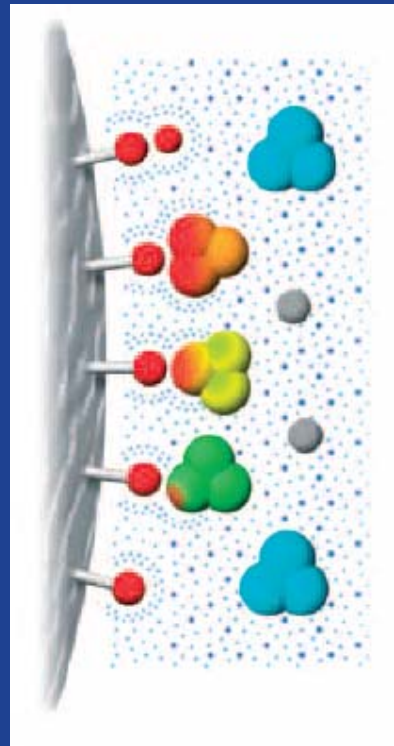


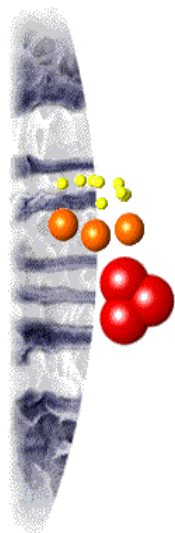
疏水相互作用层析技术

Hydrophobic Interaction Chromatography

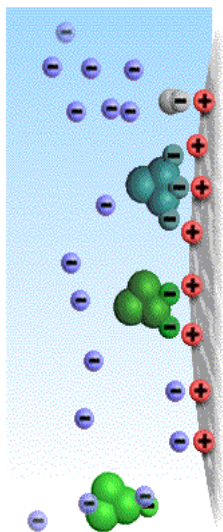


imagination at work

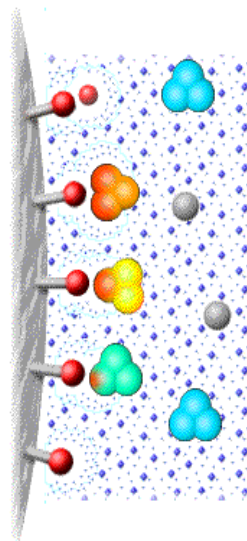
层析技术



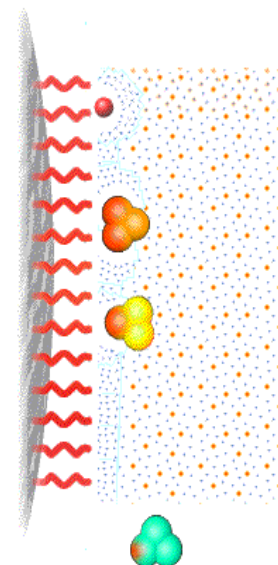
凝胶过滤



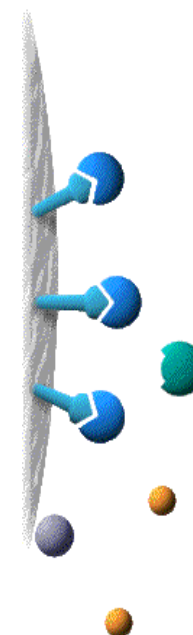
离子交换



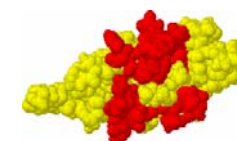
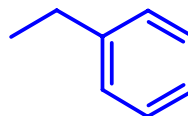
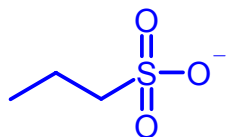
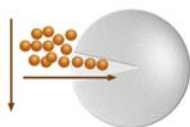
疏水层析



