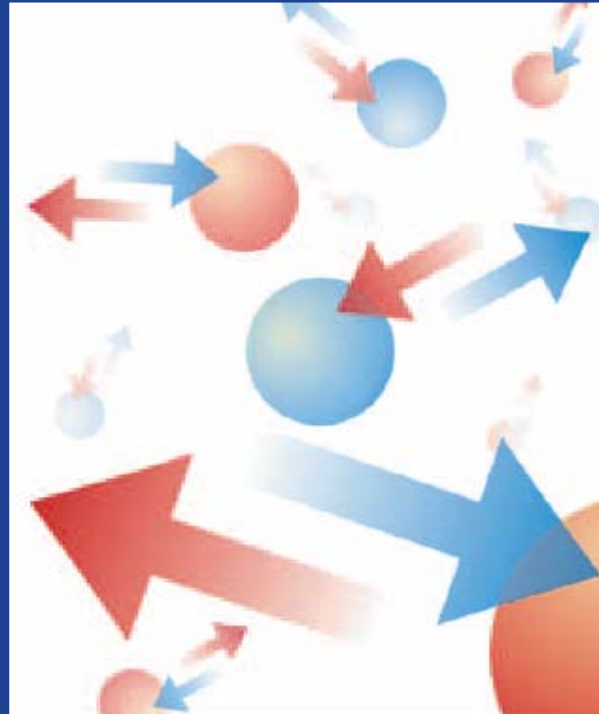


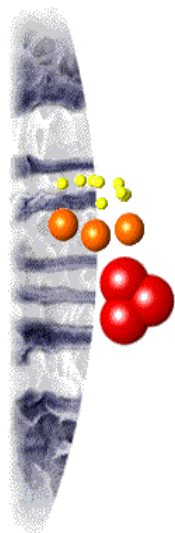
# 离子交换层析技术

## Ion Exchange Chromatography

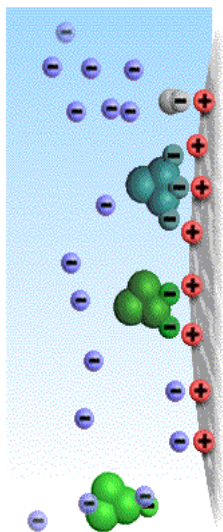


imagination at work

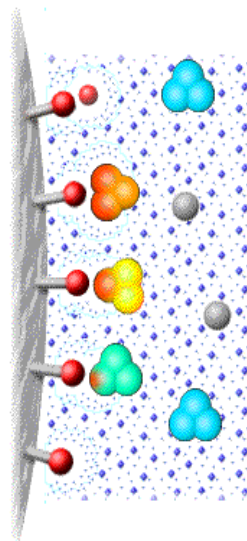
# 层析技术



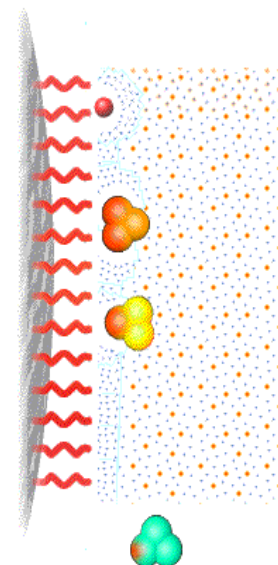
凝胶过滤



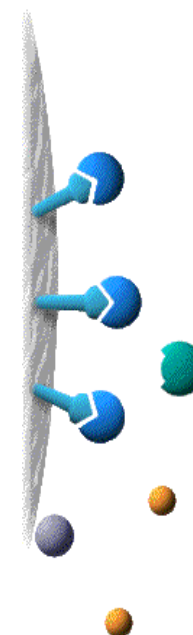
离子交换



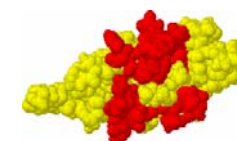
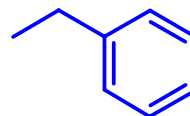
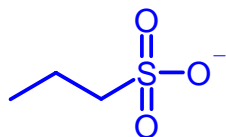
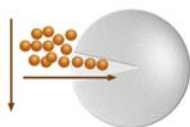
疏水层析



反相层析

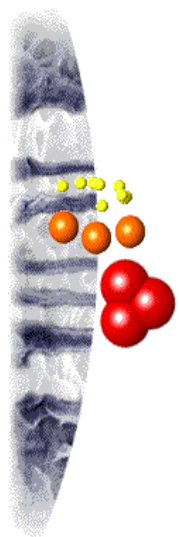


亲和层析

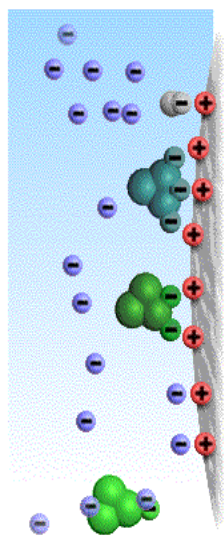


GE imagination at work

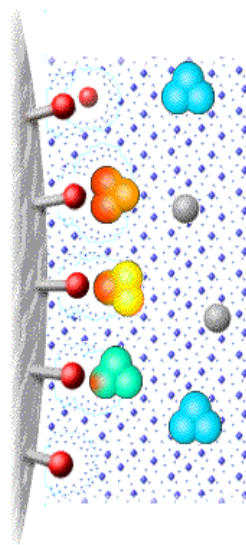
# 层析技术原理



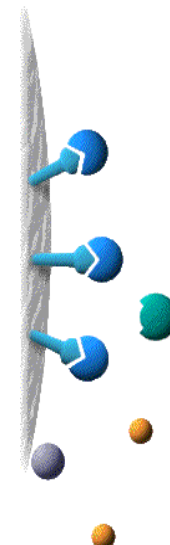
凝胶过滤



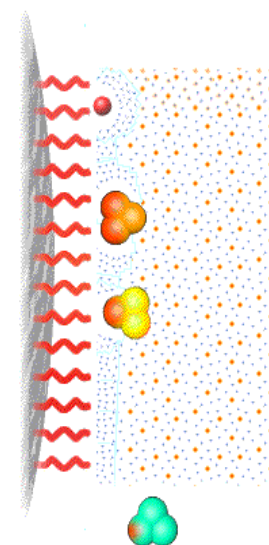
离子交换



疏水层析



亲和层析



反相层析

蛋白所带的电荷    蛋白疏水性

# 内容

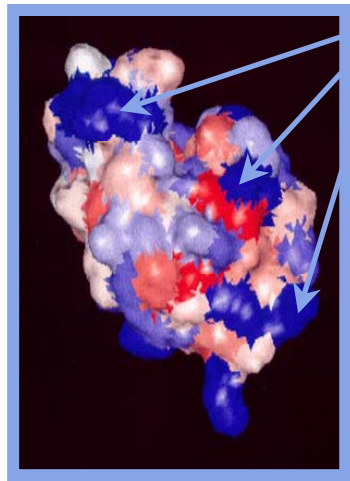
- 介绍
- 机理及原理
- 纯化中的实际问题
- 应用
- 总结



imagination at work

# 什么是离子交换层析?

离子交换层析是一种吸附层析。根据带电荷的分子和层析填料上相反电荷之间可逆的相互作用进行分离。离子交换层析是基于分子之间电荷的差异进行分离。



带电荷的表面

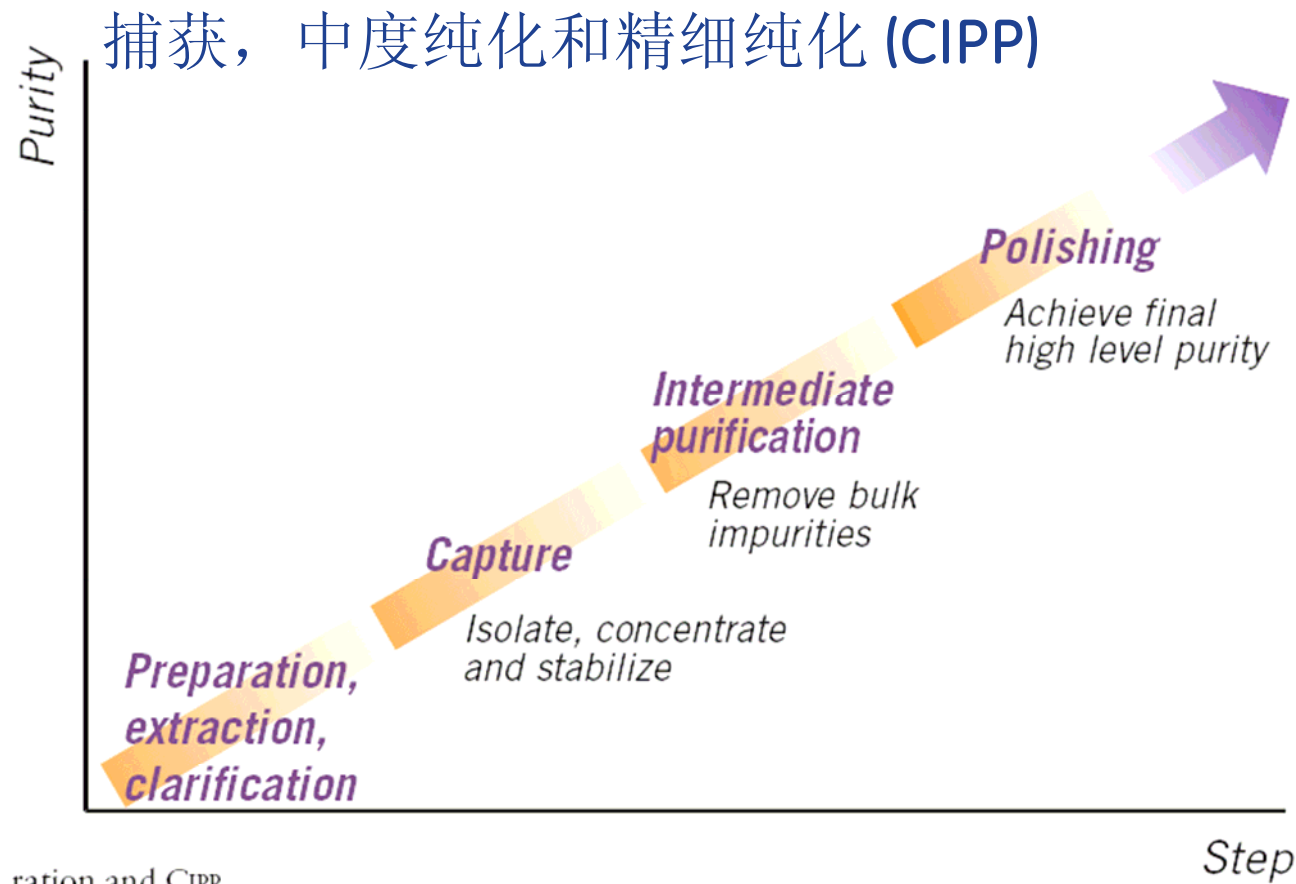
- 蛋白质的表面有带电荷的氨基酸
- 净电荷是正的或负的
- 净电荷随pH改变



GE imagination at work

# 为什么用离子交换色谱？

可以用在纯化的各个阶段及不同规模的纯化中



# 为什么用离子交换色谱？

- 可控性
- 高选择性
- 高载量
- 具有可浓缩性
- 高的回收率



# 内容

- 介绍
- 机理及原理
- 纯化过程中的实际问题
- 应用
- 总结



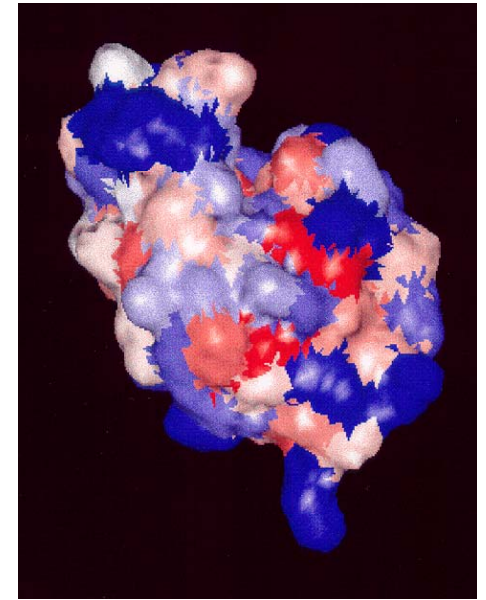
imagination at work



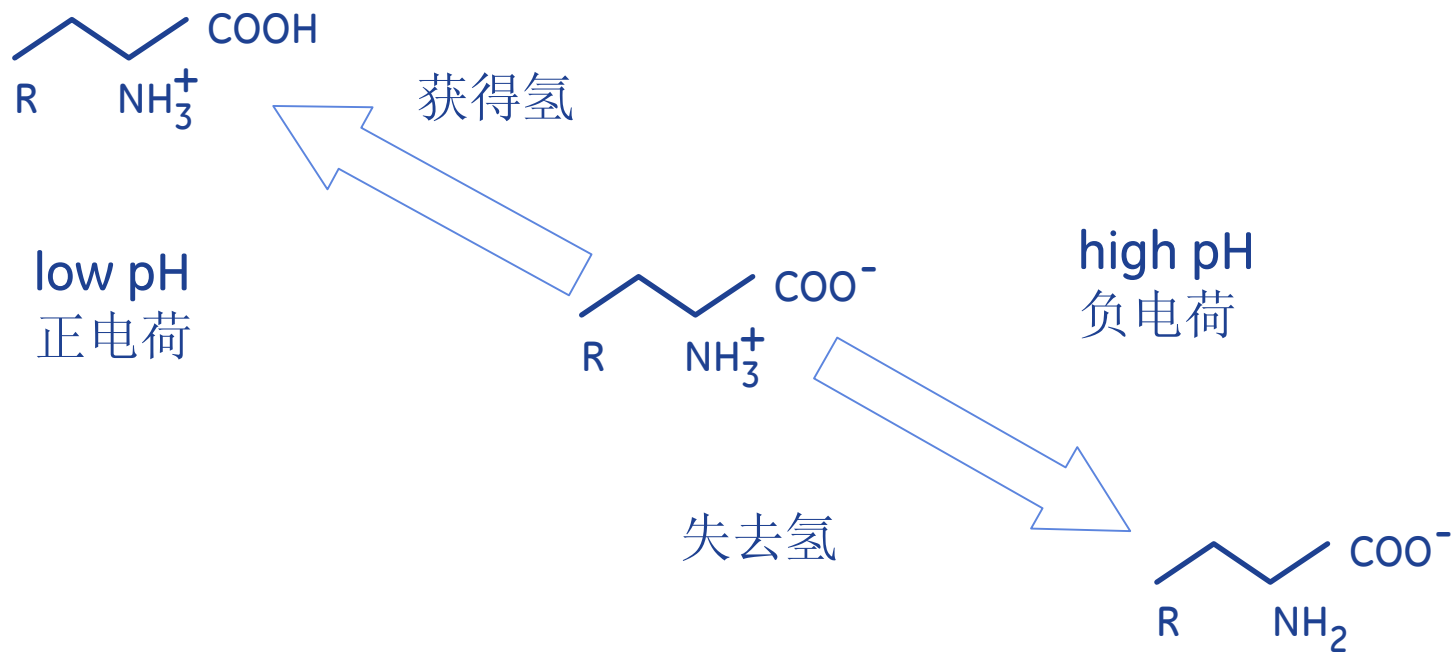
# 通过电荷的分离

## 相反电荷之间的相互作用

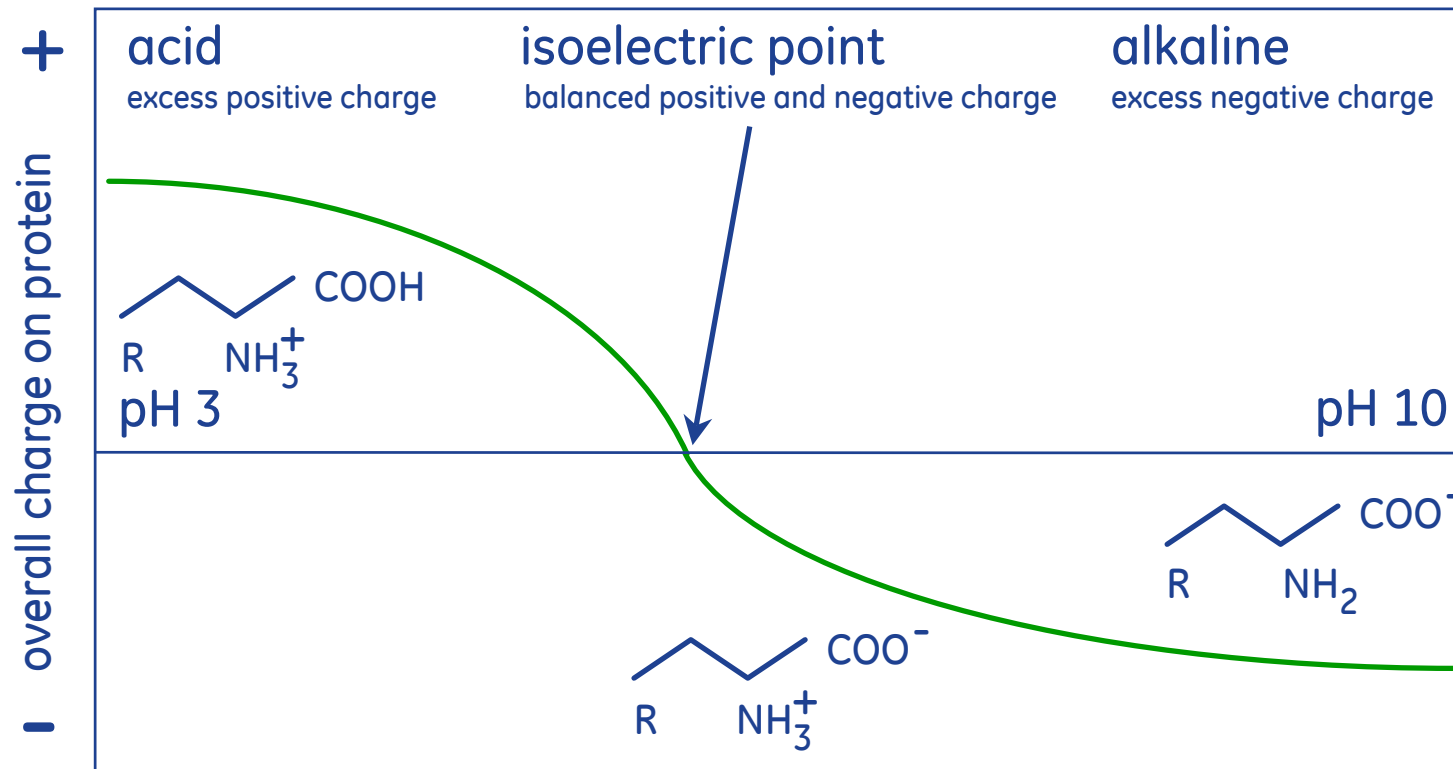
- 阴离子和阳离子交换
- 当蛋白带负电荷时, 进行阴离子-阴离子交换
- 当蛋白带正电荷时, 进行阳离子-阳离子交换



