融合蛋白除盐。UV (蛋白)和电导 (盐)的峰图可以分开除盐的组分, 方便优化分离条件。

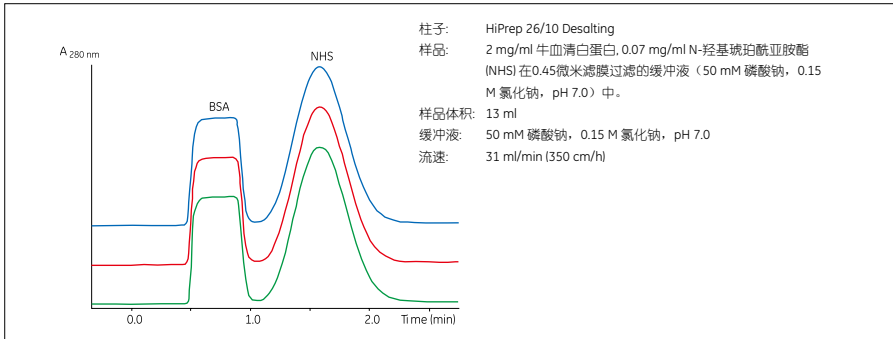


图46 从牛血清白蛋白中去除N-羟基琥珀酰亚胺酯的可重复性结果。

运行分离

每个样品进行除盐和缓冲液交换, 可能需要花费五分钟时间, 对于绝大多数蛋白回收率大于95%。

- 为了阻止可能的离子相互作用, 在除盐过程和最终的样品缓冲液中, 推荐使用低盐浓度(25 mM氯化钠)。如果必须避免出现氯化钠, 可以使用挥发性的缓冲液, 如100 mM的乙酸胺或者100 mM的碳酸氢胺。
- 样品应当完全溶解。离心或者过滤去除颗粒物(参见附录3)。总是使用去除气体的缓冲液, 避免向柱子中引入气泡。
- 当使用常规的液体缓冲液时, 高达70 mg/ml的蛋白样品浓度不影响分离。

如果可能，使用带有UV和电导监控器的色谱系统，方便样品上样的优化。在A280的蛋白洗脱峰和盐峰的出现可以精确的监控，不同的分离可以很容易的进行比较，如图47所示。

如果电导不能监控，又需要完全回收除盐样品，上样体积应当在15%到20%的总柱体积之间。

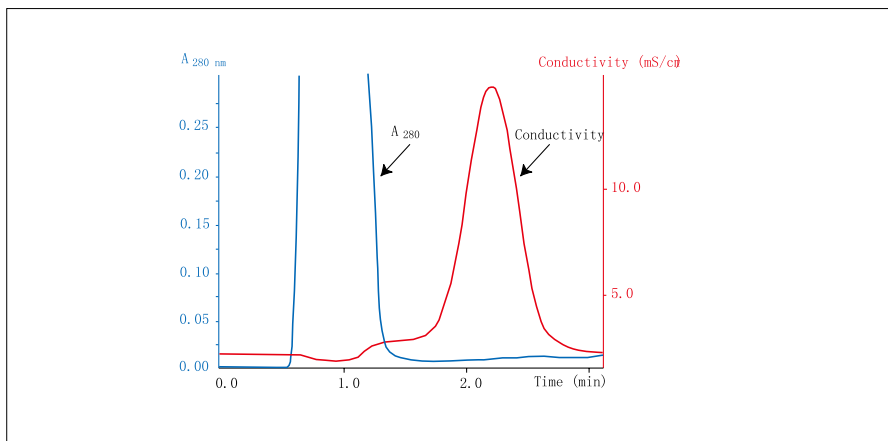


图47 应用HiPrep 26/10 除盐进行鼠血浆的缓冲液交换。

选择1: 使用HiTrap柱子和注射器



推荐的最大样品体积是1.5毫升。下面的表格给出了减少柱子上样的样品体积的效果。

表1 使用注射器或Multipipette™和Hitrap除盐5毫升推荐的样品体积和洗脱体积

样品上样体积	加入的缓冲液	洗脱和收集	产率%	保留盐分%	稀释因子
0.25 ml	1.25 ml	1.0 ml	> 95	0.0	4.0
0.50 ml	1.0 ml	1.5 ml	> 95	< 0.1	3.0
1.00 ml	0.5 ml	2.0 ml	> 95	< 0.2	2.0
1.50 ml	0 ml	2.0 ml	> 95	< 0.2	1.3



步骤3



步骤4



步骤6

1. 用注射器吸满缓冲液。拧开柱子顶部的终止塞。为了避免柱子中产生气泡，“液滴对液滴”连接柱子和注射器（通过提供的接头）。
 2. 移开末端螺旋帽。
 3. 使用25毫升缓冲液流速5ml/min清洗柱子，完全去除20%的乙醇（作为储存液提供）。如果柱子中产生了气泡，使用去除气泡的水洗，直到气泡消失。在上样过程中偶然引入柱子的气泡不会影响分离。
 4. 使用2到5毫升注射器流速1到10ml/min上样。丢弃柱子上洗脱的液体。
 5. 如果样品体积少于1.5毫升，改变为缓冲液，继续注射，直到总共有1.5毫升洗脱液。丢弃柱子上洗脱的液体。
 6. 从表一中选择合适的体积洗脱蛋白。
使用给出的体积收集除盐的蛋白。
- 注意：当使用HiTrap 5毫升柱子时，5ml/min近似对应120滴每分钟。



上样和上缓冲液时也可以使用一个简单的外周蠕动泵。

选择2：使用ÅKTAprime进行简单除盐

ÅKTAprime有单独的HiTrap 除盐5毫升和HiPrep 26/10除盐柱的预编程的模板。



缓冲液制备

准备至少500毫升所需的缓冲液

1. 根据提供的ÅKTAprime线索卡的指导，连接柱子，给系统上缓冲液。
2. 选择应用模板。
3. 开始方法。
4. 输入样品体积，按压OK。

选择3：使用重力上样PD-10柱除盐

缓冲液制备

1. 移走上部的帽，倒掉多余的液体。
2. 剪掉底部的顶。
3. 将柱子放在提供的除盐伴侣里放在塑料盘中，用25毫升缓冲液进行平衡。丢弃洗脱液。
4. 加入总共2.5毫升的样品体积。如果样品体积少于2.5毫升，加入缓冲液使最终体积到达2.5毫升。丢弃洗脱液。
5. 加入3.5毫升缓冲液以洗脱高分子量组分，收集洗脱液。



使用上面描述的标准操作规程，蛋白产率多数大于95%，含有少于4%的盐分（低分子量）污染。稀释因子是一比四。



Sephadex G-10可以装入空的PD-10柱子，使用和PD-10除盐柱相同的模式运行。

除盐的优化

1. 尽可能选择最适合需要进行除盐的样品体积的预装柱（参见分离选择）。
对于大多数分离，提供的指导可以保证获得满意的结果，基本上不需要进行优化。
2. 确保缓冲液条件是分离的最优条件。
3. 选择推荐的最高流速。图48给出了流速影响组群分离的例子。
4. 确定最大的样品上样体积。图49给出了样品体积影响组群分离的例子。

柱子: HiTrap Desalting 5 ml
 样品: 牛血清白蛋白, 2 mg/ml, 缓冲液(0.5 M 氯化钠, 0.05 M 磷酸钠, pH 7.0)
 缓冲液: 0.05 M 磷酸钠, 0.15 M 氯化钠, pH 7.0
 样品体积: 0.8 ml
 流速: 1.7, 3.3, 6.7, 10.0, 13.3, 16.7, 20.0 ml/min

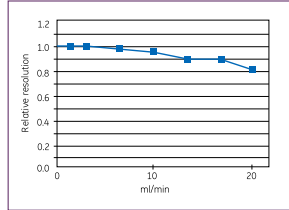
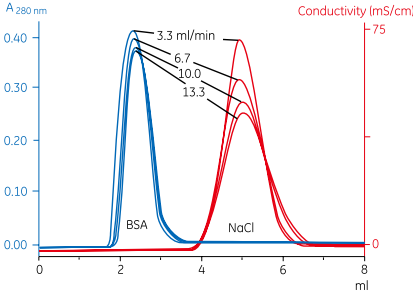


图48 使用HiTrap除盐柱流速对分离的影响

柱子: HiTrap Desalting 5 ml
 样品: 牛血清白蛋白, 2 mg/ml, 缓冲液(0.5 M 氯化钠, 0.05 M 磷酸钠, pH 7.0)
 缓冲液: 0.05 M 磷酸钠, 0.15 M 氯化钠, pH 7.0
 样品体积: 0.8, 1.3, 1.7, 2.2 ml
 流速: 5 ml/min
 收集体积: 1.5 × 毫升

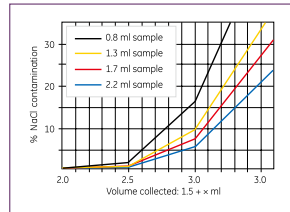
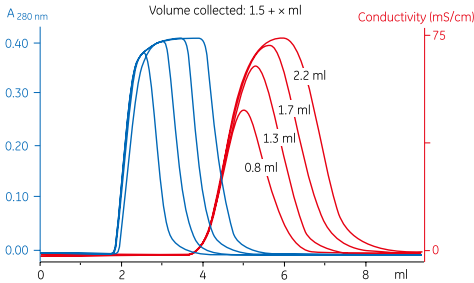


图49 使用HiTrap除盐柱样品体积对分离的影响

当样品体积增加（最大高达30%的总柱体积），稀释因子降低，洗脱后样品中残留的盐分含量有轻微的增加。63页表1论述了使用HiTrap除盐5毫升柱子时的这个效应。



高达30%的总柱体积的样品体积可以在最小的样品稀释下进行分离。更大的样品体积可以使用，但是分辨率会降低。

扩大规模处理大体积样品

依次连接多个柱子增加了有效的柱子体积，因此增加了样品的上样容积。当单独或者串联使用预装的除盐柱时，表2给出了样品的上样容积和稀释因子，也可参见图50HiTrap的应用实例。

表2 除盐/缓冲液交换柱的选择指导

柱子	上样体积 (毫升)	洗脱体积 (毫升)	稀释因子	操作
HiPrep 26/10 Desalting	10	10-15	1-1.5	泵
	15 (max)	15-20	1-1.3	泵
2 × HiPrep 26/10 Desalting	30 (max)	30-40	1-1.3	泵
3 × HiPrep 26/10 Desalting	45 (max)	45-55	1-1.2	泵
4 × HiPrep 26/10 Desalting	60 (max)	60-70	1-1.2	泵
HiTrap Desalting	0.25	1.0	4	注射器/泵
	0.5	1.5	3	注射器/泵
	1.0	2.0	2	注射器/泵
	1.5 (max)	2.0	1.3	注射器/泵
2 × HiTrap Desalting	3.0	4-5	1.3-1.7	注射器/泵
3 × HiTrap Desalting	4.5 (max)	6-7	1.3-1.7	注射器/泵
PD-10 Desalting columns	1.5	3.5	2.3	重力
	2.0	3.5	1.7	重力
	2.5 (max)	3.5	1.4	重力

样品上样容积从1.5毫升增加到7.5毫升

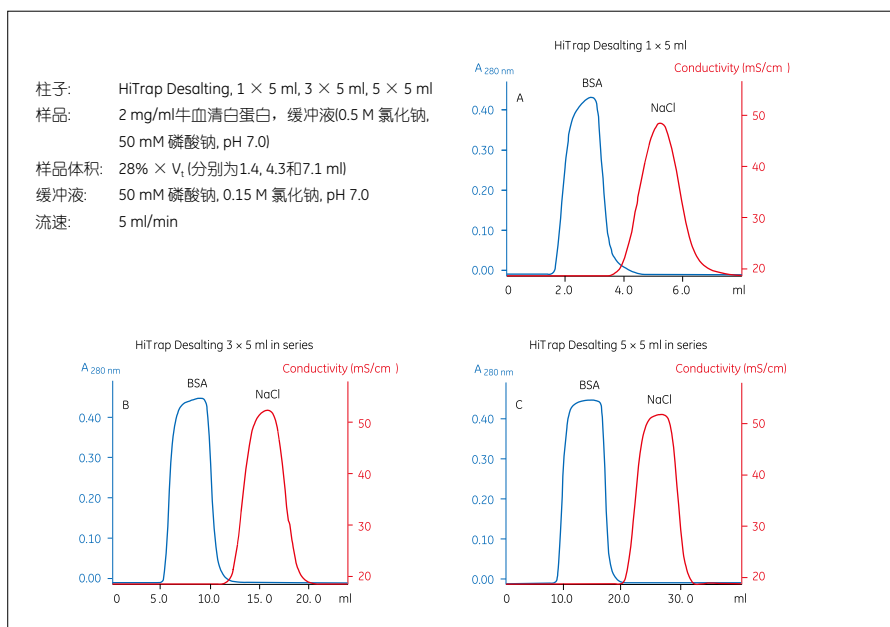


图50 使用串联的HiTrap柱子扩大规模

样品上样容积从15毫升增加到60毫升

依次连接HiPrep 26/10除盐柱子，即两根柱子：样品体积30毫升，四根柱子：样品体积60毫升，如图51所示。即使四根柱子串联，可以维持高流速，且不会引起反压力困难，因此，高达60毫升的样品可以在20至30分钟处理完毕。



图51 四根HiPrep 26/10除盐柱串联连接。

样品体积大于60毫升

选择合适的颗粒大小的Sephadex G-25，重新水化，装一根短、宽的柱子，便于除盐材料的高流速快速回收。参见附录1获得装柱的详细信息。颗粒大小决定可以使用的流速和样品体积，如图52所示。

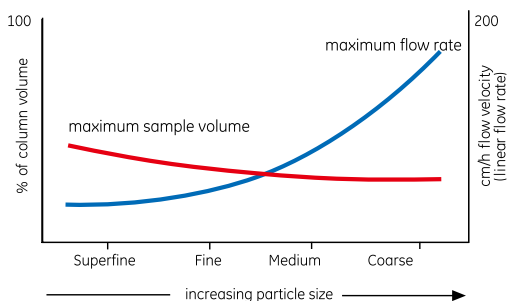


图52 Sephadex G-25：随着颗粒大小不同，推荐的样品体积和流速

- 当需要最高效率时，使用超细粉末级别，柱床高度近似15厘米。
- 实验室规模分离，使用粉末级别，柱床高度近似15厘米。
- 当必须需要高流速，而且低操作压力的制备过程，使用粗糙和中等级别。装柱的柱床高度低于50厘米。粗糙级别适合实验台处理过程。

柱料特性

Sephadex通过交联葡聚糖和环氧氯丙烷制备而成。交联程度的不同产生了不同的Sephadex柱料，影响了它们的溶胀程度和对特定分子大小的选择性。

产品	组分分离范围 (球蛋白)	pH稳定性*	床体积毫升/克 干Sephadex	最大操作流速	颗粒大小, 湿的
Sephadex G-10	$<7 \times 10^2$	长期: 2-13 短期: 2-13	2-3	Darcy法则†	55-165 μm
Sephadex G-25 Coarse	$1 \times 10^3 - 5 \times 10^3$	长期: 2-13 短期: 2-13	4-6	Darcy法则†	170-520 μm
Sephadex G-25 Medium	$1 \times 10^3 - 5 \times 10^3$	长期: 2-13 短期: 2-13	4-6	Darcy法则†	85-260 μm
Sephadex G-25 Fine	$1 \times 10^3 - 5 \times 10^3$	长期: 2-13 短期: 2-13	4-6	Darcy法则†	35-140 μm
Sephadex G-25 Superfine	$1 \times 10^3 - 5 \times 10^3$	长期: 2-13 短期: 2-13	4-6	Darcy法则†	17-70 μm
Sephadex G-50 Fine	$1 \times 10^3 - 3 \times 10^4$	长期: 2-10 短期: 2-13	9-11	Darcy法则†	40-160 μm