反相层析



亲和层析



GE imagination at work

内容

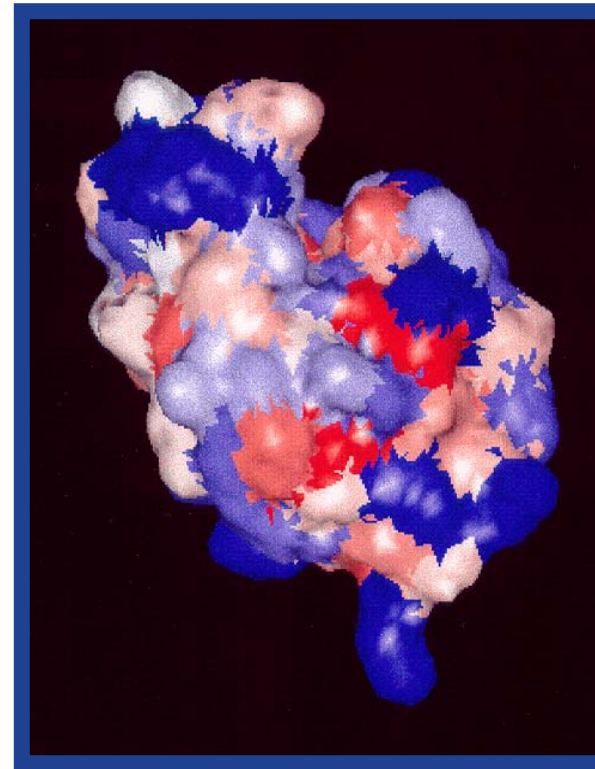
- 介绍
- 机理和原理
- 纯化过程中的实际问题—优化
- 应用
- 总结



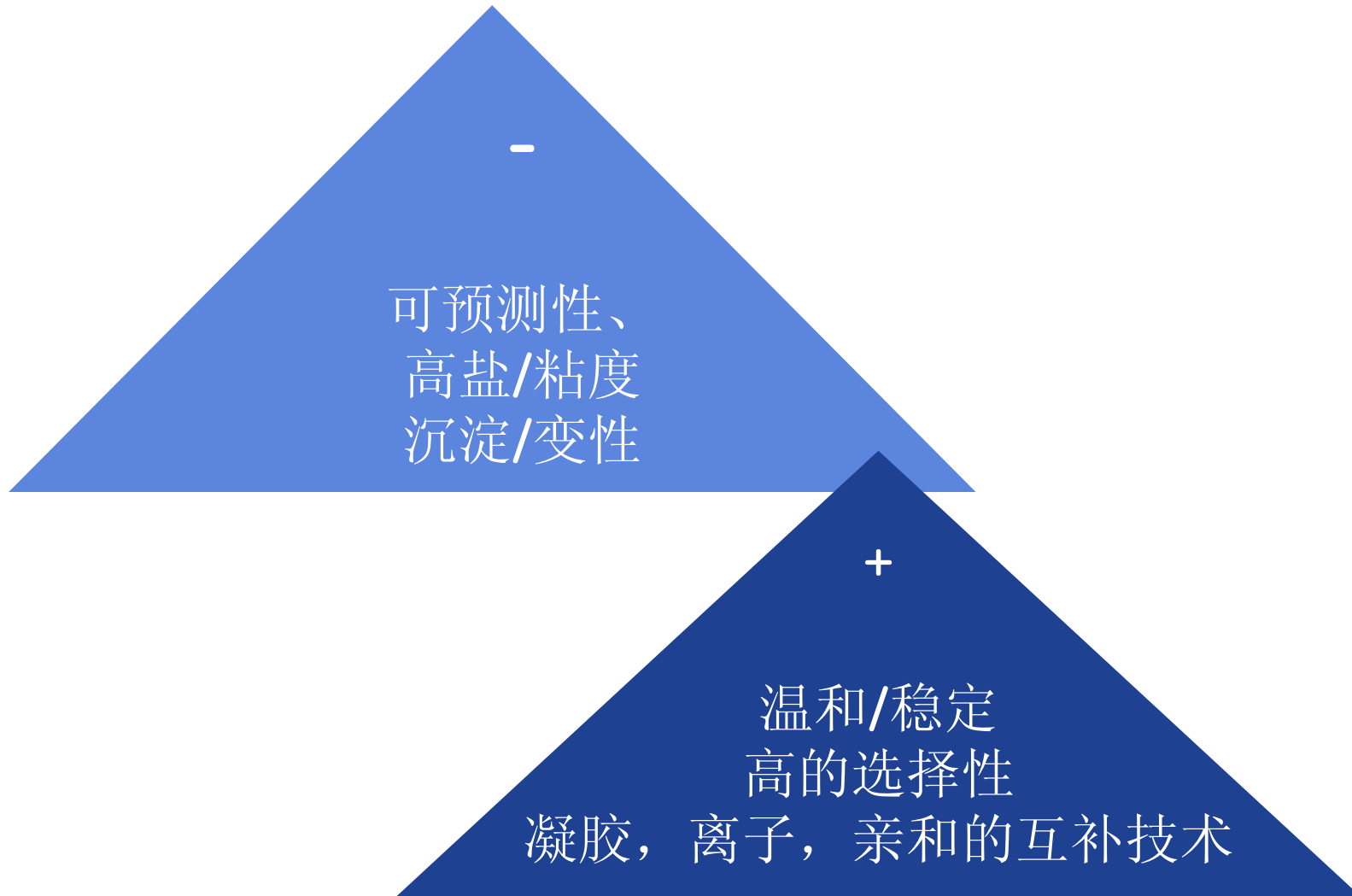
imagination at work

什么是疏水层析？

疏水层析是一种液相吸附层析，它是依据生物分子之间的疏水性的差别来进行分离的。