# pH对电荷的影响



# 滴定曲线

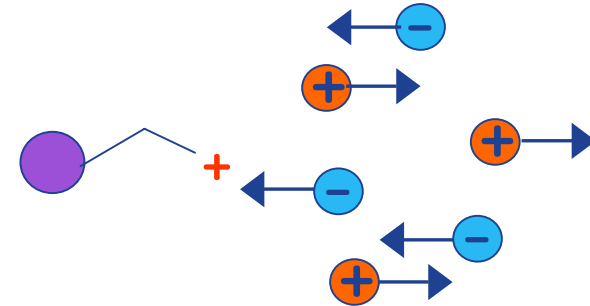


蛋白质所带有的电荷取决于pH

# 不同类型的离子交换剂

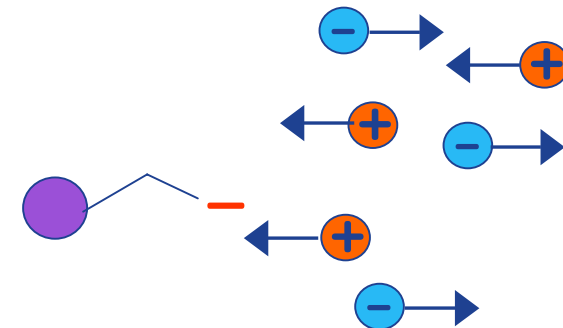
- 阴离子交换剂

- ✓ 阴离子带负电荷
- ✓ 阴离子交换剂是带正电荷的配基，结合带负电荷的分子，替换样品溶液中的阴离子
- ✓ 最常见的配基有 **Q, DEAE, ANX**

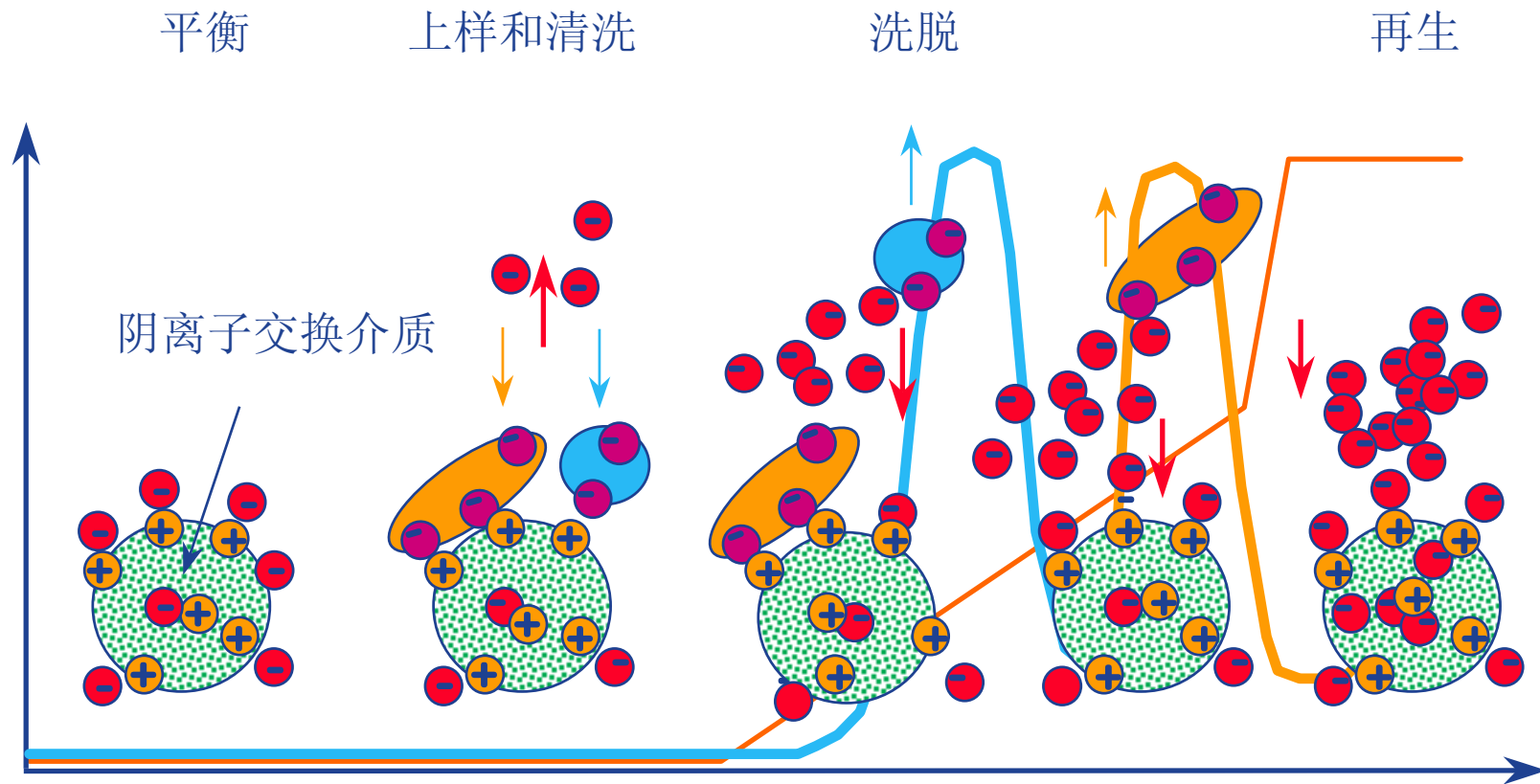


- 阳离子交换剂

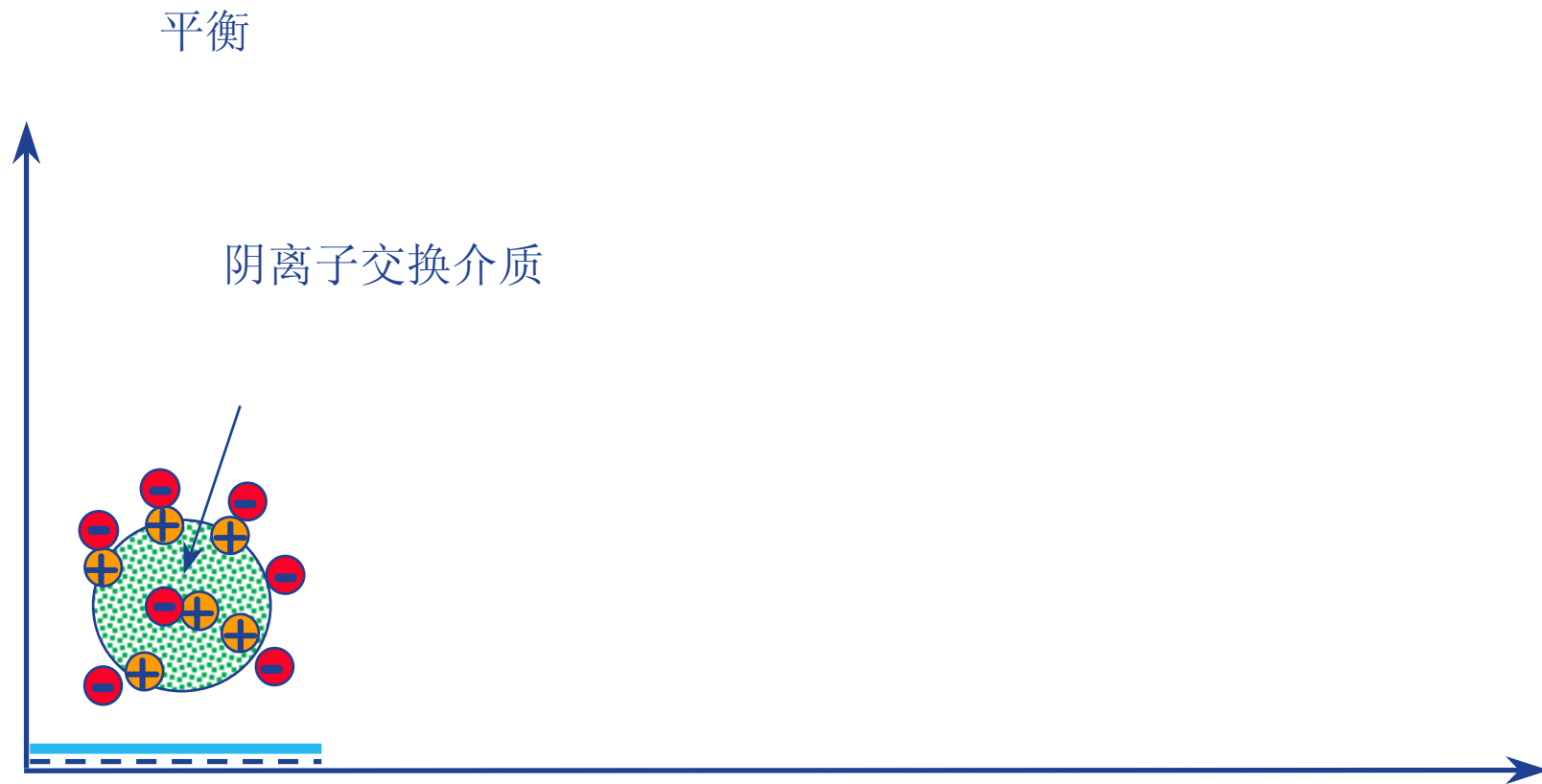
- ✓ 阳离子带正电荷
- ✓ 阳离子交换剂是带负电荷的配基，结合带正电荷的分子，替换样品溶液中的阳离子
- ✓ 最常见的配基有 **S, SP, CM**