*长期稳定性指的是柱料在长时间处于该pH范围保持稳定，对于色谱性能没有不利的副作用。

短期稳定性指的是再生、在位清洗和卫生处理过程中的pH范围。所有的范围都是基于通用电气医疗集团的经验和知识估计的。

†在实际应用中，这意味着当使用非Sephadex的其它凝胶过滤柱料时，必须考虑压力/流速。流速加倍则柱压加倍。参见附录2Darcy法则的解释。

装柱

参见附录1。

清洗

PD-10、NAP、NICK和HiTrap除盐柱子是用完即可丢弃的，但是，根据样品类型，如果不在乎交叉污染，它们可以重复使用数次。

下面是HiPrep 26/10除盐柱的程序：

1. 使用两倍柱体积的0.2 M氢氧化钠或者非离子去污剂溶液(典型的是蒸馏水溶解的0.1至0.5% Triton X-100或0.1 M乙酸)流速为10 ml/min清洗柱子。确保压力下降不超过0.15 MPa (1.5 bar, 22 psi)。
2. 使用五倍柱体积的蒸馏水流速为15 ml/min清洗柱子。
3. 使用前，至少使用五个柱子体积的缓冲液进行再平衡，直到UV监控的基线和pH值稳定。

为了去除沉淀的蛋白和肽段，使用溶解于0.1 M 乙酸, 0.5 M 氯化钠的1 mg/ml的胃蛋白酶充满柱子，室温情况下过夜，或者37摄氏度停留一个小时。重复上面的常规清洗步骤。

化学稳定性

Sephadex在所有通常使用的液体缓冲液中保持稳定，以及添加剂，如例子和非离子去污剂，变性剂（8 M尿素或6 M 盐酸胍啶）。柱料在短链醇类中稳定，如乙醇、甲醇和丙醇，但是超过25%的浓度不经常使用。注意Sephadex在醇类溶液中会收缩。

储存

没有使用的柱料保存在4至25摄氏度20%乙醇中，不要冰冻。

使用过的柱料，使用两倍柱体积的蒸馏水清洗后，接着使用两倍体积的20%的乙醇清洗。储存在4至25摄氏度。

或者，使用两倍柱体积的蒸馏水清洗后，接着使用两倍体积的0.01M的氢氧化钠清洗。氢氧化钠溶液是抑菌的，非常容易去除，而且不会使柱料收缩。

彻底去除乙醇/水混合物中的气体，使用低流速，检测柱子平衡时的反压力。

避免温度变化引起已装柱床中气泡的产生。

第三章 凝胶过滤理论

定义过程

凝胶过滤的结果通常色谱洗脱谱的形式展现（典型的是紫外吸收和 A_{280nm} ），随着样品按照分子量大小顺序从柱上被洗脱，样品的组分浓度变化，表现为色谱洗脱谱（图53）。没有进入柱料的分子随着缓冲液的流动，以相同的速度，直接流过柱子，在无效体积 V_0 被洗脱。进入部分柱料孔洞的分子，按照分子量减少的顺序从柱上被洗脱。进入全部柱料孔洞的分子，彼此之间没有分离的从柱上流下。这些分子通常在一个全柱体积 V_t 的缓冲液流过柱子之前被洗脱。

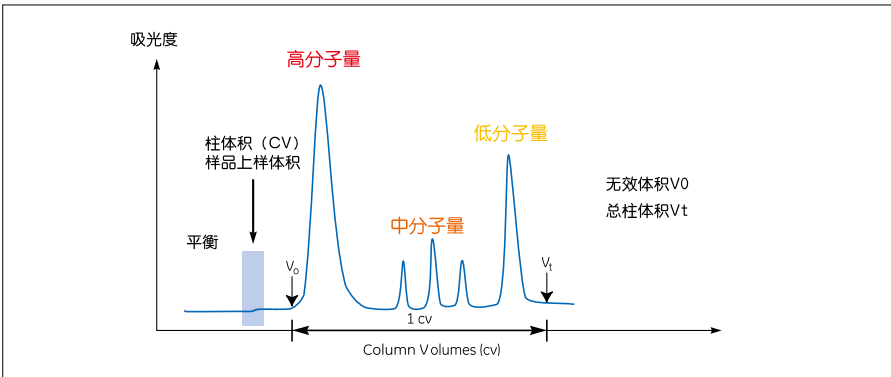


图53 高分辨率组分收集的理论色谱图

每个组分的行为可以使用它的洗脱体积 V_e 的形式表示，可以从色谱图中直接测量决定。

如图54所示，有三种不同的方法测量 V_e ，取决于柱子的上样体积。

A 当非常少的样品上样（与洗脱体积相比少到可以忽略），将洗脱图谱中峰的最高值位置作为 V_e 。

B 如果与洗脱体积相比，样品体积不可以忽略，测量从样品体积的一半处到洗脱图谱中峰的最高值位置的洗脱体积作为 V_e 。

C 当使用了非常大的样品体积（洗脱曲线中显示为平台区域），从样品上样的起点到洗脱峰上升部分的拐点（或高度的一半）的洗脱体积作为 V_e 。

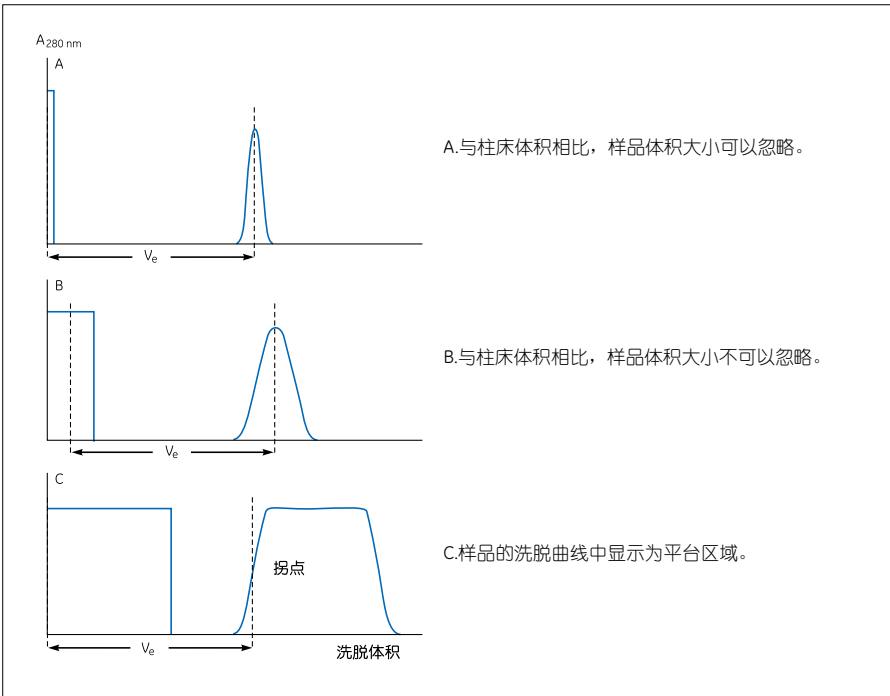


图54 洗脱体积 V_e 的测量

由于凝胶过滤通常是对称峰，洗脱体积非常好确定。然而， V_e 不能完全取决于样品的行为，因为 V_e 随着装柱柱床总体积 V_t 和装柱方式的差异而不同。样品的洗脱最好通过如下获得的分配系数(K_d)来描述：

流动相体积（缓冲液）等于无效体积 V_0 ，即比柱料中最大的孔还要大的分子，直接流过柱床，这些分子停留的缓冲液洗脱体积。装的非常好的柱子，无效体积近似于总柱体积的30%。

固定相体积 V_s ，等于 V_t ，非常小的分子可以进入的柱料中缓冲液的体积，即流动和固定相之间自由分布的分子的洗脱体积减去无效体积。

由于， V_s 或 V_t 在实际应用中很难测定，使用 $V_t - V_0$ 代替要方便得多。因此，固定相估计体积包括形成柱料的固体材料的体积。

K_d 代表给定的分子物种可以分布的固定相组分。为了获得 K_{av} 值，固定相 V_s 可以由 $V_t - V_0$ 取代。

$$K_{av} = (V_e - V_0) / (V_t - V_0)$$

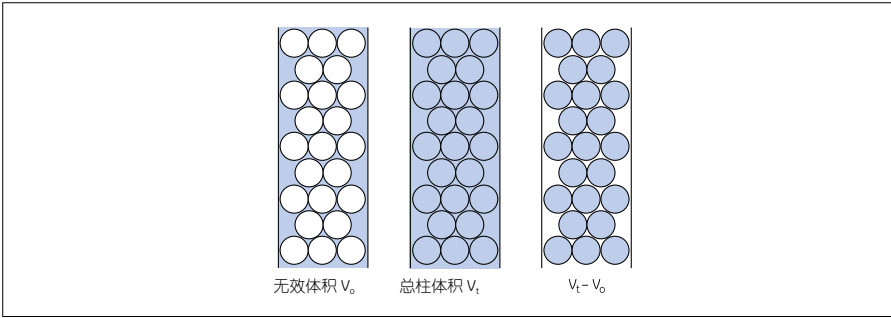


图55 V_t 和 V_0 的示意图。注意 $V_t - V_0$ 包括形成柱料的固体材料的体积。(Fischer, L. 生化和分子生物学实验室技术。第一卷第二部分。凝胶色谱导论。北荷兰出版公司，阿姆斯特丹。获得作者和出版社的允许进行翻版)。

由于 $(V_t - V_0)$ 包括所有的可溶分子不可以进入的柱料的体积。 K_{av} 不是真正的分配系数。然而，对于给定的柱料， $K_{av} : K_d$ 比值是一个常数，与分子的自然特性和浓度无关。 K_{av} 非常容易测定，和 K_d 类似，与柱子的直径和装柱情况无关，反映了样品的行为。其它的标准化数据的方法给出的数值会受到装柱情况的影响而发生变化。图56给出了这些术语之间的近似关系。

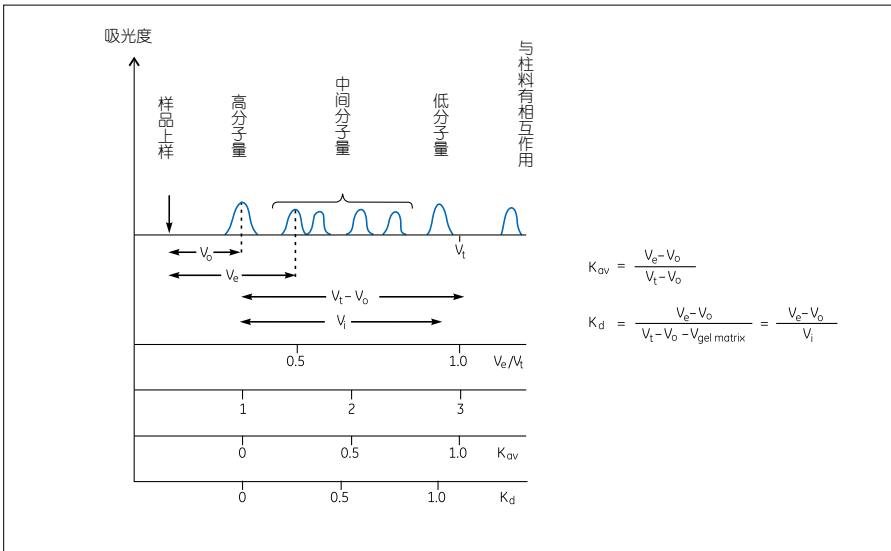


图56 用来标准化洗脱行为的几个表达之间的关系。

选择性曲线和柱料的选择

分配系数 K_{av} 与分子的大小有关。相似形状和密度分子的 K_{av} 值和分子量对数值之间存在S形的关系。在特定的范围之内， K_{av} 值和分子量对数值之间存在线性关系。凝胶过滤柱料的选择性只取决于它的孔大小的分布，通过选择性曲线进行描述。通过使用一套标准蛋白，将 K_{av} 值和分子量对数值进行描点做图，就可以获得任一凝胶柱料的选择性曲线，如图57所示。

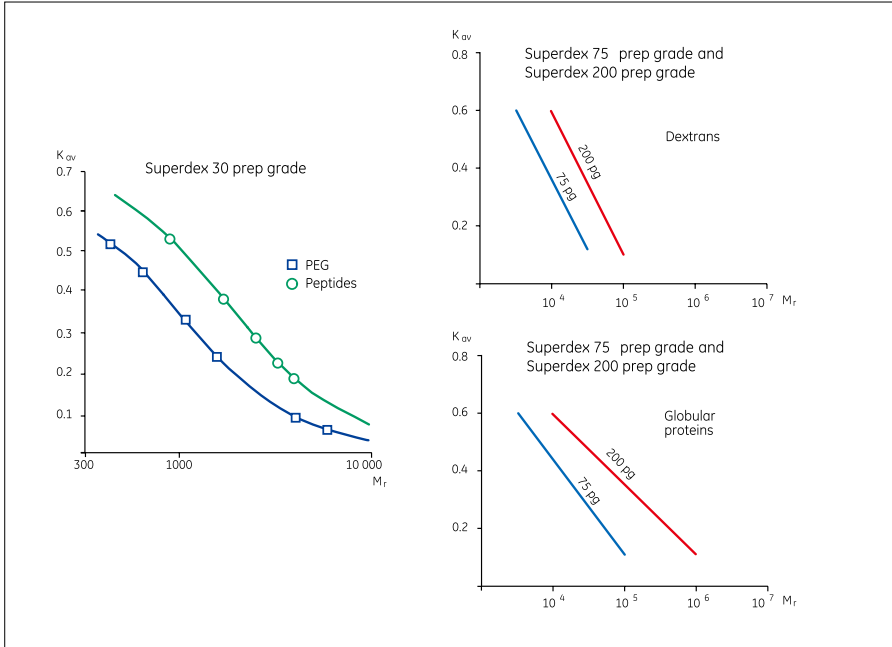


图57 Superdex 30制备级、Superdex 75制备级和Superdex 200制备级的选择性曲线。

选择的凝胶过滤柱料应当具有下列特点，使高分子量在无效体积 ($K_{av}=0$) 被洗脱，具有最小峰宽或最小稀释，并且花费的柱上时间最少。最小的分子量物质在接近 V_t ($K_{av}=1$) 时被洗脱。



在理想的情况下， K_{av} 值大于1或者小于0时，没有分子被洗脱。



如果 K_{av} 值大于1，柱料上有非特异结合。



如果经过校正之后 K_{av} 值小于0，色谱柱床中有槽路形成，柱子需要重新装柱。

分辨率

最终分辨率，峰之间的分离程度，受到很多因素的影响：样品体积和柱体积之间的比值、流速、柱子直径、颗粒大小、颗粒大小分布、装柱密度、颗粒的孔洞、以及流动相的粘性。凝胶过滤的成功主要依赖于选择合适的条件，在分离过程中可以给出有效的分离，并且有效的消除峰宽效应。