疏水层析的优点和缺点



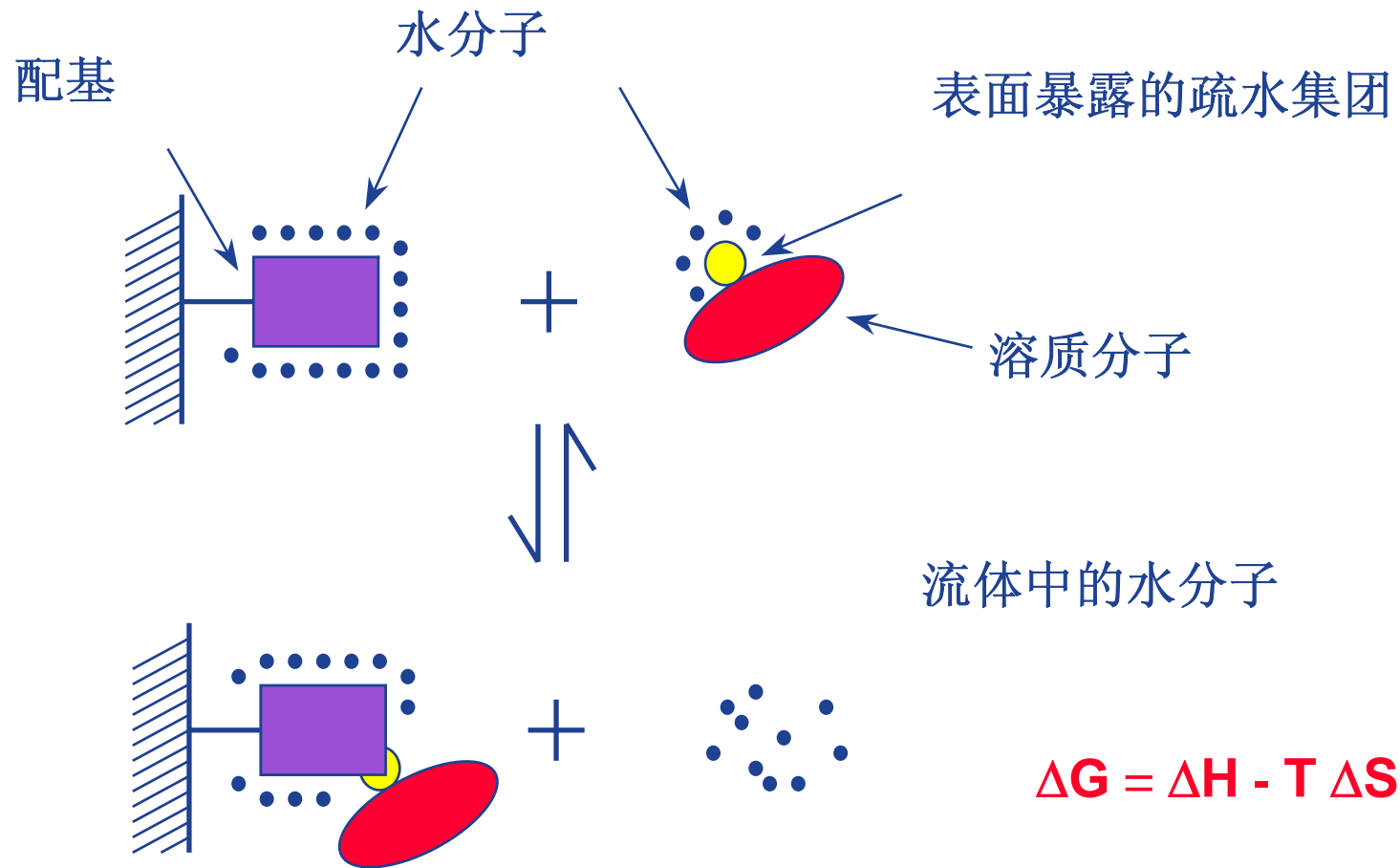
内容

- 介绍
- 机理和原理
- 纯化过程中的实际问题—优化
- 应用
- 总结



imagination at work

疏水相互作用原理



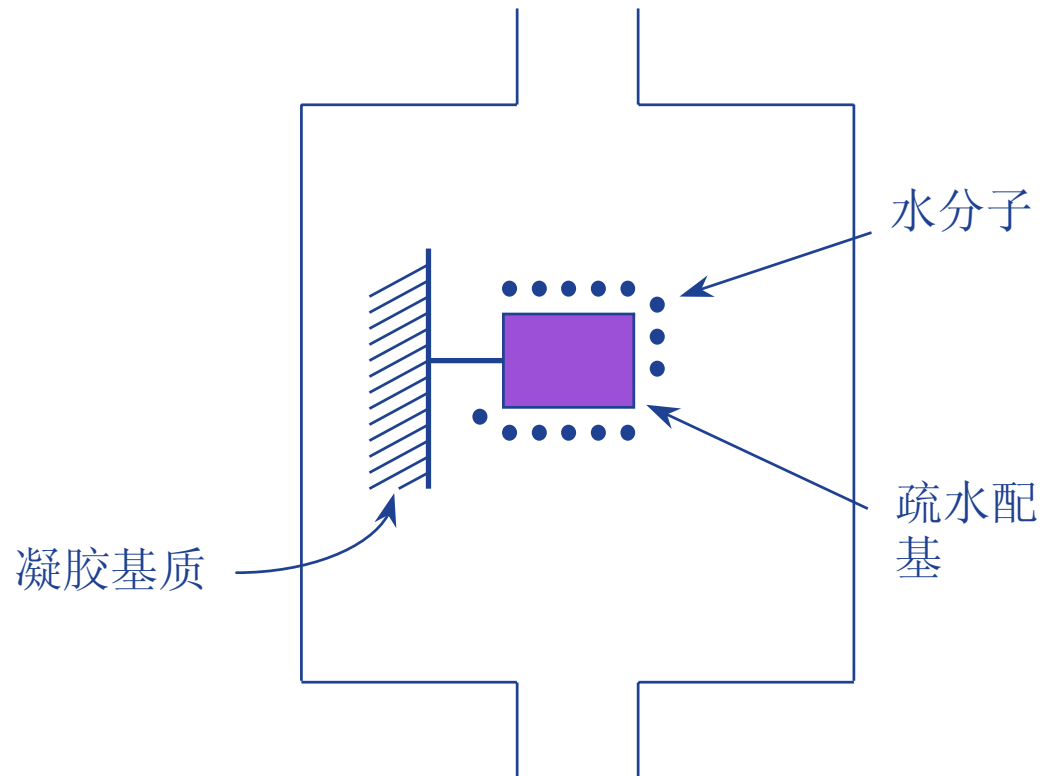
疏水层析的主要阶段

- 平衡柱子到适合结合的条件
- 上样
- 清洗杂质
- 洗脱