# 离子交换的基本步骤

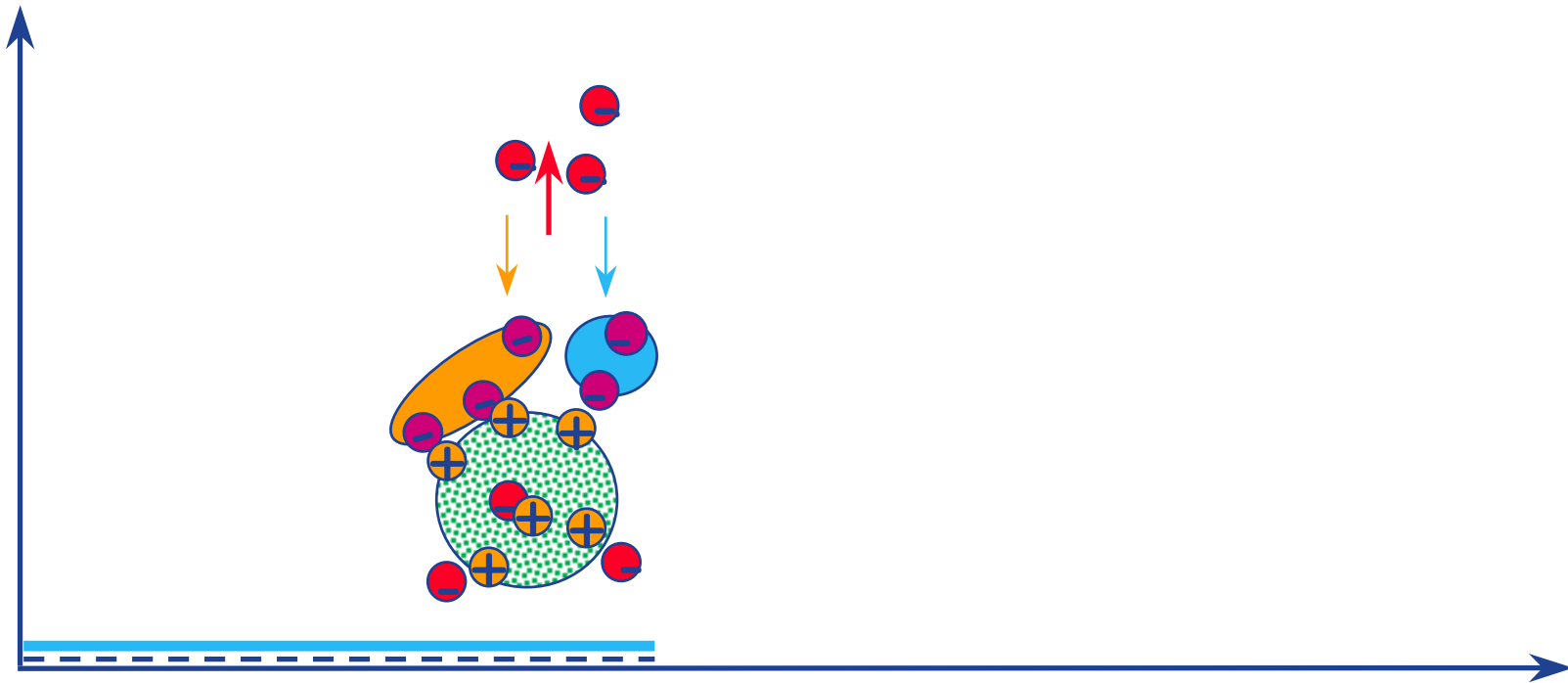


# 离子交换的基本步骤

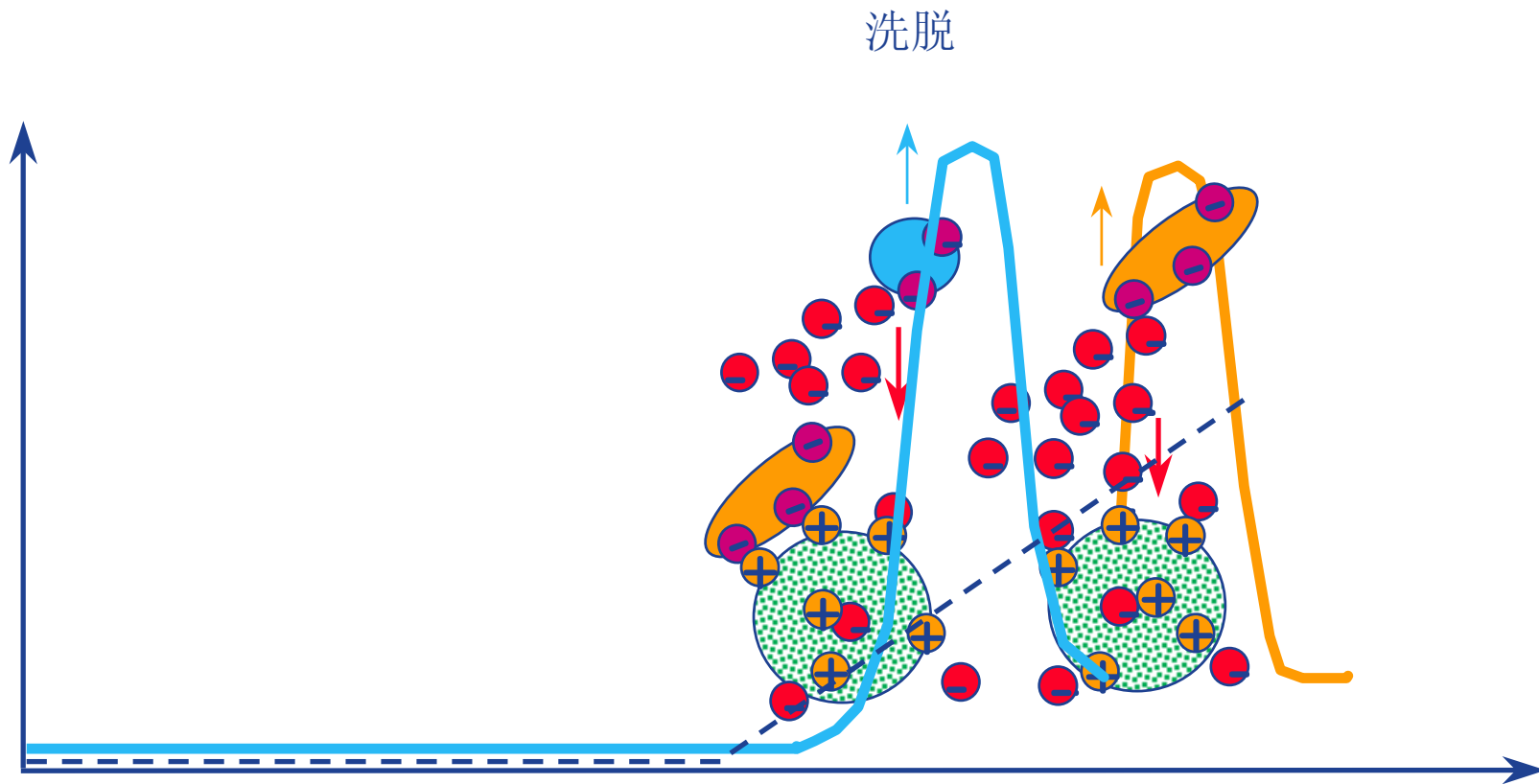


# 离子交换的基本步骤

上样和清洗

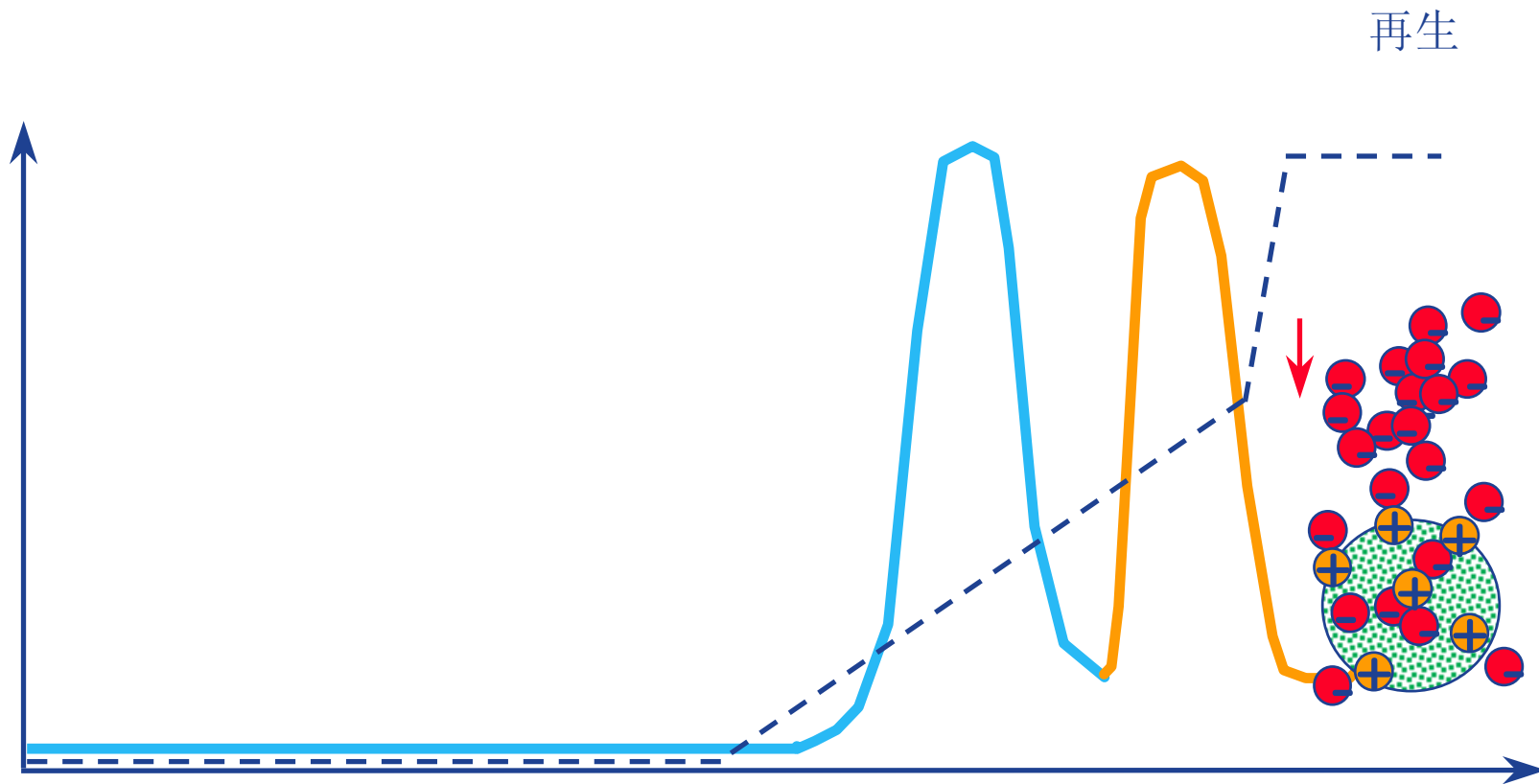


# 离子交换的基本步骤





# 离子交换的基本步骤



# 内容

- 介绍
- 机理和原理
- 纯化过程中的实际问题
- 应用
- 总结



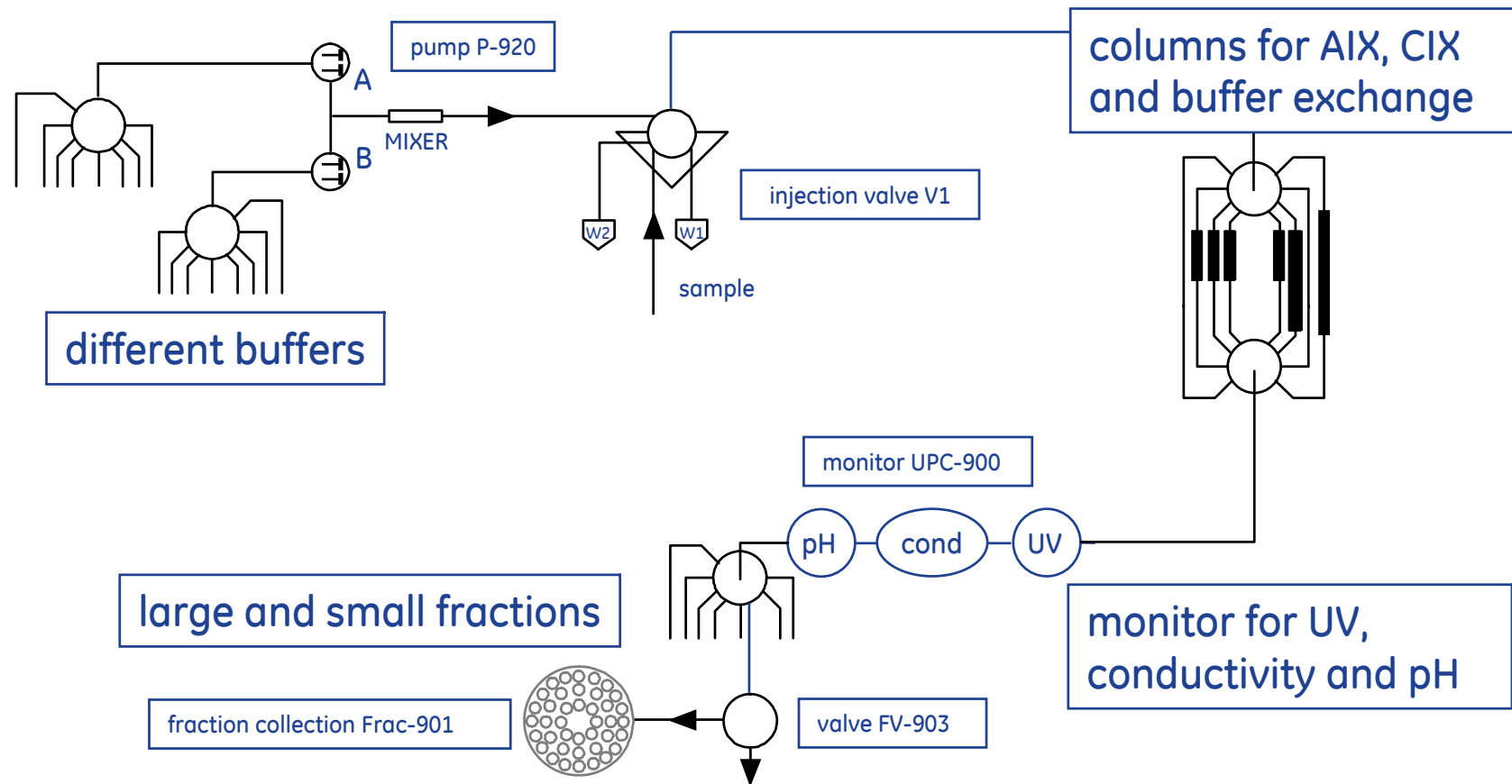
imagination at work

# 实际考虑

- 我们需要什么设备？
- 我们应该选用哪一种离子交换剂？
- 我们怎样进行离子交换分离？



# 离子交换层析的设备



# 合适的离子交换填料????

没有完美的离子交换填料!

不同的离子交换填料适合用于不同的样品载量及不同的分离目的

# 离子交换填料的功能团性质

## 基架

- 孔径 —————→ 载量, 速度
- 粒径 —————→ 峰宽, 速度
- 化学耐受性 —————→ 使用寿命, 回收率

## 配基: 带电基团

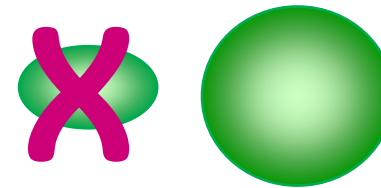
- 类型 —————→ 选择性
- 配基密度 —————→ 载量



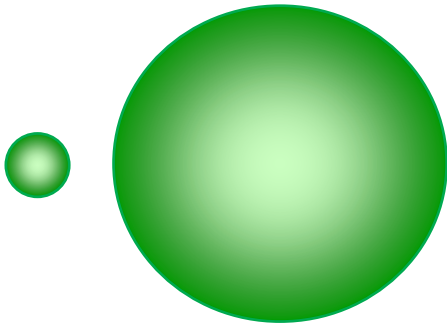
# 基架 - 多孔, 粒径大小, 化学稳定性

化学稳定性好, 如果需要,  
可用苛刻的溶液清洗介质。

物理强度高, 可在高流速下运行



粒径小, 动力学速度快  
粒径大, 适合高流速



多孔, 比表面积大, 所以载  
量高

Ion exchanger	Porosity	Max load/ml
Mini Q™	solid	ca 5 mg
Mono Q™	very high	ca 50 mg

# 均匀分布的填料

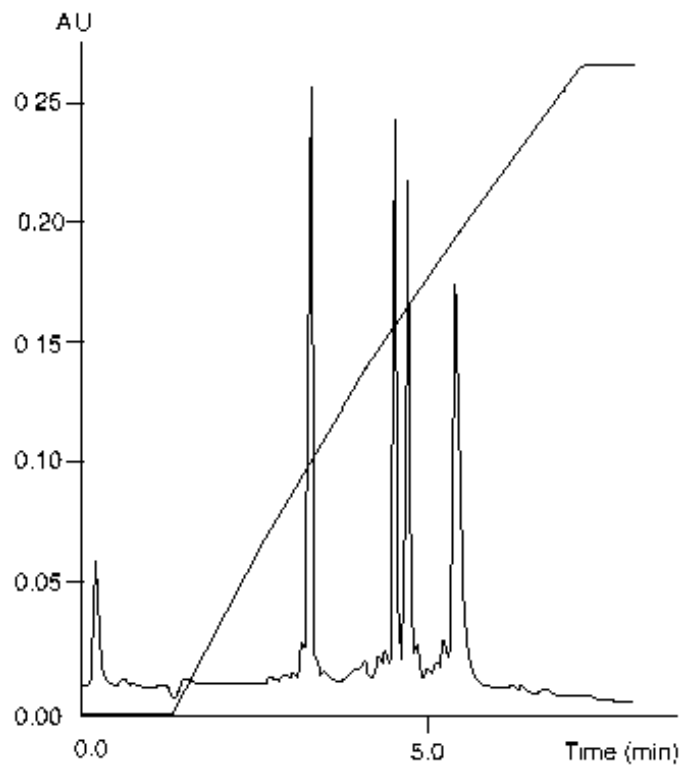
	介质	粒径大小	纯化策略
	MiniBeads™	3 μm	微量纯化
	MonoBeads™	10 μm	精细纯化
	SOURCE™ 15	15 μm	精细纯化
	SOURCE 30	30 μm	中度纯化

MiniBeads, MonoBeads, SOURCE 15 和 30 都是基于聚苯乙烯/二乙烯基苯的介质

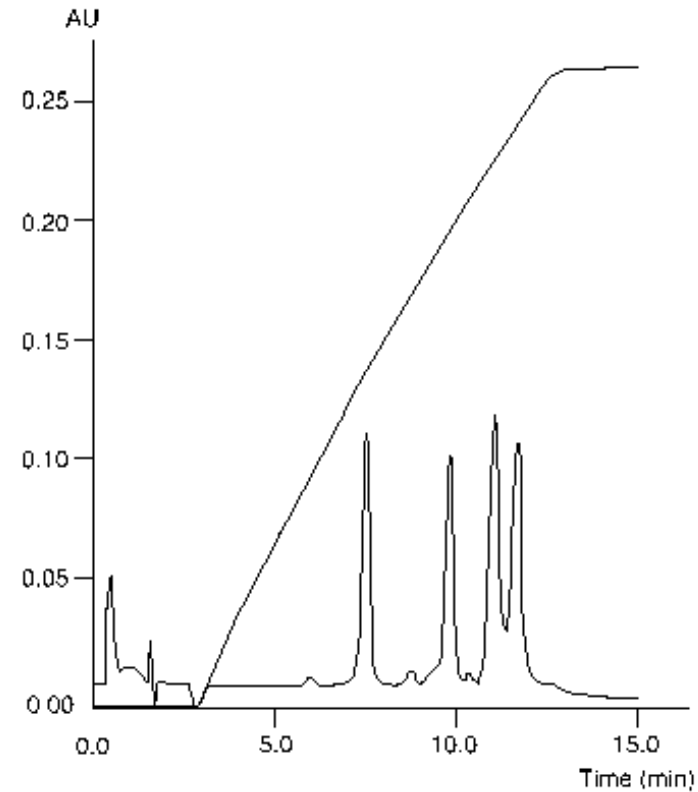


# 基架 - 粒径大小和分辨率

3  $\mu\text{m}$  Mini S<sup>TM</sup>



10  $\mu\text{m}$  Mono S<sup>TM</sup>



粒径越小，分辨率越高

# Sepharose™ 填料

- 高度交联的琼脂糖

- 6 % (HP, FF, XL)
- 4 % (4 FF)

- 粒径大小不同 (平均粒径):

- |                         |                                      |
|-------------------------|--------------------------------------|
| – High Performance (HP) | 34 $\mu\text{m}$                     |
| – Fast Flow (FF)        | 90 $\mu\text{m}$                     |
| – XL                    | 90 $\mu\text{m}$ (葡聚糖连在琼脂糖上)         |
| – Big Beads             | 100-300 $\mu\text{m}$ (bioprocess介质) |



# 配基：带电基团

## 阴离子交换剂

Diethylaminoethyl (DEAE)	$-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{H}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$	弱
Quaternary ammonium (Q)	$-\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	强

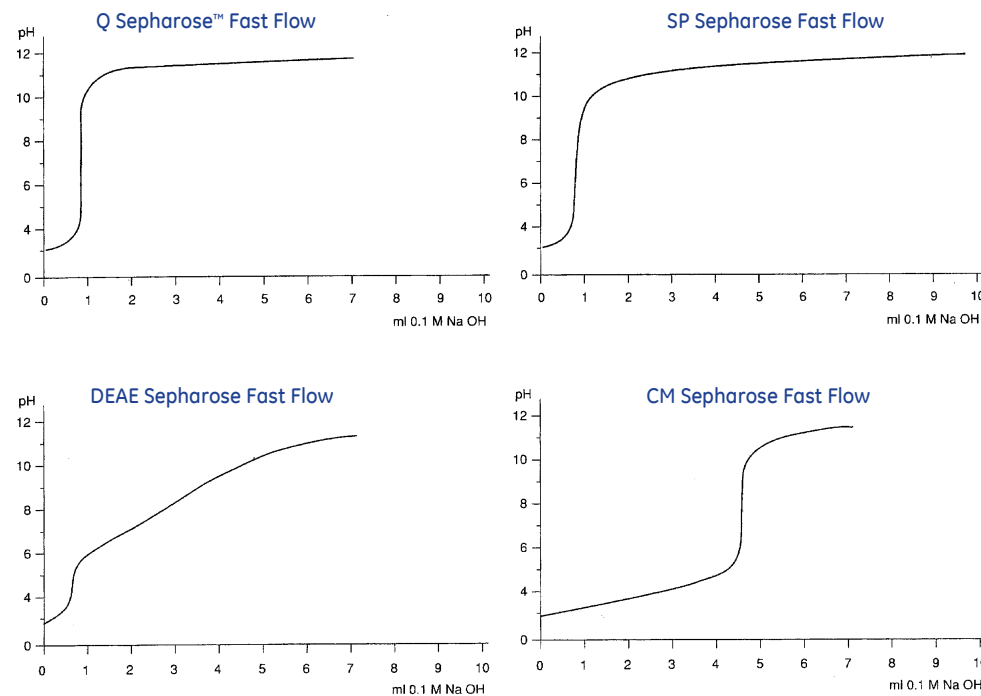
## 阳离子交换剂

Carboxymethyl (CM)	$-\text{OCH}_2\text{COO}^-$	弱
Sulphopropyl (SP)	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$	强
Methylsulphonate (S)	$-\text{CH}_2\text{SO}_3^-$	强



# 强和弱的离子交换剂

强离子交换剂: 载量在很宽的pH 范围内保持恒定



弱离子交换剂: 载量随 pH 而变化

# 强离子交换剂的优点

- 在很宽的pH范围内带电荷
- 在很宽的pH范围内带电荷几乎相同
- 平衡很快，也很容易平衡

考虑用弱离子交换剂：当强离子交换剂的选择性不满意时, 考虑用弱离子交换剂。但是需要注意弱离子交换剂的载量随着pH而变化.