分辨率 (R_s) 通过下面的表达来定义：

$$R_s = \frac{V_{r2} - V_{r1}}{\frac{(W_1 + W_2)}{2}}$$

V_{r1} 和 V_{r2} 是在两个邻近峰的中部测量的洗脱体积。
 W_1 和 W_2 是这两个峰分别的峰宽。

$V_{r2} - V_{r1}$ 代表了两个峰之间的距离， $1/2 (W_1 + W_2)$ 代表了两个峰的平均峰宽，如图58所示。

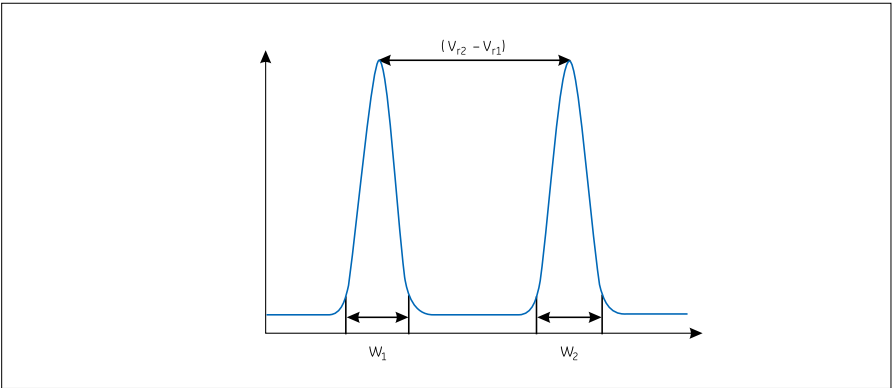


图58 定义分辨率 (R_s) 使用的参数。

如图59所示，分辨率是表示柱料选择性和产生窄峰（最小峰宽）柱料效率的函数。

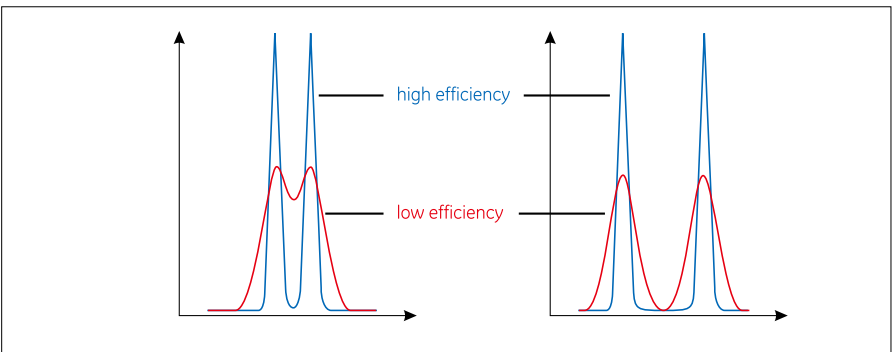


图59 选择性和消除峰宽效应的分辨率的决定因素。

已装柱子的柱效决定于它在洗脱过程中产生狭窄的对称峰的能力。参考附录1来获得装柱、柱子制备和柱效判定的相关信息。由于凝胶过滤进行分离时，只有一个柱体积的缓冲液流过柱子，柱效是非常重要的。柱效使用每米理论塔板数（N）的术语来定义：

$$N = 5.54 (V_e/W_{1/2})^2 \times 1000/L$$

这里， V_e =峰的洗脱（保存）体积

$W_{1/2}$ =峰高一半的峰宽

L=柱床高度（毫米）

V_e 和 $W_{1/2}$ 单位相同



降低柱料的颗粒大小可以提高柱效。然而，使用小一些的柱料颗粒可能引起反压力的增加，进而导致流速需要降低，延长运行时间。

装柱柱床和颗粒的均一性影响经过柱子的液流的均一性，因此影响峰形和最终的峰宽。具有高均一性的凝胶过滤柱料（较低的颗粒大小分布）方便分子洗脱时获得窄峰。

较小的颗粒大小凝胶过滤柱料方便样品分子扩散进入或移出颗粒，减少了移动相和固定相之间获得平衡所需的时间，因而可以减少峰宽，提高分辨率。

由于样品流过柱子，发生扩散，样品稀释是不可避免的。为了使样品稀释程度最小，使用设定的分离距离，即感兴趣峰之间需要的分辨率，允许的最大样品体积。样品可以被看作是流过柱子的区域。如图60所示，如果没有区域拓宽的现象发生，最大样品体积可以和分离体积（ V_{sep} ）一样大：

$$V_{sep} = V_{eB} - V_{eA}$$

然而，由于逆流扩散，在固定相和缓冲液之间没有平衡，以及柱床的纵向扩散，区域总是会拓宽。因此，样品体积总是必须小于分离体积。

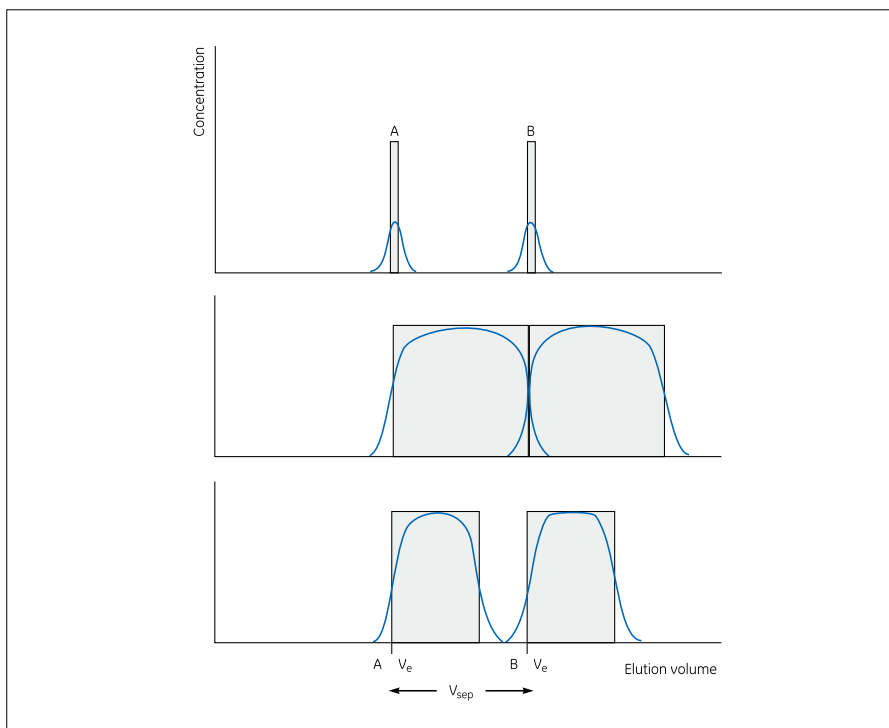


图60 不同样品体积的洗脱曲线。最上面的图对应使用小量的样品。中间的图对应如果没有区域扩散，完全进行分离，使用的最大样品体积。底部的图对应在实验条件下，获得完全分离，使用的最大样品体积。阴影区域代表如果有活性直方图，就可获得的洗脱图谱。

第四章

分子量判定和分子量分布分析

不像电泳技术，凝胶过滤在广泛多样的pH、离子强度和温度的条件下，提供了进行自然状态或者变性状态蛋白的分子量或者分子大小（斯托克斯半径）判定的方法，而且与分子所带的电荷状态无关。为了理解和遵从标明的流程，仔细阅读第三章凝胶过滤理论是非常重要的。

对于分子量判定，已经提出了一些理论模型来描述凝胶过滤过程中溶剂的行为。绝大多数模型假设溶剂分子在颗粒和周围液体的分割是完全的空间位阻效应。然而，在实际应用中，一系列同源的复合物证明它们不同洗脱体积参数和它们分子量对数值之间存在S形的关系。这样，凝胶过滤分子量判定可以通过比较洗脱体积参数，如感兴趣物质的 K_{av} ，和一些已知校准标准物的值而获得。

标准曲线通过测量一些标准物的洗脱体积，计算它们对应的 K_{av} 值（或相似的参数），将它们的 K_{av} 值和分子量对数值描点作图而获得。一旦测得未知物质的洗脱体积，计算得出它的 K_{av} 值，分子量可以从校准曲线获得。在文献中，不同的洗脱参数，如 V_e 、 V_e/V_0 、 K_d 和 K_{av} ，已经被用来进行标准曲线的制备，但是推荐使用 K_{av} 值，这是因为：1） K_{av} 值对于柱子制备和柱子直径变化引起的误差不灵敏；2） K_{av} 值不需要 K_d 需要测定的不可靠内体积（ V_i ）值。

为了精确的进行分子量判定，校正标准和感兴趣的物质之间必须在分子量和分子大小之间有相似的关系。通用电气医疗集团提供的校准试剂盒提供了性能优良的球蛋白标准来进行分子量判定。低分子量凝胶过滤校准试剂盒含有五个独立的水溶性蛋白，分子量范围在6 500到75 000之间，以及蓝色葡聚糖 2000。高分子量凝胶过滤校准试剂盒含有五个独立的水溶性蛋白，分子量范围在43 000到669 000之间，以及蓝色葡聚糖 2000。





对于成功的分子量判定重要的许多参数和高分辨率组分收集相同：



使用对于感兴趣分子有正确的组分收集范围的柱料。期望的分子量值应当在选择性曲线的线性部分（参见凝胶过滤选择指导18页）。



可能的话尽量使用预装柱。自己装的柱子一定要小心装柱（参见附录1）。

-  使用新鲜制备的校准标准，选择希望的分子量值被全部的校准范围覆盖。使用前总是过滤蓝色葡聚糖。使用少于总柱体积2%的样品体积。
-  使用相同的缓冲液分离校准标准和样品，如50 mM 磷酸钠、0.15 M氯化钠、pH 7。使用预装柱或者选择的柱料推荐的流速。
-  如果分子量未知，使用具有广泛组分收集范围的柱料，如Sephacryl HR。这也推荐用于分子量分布分析和聚合材料如葡聚糖和聚乙二醇。
-  在出现尿素、盐酸胍或SDS进行分子量测定时，将多肽和蛋白转化为随意卷曲的构象，因此减少了结构的差异。当与非变性情况获得的值进行比较时，测得的分子量数值会有差异。

如果感兴趣的分子与标准没有相似的分子形状， $K_{av} \cdot \log M_i$ 校准曲线会发生偏差。

进行分子量判定

1. 如果使用自己装的柱子，在运行缓冲液中加入新鲜过滤过的蓝色葡聚糖 2000 (1.0 mg/ml) 溶液。使用小于2%总柱体积 (V_i) 的蓝色葡聚糖上柱来测定无效体积 (V_o)，并且检查装柱情况。
2. 使用运行缓冲液溶解选择的校准蛋白 (使用制造商推荐的浓度)。稍后几分钟等待溶解，轻轻进行搅拌。不要加热或者剧烈震荡。如果需要，过滤校准溶液。
3. 使用小于2%总柱体积 (V_i) 的体积将校准溶液上柱。
4. 通过测定从上样点到洗脱峰中央的洗脱体积，测定标准的洗脱体积 (V_e)。
5. 计算标准的 K_{av} 值，通过 K_{av} 值和它们分子量对数按照如下方法制备校准曲线：

这里， V_e = 蛋白的洗脱体积


$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

V_o = 柱子的无效体积 = 蓝色葡聚糖 2000的洗脱体积

V_i = 总柱床体积

在半对数制图纸上，将每个标准蛋白的 K_{av} 值 (在线性轴上) 和对应分子量 (在对数轴上) 进行描点。在图纸上画出最适合这些点的直线。或者使用统计软件包计算出回归直线。

6. 使用小于2%总柱体积 (V_i) 的体积将样品上柱，测定感兴趣分子的洗脱体积 (V_e)。
7. 计算感兴趣成分对应的 K_{av} 值，从校准曲线中测得它的分子量。

-  只要校准柱保存良好，没有干掉，可以延长使用时间，而不需要每次判定都进行分离实验。

第五章

Sephadex LH-20

Sephadex LH-20是为分离和纯化需要有机溶剂来维持溶解性的自然产物而特意设计的，这些分子包括类固醇、类萜、脂类和低分子量肽段(高达35个氨基酸残基)。这些复合物通常使用液相/液相分割或吸收色谱形式进行分离。Sephadex LH-20对于特定溶剂中的芳香复合物有非常高的选择性，可以用在相近的相关物种分析或者工业规模制备。

Sephadex LH-20是由氢氧化丙醇盐葡聚糖珠子交联产生聚合蔗糖网而形成的。柱料可以在水和有机溶剂中进行溶胀。Sephadex LH-20的部分结构如图61所示。

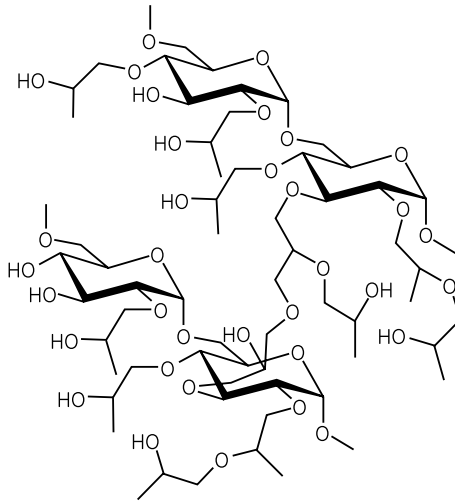



图61 Sephadex LH-20的部分结构。

Sephadex LH-20适合在离子交换或者反向色谱处理之前进行起始纯化，或者作为最后处理步骤，例如在非对映立体异构物制备中。

根据选择的溶剂，Sephadex LH-20也可以用来分离在柱料和有机溶剂间划分的成分。Sephadex LH-20同时具有亲水和疏水特性，结合这两者对于特定的应用可以提供独特的色谱选择性。

为了获得关于有机溶剂中进行凝胶过滤的更多详细信息，参见通用电气医疗集团提供的H. Henke 编著的应用Sephadex LH-20的制备凝胶色谱。

 Sephadex可以用来进行有机溶剂中的凝胶过滤，例如二甲基甲酰胺可以和Sephadex G-10一起使用，水和短链醇类的混合物可以和Sephadex G-10、G-25和G-50一起使用。

分离选择

产品	组分收集范围 (球蛋白)	样品上样容积*	最大操作反压力	最大操作流速
Sephadex LH-20	$< 5 \times 10^3$ (排出界线 取决于溶剂)	2%柱体积	溶剂依赖的	12厘米每分钟 (720cm/h) (柱床高度14厘米, 反压力15 MPa)

* 如果使用的是Sephadex LH-20吸附模式，样品体积没有限制，直到到达柱子饱和点。

分离样品

HIV-1逆转录酶抑制剂已经从 *Phyllanthus niruri* 中分离出来，一种用来治疗水肿和黄疸的天然药物已经使用了很多年。抑制HIV-1逆转录酶的活性成分已经被鉴定为repandusinic酸A单钠盐，一种小鞣酸样分子。图62给出了自由酸的结构。

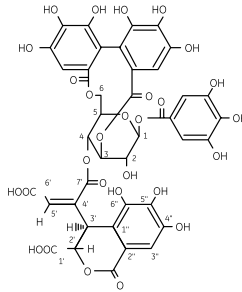


图62 repandusinic酸A自由酸形式的结构。

表3给出了使用Sephadex LH-20分析分离活性抑制剂的回收率。

表3 从 *P. niruri* 中分离repandusinic酸A的数据总结

纯化步骤	产量 (毫克)	ID50* (微克每毫升)	特定活性 ($\times 10^2$ IU/毫克)	总活性† ($\times 10^3$ IU)
水抽提	6 600	50	4	2 640
甲醇不可溶	2 500	20	10	2 500
Sephadex LH-20 组分 4-11‡	247	3.0-3.6	56-67	1 616
纤维素				
组分1	189	7.8	26	484
组分2	24	5.0	40	96
组分3	18	2.4	83	150
组分4	9	3.4	58	52
组分5	14	1.8	111	156
RA (纯的物质)	5.9	0.3	668	394