平衡

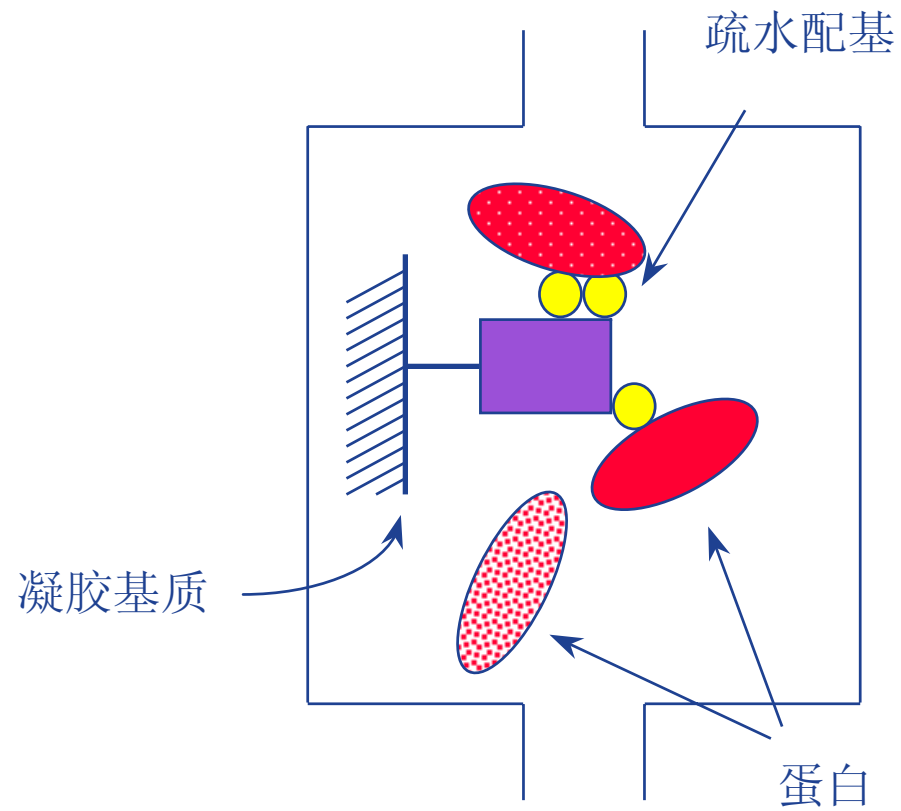
1. 平衡
2. 上样
3. 清洗
4. 洗脱

平衡柱子到适合结合的条件



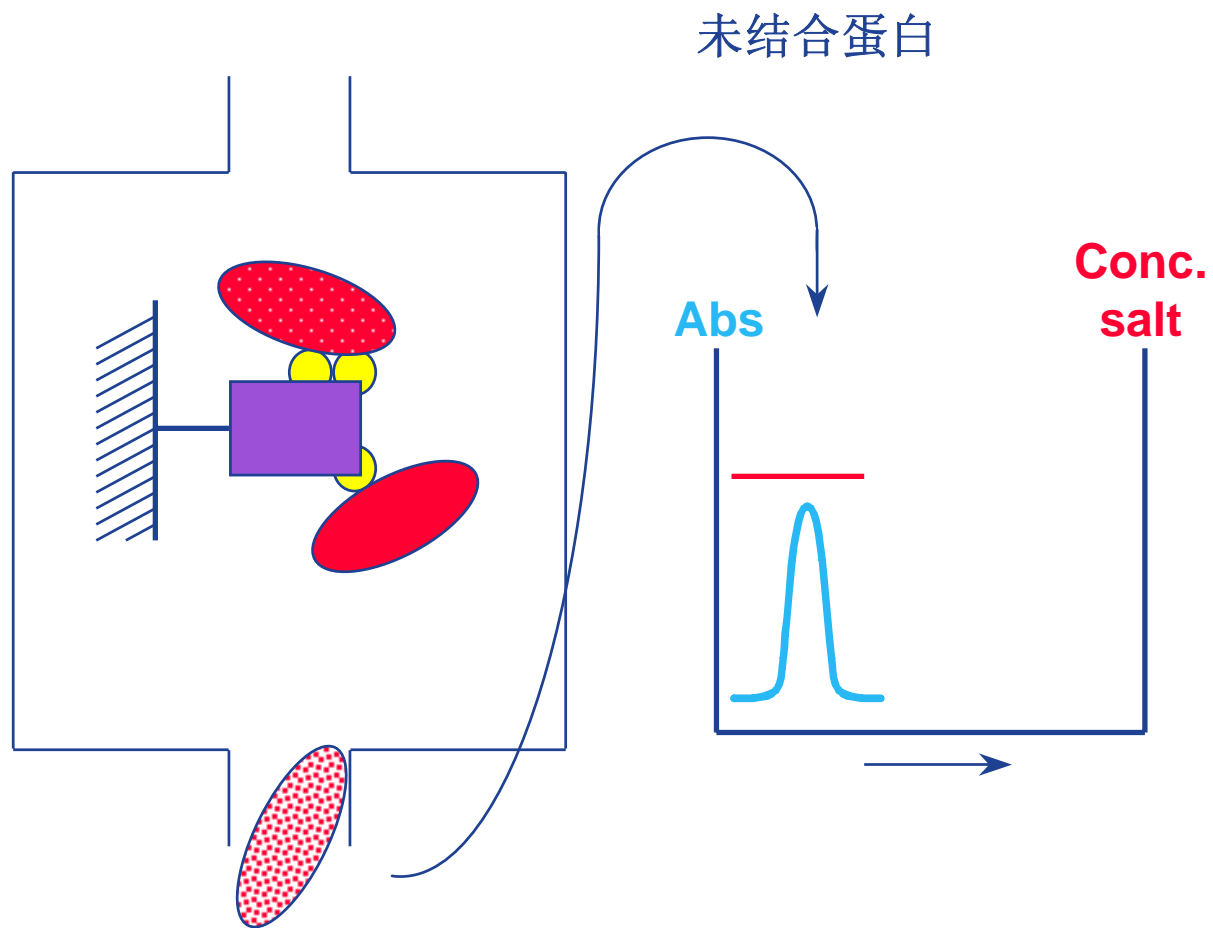
上样

1. 平衡
2. 上样
3. 清洗
4. 洗脱



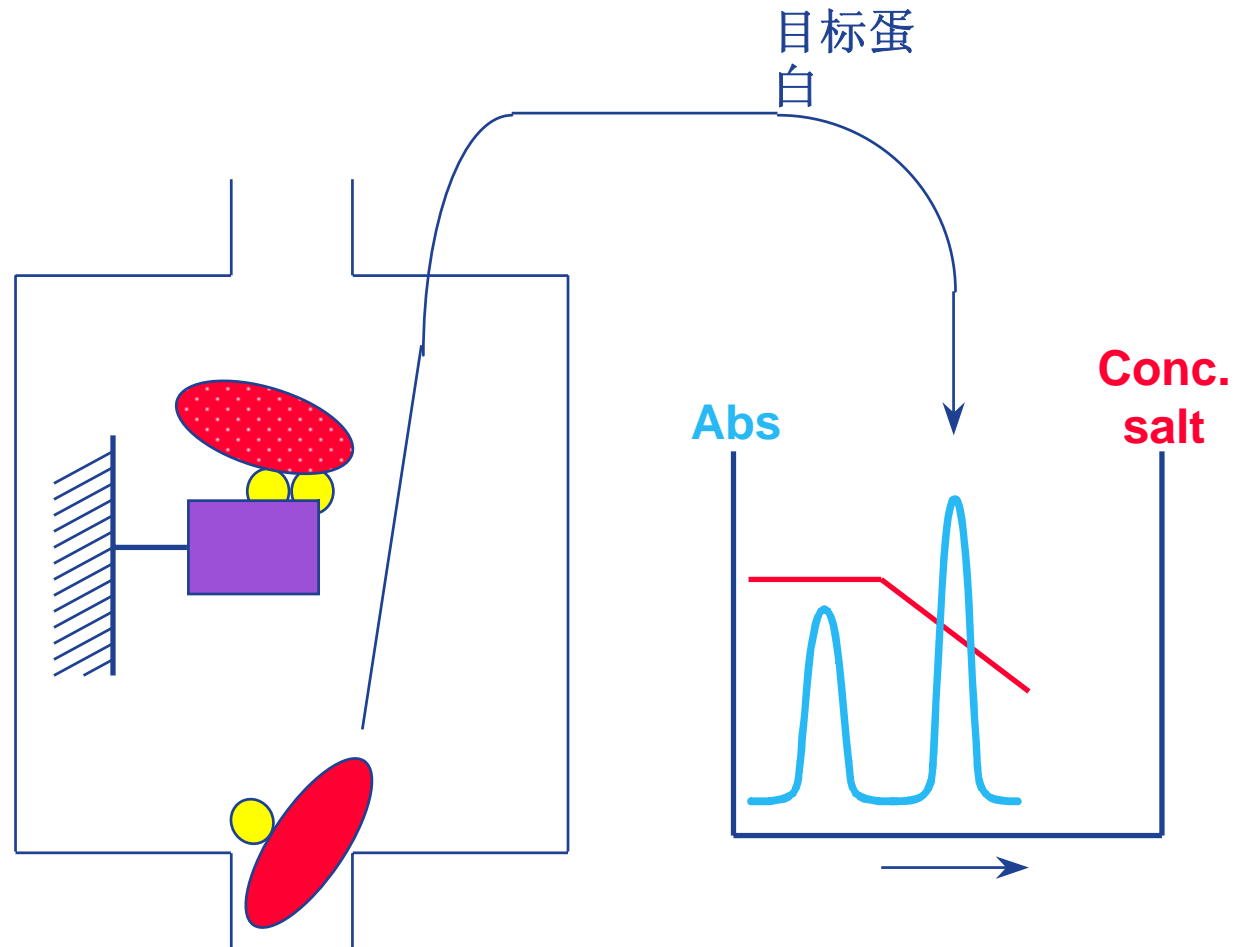
清洗未结合杂质

1. 平衡
2. 上样
- 3. 清洗**