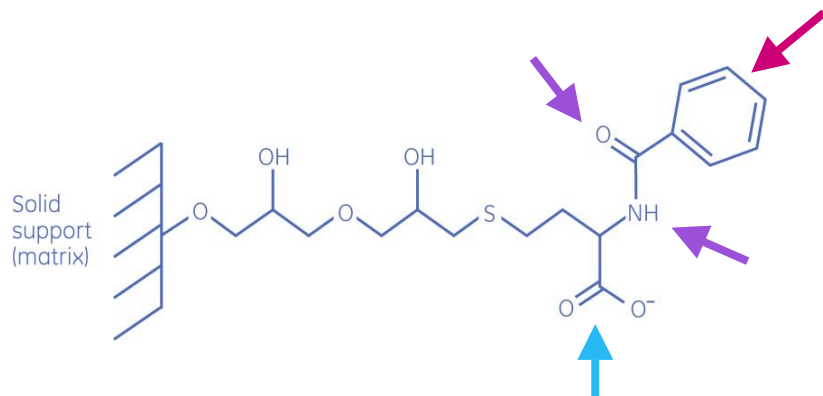
# 多模式配基

多种模式的相互作用

- 电荷相互作用
- 疏水相互作用
- 氢键

## MMC 配基

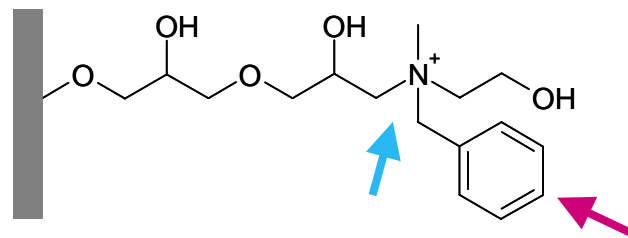
- 多模式
- 行为像弱阳离子交换剂
- 在高电导下结合



GE imagination at work

## •adhere 配基

- 多模式
- 行为像强阴离子交换剂



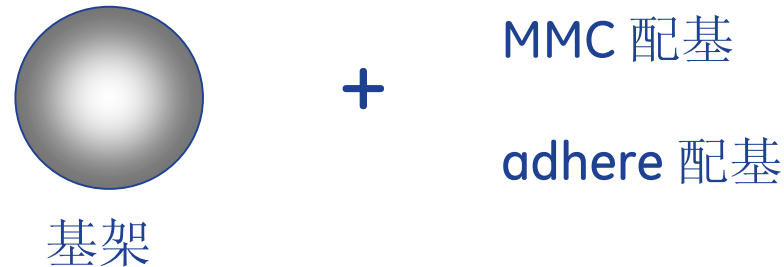
N-Benzyl-N-methylethanolamine  
N-苯甲基-N-甲基乙醇胺

# Capto™ 填料

## Capto Q, Capto S 和 Capto DEAE



## Capto MMC 和 Capto adhere



# 离子交换填料选择指南

	Form	Mean particle size
精细纯化	MiniBeads™	Polystyrene/divinyl benzene 3 µm
	MonoBeads™	Polystyrene/divinyl benzene 10 µm
	SOURCE 15	Polystyrene/divinyl benzene 15 µm
	SOURCE 30	Polystyrene/divinyl benzene 30 µm
	Sepharose High Performance	Agarose 6% 34 µm
捕获	Capto	highly cross-linked agarose with dextran surface extender 90 µm
	Sepharose Fast Flow	Agarose 6% 90 µm
	Sepharose 4 Fast Flow	Agarose 4% 90 µm
	Sepharose XL	Agarose 6% dextran chains coupled to agarose 90 µm
	Sepharose Big Beads	Agarose 6% 200 µm

中度纯化

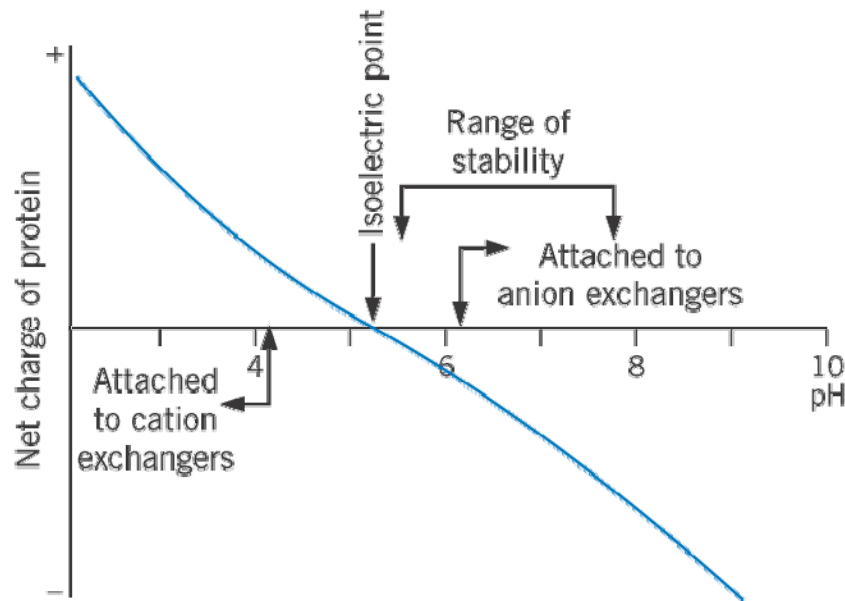


GE imaging



# 选择合适的离子交换剂

因为像蛋白质这样的分子净电荷和pH有关，所以是基于离子交换剂的类型和确保样品稳定所需的pH进行选择。



如何选择合适的离子交换填料？

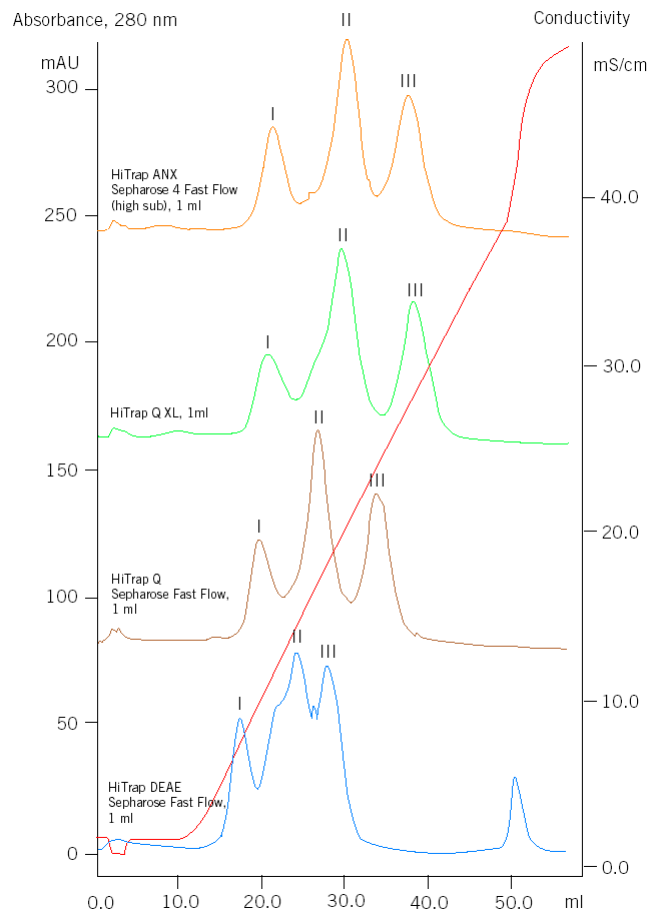
从强离子交换剂开始 (Q,S,SP)

- 可以在宽pH范围开展工作
- 如果目标蛋白的等电点低于 pH 7.0 或未知，用强阴离子交换剂
- 如果强离子交换剂不满意，可以考虑弱离子交换剂



GE imagination at work

# 筛选合适的离子交换剂



## Sample:

0.4 mg conalbumin  $pI=6.3$ , 0.8 mg  $\alpha$ -lactoglobulin  $pI=5.8$ , 1.2 mg soya bean trypsin inhibitor  $pI=4.5$  dissolved in 2 ml start buffer.

## Columns:

HiTrap™ DEAE FF 1 ml  
HiTrap Q FF 1 ml  
HiTrap Q XL 1 ml  
HiTrap ANX FF high sub 1 ml