* ID50是指引起HIV-1-RT 50%抑制效率的抑制剂浓度。此实验中使用粗的HIV-1-RT。

† IU是强制的抑制活性单位，即获得HIV-1-RT实验中50%抑制[3H]dTTP整合进入聚合体的每一组分需要的重量去除每一步组分总重量来获得。

‡ 组分4-10和组分11结合在一起，因为两个组分都含有抑制活性。

图63显示使用Sephadex LH-20制备规模分离2-对乙酰氨基苯甲酸和4-对乙酰氨基苯甲酸。在这个分离中，柱料的疏水性和亲水性提供了独特的色谱选择性，导致相似相关物种的高分辨率。仅有苯环对测位置含有酸铵结构的分子发生了扩散。

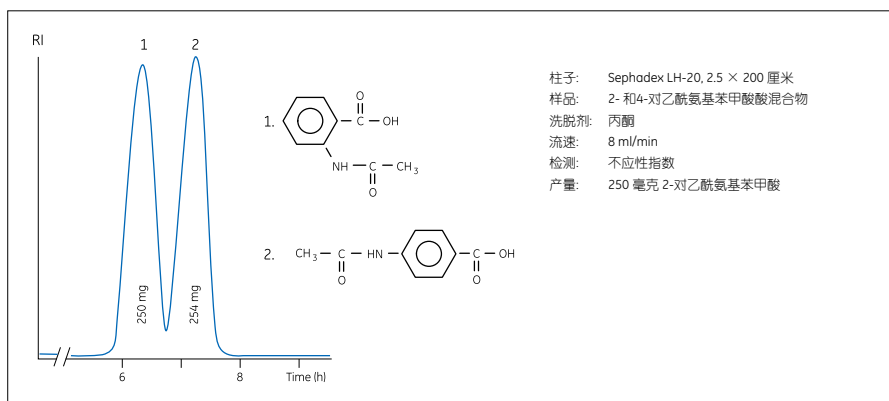



图63 Sephadex LH-20上分离2- and 4-对乙酰氨基苯甲酸。

装柱

根据分离需要的柱子体积的大小，从表4中选择具有溶剂抗性的柱子进行Sephadex LH-20装柱。

表4 具有溶剂抗性的柱子（* SR 10/50J 包括硼硅玻璃罩。其它的SR柱子不含有玻璃罩。所有的SR柱子都提供上部 and 下部两个组装接头。）

柱子	体积（毫升）	床高（厘米）
SR 10/50	16-39	20-50
SR 10/50J*	16-39	20-50
SR 25/45	73-220	15-45
SR 25/100	343-490	70-100

 在样品进行柱子上样之前进行简单的澄清步骤，可以避免堵塞柱子的危险，减少严格的柱子清洗的需要，延长色谱柱料的使用时间。使用前过滤或者离心所有的试剂和样品。

1. 参考85页图5，根据溶剂系统的溶胀程度，计算需要的干柱料的数量。使用分离使用的溶剂，在室温溶胀Sephadex LH-20至少3个小时。
2. 以干柱料与溶剂75:25制备柱料浆，轻轻将柱料中的细小颗粒倒出。
3. 将所有要使用的材料平衡至室温。
4. 将柱料浆进行重悬，进而将其倒入柱子（使用玻璃棒引流帮助消除气泡）。
5. 将溶剂注满柱子蓄水空间，直至顶部。盖上塞子，连接上泵，打开柱子出口。
6. 以300cm/h装柱，直到柱床达到稳定的高度。停止液流、排空并且移走装柱蓄水空间。
7. 仔细的使用溶剂充满柱子，向柱子中插入湿的接头。确保柱料网下没有气泡残留，调整接头O形环，以给柱子壁滑动的活塞。

8. 连接所有的管子，确保在流路中没有气泡。
9. 慢慢的移动接头，确保管子中的气泡被溶剂取代，将接头在柱料表面的位置锁死。
10. 打开柱子出口，持续的装柱，直到柱床稳定，最后可以调整上部的接头。

在象氯仿这样的溶剂中，Sephadex LH-20不象在其它溶剂中那么致密，柱料容易飘动。将柱料倒入柱子，在第二根接头插入之前一直排出。在柱料的表面位置锁死接头，直接从上面流入氯仿。柱床在上部的接头装柱，低的接头能朝着柱料低的表面慢慢朝上推。当为避免压缩柱床移动接头时，关闭柱子出口。

运行分离



以1cm/h的线性流速开始，检测分辨率。流速越低，分辨率越好。

1. 使用至少两倍柱体积的溶剂平衡柱子，直至获得稳定的基线。
2. 样品的上样体积相当于总柱体积的1%到2%。
3. 使用一倍柱体积进行洗脱。使用相同的溶剂，运行之间不需要进行再平衡。

清洗

使用两到三倍柱体积的溶剂清洗柱子，如果改变分离条件，接着使用新的溶剂进行再平衡。

柱料特性

	pH稳定性	每毫升柱床所需干柱料	颗粒大小
Sephadex LH-20	工作：2至11 * 短期：2至13	取决于溶剂，参见表5	干：18至111微米 湿：取决于溶剂

* 短期pH稳定性指的是再生、在位清洗和卫生处理过程中的pH范围。所有的范围都是基于通用电气医疗集团的经验和知识估计的。

Sephadex LH-20湿颗粒的大小由于溶胀使用的溶剂的不同而有差异，如表5所示。

表5 Sephadex LH-20在不同溶剂中进行溶胀，装柱柱床体积的近似值。

溶剂	近似柱床体积（每克干Sephadex LH-20的溶胀毫升）
二甲基亚砜	4.4-4.6
吡啶	4.2-4.4
水	4.0-4.4
二甲基甲酰胺	4.0-4.4
甲醇	3.9-4.3
盐水	3.8-4.2
二氯化乙烯	3.8-4.1
氯仿*	3.8-4.1
丙醇	3.7-4.0
乙醇†	3.6-3.9
异丁醇	3.6-3.9
甲酰胺	3.6-3.9
二氯甲烷	3.6-3.9
丁醇	3.5-3.8
异丙醇	3.3-3.6
四氢呋喃	3.3-3.6
二恶烷	3.2-3.5
丙酮	2.4-2.6
乙腈‡	2.2-2.4
四氯化碳‡	1.8-2.2
苯‡	1.6-2.0
乙酸乙酯‡	1.6-1.8
甲苯‡	1.5-1.6

* 含有1%乙醇。

† 含有1%苯。

‡ 每克干Sephadex LH-20溶胀后柱床体积少于2.5毫升的溶剂一般不使用。

化学稳定性

Sephadex LH-20在绝大多数水溶液和有机溶剂系统中都保持稳定。柱料在pH小于2.0或者强氧化剂中不稳定。

储存

干柱料储存在4至25摄氏度。已经装柱或者使用过的柱料储存在4至8摄氏度，并且需要使用抗菌剂。

在有机溶剂之间转移Sephadex LH-20

把Sephadex LH-20从水溶液转移到有机溶剂，使用梯度依次上升的有机溶剂混合物转移。这样可以确保需要的有机溶剂高效的取代水。

为了从水溶液或有机溶剂（100%A）转移到一种新的有机溶剂（100%B），进行如下操作：开始转移至70%A:30%B，然后30%A:70%B，最后到100%B。如果A和B互不相易混合的，使用中间溶剂进行转移，例如通过丙酮从水转至氯仿，如图64所示。

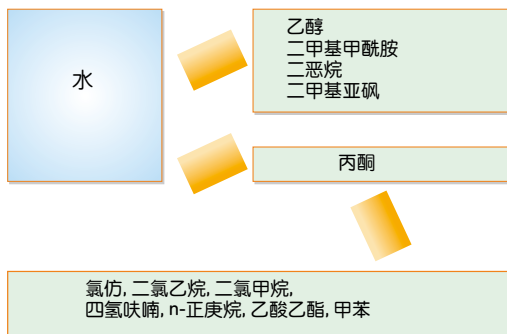


图64 改变有机溶剂建议的流程

1. 将需要数量的柱料转移到烧结的玻璃Buchner漏斗，轻轻吸走多余的液体溶液。
2. 加入接下来使用的溶剂，轻轻搅拌重悬柱料。
3. 吸走多余的溶剂，在相同的溶剂中进行重悬。
4. 依次在接下来使用的溶剂中重复上述过程。每次改变溶剂状况至少进行两次重悬，直至达到最终溶剂成分。
5. 使用具有溶剂抗性的SR 10/50、SR 25/45或者SR 25/100柱子进行柱料装柱。

第六章

纯化策略中的凝胶过滤（CIPP）

对于高程度的纯化，或者一步亲和纯化没有合适的配基，必须使用包括捕获、中度纯化和精制（CIPP）在内的纯化策略，研发有效的多步处理过程。

CIPP在药物工业和研究型实验室都有应用，可以保证更快的方法研发，短期纯化产品和更好的经济效益。本章简单概要的介绍这种方法，对于多步蛋白纯化是值得推荐的。通用电气医疗集团提供的蛋白纯化手册，对于制定高效有效的蛋白纯化策略，和每一步及纯化规模放大的正确的柱料选择，都提供了理想的指导。如图65所示，对于任何纯化，重要的第一步都是正确的样品制备，附录3给出了更多的详细信息。凝胶过滤经常在样品制备中被用来进行除盐和进行缓冲液交换（使用Sephadex G-25），可以使用高达30%总柱体积的样品体积。

在高分辨率模式，凝胶过滤应用于纯化的最终精制步骤非常理想，这时样品体积已经减少（在凝胶过滤中，样品体积非常显著的影响速度和分辨率）。样品被同溶剂地洗脱（单一缓冲液，没有梯度），缓冲液可以适合样品类型或者接下来纯化、分析或者储存的需要而不同，由于缓冲液构成不直接影响分辨率。

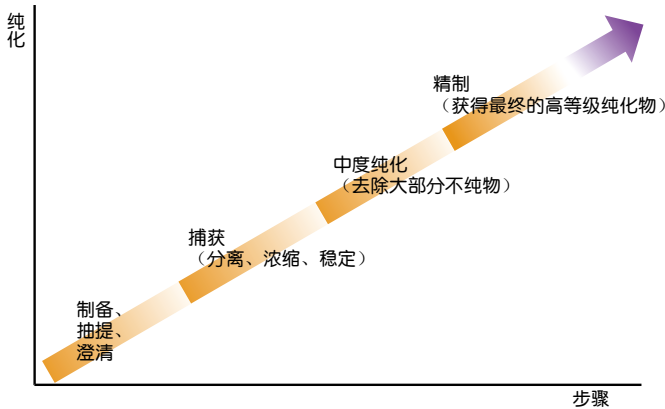



图65 制备和CIPP。

应用CIPP

图示的纯化过程有三个阶段：捕获、中度纯化和精制

 在纯化过程的每一步都设定特定的目标。

每个特定步骤相关的纯化问题极大的取决于起始材料的特性。因此，纯化步骤的目标根据在此过程中的位置不同而异。

在捕获阶段，目标是分离、浓缩和稳定目标产物。产品应当被浓缩，并且转移到保持其能力和活性的环境中。

在中度纯化阶段，目标是去除大部分不纯物，如其它蛋白和核酸、内毒素和病毒。

在精制阶段，除了微量或极其相关的物质，绝大多数不纯物已经被去除。目标是去除任何残留的微量不纯物或极其相关的物质获得最终的纯化物。



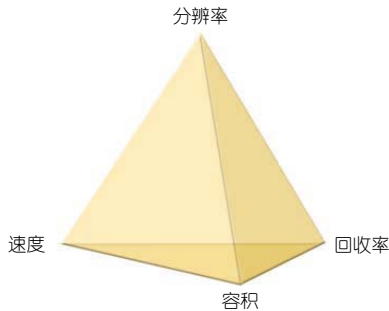
对于高效率的纯化，捕获、中度纯化和精制使用的纯化技术的优化选择和组合是关键。

纯化技术的选择和组合

如表6所示，使用纯化技术进行蛋白纯化，需要根据不同的特殊性质进行分离。

表6 在纯化中使用的蛋白特性

蛋白性质	技术
大小	凝胶过滤（GF）
电荷	离子交换（IEX）
疏水性	疏水相互作用（HIC），反相（RPC）
生物识别（配基特异性）	亲和（AC）



每种技术都在分辨率、容积、速度和回收率之间提供平衡

容积，在显示的简单模式，指的是在纯化过程中目标蛋白的上样数量。在一些例子中，可以上样的样品数量受到体积的限制（如凝胶过滤）或者是大量的污染物而不是目标蛋白的数量的限制。

速度在纯化的早期阶段最重要，这时污染物，如蛋白酶，必须被尽可能快地去除。

回收率随着纯化的进行变得越来越重要，由于已纯化产品量的增加。回收率受到样品破坏过程和柱子不适宜情况的影响。

分辨率通过技术的选择性和色谱柱料的有效性产生狭窄的峰形而获得。总的来说，分辨率在纯化的最终阶段是最难获得的，这时不纯物和目标蛋白具有非常相似的特性。



 选择适合纯化步骤目标的技术。每一步的开始或者结束，根据技术的主要优势和样品情况。选择符合逻辑的纯化技术的组合。


表7给出了CIPP策略中使用的每种纯化技术适应性的指导。

表7 CIPP中纯化技术的适应性

技术	主要特性	捕获	中度	精制	样品起始情况	样品结束情况
IEX	高分辨率 高容积 高速度	★★★★	★★★★	★★★★	低离子强度 样品体积不限	高离子强度或pH改变 浓缩样品
HIC	高分辨率 高容积 高速度	★★	★★★★	★	高离子强度 样品体积不限	低离子强度 浓缩样品
AC	高分辨率 高容积 高速度	★★★★	★★★★	★★	特异结合情况 样品体积不限	特定的洗脱条件 浓缩样品
GF	高分辨率 使用Superdex 柱料		★	★★★	限制样品体积（小于5% 总柱体积）和流速范围	缓冲液交换（如果需 要）稀释样品
RPC	高分辨率		★	★★★	样品体积通常不限，可 能需要添加物	在有机溶剂，生物学 活性丢失的危险

 通过结合多种技术，在样品纯化的多个步骤间使样品的处理最小化，避免样品调节的需要。样品在第一根柱子上应当以适合接下来柱子起始条件的情况进行洗脱（参见表7）。

硫酸铵经常被用来进行样品的澄清和浓缩（参见附录3），使样品处于高盐浓度。因此，需要高盐来增强和柱料结合的HIC技术，成为捕获步骤的理想选择。从HIC柱子上洗脱之后，盐浓度和总样品体积都会显著的降低。使用除盐柱进行组分收集样品的稀释或者快速缓冲液交换为接下来的IEX或者AC步骤进行准备。

 凝胶过滤是一种不受缓冲液条件影响，但是具有限制容量的非结合技术。GF非常适合在其其它的浓缩技术（IEX、HIC、AC）之后使用，由于目标蛋白将会在减少的体积进行洗脱，缓冲液的成分不会影响凝胶过滤过程。