4. 洗脱



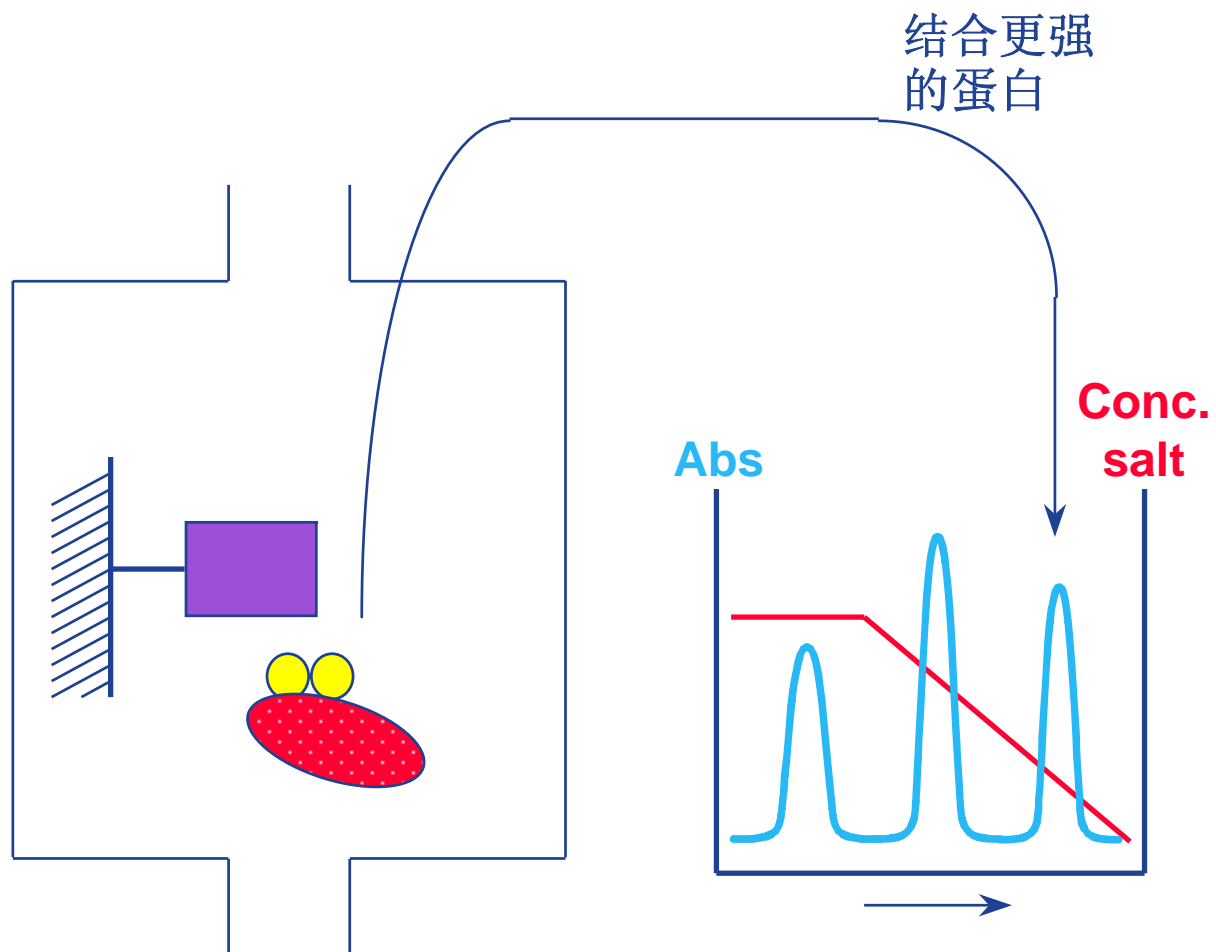
洗脱

1. 平衡
2. 上样
3. 清洗
4. 洗脱



洗脱

1. 平衡
2. 上样
3. 清洗
4. 洗脱



第一次试验, 通用的条件

结合缓冲液: 50 mM PBS pH 7.0 ,含有 1-1.5 M 硫酸铵

洗脱缓冲液: 50 mM PBS pH 7.0

梯度: 10-15 柱体积

流速: 参考说明书