## Start buffer:

20 mM Tris-HCl pH 7.4

## Elution buffer:

20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl pH 7.4

## Flow rate:

1 ml/min 150 cm/h

## Running parameters

### equilibration:

20 ml start buffer

### sample application:

2 ml

### wash:

5 ml start buffer elution 40 ml, linear gradient, 0–80 % elution buffer

## Instrumentation:

ÄKTAexplorer™ 100 controlled by UNICORN™ 3.0



HiTrap IEX selection Kit

# 选择哪种离子交换剂？

## IEX 筛选试剂盒:

HiTrap™ IEX Selection Kit

HiTrap Capto™ IEX Selection Kit

HiScreen™ IEX columns

IEX media selection kit



## 实验室规模的起始条件:

捕获 → HiPrep™ 16/10 Q & SP FF/XL

中度纯化 → HiLoad™ 16/10 Q & SP HP

精细纯化 → Mono Q™, Mini Q™ & Mono™ and Mini S™



GE imagination at work

# 正确的条件

- pH
- 添加剂
- 洗脱方式
- 流速



# 选择缓冲系统

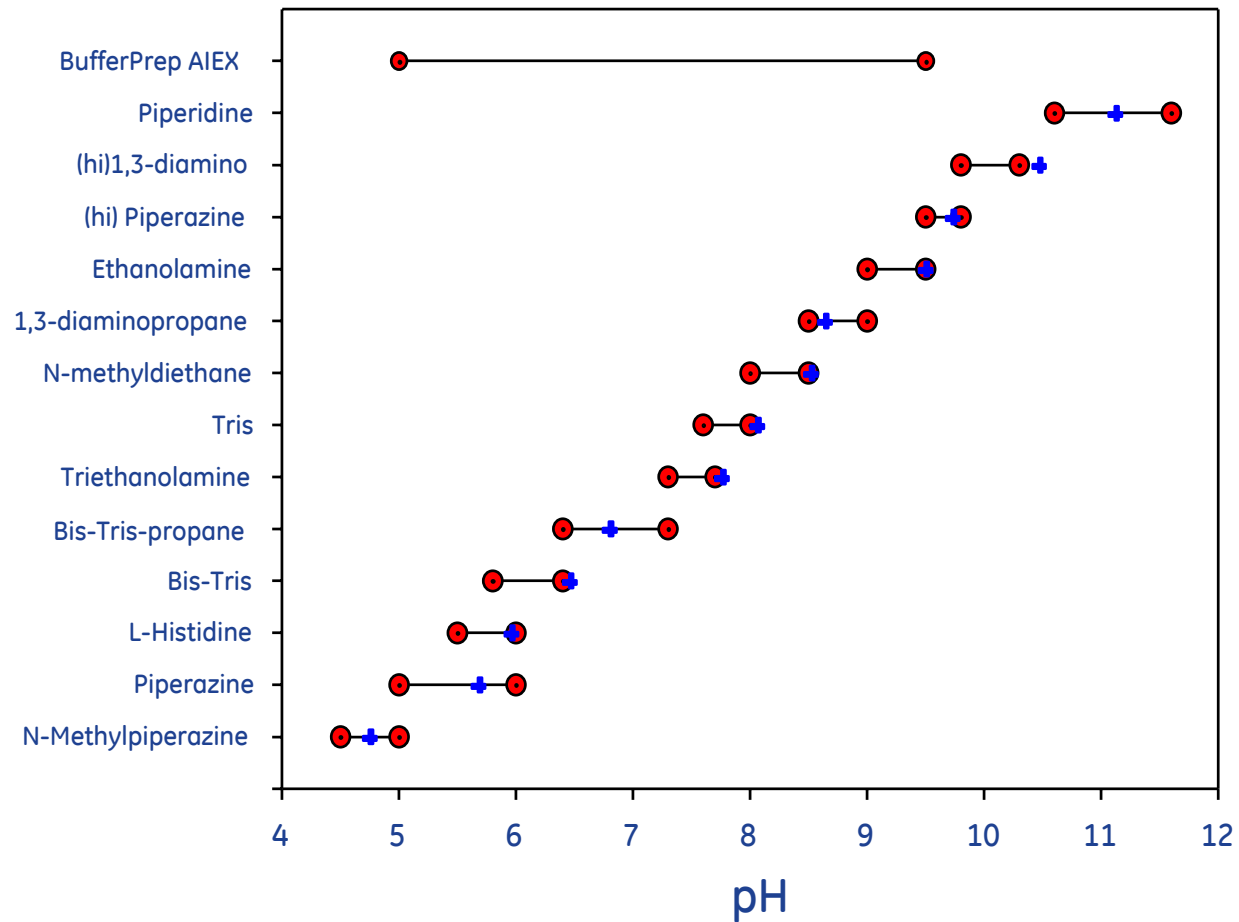
## 阴离子交换

- 阳离子型缓冲体系, pH 略高于目标蛋白结合的 pH
- 增加pH 可以提高结合的力度

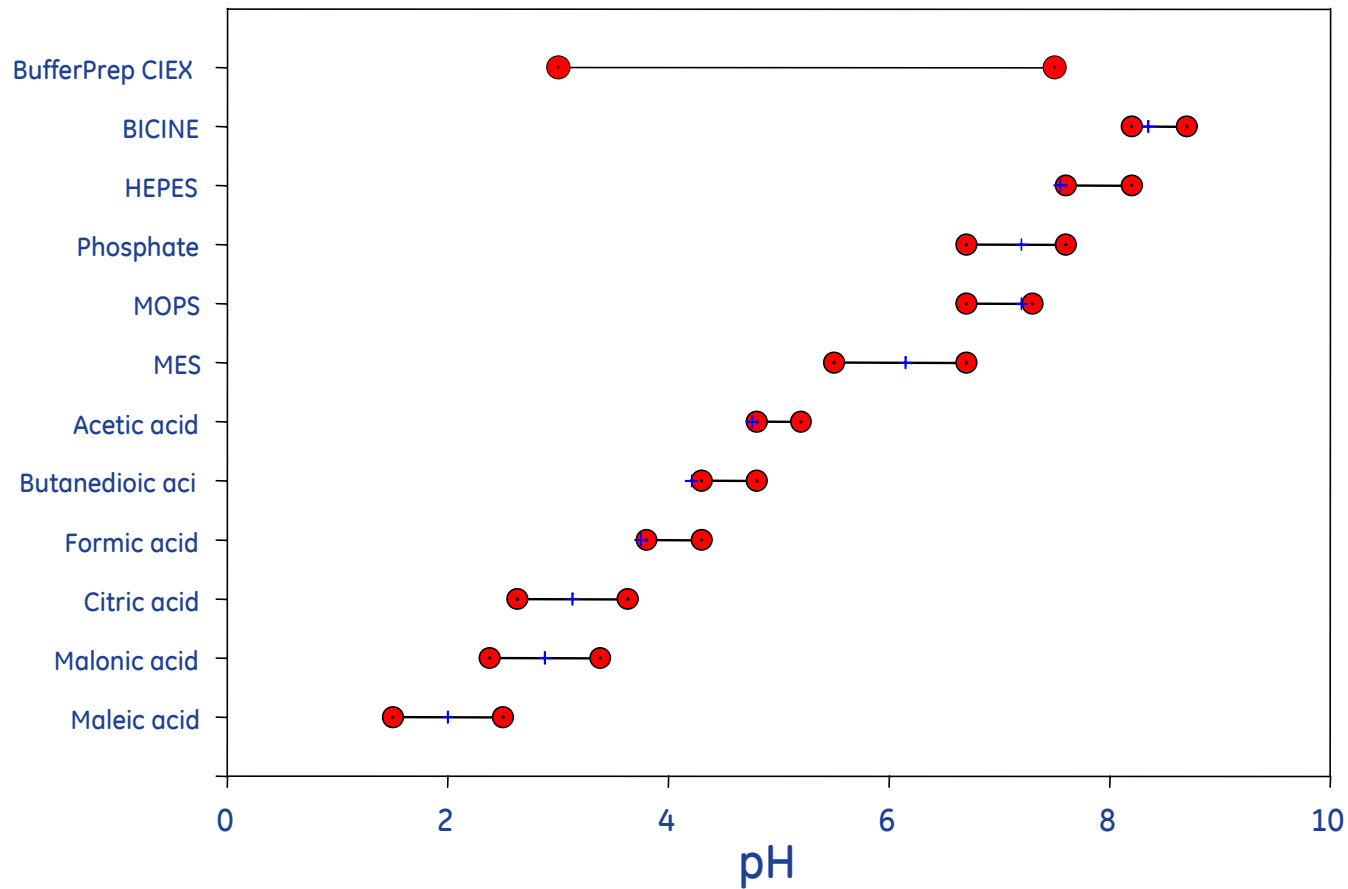
## 阳离子交换

- 阴离子型缓冲体系, pH略低于目标蛋白结合的 pH
- 降低pH可以提高结合的力度

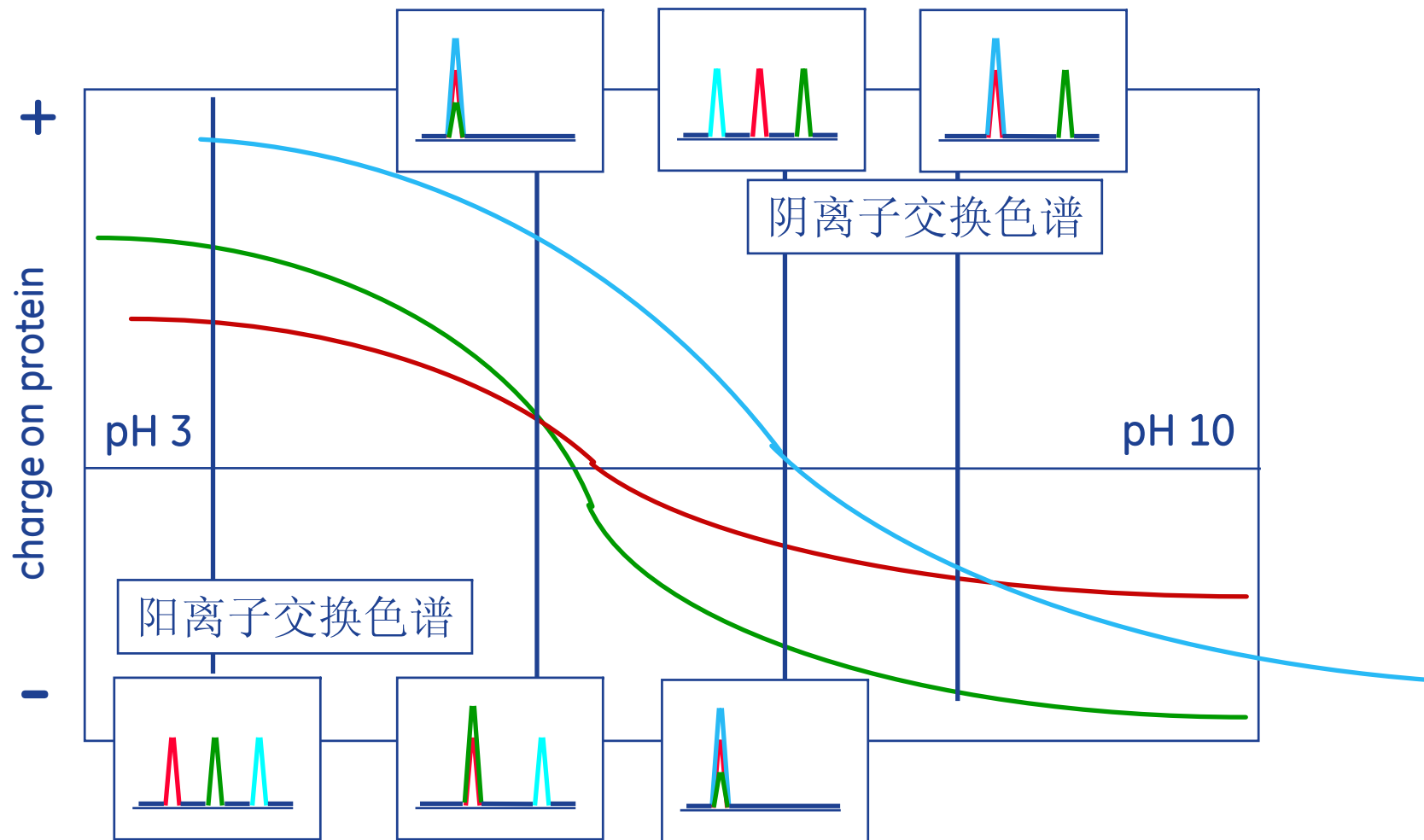
# 阴离子交换的缓冲体系



# 阳离子交换的缓冲体系



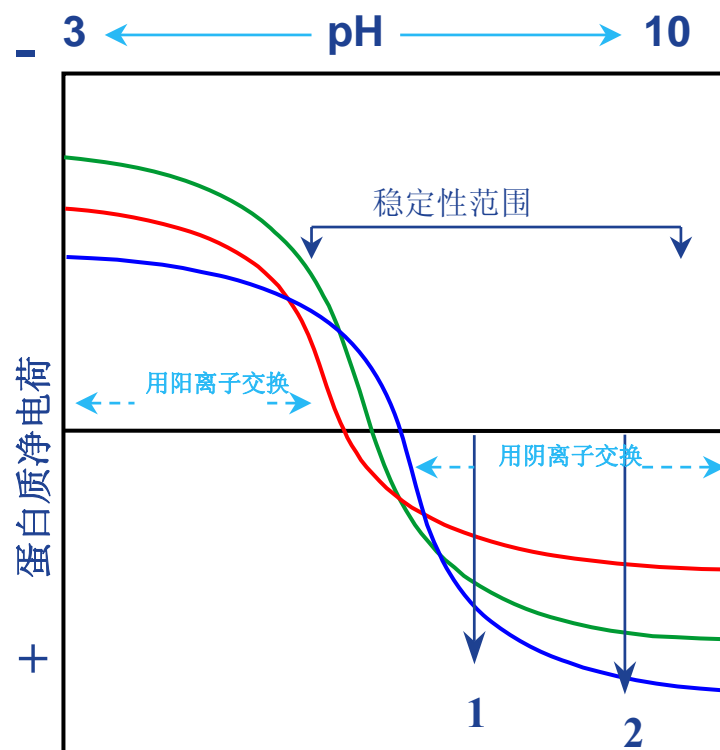
# 通过pH来控制选择性



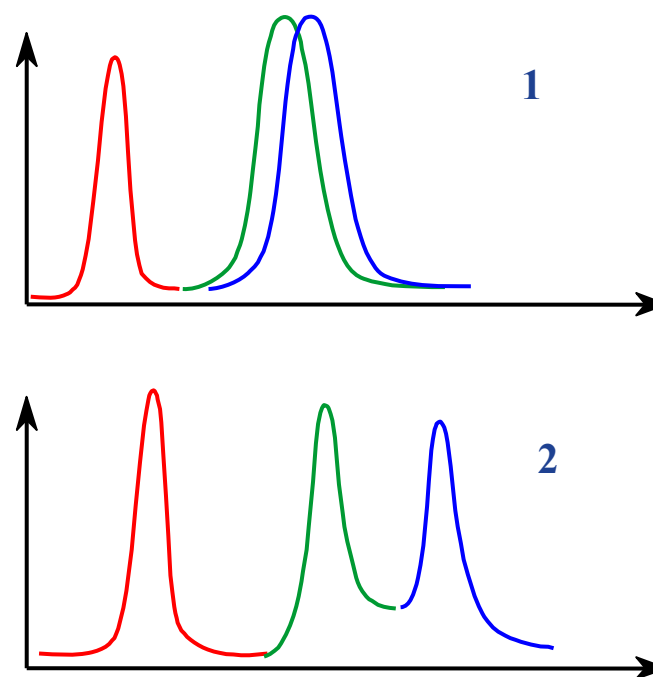


# 用滴定曲线来确定初始的pH

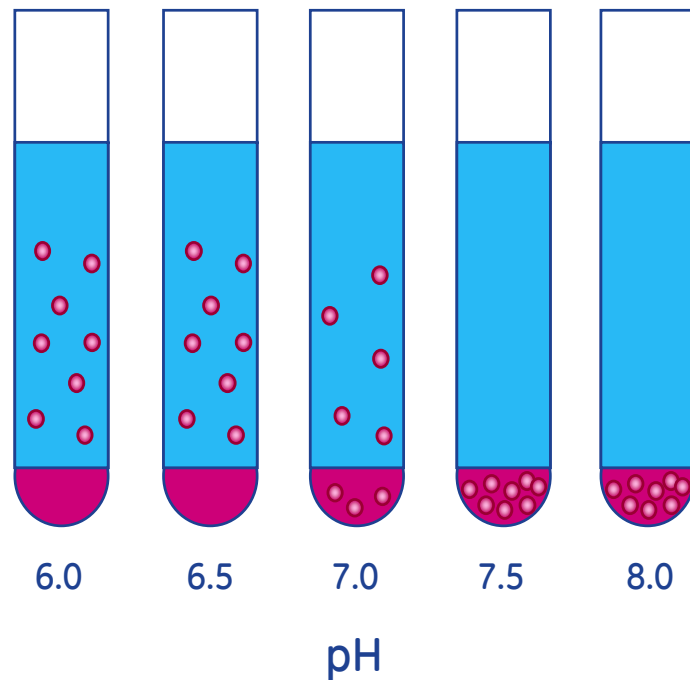
滴定曲线



不同 pH 下的分离情况



# 用试管测试法来确定初始的pH

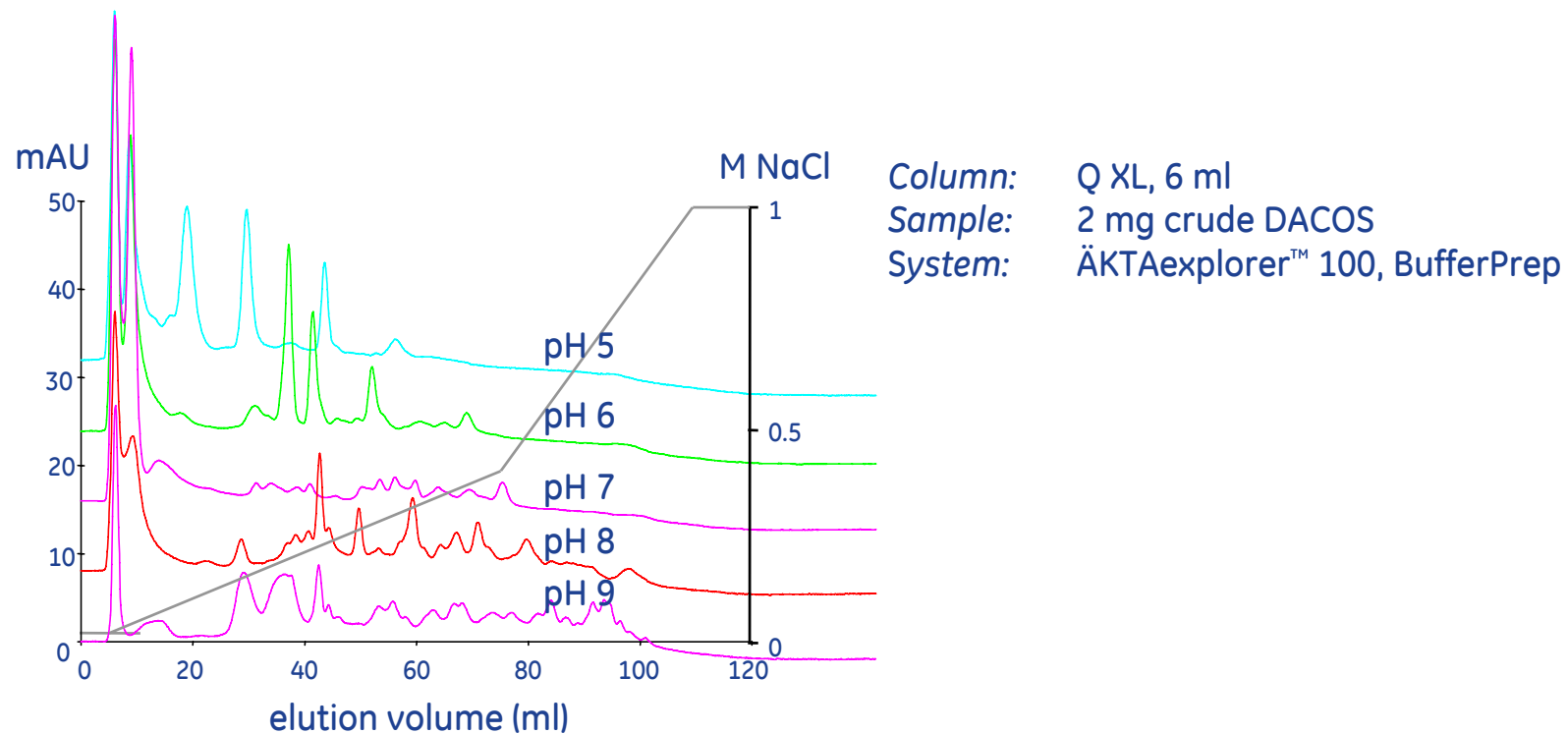


1. 放 1 ml 离子交换填料到几个试管中
  2. 分别添加不同pH的缓冲液
  3. 加样, 混合
  4. 分析上清看是否有目标蛋白
- 这里在pH 7.5 以上结合完全

结论:  
阴离子交换填料, 初始 pH 7.5

# 通过scouting方法来确定初始的pH

如下例pH scouting 用于分离 DACOS

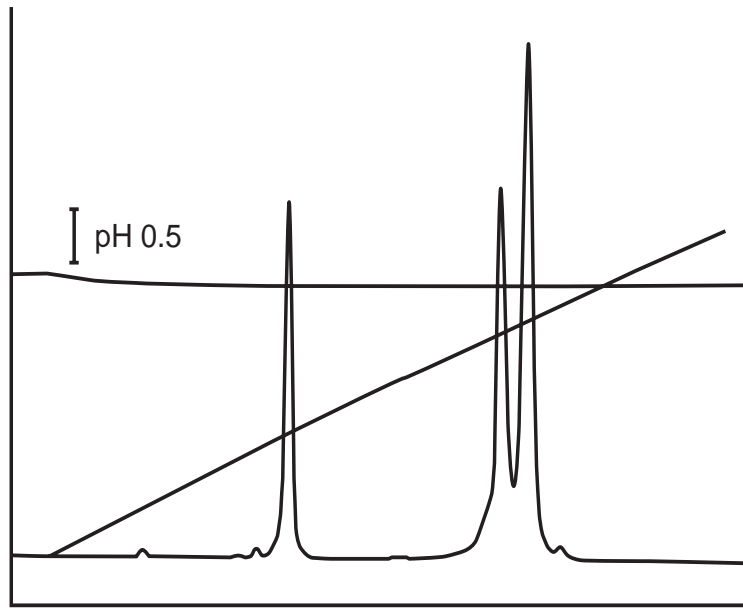


# 选择缓冲液需要注意的问题

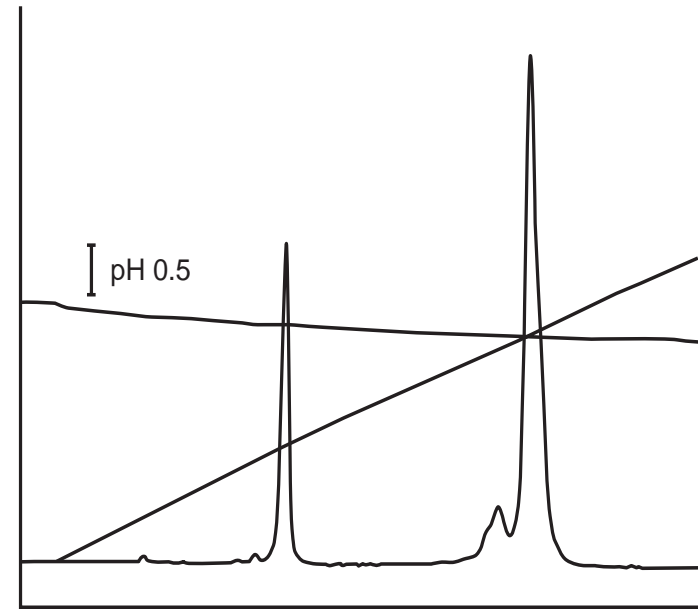
- 用和离子交换填料带有同样电荷的缓冲液
  - 用相同的离子来调节缓冲液的pH
  - 在添加盐后再调节 pH
  - 在工作温度下调节pH
  - 在运行中监测 pH 和电导
- 空白运行!