最终策略的选择总是取决于特定样品的性质和纯化需要的级别。图66显示了逻辑上的多种技术的组合。

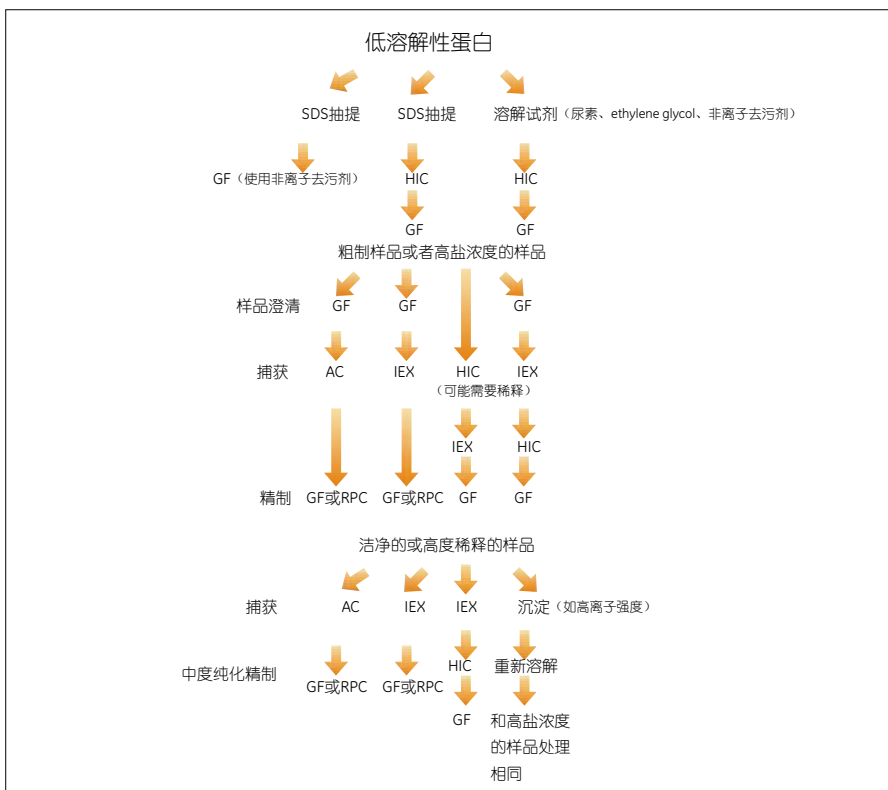


图66 色谱技术的逻辑组合

对于任何捕获技术，选择与目标蛋白具有最有效结合的技术，并且尽可能少的污染物会进行结合，如和目标蛋白具有最高选择性和/或容量的技术。

使用多种技术的结合或不同的选择进行样品的纯化。例如，在IEX-HIC-GF策略，捕获步骤选择根据电荷的差异（IEX），中度纯化步骤根据疏水性的不同（HIC），最终的精制步骤根据大小不同（GF）。

如果对于目标蛋白一无所知。这种技术组合可以被当作标准操作流程。

不管使用阳离子或者阴离子交换，IEX是一种可以提供不同选择性的技术。纯化的pH可以进行调节，来改变样品成分的电荷状态。因此，在纯化策略的捕获、中度纯化和精制中可以不止一次的使用IEX。IEX在相同的纯化策略中可以被有效的使用，在捕获的低分辨率模式或者精制的高分辨率模式来进行快速纯化。

在相同的纯化策略中考虑使用阳离子和阴离子交换两种色谱技术来获得不同的选择性。

精制步骤中的凝胶过滤

绝大多数情况下，通过电荷、疏水性或者亲和进行分离在纯化策略的早期阶段使用，因此，高分辨率的凝胶过滤用于最终的精制步骤非常理想。如图67所示，产品可以一步纯化和转移到需要的缓冲液，二聚体和聚集物可以被去除。

凝胶过滤也是最慢的色谱技术，柱子的大小决定可以上样的样品体积。因此，逻辑上讲，最好在减少样品体积的技术使用凝胶过滤技术，这样可以使用小一些的柱子。

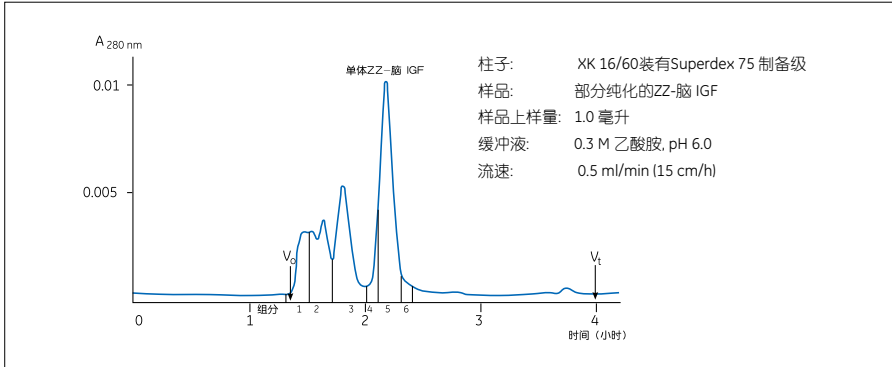


图67 最终的精制步骤：使用Superdex 75 制备级分离二聚体和多聚体

精制步骤的柱料应当提供最大可能的分辨率。Superdex是实验室规模的首选，Superdex制备级是大规模应用的首选。

RPC也可考虑使用在精制步骤，提供经得起运行条件的目标蛋白。反向色谱（RPC）基于疏水性分离蛋白和肽段。RPC是高选择性（高分辨率）技术，通常需要使用有机溶剂。该技术广泛用于纯化检测分析，这时活性和三级结构的回收率不是必要的。由于许多蛋白被有机溶剂变性，RPC通常不推荐用来纯化蛋白，因为活性的回收率，和重新折叠为正确的三级结构可能会比较复杂。然而，在精制阶段，当蛋白的不纯物绝大多数已经被去除，RPC成为一种非常好的技术，尤其对于经常不被有机溶剂变性的小的目标蛋白。

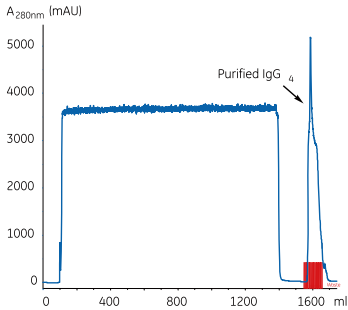
CIPP并不意味着总是一定有三个纯化步骤。例如，捕获和中度纯化可以通过单一步骤完成，中度纯化和精制也可以。类似的，纯化的需求可能不高，因此，一步快速捕获步骤就可以获得预计的结果。对于治疗性的蛋白，可能需要四步或者五步来达到最高的纯度和安全性的需要。使用步骤的数目总是取决于纯化的需要和蛋白的使用目的。

人IgG₄单克隆抗体的纯化

人IgG₄单克隆抗体在骨髓瘤细胞培养中进行表达，使用亲和色谱和凝胶过滤结合的方法进行纯化。抗体使用MabSelect™亲和色谱进行捕获。接着使用Superdex 200制备级凝胶过滤从二聚体和大的多聚体中分离单体。

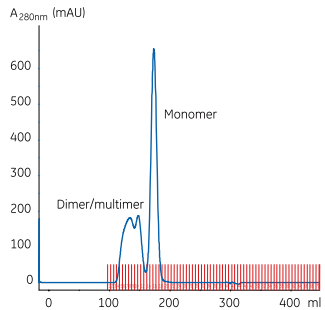
亲和色谱进行捕获

样品: 1282 毫升骨髓瘤细胞培养物含有人IgG₄ (~0.33 毫克每毫升)
 柱子: MabSelect (18 毫升), XK 16/20 柱子
 结合缓冲液: 20 mM 磷酸钠, 0.15 M 氯化钠, pH 7.4
 洗脱缓冲液: 100 mM 柠檬酸钠, pH 3.0
 流速: 220 cm/h (7.4 ml/min)
 系统: ÄKTApexplorer
 操作: 平衡: 5 倍柱体积(CV)结合缓冲液
 样品上样: 1 282 毫升
 清洗: 10 倍柱体积结合缓冲液
 洗脱: 步骤梯度 100% 5倍柱体积洗脱缓冲液



单体纯化 (精制步骤)

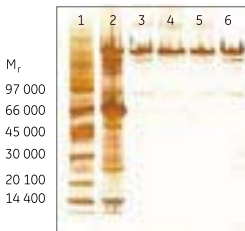
样品: 7.5 毫升混合的组分来自于MabSelect柱子
 柱子: HiLoad 26/60 Superdex 200 制备级
 缓冲液: 50 mM 磷酸钠, 0.15 M 氯化钠, pH 7.0
 流速: 22.6 cm/h (2 ml/min)
 系统: ÄKTApexplorer
 操作: 平衡 2倍柱体积;
 样品上样: 同溶剂洗脱 1倍柱体积
 CV = 总柱体积= V_i



分析: SDS-PAGE, 银染

未还原样品

Lane 1: 低分子量标志物
 Lane 2: 骨髓瘤细胞培养粗提样品
 Lane 3: 捕获步骤混合的洗脱样品
 Lane 4: 精制步骤组分 4-9
 Lane 5: 精制步骤组分10-12
 Lane 6: 精制步骤组分14-18



还原样品

Lane 1: 低分子量标志物
 Lane 2: 捕获步骤混合的洗脱样品
 Lane 3: 精制步骤组分 4-9
 Lane 4: 精制步骤组分10-12
 Lane 5: 精制步骤组分14-18

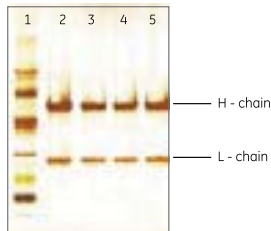


图68 人IgG₄的两步纯化。

附录1

装柱和准备

使用任何凝胶过滤柱料，好的装柱对于高分辨率组分收集都是必要的。通用电气医疗集团提供的预装柱可以确保重复性的结果和最佳的性能。如果您需要的柱子体积和柱料没有预装柱提供，请联系通用电气医疗集团当地的销售代表垂询我们的装柱服务。

在任何凝胶过滤实验中，装柱都是一个非常关键的步骤。装的不好的柱子会引起不平稳的液流、拓宽的峰形、分辨率的丢失，也能够影响可以使用的流速。如果您决定自己进行凝胶过滤装柱，那么此附录中的指导方针可以适用于任何规模的操作。

装柱录像可以示范如何产生一个装的非常好的柱子（参见订货信息）。录像尤其强调凝胶过滤装柱的重要性。一旦获得了装的非常好的柱子，凝胶过滤操作非常简单。柱子只要认真使用和维护，可以长期的提供可重复性的、高分辨率的结果。



确保有足够的缓冲液来进行长期的、无需干扰的运行，或者泵可以编程在合适的时间停止液流。凝胶过滤柱子一旦流干必须重装。



用来凝胶过滤柱料装柱的柱子

XK柱子完全适应当前可提供柱料的高流速，并且有多种宽范围的柱子直径可供选择。XK柱子和主要附件的订货信息可以在本手册的后面找到。如果希望获得所有零用备件列表，请参考通用电气医疗集团生物产品目录或者网站目录（www.gelifsciences.com/protein-purification）。

表8 用来凝胶过滤柱料装柱的XK柱子

柱子	柱子体积（毫升）带有一个接头
XK 16/20	2 - 34
XK 16/40	42 - 74
XK 16/70	102 - 135
XK 16/100	163 - 195
XK 26/20	0 - 80
XK 26/40	122 - 196
XK 26/70	281 - 356
XK 26/100	440 - 315
XK 50/20	0 - 275
XK 50/30	330 - 510
XK 50/60	785 - 1099
XK 50/100	1570 - 1884

接头是柱子末端可调整的部分，用来帮助消除在样品上样时已装柱柱料表面受到的冲击，防止不溶颗粒进入柱子而引起柱子堵塞。

所有的XK柱子交付时都提供一个AK接头，但是如果需要短一些的柱床高度，可以使用第二根接头，而不需要柱子末端的匹头。带有M6连接头的TEFZEL管子，温度稳定的套子，咔嚓打开的支撑网环，拆除工具和用户手册和XK柱子一起提供。



在常规的实验室条件下，长的XK50柱子很难进行装柱。作为替换，使用我们的装柱服务，或者串联两根或多根短一些的XK柱子（20或30厘米柱床高度）来获得需要的柱床高度。

检查柱效

柱子的性能应该固定间隔时间进行检测，通过检查理论塔板数和峰形对称性。预装柱提供了推荐值。

柱子性能的代表性值：

Superdex: 效率 $N > 10\,000$, 峰形对称性 $A_s = 0.70-1.30$

Sephacryl HR: 效率 $N > 9\,000$, 峰形对称性 $A_s = 0.80-1.50$

1. 使用蒸馏水线性流速60cm/h平衡装好的柱子。
2. 加入相当于总装柱体积0.2%的丙酮（10毫克每毫升水溶液）。
3. 监测紫外280纳米吸收峰，从丙酮上样直至丙酮被洗脱，信号回到基线。
4. 计算柱效，即理论塔板数（N）：

$$N = 5.54 (V_e / W_{1/2})^2 \times 1000/L$$

这里， V_e =峰洗脱（保持）体积

$W_{1/2}$ =半峰高度峰宽

L =柱床高度（毫米）

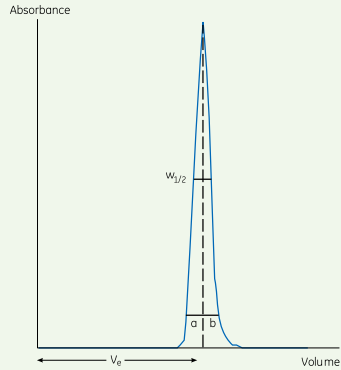
V_e 和 $W_{1/2}$ 单位相同

计算对称因子（ A_s ）：

$$A_s = b/a$$

这里， a =10%峰高的第一半峰宽

b =10%峰高的第二半峰宽




使用Superdex 制备级和Sephacryl高分辨率进行高分辨率组分装柱


Superdex 制备级和Sephacryl高分辨率应当使用XK系列柱子，在高流速进行装柱和平衡。XK柱子为了凝胶过滤进行了优化设计，柱床设计确保均一的液流；柱子出口的死体积低于0.1%的柱体积，以保证最小的样品稀释，防止分离峰的再混合。XK柱子使用的生产材料不干扰不稳定的生物物质。这些柱子容易拆卸和组装，方便进行彻底清洗，当处理生物样品时这点尤其重要。

- 确保柱子及所有成分清洁和状况良好。网、网扣件和玻璃管没有损坏尤其重要。使用去除气体的缓冲液，将所有材料平衡到运行分离所需要的温度。避免使用具有巨大死体积的简单的柱子，由于这会影响分辨率。
- 对于高分辨率组分收集，使用柱床高度在30至60厘米之间。上样的样品体积相当于1-2%的柱子体积。如果可以保持好的分辨率，样品体积可以增加高达4%。
- 选定的柱料应当具有需要的装柱体积的1.15倍体积，参见表8的例子。


1. Sephacryl HR和Superdex制备级以溶胀形式提供，悬浮保存在20%的乙醇中。轻轻晃动悬浮柱料，将足量的柱料倒入有刻度的量筒或烧杯中。
避免使用磁力搅拌、药匙或者玻璃搅拌棒，由于它们会损坏柱料。
2. 在玻璃滤器上使用5至10体积的蒸馏水清洗柱料，使用蒸馏水进行重悬，最终浓度为设定的50%。
柱料必须彻底清洗，完全去除20%乙醇储存液体。残存的乙醇会干扰接下来的流程。


 为了产生更均匀分布的Superdex制备级的柱料浆，TweentM 20（每500毫升已清洗的柱料浆加入250毫升）可以加入来减少表面张力。

3. 通过流出管加入蒸馏水浸湿底部的滤器。关闭底部匹头的出口。装上滤器和底部末端的匹头。
4. 将装柱容器和柱子紧密连接。


 对于XK 16和XK 26柱子，使用第二根柱子代替装柱容器，这样更容易获得装得好的柱子。第二根柱子使用合适和XK 16和XK 26装柱连接头。

5. 在实验台垂直的竖好柱子和装柱容器。
6. 使用蒸馏水填充柱子到柱子末端匹头两厘米以上。避免气泡。
7. 将悬浮的柱料使用真空泵去除气泡，认真地将悬浮的柱料使用玻璃棒沿着柱子壁倒入柱子。
避免引入气泡。单次操作倒入所有的柱料浆，使用蒸馏水将装柱容器填满到顶端。
8. 连接泵的出口到装柱容器的进口。打开柱子出口，开始缓冲液流动，参见表9获取流速推荐。