填料: Phenyl Sepharose™ 6 Fast Flow (high sub)

内容

- 介绍
- 机理和原理
- 纯化过程中的实际问题—优化
- 应用



imagination at work

如何优化？

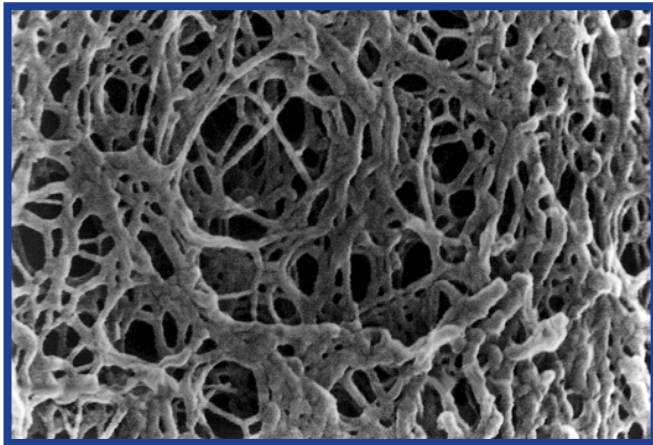
- 针对样品建立“盐稳定的范围”
- 选择层析填料
 - 基架的类型
 - 配基的类型
 - 配基取代的程度
- 选择结合条件
- 选择洗脱条件
- 优化策略