# 采用不同的方式来配置“相同”的缓冲液



- A. Citrate 20 mM, pH 4.9
- B. Citrate 20 mM, NaCl 1 M, pH 4.9



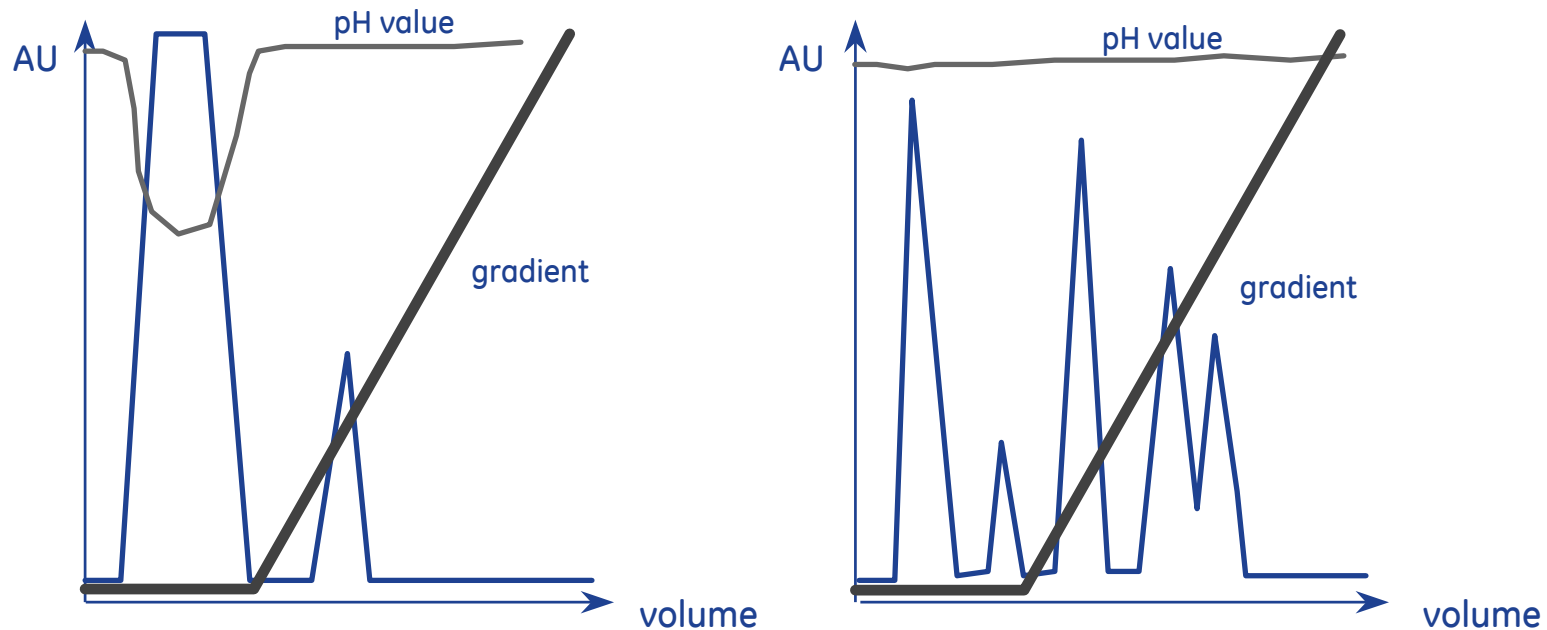
- A. Citrate 20 mM, pH 4.9
- B. A + NaCl 1 M

# 其它一些缓冲液技巧

- 20–50 mM 缓冲液浓度往往是足够的
- 工作缓冲液的pH远离缓冲液的 pKa 值不要超过0.5个单位
- 为了保证缓冲液的pH, 溶解样品到起始缓冲液中, 尤其是对于大体积的样品



# pH 值和缓冲能力



1. 为了保证缓冲液的pH, 样品应该溶解到起始缓冲液中, 尤其是对于大体积的样品更加关键
2. 缓冲液的离子浓度应该在20-50mM

# 如果缓冲液离子和离子交换剂结合



当  $A^-$  和离子交换剂结合，平衡被打破，pH 改变，缓冲能力丢失。



# 如果缓冲离子结合

你必须使用这样的缓冲液:

- 确保缓冲液浓度足够高
- 确保层析柱已平衡好，并用缓冲离子饱和
- 用缓冲液浓度梯度洗脱

# 洗脱添加剂

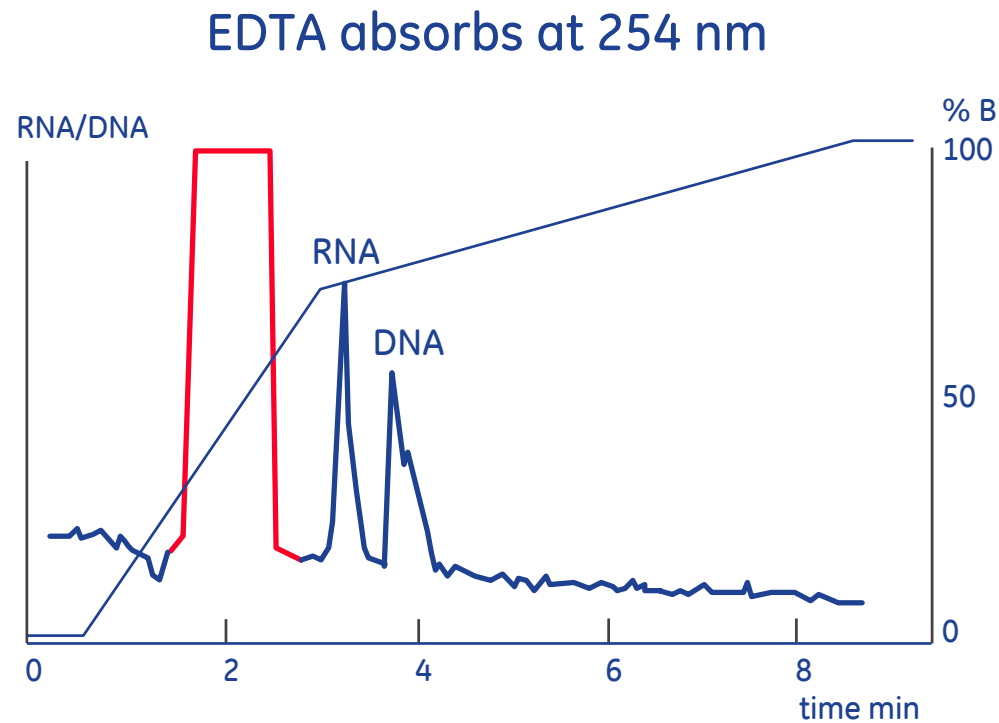
不带电荷的中性添加剂通常是可行的！

用法:

- 阴离子交换填料采用带正电荷的添加剂
- 阳离子交换填料采用带负电荷的添加剂

# 添加剂和潜在的问题

## EDTA 在阴离子交换层析中的累积和洗脱



# 添加剂和潜在的问题

## 去垢剂结合在层析柱上

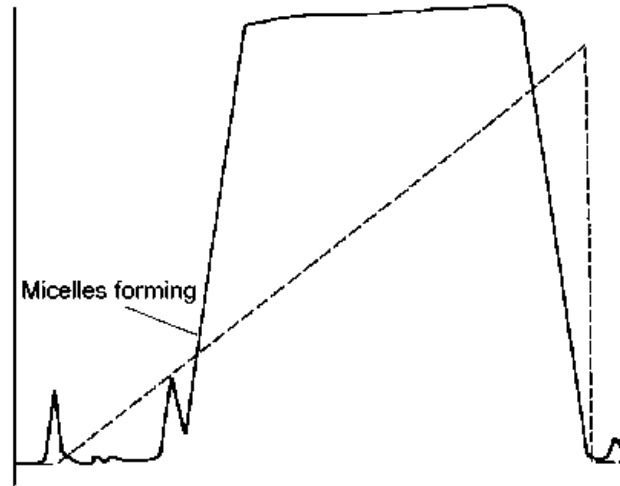
- 阴离子去垢剂如 **SDS** 会结合在阴离子交换剂上
- 阳离子去垢剂如 **CPC** 会结合在阳离子交换剂上

试图去除它们是浪费时间，所以确保用正确的方式使用去垢剂。

# 添加剂和潜在的问题

去垢剂在盐梯度中达到临界胶束浓度 **CMC**

超过临界胶束浓度 **CMC**, 去垢剂形成胶束导致紫外检测出问题。



# 一些需要注意的问题

- 检查样品分子的溶解性和稳定性
- 有机溶剂会增加缓冲液的 $pK_a$
- 观察当在缓冲液中添加了甘油和其他醇类物质后粘度和反压会增加
- 采用去污剂后，最好先运行空白



# 洗脱方法

等度	↔	不常用
步级梯度	↔	用在捕获步骤中很好
线性梯度	↔	标准方法
适合的梯度	↔	节省时间、改善结果
pH梯度	↔	很少用
盐梯度	↔	标准方法
pH 和梯度	↔	can be tricky!



# 盐梯度

注意不同盐的浓度具有相同的洗脱能力:

- Sulphate ( $\text{SO}_4^{-2}$ )      150 mM
- Chloride ( $\text{Cl}^{-1}$ )      350 mM
- Acetate ( $\text{CH}_3\text{COO}^{-1}$ )   700 mM

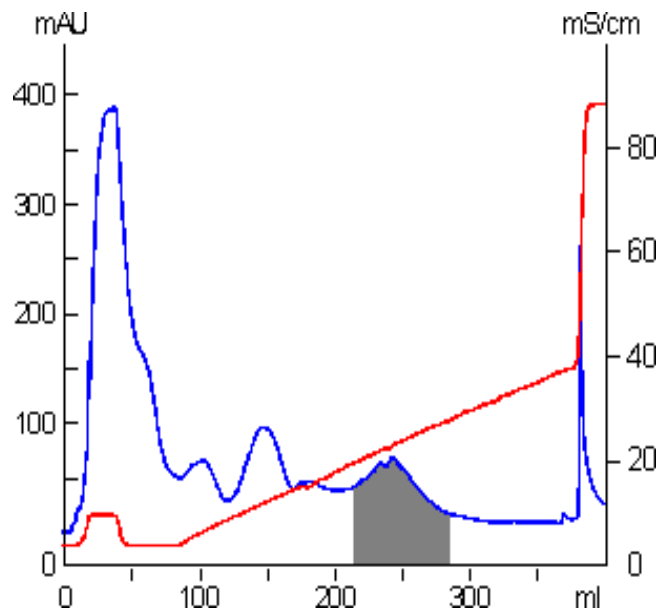
大多数情况下，改变了洗脱盐，由于洗脱强度的不同需要改变洗脱的斜率



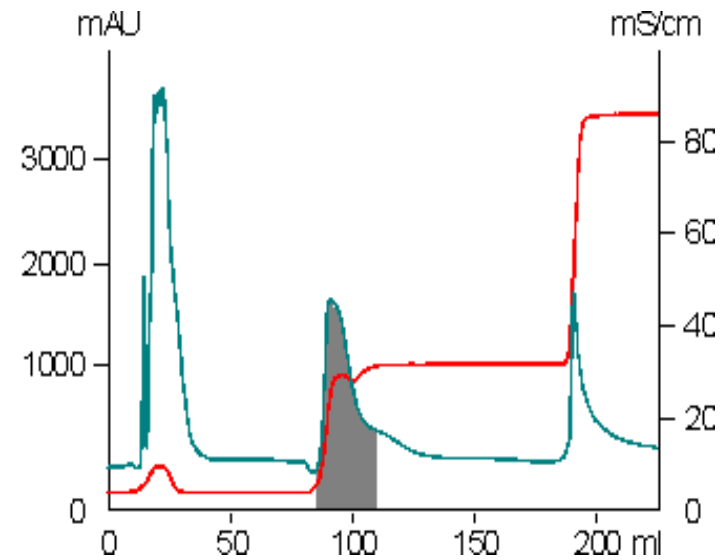


# 在捕获中改变洗脱方法

linear gradient, starting point

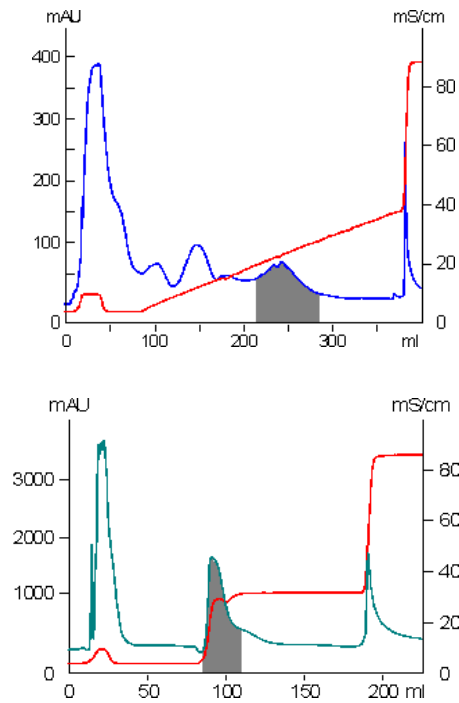


optimised step elution

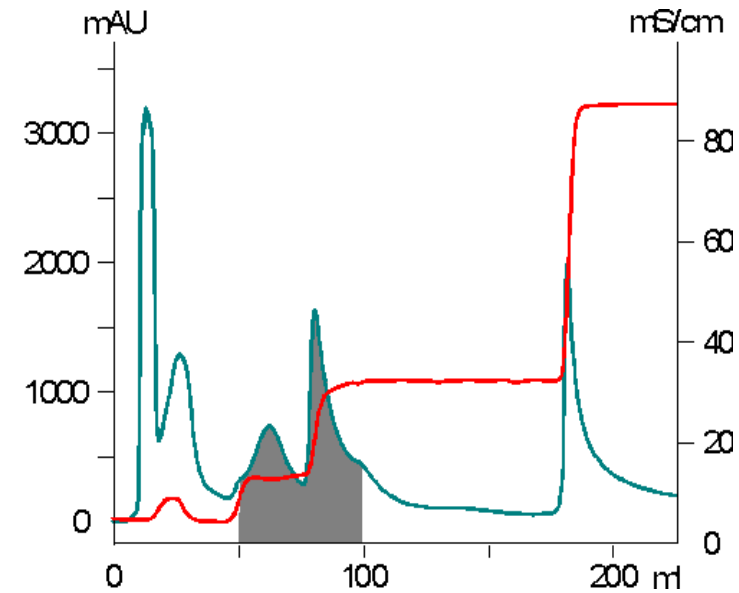


HiPrep™ 16/10 Q XL: rec DAOCS, *E. coli*

# 步级梯度



gradient step splits a single peak

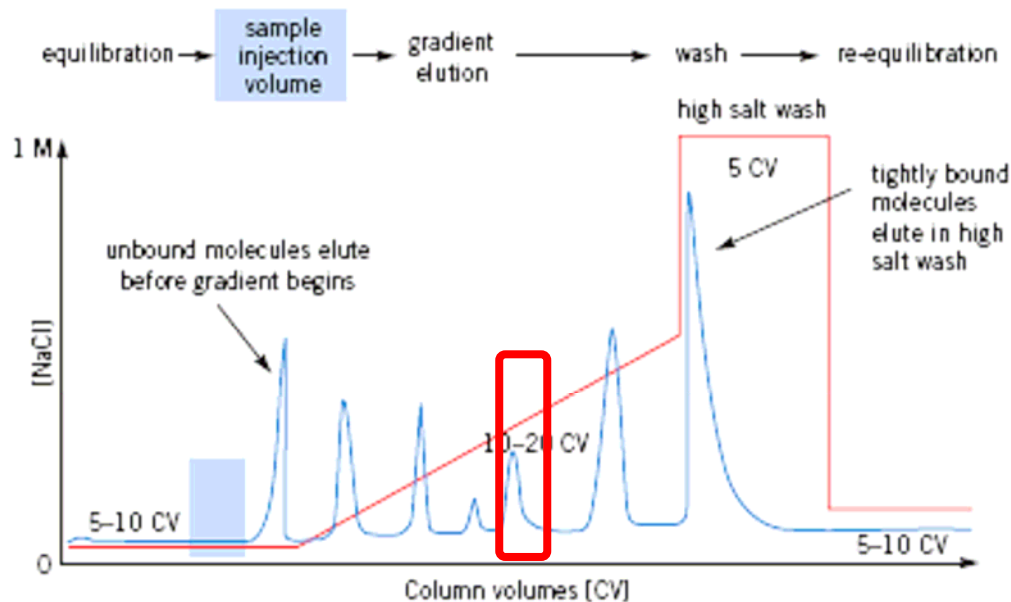


HiPrep™ 16/10 Q XL: rec DAOCS, *E. coli*



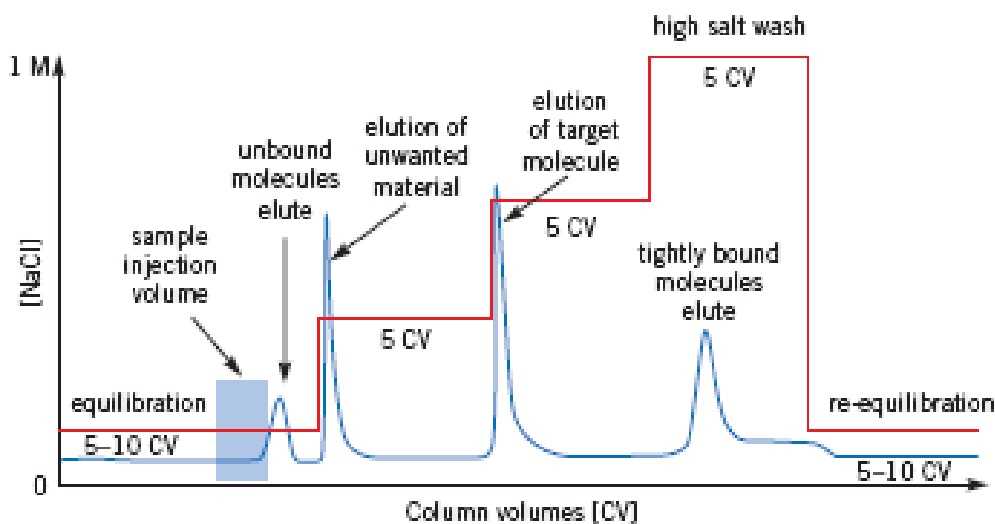
GE imagination at work

# 线性和步级梯度



线性梯度——预实验

Fig. 10a. Typical high resolution IEX separation using linear gradient elution (25–45 column volumes).



优化的步级梯度洗脱

Fig. 10b. Typical IEX separation using step elution (25–30 column volumes).