 为了获得满意的柱效，Superdex制备级必须两步装柱：第一步两个小时，或者柱床到达稳定的高度；第二步60分钟。表9给出了每一步的流速推荐。

 仅使用比表9第二步稍微高一些的流速，Sephacryl HR通常可以满意的装柱。如果第一次尝试柱效不满意的话，使用两步过程。

9. 停止泵，移走装柱容器。使用蒸馏水将柱子填满，柱子上部形成朝上的界面，插入接头。
调整接头到已装柱的表面。
- 10 使用第二步的流速近似十分钟持续的装柱。如果推荐的流速没办法获得，使用泵可以提供的最大流速。标记已装柱顶部的位置，停下泵，关闭柱子出口，移下接头到柱料表面，然后将接头推入柱料3毫米。柱子现在可以使用了。参见表9获得Sephacryl HR和Superdex制备级柱料最大推荐流速和操作压力。

 装柱过程中不要超过柱子的最大压力（Sephacryl HR是0.3 MPa, 0.3 bar；Superdex制备级是5 MPa,5 bar）。


 总是注意与产品一起提供的特定储存指导。

表9 已装柱Sephacryl HR和Superdex制备级的推荐流速

柱子	柱床高度	第一步	第二步	第一步	第二步
		Sephacryl HR ml/min	Sephacryl HR ml/min	Superdex制备级 ml/min	Superdex制备级 ml/min
XK 16/40	35	2	12-14	2	10-12
XK 16/70	65	2	12-14	2	10-12
XK16/100	95	2	12-14	2	10-12
XK 26/40	35	4	6-8	4	12
XK 26/70	65	4	6-8	4	12
XK 26/100	95	4	6-8	4	12
XK 50/20	10-15	9	12	10	20
XK 50/30	20-25	9	12	10	20
XK 50/60	55	9	12	10	20
XK 50/100	95	9	12	10	20

控制流速

在装柱和色谱分离过程中，控制流速的最安全和最容易的方法是使用为ÅKTA色谱系统设计的控制泵。精确和可重复的流速控制，对于高效率的进行装柱、进行重复实验和执行常规制备工作，尤其重要。



可获得的最大流速取决于柱子的直径和缓冲液的粘度。窄的柱子比宽的柱子可以承受更高的压力和更高的线性流速（cm/h）。



总是连接泵，这样缓冲液被泵到柱子上（而不是在柱子之后连接泵，通过柱子进行排出缓冲液）。这样由于吸入效应减少了泡沫生成的危险。



不要使用超出柱料压力和流速的最大推荐值（参见第二章）。超出这些值会引起柱料压缩，减少分离时的流速和分辨率。

在任何分离过程中，不要超出75%装柱流速。



外周蠕动泵不能获得最高的流速，或者Superdex和Sephacryl耐受的反压力。因而不推荐用来装柱，或者在大柱子上运行高分辨率组分收集。

使用Sephadex进行组群分离装柱

Sephadex提供的是干粉，使用之前必须在过剩的缓冲液中进行溶胀。溶胀之后，使用缓冲液进行调节，形成浓稠的浆液，再使用真空泵去除气泡。大约75%设定的柱料比较合适。微细的颗粒可以慢慢倒出。

- 使用沸腾的水浴加速溶胀过程（参见表10）。这也用来去除悬浮液中的气体。使用前，冷却悬浮液。

表10 Sephadex的床体积和溶胀时间

柱料	近似的床体积	溶胀时间（小时）	溶胀时间（小时）
Sephadex G-10	2-3	3	1
Sephadex G-25（所有等级）	4-6	3	1
Sephadex G（细粉）	9-11	3	1

- 确保柱子及所有成分清洁和状况良好。网、网扣件和玻璃管没有损坏尤其重要。使用去除气体的缓冲液，将所有材料平衡到运行分离所需要的温度。装好的柱子远离气流或直接阳光暴晒的位置，避免引起温度的变化和泡沫形成。

- 对于组群分离，使用高达10厘米的柱床高度。样品体积可以高达30%的总柱体积。除盐的话，使用高达五倍样品体积的柱料进行装柱。

注意：这个用法指导适用于装柱时使用两个接头的柱子。

- 称出正确数量的干Sephadex，根据上面的用法指导进行柱料的溶胀。避免使用磁力搅拌、药匙或者玻璃搅拌棒，由于它们会损坏柱料。
- 通过流出管加入蒸馏水浸湿底部的滤器。关闭底部匹头的出口。装上滤器和底部末端的匹头。

- 对于XK 16和XK 26柱子，使用第二根柱子代替装柱容器，这样更容易获得装得好的柱子。第二根柱子使用合适和XK 16和XK 26装柱连接头。

- 如果柱料浆液比柱子的体积大，给柱子连接装柱容器（图69）。
- 在实验台垂直的竖好柱子和装柱容器。
- 使用蒸馏水或缓冲液填充柱子到柱子末端匹头两厘米以上的高度。避免气泡。
- 将混合好、已去除气泡悬浮柱料单次操作使用玻璃棒沿着柱子内壁倒入柱子。避免引入气泡。
- 连接泵的出口到装柱容器的进口。打开柱子出口，开始缓冲液流动。流过柱子两到三倍柱子体积的缓冲液，为了稳定柱床，完全平衡。使用比分离时的流速稍微高一些的流速。
- 获得稳定的柱床高度后，保持装柱流速至少三倍柱体积。
- 在柱子上标记柱床高度，关闭柱子出口。移走装柱容器。
- 仔细的加入缓冲液填满柱子，形成朝上的界面（参见图70）。

1. 连接所有的管子。拧松接头变紧装置，将接头以一定角度插入柱子，这样在网下没有气体截流。将接头慢慢的插上柱子直到标记处。注意接头出口应当打开，柱子出口应当关闭。
2. 调整变紧装置，在柱子壁和O形环之间形成滑动塞。拧紧柱子上的接头。
3. 近似十分钟持续的装柱。停下泵，关闭柱子出口，移下接头到柱料表面。然后将接头推入柱料3毫米。柱子现在可以平衡了。



图69 使用装柱容器



图70 加上部接头

- Sephadex G-10、G-25和G-50遵从Darcy法则，例如，如果流速加倍，则柱压也会加倍，因此流速或操作压力最大值不需要考虑（参见附录2Darcy法则的解释）。

控制流速

在装柱和色谱分离过程中，控制流速的最安全和最容易的方法是使用为ÅKTA色谱系统设计的控制泵。精确和可重复的流速控制，对于高效率的进行装柱、进行重复实验和执行常规制备工作，尤其重要。外周蠕动泵可以使用在Sephadex装的小柱子。

- 总是连接泵，这样缓冲液被泵到柱子上（而不是在柱子之后连接泵，通过柱子进行排出缓冲液）。这样由于吸入效应减少了泡沫生成的危险。

- 装柱流速总是要高于分离流速。

重力装柱

Sephadex可以使用重力填充系统装柱，通过水稳压不同控制流速，水稳压是在缓冲液容器和柱子出口中的缓冲液的自由表面的差异产生的操作压。

使用图71显示的安全环阻止气体进入柱子。

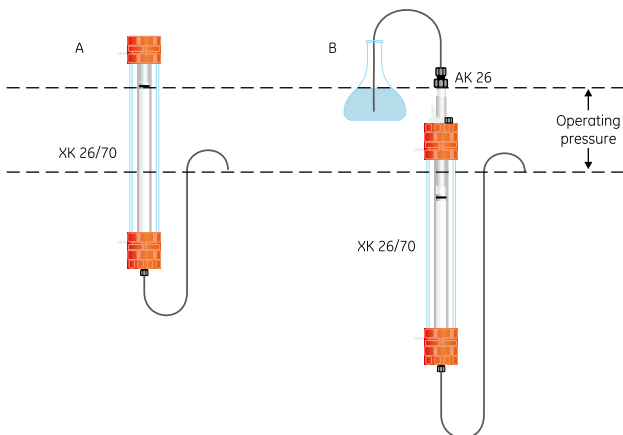


图71a 操作压A和B的定义。测量柱子的自由表面和出水管末端之间的距离作为压力（厘米水柱）。

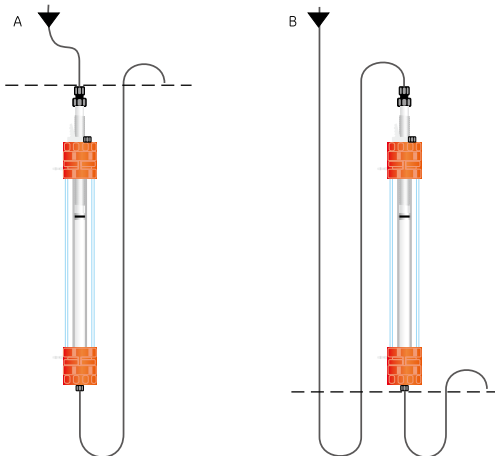


图71b 替换安全环的安装

A. 柱子之后安装安全环，柱子出水管末端在柱子之上。进水管的缓冲液达到出水管水平时，液流停止。

B. 柱子之前安装安全环，柱子出水管在进水管低的环之上的任意位置，进水管的缓冲液达到出水管水平时，液流停止。



温度影响缓冲液的粘度。对于给定的压力头，低的流速在寒冷的房间比在室温更容易达到。

客户定制产品

通用电气医疗集团的客户定制产品（CP）团队提供根据客户从我们的柱子和柱料中选择定制的预装柱。当标准范围里没有合适的柱料时，客户定制的柱料（CDM）可以为特定的工业分离过程而进行生产。通用电气医疗集团的客户定制柱料团队根据特定的分离需要，在设计、生产、测试和运输柱料方面与使用者紧密地合作，共同工作。当色谱步骤研发成为生产制造过程的完整一个部分，柱子的选择对于确保稳定的性能和可靠的操作至关重要。通用电气医疗集团提供全面范围的柱子，确保我们纯化柱料的最高性能，适应现代制药生产的需要。请联系当地的销售代表来获取关于CP和CDM产品和服务的更多详细信息。

附录2

Sephadex和Darcy法则

Sephadex G-10、G-25和G-50可以被假想为在凝胶过滤中象刚性的球的行为方式，因而遵从Darcy法则。

$$U = K \Delta P L^{-1} (1)$$

U = 线性流速，表达为cm/h (参见附录5)。

ΔP = 柱床压力下降，表达为cm H₂O

L = 柱床高度，表达为cm

K = 比例常数，取决于柱床材料和缓冲液的特性。

假定缓冲液粘度为1 cP: $U = K_0 \Delta P L^{-1} (2)$

K_0 = “特定的渗透性”，取决于柱料和水重融的颗粒大小。



注意流速与柱床压力下降成比例，假定恒定的压力方向，与柱床高度成反比例。在实际应用过程中，这就意味着当使用除Sephadex其它的凝胶过滤柱料，一定要考虑压力/流速，流速加倍导致柱压加倍。为了好估计，流速与柱子直径无关。



超过1 cP粘度的流速可以通过关系获得：流速与粘度成反比例。高缓冲液粘度可以通过增加操作压来补充，因而维持高流速。

理论流速（不是最大值）可以通过插入 ΔP 和L值从公式（2）中计算。表11种给出了特定的渗透性（K）值。

表11 Sephadex的特定的渗透性

Sephadex类型	渗透性K
Sephadex G-10	19
Sephadex G-25 超粉末	9
Sephadex G 粉末	30
Sephadex G 中等	80
Sephadex G 粗	290
Sephadex G 粉末	36

附录3

样品制备

色谱纯化的样品应当清洁，没有颗粒物质。在开始进行纯化之前，通过简单的几个步骤精制样品，可以避免柱子堵塞、可以减少严格清洗程序的需要、能够延长色谱柱料的使用寿命。

样品抽提方法和缓冲液、添加物、去污剂的选择，极大地取决于材料来源、靶分子稳定性、将要使用的色谱技术和产品的使用目的。这些目的在通用电气医疗集团提供的蛋白纯化手册中有一般的介绍，在重组蛋白手册、蛋白扩增和简单纯化以及抗体纯化手册中有针对特定靶分子的介绍。

样品稳定性

在绝大多数例子中，纯化后需要保持生物学活性。当跟踪纯化过程时，维持靶分子的生物学活性也是一个优势，由于靶分子检测经常依赖于它的生物学活性。样品组分的变性经常导致沉淀或增强非特异吸附，两者都会损害柱子的功能。因此，检测样品稳定的界限，纯化过程中在这些界限下工作，有很多好处。

蛋白通常含有高程度的三级结构，通过范德华力、离子和疏水相互作用和氢键结合在一起。任何引起这些力不稳定的情况会引起变性和/或沉淀。与此形成对比的是，肽段仅有低程度的三级结构。他们的自然状态受控于二级结构，主要通过氢键稳定。由于这个原因，肽段比蛋白耐受更加广泛的条件范围。这个自然结构的基本差异也反应在蛋白不容易变性，而肽段经常自发变性。



在开始研发一种纯化技术方法之前，建议先执行稳定性检测。下面的几条可以用来作为进行这种检测的依据。

- 通过将样品溶液在室温放置过夜，检测稳定性和蛋白降解活性发生情况。离心样品，测量上清的活性和280纳米的紫外吸光度。
- 在pH 2到9之间每隔一个pH单位检测pH稳定性。
- 使用0到2 M氯化钠和0到2 M硫酸铵，每隔0.5 M测量盐稳定性。
- 使用0到50% 乙腈和甲醇，每隔10%的浓度测量稳定性。
- 在4到40摄氏度之间，每隔10度测量温度稳定性。

样品的澄清

离心和过滤是用来进行样品澄清的标准实验室技术，当处理小样品时常规使用。

高度建议在色谱纯化之前，立即离心和过滤样品。

离心

离心去除脂类和颗粒物质，如细胞残骸。如果样品在离心之后仍然混浊，使用滤纸或5微米的滤器作为第一步，下面的其中之一作为第二步过滤。

- 对于小量的样品体积或与滤器吸附的蛋白，10 000g离心15分钟。
- 对于细胞残骸，40 000g到50 000g离心30分钟。
- 血清样品可以在离心去除残存的脂类之后，通过玻璃棉进行过滤。

过滤

过滤去除颗粒物质。醋酸纤维素或PVDF薄膜过滤的非特异结合蛋白数量最少。

对于色谱之前的样品制备，根据色谱柱料珠子大小选择过滤孔大小。

指定过滤孔大小	色谱柱料颗粒大小
1微米	90微米或以上
0.45微米	34微米
0.22微米	3、10、15微米或需要特别清洁的样品或无菌样品



在检测运行中检测靶蛋白的回收率。有些蛋白可以和滤器表面非特异的吸附。

除盐

除盐柱适合任何样品体积，可以一步快速去除低分子量污染物，同时将样品转移到合适的缓冲液情况。除盐之前离心和/或过滤样品仍然值得推荐。第二章57页给出了详细的缓冲液交换和除盐的流程。

在实验室规模，当样品经过过滤或者离心之后，已经相当地洁净，缓冲液交换和除盐步骤可以避免。对于亲和层析或者疏水相互作用色谱，调整样品的pH值就足够了，如果必要，进行稀释降低溶液的离子强度。