选择层析填料 基架的类型

交联的琼脂糖

- Sephacrose FF and HP
- Sephacrose 4B and CL-4B



AGAROSE

合成的共聚物材料

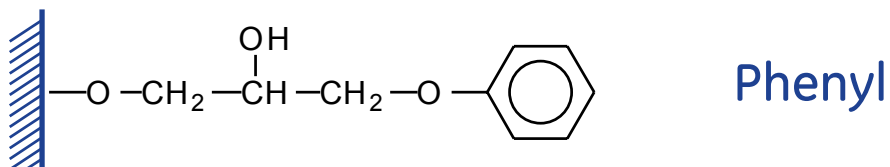
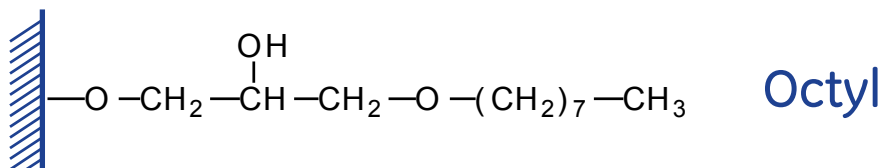
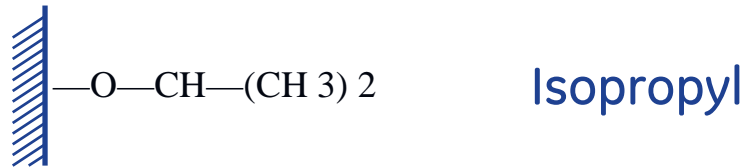
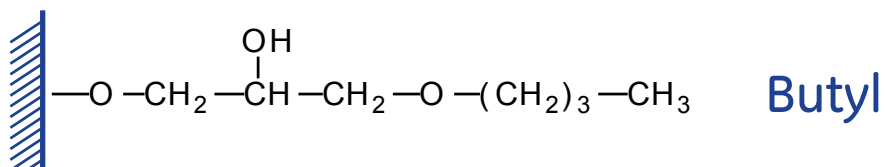
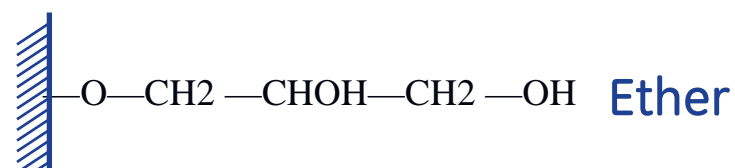
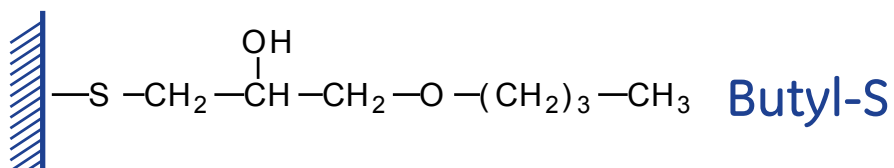
- SOURCE



SOURCE™

选择层析填料

配基的类型



GE imagination at work

疏水性不断增强的顺序

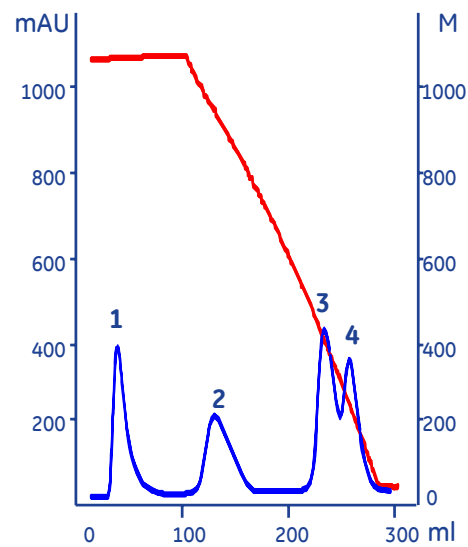
Phenyl
Octyl
Butyl
Isopropyl
Ether
Butyl-S



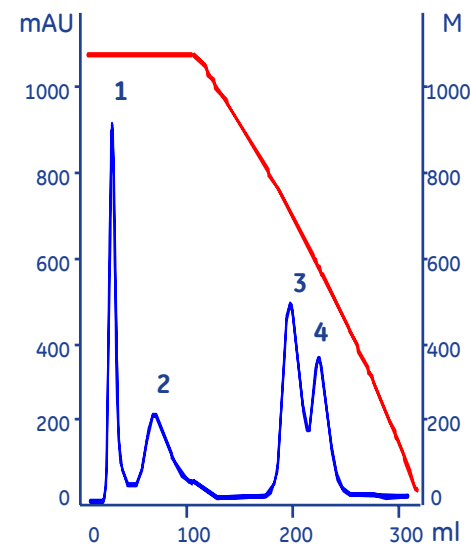
选择层析填料

配基的取代程度

Columns: HiPrep™ 16/10
Sample: Cytochrome C (1), ribonuclease A (2), lysozyme (3)
and α -chymotrypsinogen (4)



Phenyl (high sub)