# pH 梯度洗脱

在阴离子交换中降低 pH

- 滴定蛋白上的羧基  $\text{COO}^-$

阳离子交换中增加 pH

- 滴定蛋白上的氨基  $\text{NH}_3^+$



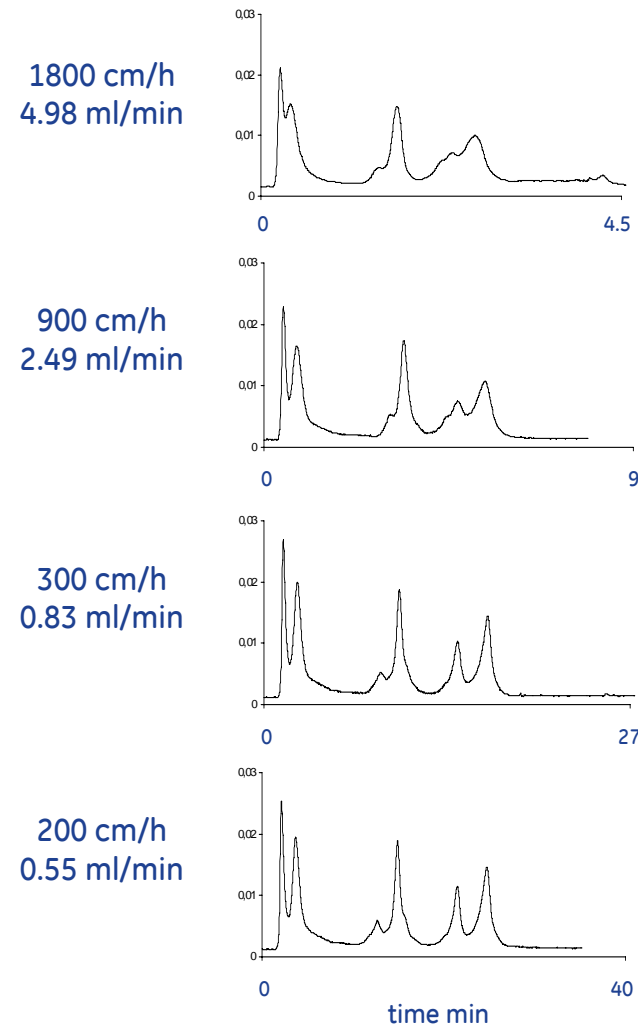
# 流速的优化

高流速:

- 高的样品通量
- 高的生产能力

低的流速:

- 好的柱效



# 样品制备

- 过滤和离心来去除颗粒，防止堵塞层析柱
- 在脱盐柱上进行缓冲液置换用于调整缓冲液的pH和盐浓度
- 如果缓冲液的pH和盐浓度调整好了，大体积的样品可以直接上样



# 再平衡

## 洗脱后

- 用 **1 M salt** 去除结合比较紧的物质。然后用**5个柱体积**的缓冲液进行再平衡

## 柱子的清洗

- 大多数好的离子交换填料可以用 **1 M NaOH** 清洗—取出大部分的杂质!
- 用水再进行清洗
- 中性去污剂和酶以可以用来进行清洗杂质， 但接下来去除他们有一些困难



# 内容

- 介绍
- 机理和原理
- 纯化过程中的实际问题
- 应用
- 总结



imagination at work



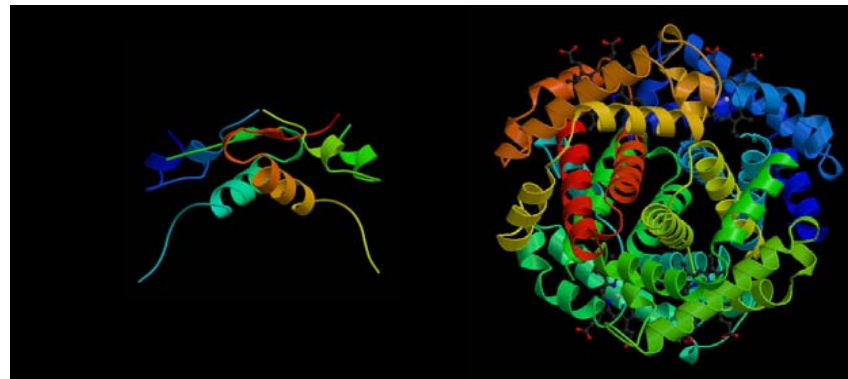
# 什么时候使用离子交换层析技术？

- 在纯化的所有的步骤和所有规模

- ✓ 捕获
- ✓ 中度纯化
- ✓ 精细纯化

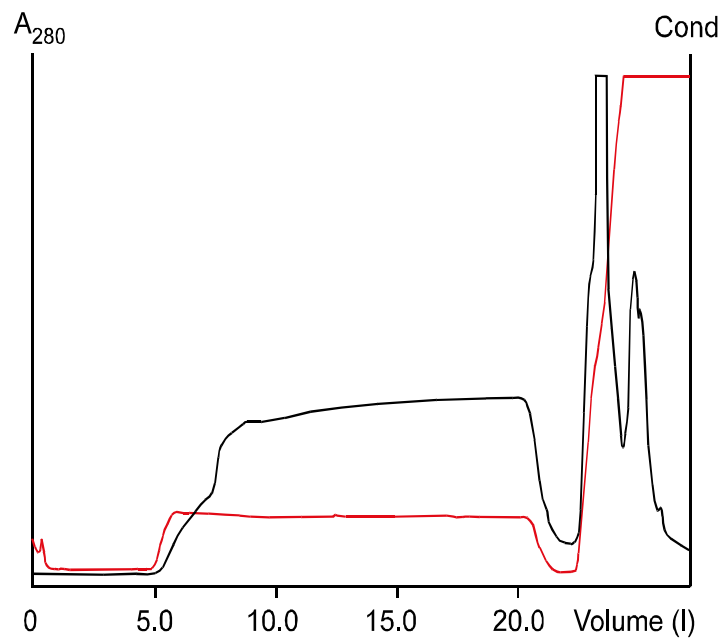


- 针对所有类型的目标分子

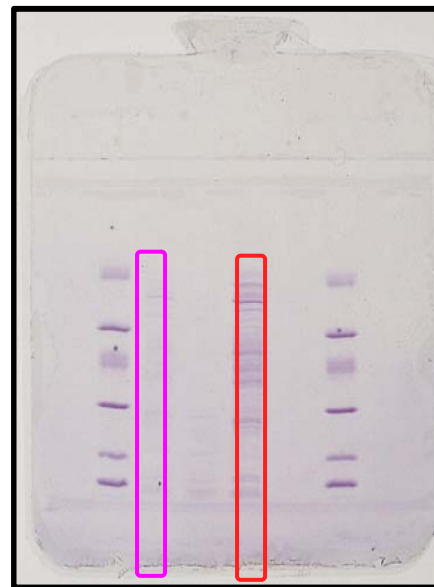


# 捕获

直接从澄清得料液中捕获目的产品并进行有效的纯化



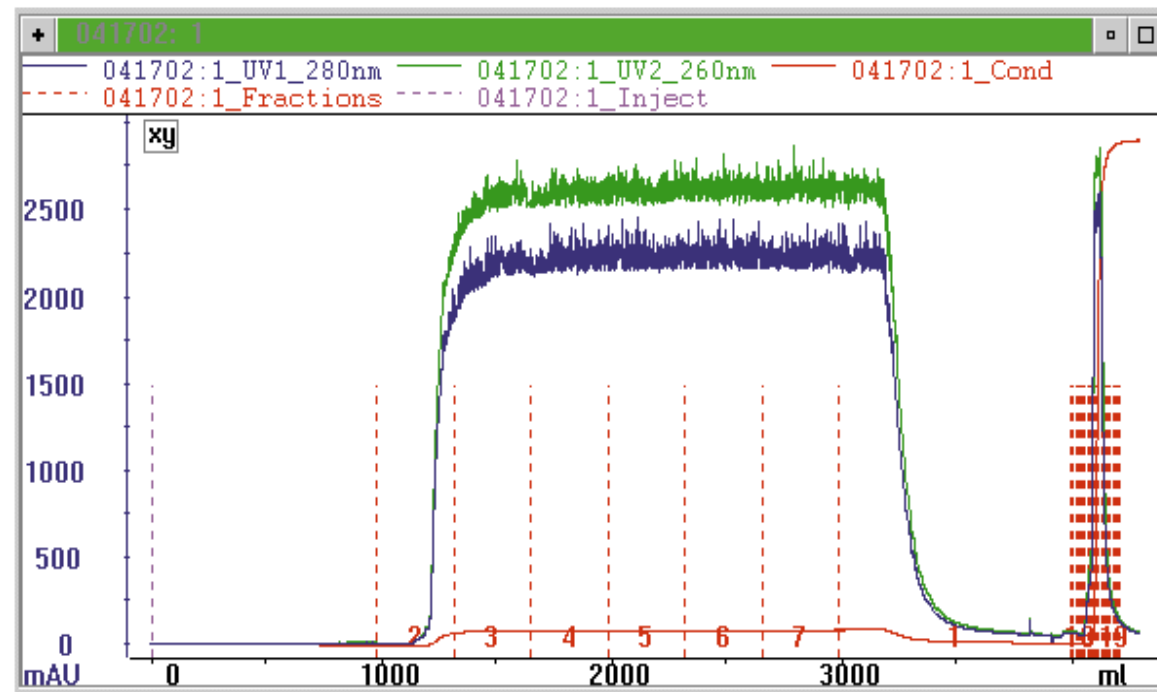
Q Sepharose™ XL: rec  $\alpha$ -amylase, *E. coli*



- lane 1. -
- lane 2. LMW markers
- lane 3. starting material
- lane 4. flow through
- lane 5. 1st peak  
containing  $\alpha$ -amylase
- lane 6. 2nd peak
- lane 7. LMW markers

1 2 3 4 5 6 7

# 浓缩



STREAMLINE™ DEAE: rec α-amylase, *E. coli*

# 中度纯化

Column: SOURCE 30Q, FineLINE 100 (375 ml)

Sample: 部分纯化的重组 *P.aeruginosa* exotoxin A,  
用水 1:3 稀释

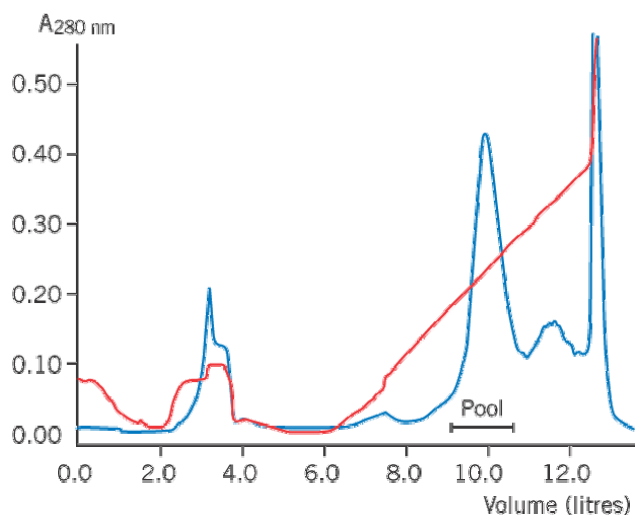
Sample: 1.8 g total protein ( 0.29 g exotoxin A) in 1.5 l

Start buffer: 20 mM sodium phosphate, pH 7.4

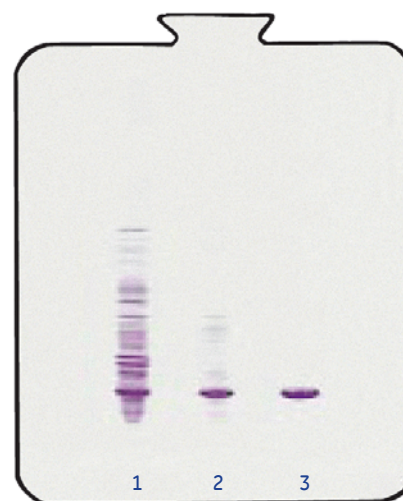
Elution buffer: 20 mM sodium phosphate, 1 M NaCl, pH 7.4

Flow: 785 ml/min (600 cm/h)

Gradient: 0–50% elution buffer in 20 CV



Intermediate purification of recombinant *P. aeruginosa* exotoxin A on SOURCE 30Q.



## Native PAGE results, Phast System, Coomassie staining

Lane 1. Pool from step 2 on Phenyl Sepharose

Fast Flow (high sub)

Lane 2. Pool from step 3 on SOURCE 30Q

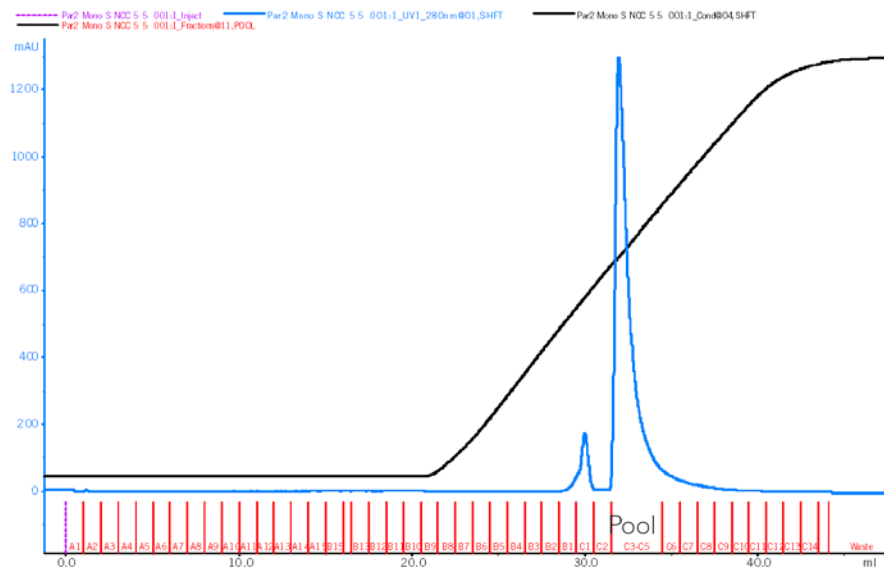
Lane 3. Pool from step 4 on SOURCE 15PHE



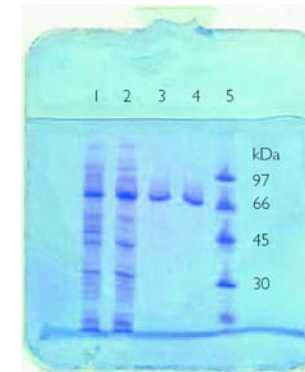
GE imagination at work

# 精细纯化

**Column:** Mono S™ 5/50 GL  
**Sample:** 14.5 ml partially purified transposase TniA  
**Binding buffer A:** 20 mM MES pH 6.5, 1 mM EDTA, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT  
**Elution buffer B:** 20 mM MES pH 6.5, 1 mM EDTA, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 1 M NaCl  
**Flow rate:** 1 ml/min  
**Gradient:** 0 – 100% Buffer B, 20 CV  
**System:** ÄKTAexplorer™ 100



PhastGel™ Homogenous 12.5  
 Coomassie™ stained



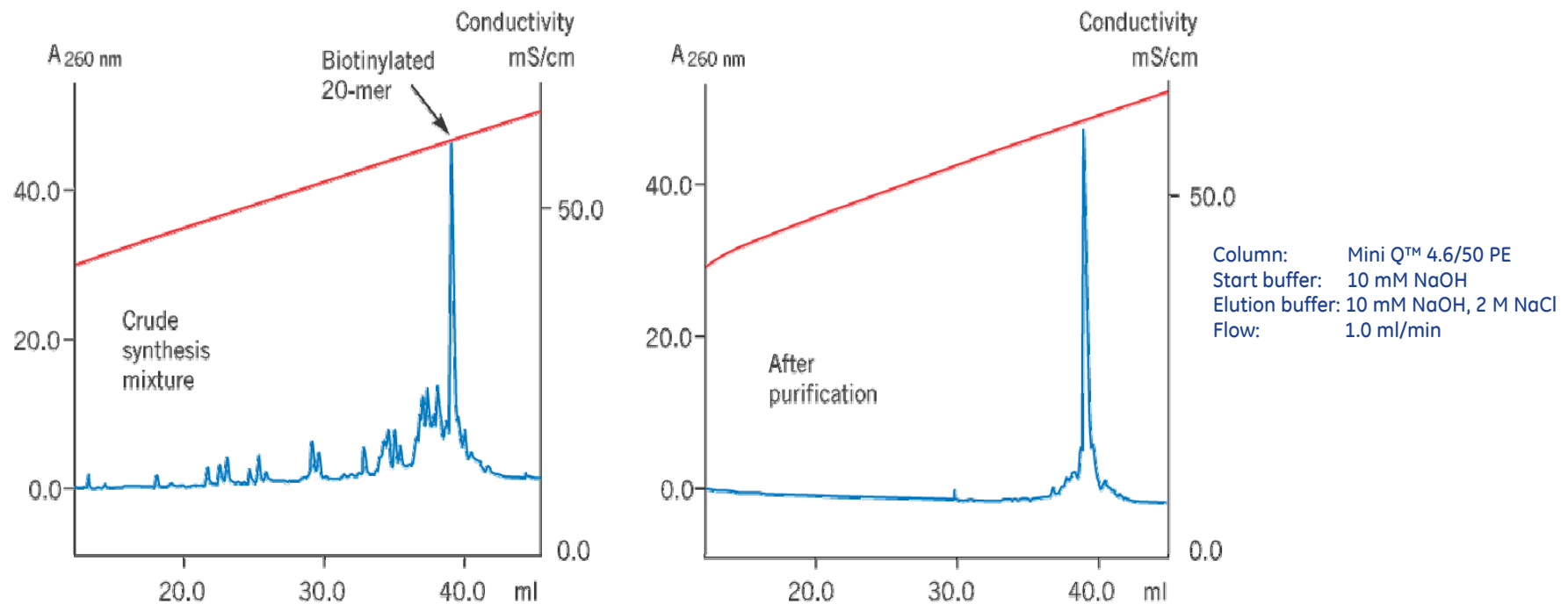
- lane 1. Clarified sonicate supernatant diluted 5X
- lane 2. Pooled fractions from step 1  
SOURCE™ 15Q 4.6/100 PE
- lane 3. Pooled fractions from step 2  
HiTrap™ Heparin, 5 ml
- lane 4. Pooled fractions from step 3  
Mono S 5/50 GL
- lane 5. LMW – SDS Marker Kit