快速的处理小体积或大体积样品。在纯化步骤之前或之间使用，如果需要（记住每多一步能够降低产量，除盐也会稀释样品）。

从分子量大于5000的蛋白中进行除盐。

如果需要挥发性缓冲液，使用100 mM乙酸胺或100 mM碳酸氢胺。

特殊样品的制备步骤

如果已知粗样品含有污染物，如脂类、脂蛋白、或酚红，可能在柱子上堆积，或者特定的粗制不纯物，如大量的蛋白，可能就需要特定的样品制备步骤，在色谱步骤之前进行杂质去除。

组分沉淀

组分沉淀经常用在实验室规模从小样品体积中去除粗制不纯物，偶尔用在小规模商业生产上。沉淀技术通过不同的溶解性原则进行组分分离。由于蛋白品种疏水程度的不同，增加盐浓度能够增强蛋白之间的疏水相互作用，引起沉淀。如图72所示，组分沉淀可以有三种方式用来去除粗的不纯物。

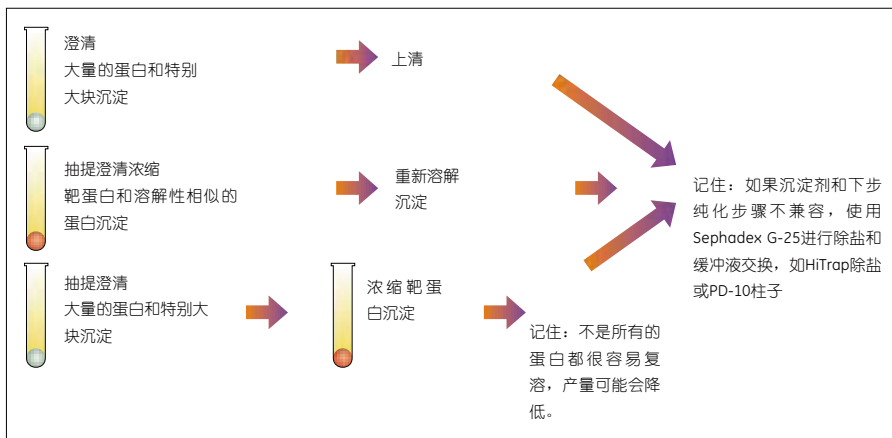


图72 使用沉淀的三种方式。

表12 总结了沉淀剂的例子。最常用的沉淀方法使用硫酸铵给出了更详尽的描述。

表12 沉淀技术的例子

沉淀剂	代表性使用情况	样品类型	注释
硫酸铵	如下所述。 可用于HIC。	大于1毫克每毫升 蛋白。	稳定蛋白，免疫球蛋白没有特 异性。
硫酸葡聚糖	每毫升样品加入0.04毫升 10%的硫酸葡聚糖和1毫升 1M氯化钙，混合15分钟， 10000g离心，丢弃沉淀。	含有高等级脂蛋白 的样品，如腹水。	沉淀脂蛋白。
聚乙烯吡咯烷	加入3%（重量体积比）， 搅拌4小时，17000g离心， 丢弃沉淀。	含有高等级脂蛋白 的样品，如腹水。	硫酸葡聚糖的替代物。
聚乙二醇 （PEG，分子量 大于4000）	高达20%（重量体积比）	血浆蛋白。	没有变性，上清可直接用于IEX 或AC，完全去除有困难。
丙酮（冰的）	0摄氏度高达80%（重量体 积比）。使用Eppendorf™ 离心机全速离心收集沉淀。		可能不可逆的变性蛋白。肽段 沉淀或浓缩样品进行电泳非常 有用。
聚乙烯亚胺	0.1%（重量体积比）		沉淀聚集的核蛋白。
硫酸与精蛋白	1%（重量体积比）		沉淀聚集的核蛋白。
硫酸链霉素	1%（重量体积比）		沉淀核酸。
羊脂酸	(X/15) g，这里X为样品体 积	抗体浓度应当大于1 毫克每毫升。	从血清或腹水中沉淀大量的蛋 白，将免疫球蛋白留在溶液中。

细节来自：

Scopes R.K., 蛋白纯化, 原理和实践, Springer, (1994),

J.C. Janson and L. Rydén, 蛋白纯化, 原理, 高分辨率方法和应用, 第二版. Wiley Inc, (1998).

个人交流。

硫酸铵沉淀



一些蛋白可能会被硫酸铵破坏。当加入晶体硫酸铵时，需要小心：高局部的浓度可能引起不希望的蛋白沉淀，造成污染。



对于常规的、可重复的纯化，喜好色谱使用硫酸铵沉淀应当避免。



一般来讲，对于低于1毫克每毫升的蛋白浓度，沉淀很少有效。

沉淀所需溶液：

饱和硫酸铵溶液（将100克硫酸铵加入100毫升蒸馏水，搅拌溶解）。
1 M Tris-HCl, pH 8.0。
第一步纯化的缓冲液。

1. 过滤（0.45微米）或离心样品（4摄氏度10000g）。
2. 加入1份1 M Tris-HCl, pH 8.0到10份样品体积，以维持pH。
3. 轻轻的搅拌。一滴一滴加入硫酸铵溶液。加到50%饱和度。搅拌1小时。
4. 10000g离心20分钟。
5. 移走上清。以相同浓度的硫酸铵溶液等体积重悬清洗沉淀两次（即不会重新溶解已沉淀蛋白或引起进一步沉淀的溶液）。再次离心。
6. 使用下一步使用的缓冲液小体积重新溶解沉淀。
7. 使用Sephadex G-25除盐柱通过澄清/缓冲液交换步骤，去除硫酸铵（参见57页第二章）。
%饱和度可以调整为沉淀靶分子或沉淀污染物。

根据温度不同，达到给定的饱和程度的硫酸铵的数量会有所不同。表13给出了20摄氏度需要的数量。

表13 20摄氏度达到给定的饱和程度需要的硫酸铵的数量。

		获得的最终百分比饱和度																	
		20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100	
获得的最终百分比饱和度和 起始百分比饱和度	20摄氏度每升溶液需要加入的硫酸铵数量（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		

蛋白沉淀的复溶

许多蛋白在很少量接下来色谱步骤使用的缓冲液中就很容易复溶。然而，对于溶解性差的蛋白，可能需要变性剂。特殊情况取决于特定的蛋白。这些试剂必须总是去除允许蛋白的完全复性，最大的质量和活性的回收。在纯化过程中，色谱步骤经常去除变性剂。表14给出了常用的变性剂的例子。

表14

变性剂	代表性使用情况	去除/注释
尿素	2M-8M	使用Sephadex G-25去除
盐酸胍	3M-6M	使用Sephadex G-25或IEX去除
Triton X-100	2%	使用Sephadex G-25或IEX去除
沙可西（月桂酰肌氨酸钠）	1.5%	使用Sephadex G-25或IEX去除
N-辛基 葡糖苷	2%	使用Sephadex G-25或IEX去除
硫酸十二烷基钠	0.1-0.5%	在第一步色谱，非离子去污剂交换，避免阴离子交换色谱
碱性pH	pH大于9,氢氧化钠	色谱过程可能需要调整pH，以维持溶解性。



细节来自：

Scopes R.K., 蛋白纯化, 原理和实践, Springer, (1994), J.C. Janson and L. Rydén, 蛋白纯化, 原理, 高分辨率方法和应用, 第二版. Wiley Inc, (1998)和其它资源。

参见第二章57页。


脂蛋白的去除

脂蛋白和别的脂材料可以很快地堵塞色谱柱，建议在开始纯化之前去除。沉淀剂，如硫酸葡聚糖和聚乙烯吡咯烷，在组分沉淀下面进行过描述，推荐用来从样品如腹水中去除高程度的脂蛋白。


-  离心样品，避免靶分子和滤膜的非特异结合危险。
-  样品如血浆可以通过玻璃棉进行过滤，以去除参与的脂类。

酚红的去除

酚红在实验室规模常用来作为细胞培养的pH指示剂。尽管和纯化没有直接干扰，但是酚红可以和特定的纯化柱料结合，应当尽早去除，避免污染的危险。已知酚红可以在pH大于7时和阴离子交换柱料结合。

-  使用除盐柱同时去除酚红（低分子量）并将样品转移到合适的缓冲液条件，进行下一步纯化，如57页第二章所述。

低分子量污染物的去除

-  如果样品含有高等级的低分子量污染，在第一步色谱纯化步骤之前，使用除盐柱，如57页第二章所述。

附录4

纯化设备的选择

简单的缓冲液交换和除盐步骤可以使用注射器或者外周蠕动泵和预制的HiTrap柱子一起进行。如果进行高分辨率分离，就需要色谱系统来精确的控制流速。

工作方式	标准ÄKTA设计的设备				注射器或者外周蠕动泵和HiTrap除盐柱	重力填充柱
	Explorer 100	Purifier 10	FPLC	Prime		
简单，一步除盐，缓冲液交换	✓	✓	✓	✓	✓	✓
常规分离可重复性操作	✓	✓	✓	✓		
增加纯度的一步分离的优化	✓	✓	✓	✓		
常规需要的系统控制和数据处理，如GLP	✓	✓	✓			
自动化方法的研发和优化	✓	✓	✓			
自动缓冲液制备	✓	✓				
自动pH调节	✓	✓				
自动柱料和柱子调节	✓					
自动多步纯化	✓					
规模扩大，过程研发和生产转换	✓					



ÄKTAexplorer



ÄKTA



ÄKTApurifier



ÄKTA FPLC™

附录5

线性流速 (cm/h) 和体积流速 (ml/min) 之间的相互转化

当比较不同大小柱子的结果时，流速表示为线性流速 (cm/h) 比较方便。然而，流速经常测量为体积流速 (ml/min)。为了在线性流速和体积流速之间进行转换，可以使用下面的公式之一。

从线性流速 (cm/h) 到体积流速 (ml/min)

$$\begin{aligned}\text{体积流速 (ml/min)} &= \text{线性流速 (cm/h)} / 60 \times \text{柱子横截面积 (平方厘米)} \\ &= Y/60 \times \pi \times d^2/4\end{aligned}$$

这里，

Y=线性流速 (cm/h)

d=柱子内直径 (厘米)

例如：

XK 16/70的柱子 (内直径1.6厘米)，当线性流速是150cm/h，体积流速是多少？

Y=线性流速=150cm/h

d=柱子内直径=1.6厘米

体积流速=150 × π × 1.6 × 1.6 / (60 × 4) ml/min=5.03ml/min

从体积流速 (ml/min) 到线性流速 (cm/h)

$$\begin{aligned}\text{线性流速 (cm/h)} &= \text{体积流速 (ml/min)} \times 60 / \text{柱子横截面积 (平方厘米)} \\ &= Z \times 60 \times 4 / \pi \times d^2\end{aligned}$$

这里，Z=柱子体积流速 (ml/min)

d=柱子内直径 (厘米)

例子：

HR 5/5的柱子 (内直径0.5厘米)，当体积流速是1ml/min，线性流速是多少？

Z=柱子体积流速=1ml/min

d=柱子内直径=0.5厘米

线性流速=1 × 60 × 4 / (π × 0.5 × 0.5) cm/h=305.6cm/h

从ml/min到使用注射器

1ml/min=在HiTrap1毫升的柱子上近似30滴每分钟

5ml/min=在HiTrap5毫升的柱子上近似120滴每分钟

附录6

数据转换：蛋白，柱压

质量（克每摩）	1微克	1纳摩
10 000	100皮摩：6 × 10 ¹³ 分子	10微克
50 000	20皮摩：1.2 × 10 ¹³ 分子	50微克
100 000	10皮摩：6.0 × 10 ¹² 分子	100微克
150 000	6.7皮摩：4.0 × 10 ¹² 分子	150微克

1 kb of DNA = 333氨基酸编码能力= 37 000克每摩

270 bp DNA = 10 000克每摩

1.35 kb DNA = 50 000克每摩

2.70 kb DNA = 100 000克每摩

氨基酸平均分子量 = 120克每摩。

	1毫克每毫升时A280
IgG	1.35
IgM	1.20
IgA	1.30
蛋白A	0.17
卵白素	1.50
链卵白素	3.40
牛血清白蛋白	0.70


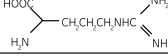
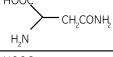
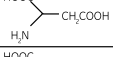

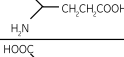
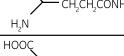

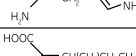
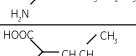
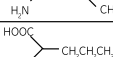
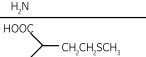
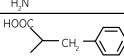
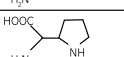



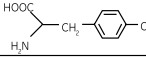
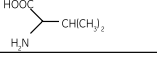

柱子压力

最大操作反压力指的是超过此压力柱子内容物可能开始压缩。

压力单位表示为兆帕、bar或磅每平方英寸，可以使用如下的关系转换：1兆帕=10bar=145磅。

附录7

氨基酸一览表

氨基酸	三联密码子	单个密码子	结构
丙氨酸	Ala	A	
精氨酸	Arg	R	
天门冬酰胺	Asn	N	
天门冬氨酸	Asp	D	
半胱氨酸	Cys	C	
谷氨酸	Glu	E	
谷氨酰胺	Gln	Q	
甘氨酸	Gly	G	
组氨酸	His	H	
异亮氨酸	Ile	I	
亮氨酸	Leu	L	
赖氨酸	Lys	K	
甲硫氨酸	Met	M	
苯丙氨酸	Phe	F	
脯氨酸	Pro	P	
丝氨酸	Ser	S	
苏氨酸	Thr	T	
色氨酸	Trp	W	
酪氨酸	Tyr	Y	
缬氨酸	Val	V	

分子式	M _r	中间单元 残基 (-H ₂ O) 分子式	M _r	在pH 6.0-7.0 电荷	亲水性 (非极性)	不带电荷 (极性)	亲水性 (极性)
C ₃ H ₇ NO ₂	89.1	C ₃ H ₅ NO	71.1	中性的	■		
C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	174.2	C ₆ H ₁₂ N ₄ O	156.2	碱性的 (+ve)			■
C ₄ H ₈ N ₂ O ₃	132.1	C ₄ H ₆ N ₂ O ₂	114.1	中性的		■	
C ₄ H ₇ NO ₄	133.1	C ₄ H ₅ NO ₃	115.1	酸性的 (-ve)			■
C ₃ H ₇ NO ₂ S	121.2	C ₃ H ₅ NOS	103.2	中性的		■	
C ₅ H ₉ NO ₄	147.1	C ₅ H ₇ NO ₃	129.1	酸性的 (-ve)			■
C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃	146.1	C ₅ H ₈ N ₂ O ₂	128.1	中性的		■	
C ₂ H ₅ NO ₂	75.1	C ₂ H ₃ NO	57.1	中性的		■	
C ₆ H ₉ N ₃ O ₂	155.2	C ₆ H ₇ N ₃ O	137.2	碱性的 (+ve)			■
C ₆ H ₁₃ NO ₂	131.2	C ₆ H ₁₁ NO	113.2	中性的	■		
C ₆ H ₁₃ NO ₂	131.2	C ₆ H ₁₁ NO	113.2	中性的	■		
C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂	146.2	C ₆ H ₁₂ N ₂ O	128.2	碱性的 (+ve)			■
C ₅ H ₁₁ NO ₂ S	149.2	C ₅ H ₉ NOS	131.2	中性的	■		
C ₉ H ₁₁ NO ₂	165.2	C ₉ H ₉ NO	147.2	中性的	■		
C ₅ H ₉ NO ₂	115.1	C ₅ H ₇ NO	97.1	中性的	■		
C ₃ H ₇ NO ₃	105.1	C ₃ H ₅ NO ₂	87.1	中性的		■	
C ₄ H ₉ NO ₃	119.1	C ₄ H ₇ NO ₂	101.1	中性的		■	
C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	204.2	C ₁₁ H ₁₀ N ₂ O	186.2	■			
C ₉ H ₁₁ NO ₃	181.2	C ₉ H ₉ NO ₂	163.2	中性的		■	
C ₅ H ₁₁ NO ₂	117.1	C ₅ H ₉ NO	99.1	中性的	■		

附录8

纯化过程中的分析实验

为了跟踪纯化过程，分析实验是必要的。这些分析实验用来评估每一步在产量、生物活性、回收率方面的效率，并且可以帮助优化实验条件。对于目标分子的可靠实验的重要性再怎么强调都不为过。



当检测色谱组分的时候，确保用来纯化的缓冲液不干扰实验。

总蛋白判定

Lowry或Bradford方法是用来测定总蛋白含量的最经常使用的实验。Bradford方法尤其适合测定含有高脂的样品，高脂会干扰Lowry方法。

纯度测定

纯度经常使用SDS-PAGE进行估计。此外，等电聚焦，毛细管电泳，反相色谱或质谱也可以使用。

SDS-PAGE分析

需要的试剂

6X SDS上样缓冲液：0.35 M Tris-HCl (pH 6.8)、10.28% (w/v) SDS、36% (v/v) 甘油、0.6 M 二硫苏糖醇 (or 5% 2-巯基乙醇)、0.012% (w/v) 溴芬兰。零下80摄氏度储存在0.5离心管内。

1. 加入2微升6X SDS上样缓冲液到5至10微升粗提物、细胞裂解物或适合的纯化组分的上清中。
2. 简短漩涡震荡，90至100摄氏度加热5分钟。
3. SDS-PAGE胶上样。
4. 跑胶，使用考马斯™亮蓝（考马斯亮蓝R片）或银染（PlusOne™银染试剂盒，蛋白）染色。



SDS胶中丙烯酰胺的百分比浓度应当根据感兴趣蛋白预计分子量进行选择（参见表15）。


表15

在溶解胶中的丙烯酰胺浓度%	分离大小范围
单独百分比:	
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
梯度:	
5-15%	14 000-20 000
5-20%	10 000-20 000
10-20%	10 000-15 000


1较大的蛋白无法明显的进入凝胶。

功能实验

免疫特异相互作用已经发展建立了许多评估靶分子活性浓度的实验系统。

 当使用考马斯亮蓝染色或银染检测SDS-PAGE灵敏度不够时，经常使用免疫印迹分析。

1. 使用SDS-PAGE分离蛋白样品。
2. 将已经分离的蛋白样品从胶转移到合适的膜上，如Hybond™ ECL™ (适合接下来ECL检测)或Hybond P(适合接下来ECL Plus™检测)。
3. 使用合适的特定试剂进行膜显色。

 电泳和蛋白转印可以使用不同的仪器设备和试剂完成。如果想获得进一步的详细信息，请参考通用电气医疗集团提供的蛋白电泳技术手册和Hybond ECL用法手册。

- ELISAs是最常使用的活性实验。
- 使用表面等离子共振现象检测免疫特异的相互作用进行功能实验（如使用BIACORE™系统），可以测定活性浓度、抗原表位制图和进行反应激酶的研究。

靶蛋白的检测和分析实验

SDS-PAGE、免疫印迹和ELISAs也可以运用到已经被连接特定的标记物的遗传工程分子检测和分析实验。在某些情况下，可以研发基于连接的标记物的特性的实验，如，对于酶检测的GST检测模式和GST标记蛋白的定量。如果想获得关于GST和六组氨酸标记蛋白检测和定量的进一步详细信息，请参阅通用电气医疗集团提供的重组蛋白手册：蛋白扩增和简单纯化和GST基因融合系统手册。

附录9

生物样品的储存



这里给出的建议是大体的原则，不能适用于所有的生物学样品。遵从这些推荐之前，一定要考虑特定样品的特性和它的使用目的。

一般建议

- 如果必要加入稳定试剂。纯化蛋白储存经常需要稳定剂的存在。
- 血清、培养上清和腹水需要在零下20到零下70摄氏度冷冻储存，并且小管进行分装。
- 避免反复冻融或反复冻干重融，这样会降低生物学活性。
- 避免接近稳定极限的条件，如pH或盐浓度，还原剂或螯合剂。
- 装在密闭容器中保存在4摄氏度冰箱，使细菌生长和蛋白酶活性最小化。如果可能，在4摄氏度超过24小时，加入保存剂（如0.01% 乙汞硫代水杨酸钠）。



叠氮钠可以干扰很多偶联方法和一些生物实验，而且对身体有害。可以使用除盐柱去除（参见57页第二章）。

纯化蛋白的一般建议

- 以沉淀形式储存在高浓度的硫酸胺中，如4.0 M。
- 冻存在50%的甘油中，尤其适合酶类。
- 如果产物用来进行生物学实验，避免使用保存剂。如果要进行体内实验，保存剂一定不要添加。而要将样品分装后冷冻保存。
- 无菌过滤可以延长储存时间。
- 加入稳定剂，如5-20%甘油，10毫克每毫升血清白蛋白，配体（根据活性蛋白的浓度确定），都可以有助于维持生物学活性。记住添加物将会降低蛋白纯度，可能需要在后面的步骤中去除。
- 避免反复冻融或反复冻干重融，这样会降低生物学活性。



叠氮钠可以干扰很多偶联方法和一些生物实验。可以使用除盐柱去除（参见57页第二章）。



冷球蛋白是一组蛋白，包括一些小鼠IgG₃亚类的抗体，不能够储存在4摄氏度，因为在这个温度它们会沉淀。在有保护剂的情况下室温保存。

附加读物和参考材料

	货号
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: 蛋白扩增和简单纯化	18-1142-75
GST基因融合系统手册	18-1157-58
亲和色谱手册: 原理和方法	18-1022-29
离子交换色谱手册: 原理和方法	18-1114-21
疏水相互作用色谱手册: 原理和方法	18-1020-90
反相色谱手册: 原理和方法	18-1112-93
扩大床吸附手册: 原理和方法	18-1124-26
蛋白和肽段纯化技术选择	18-1128-63
蛋白和肽段的快速除盐和缓冲液交换	18-1128-62
凝胶过滤柱子和柱料选择指导	18-1124-19
离子交换柱子和柱料选择指导	18-1127-31
使用多种缓冲液和PBE进行色谱聚焦手册	18-1009-07
HIC柱子和柱料产品概要	18-1100-98
亲和柱子和柱料产品概要	18-1121-86
方便的蛋白纯化, HiTrap柱子指导	18-1128-81
AKTAdesign小册子	18-1158-77
AKTA 3D试剂盒小册子	18-1160-45
GST融合系统小册子	18-1159-30
蛋白纯化软件	18-1155-49
蛋白纯化: 原理、高分辨率方法和应用J-C. Jansson和L.Rydén	18-1128-68
Sephadex LH-20: 有机溶剂中的色谱	18-1009-74
Sephadex LH-20的制备胶色谱, H. Henke	18-1113-89
装柱录像 (PAL)	17-0893-01
装柱录像 (NTSC)	17-0894-01
HiTrap Desalting参考文献列表	18-1156-70*
HiPrep 26/10 Desalting参考文献列表	18-1156-89*
HiPrep Sephacryl S-100 HR参考文献列表	18-1156-86*
HiPrep Sephacryl S-200 HR参考文献列表	18-1156-87*
HiPrep Sephacryl S-300 HR参考文献列表	18-1156-88*
HiLoad Superdex 30 prep grade参考文献列表	18-1156-94*
HiLoad Superdex 75 prep grade参考文献列表	18-1156-95*
HiLoad Superdex 200 prep grade参考文献列表	18-1156-96*
分析	
使用功能强大的双向电泳技术进行蛋白分析	18-1124-82
双向电泳手册	80-6429-60
蛋白电泳技术手册	80-6013-88
ECL Western和ECL Plus Western Blotting应用指导	18-1139-13

*文献列表只能够从www.gelifesciences.com/protein-purification网址获得, 以上目录的许多资料可以下载。

订货信息

产品	数量	货号
高分辨率组分收集		
Superdex		
Superdex Peptide PC 3.2/30	1 × 2.4 ml 柱子	17-1458-01
Superdex 75 PC 3.2/30	1 × 2.4 ml 柱子	17-0771-01
Superdex 200 PC 3.2/30	1 × 2.4 ml 柱子	17-1089-01
Superdex Peptide HR 10/30	1 × 24 ml 柱子	17-1453-01
Superdex 75 HR 10/30	1 × 24 ml 柱子	17-1047-01
Superdex 200 HR 10/30	1 × 24 ml 柱子	17-1088-01
HiLoad 16/60 Superdex 30 prep grade	1 × 120 ml 柱子	17-1139-01
HiLoad 26/60 Superdex 30 prep grade	1 × 320 ml 柱子	17-1140-01
HiLoad 16/60 Superdex 75 prep grade	1 × 120 ml 柱子	17-1068-01
HiLoad 26/60 Superdex 75 prep grade	1 × 320 ml 柱子	17-1070-01
HiLoad 16/60 Superdex 200 prep grade	1 × 120 ml 柱子	17-1069-01
HiLoad 26/60 Superdex 200 prep grade	1 × 320 ml 柱子	17-1071-01
Superdex 30 prep grade	25 ml	17-0905-10
Superdex 30 prep grade	150 ml	17-0905-01
Superdex 75 prep grade	25 ml	17-1044-10
Superdex 75 prep grade	150 ml	17-1044-01
Superdex 200 prep grade	25 ml	17-1043-10
Superdex 200 prep grade	150 ml	17-1043-01
Superose		
Superose 6 PC 3.2/30	1 × 2.4 ml 柱子	17-0673-01
Superose 12 PC 3.2/30	1 × 2.4 ml 柱子	17-0674-01
Superose 6 HR 10/30	1 × 24 ml 柱子	17-0537-01
Superose 12 HR 10/30	1 × 24 ml 柱子	17-0538-01
Superose 6 prep grade	125 ml	17-0489-01
Superose 12 prep grade	125 ml	17-0536-01
Sephacryl		
HiPrep 16/60 Sephacryl S-100 HR	1 × 120 ml 柱子	17-1165-01
HiPrep 26/60 Sephacryl S-100 HR	1 × 320 ml 柱子	17-1194-01
HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 HR	1 × 120 ml 柱子	17-1166-01
HiPrep 26/60 Sephacryl S-200 HR	1 × 320 ml 柱子	17-1195-01
HiPrep 16/60 Sephacryl S-300 HR	1 × 120 ml 柱子	17-1167-01
HiPrep 26/60 Sephacryl S-300 HR	1 × 320 ml 柱子	17-1196-01
Sephacryl S-100 HR	150 ml	17-0612-10
Sephacryl S-100 HR	750 ml	17-0612-01
Sephacryl S-200 HR	150 ml	17-0584-10
Sephacryl S-200 HR	750 ml	17-0584-01
Sephacryl S-300 HR	150 ml	17-0599-10
Sephacryl S-300 HR	750 ml	17-0599-01
Sephacryl S-400 HR	150 ml	17-0609-10
Sephacryl S-400 HR	750 ml	17-0609-01
Sephacryl S-500 HR	150 ml	17-0613-10
Sephacryl S-500 HR	750 ml	17-0613-01
Sephacryl S-1000 SF	750 ml	17-0476-01

产品	数量	货号
除盐和组群分离		
HiTrap 除盐	5 × 5 ml 柱子	17-1408-01
HiPrep 26/10除盐	1 × 53 ml 柱子	17-5087-01
PD-10除盐柱子	30重力填充柱子	17-0851-01
Empty PD-10除盐柱子	50 重力填充空柱子	17-0435-01
NICK 柱子	20 重力填充柱子	17-0855-01*
NICK 柱子	50 重力填充柱子	17-0855-02*
NAP-5 柱子	20 重力填充柱子	17-0853-01*
NAP-5 柱子	50 重力填充柱子	17-0853-02*
NAP-10 柱子	20 重力填充柱子	17-0854-01*
NAP-10 柱子	50 重力填充柱子	17-0854-02*
NAP-25 柱子	20 重力填充柱子	17-0852-01*
NAP-25 柱子	50 重力填充柱子	17-0852-02*
Sephadex G-10	100 g	17-0010-01
Sephadex G-10	500 g	17-0010-02
Sephadex G-25 Coarse	100 g	17-0034-01
Sephadex G-25 Coarse	500 g	17-0034-02
Sephadex G-25 Fine	100 g	17-0032-01
Sephadex G-25 Fine	500 g	17-0032-02
Sephadex G-25 Medium	100 g	17-0033-01
Sephadex G-25 Medium	500 g	17-0033-02
Sephadex G-25 Superfine	100 g	17-0031-01
Sephadex G-25 Superfine	500 g	17-0031-02
Sephadex G-50 Fine	100 g	17-0042-01
Sephadex G-50 Fine	500 g	17-0042-02
有机溶剂中分离		
Sephadex LH-20	25 g	17-0090-10
Sephadex LH-20	100 g	17-0090-01
Sephadex LH-20	500 g	17-0090-02
校准试剂盒		
凝胶过滤低分子量校准试剂盒 包含核糖核酸酶 A (13 700)	1试剂盒	17-0442-01
凝乳蛋白酶原 A(25 000)		
卵清蛋白(43 000)		
牛血清白蛋白 (67 000)		
蓝色葡聚糖 2000		
凝胶过滤高分子量校准试剂盒 包含醛缩酶(158 000)	1试剂盒	17-0441-01
过氧化氢酶(232 000)		
铁蛋白 (440 000)		
甲状腺球蛋白(669 000)		
蓝色葡聚糖 2000		
蓝色葡聚糖 2000	10 g	17-0360-01

* 预装柱适合进行寡核苷酸、DNA和蛋白的除盐。

产品	数量	货号
柱子		
XK 16/20 柱子	1	18-8773-01
XK 16/40 柱子	1	18-8774-01
XK 16/70 柱子	1	18-8775-01
XK 16/100 柱子	1	18-8776-01
XK 26/20 柱子	1	18-1000-72
XK 26/40 柱子	1	18-8768-01
XK 26/70 柱子	1	18-8769-01
XK 26/100 柱子	1	18-8770-01
XK 50/20 柱子	1	18-1000-71
XK 50/30 柱子	1	18-8751-01
XK 50/60 柱子	1	18-8752-01
XK 50/100 柱子	1	18-8753-01

所有XK柱子同时提供一个AK adaptor、TEFZEL管(内径0.8 mm适用于XK 16和XK 26柱子, 内径1.2 mm适用于XK 50柱子)、M6 连接器、保温套、支撑网环、拆卸工具(仅XK 16和XK 26带有)和使用指导。

附件和备用件

Packing Connector XK 16	1	18-1153-44
Packing Connector XK 26	1	18-1153-45
有机溶剂抗性的柱子		
SR 10/50 column	1	19-2638-01
SR 10/50J column*	1	19-1734-01
SR 25/45 column	1	19-0879-01
SR 25/100 column	1	19-0880-01

所有的SR柱子同时提供两套SRA adaptors、PTFE管(2 × 50 cm)、备用柱床支撑、管子和接头、凸缘工具和用户指导。

*SR 10/50J含有一个硼酸硅酸盐玻璃套。其它的SR柱子不带有玻璃套。

附件

SRE 10 packing reservoir	1	19-2097-01
--------------------------	---	------------

如需获得完整的列表, 请参考通用电气医疗集团生物学产品目录或www.gelifesciences.com/protein-purification网址。