High-resolution cation exchange CIEC chromatography on Mono S 5/50 GL Tricorn™



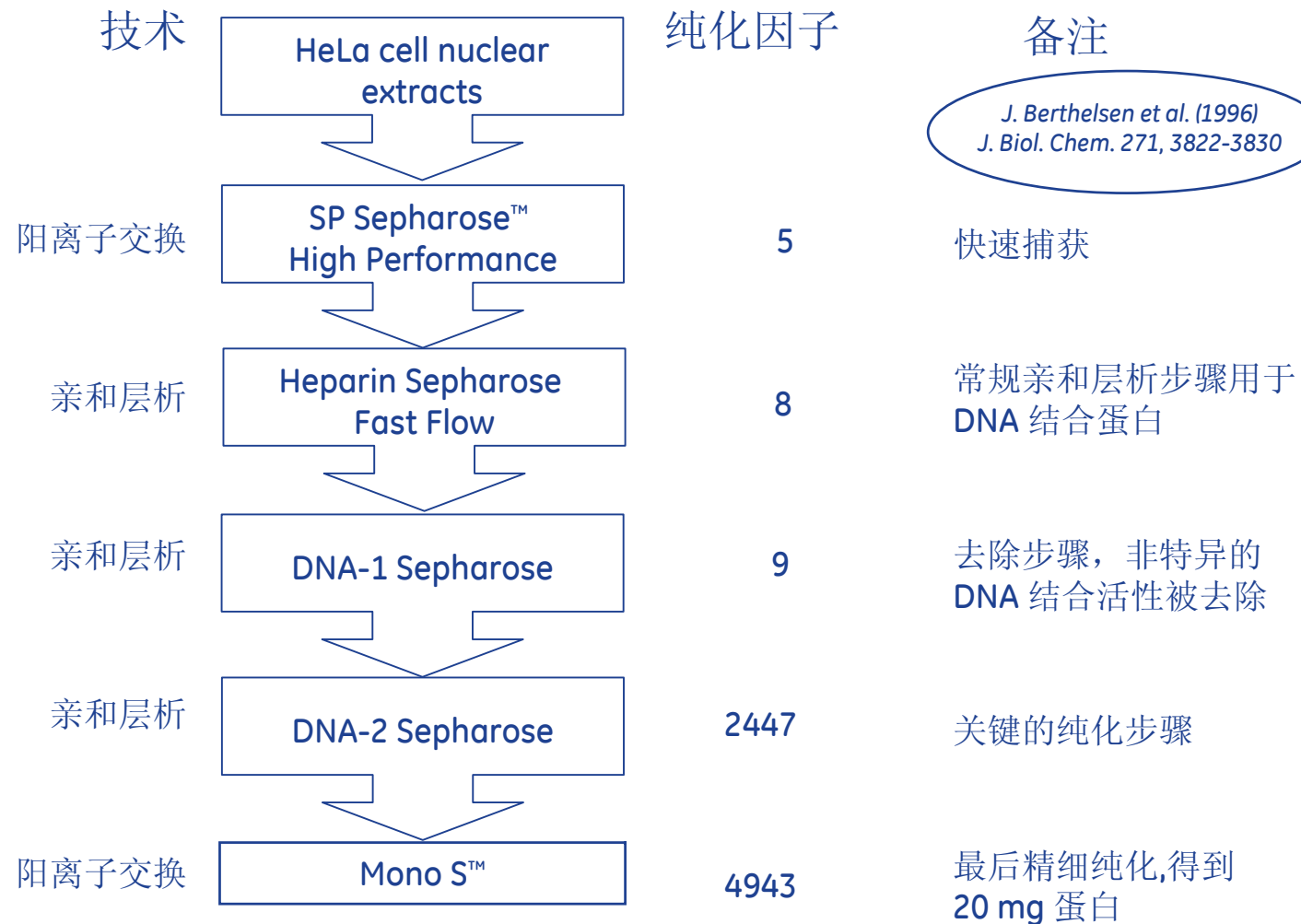
GE imagination at work

# 纯度检测

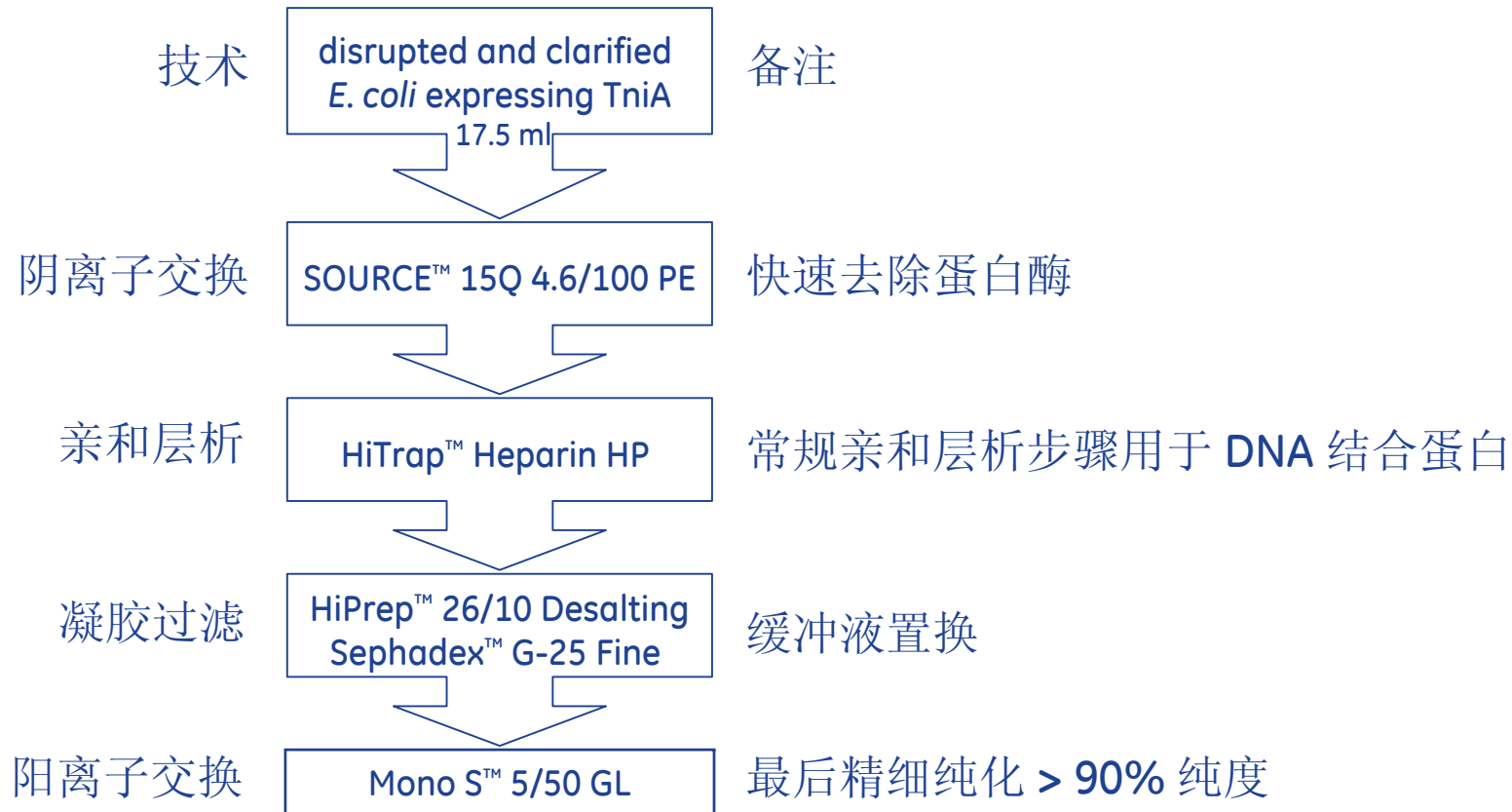


在Mini Q 4.6/50 PE上检测合成的5'-生物素化20个碱基的寡核苷酸用RESOURCE™ RPC柱纯化前后的纯度。

# DNA 结合蛋白的纯化

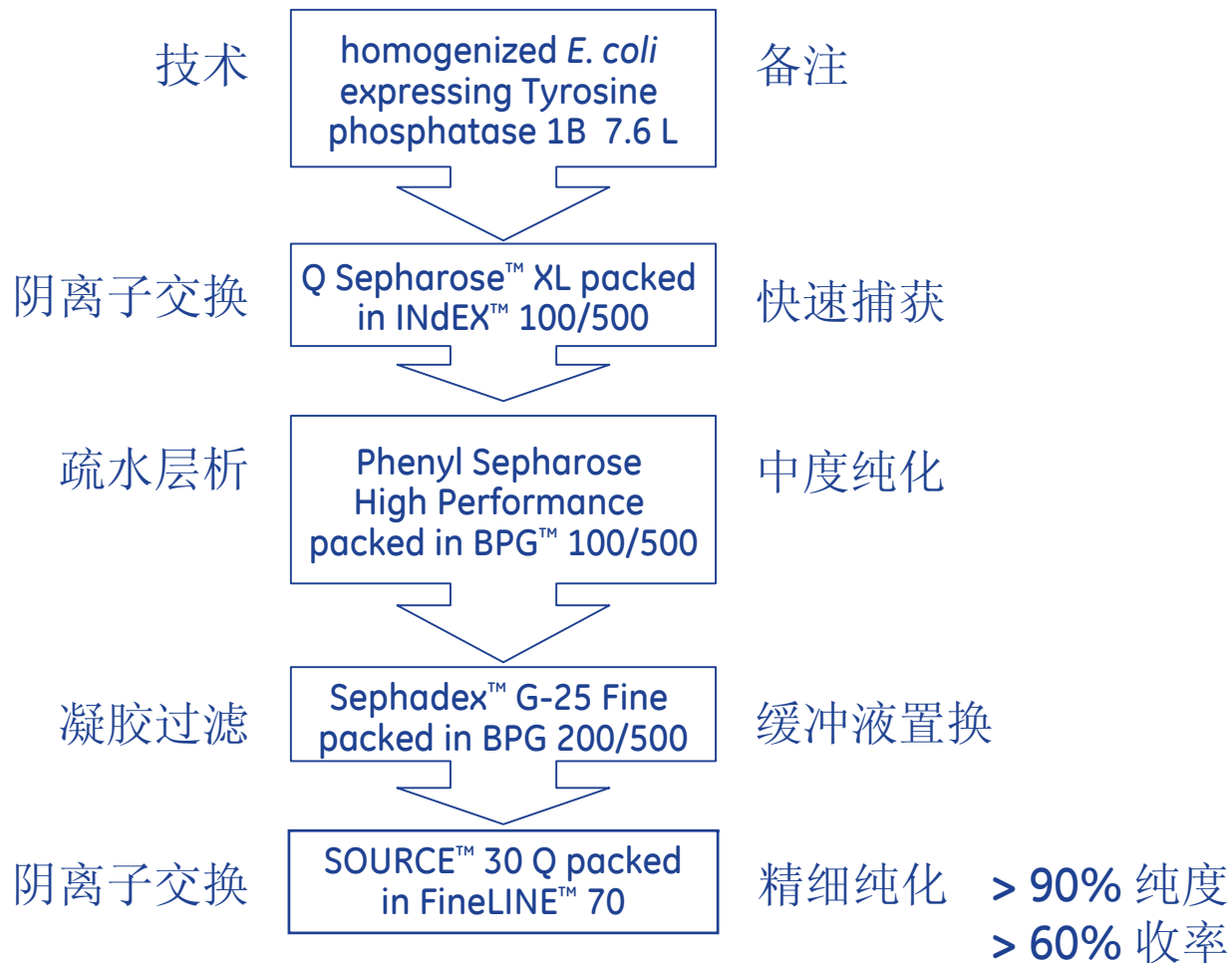


# 实验室规模纯化碱性 DNA-结合蛋白



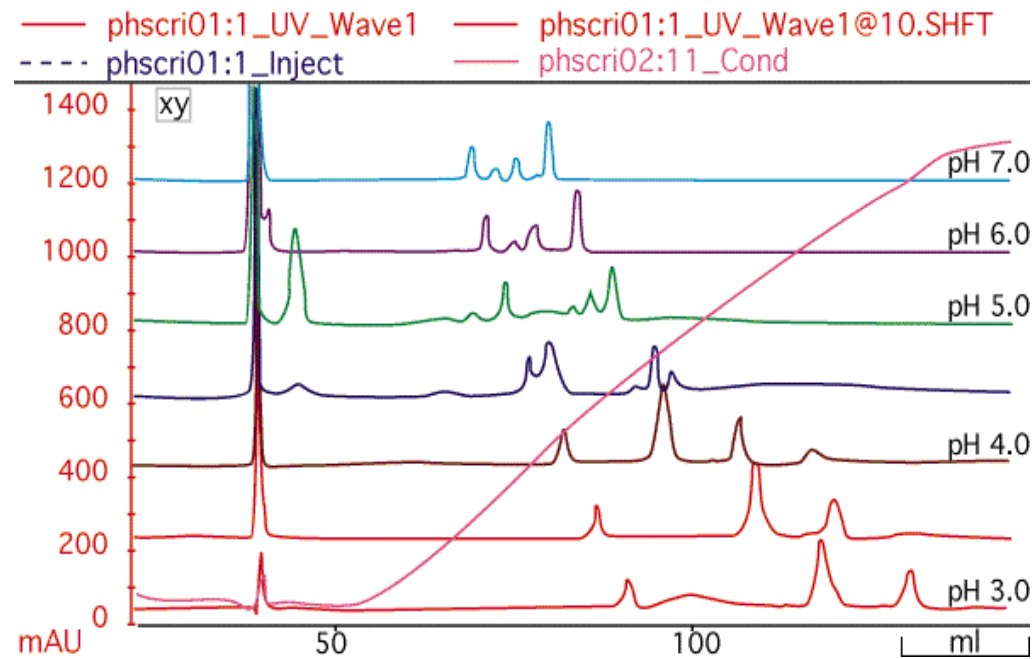


# 在中试规模纯化重组蛋白



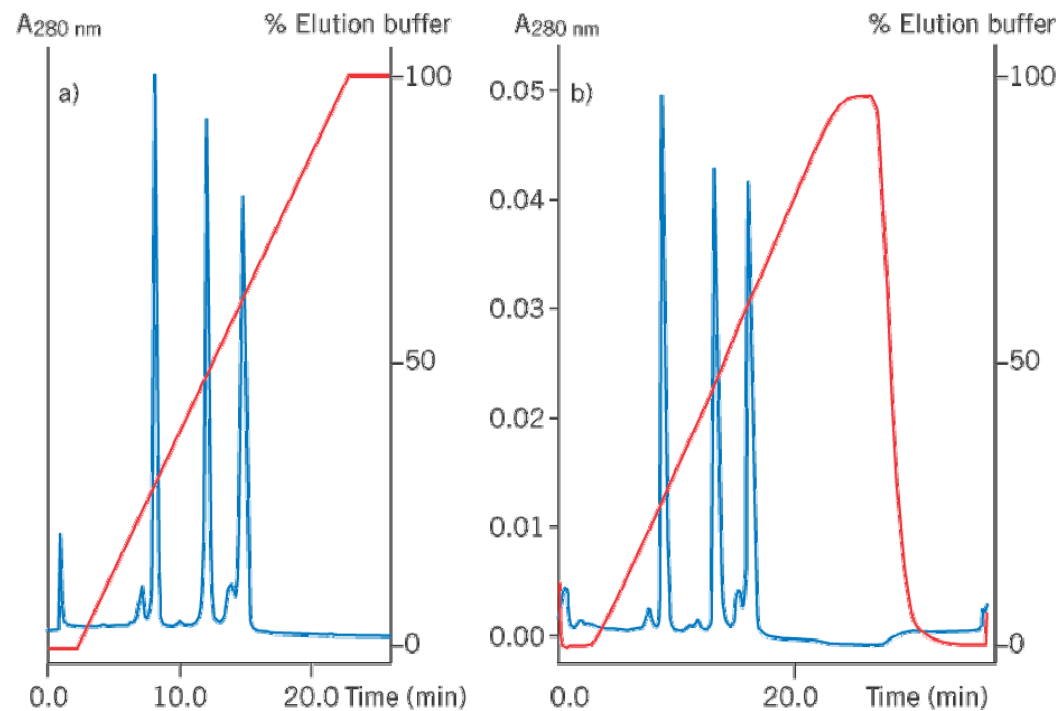
# 可控的分离

结果可以进一步优化不同的参数



Effect of pH on fractionation of model proteins

# 放大: 分辨率不变



Separation of proteins scaled up from a 2,2 ml column to a 390 ml column

Column: a) SOURCE 15S, 2.2 ml  
b) SOURCE 15S, FineLINE 100, 390 ml  
Sample: ribonuclease, cytochrome C and lysozyme  
Sample load: a) 0.46 mg in 200  $\mu$ l  
b) 80.5 mg in 350 ml  
Start buffer: 20 mM sodium phosphate, pH 6.8  
Elution buffer: 20 mM sodium phosphate, 0.4 M NaCl, pH 6.8  
Flow: a) 2.2 ml/min (300 cm/h)  
b) 385 ml/min (300 cm/h)  
Gradient: 0% elution buffer (2 CV)

# 内容

- 介绍
- 机理和原理
- 纯化过程中的实际问题
- 应用
- 总结



imagination at work

# 总结

- 可以用在纯化的各个规模和各个阶段
- 可控性
- 高的选择性
- 高的载量
- 浓缩效应
- 高的回收率



# 谢谢

Please visit:

[www.gehealthcare.com/protein-purification](http://www.gehealthcare.com/protein-purification)



imagination at work