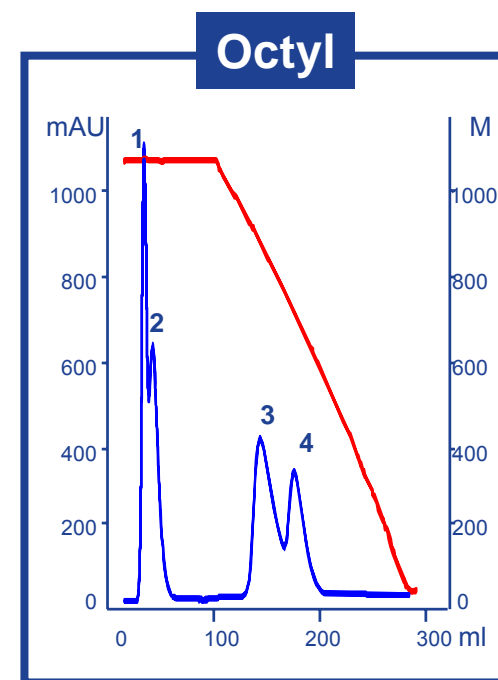
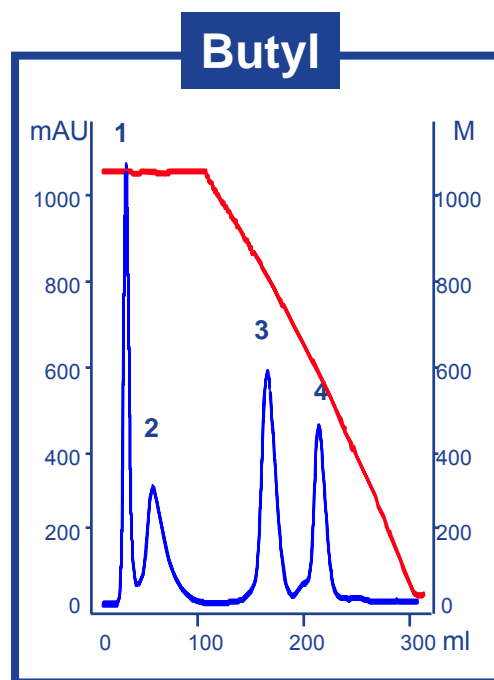
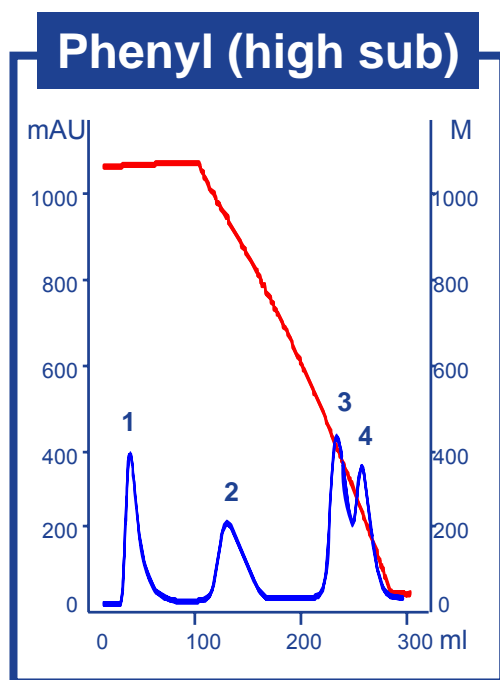


Phenyl (low sub)

不同的填料有不同的选择性

Columns: HiPrep™ 16/10

Sample: Cytochrome C (1), ribonuclease A (2), lysozyme (3) and α -chymotrypsinogen (4)



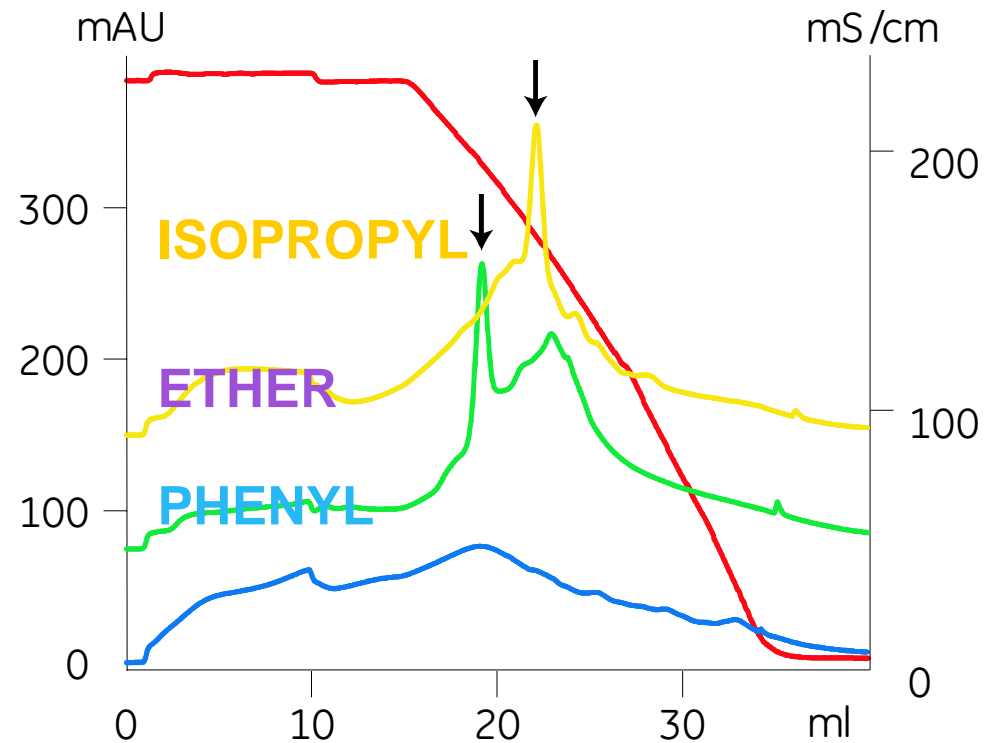
GE imagination at work

不同的填料有不同的选择性

Target protein: Deacetoxycephalosporin C synthase (DAOCS)

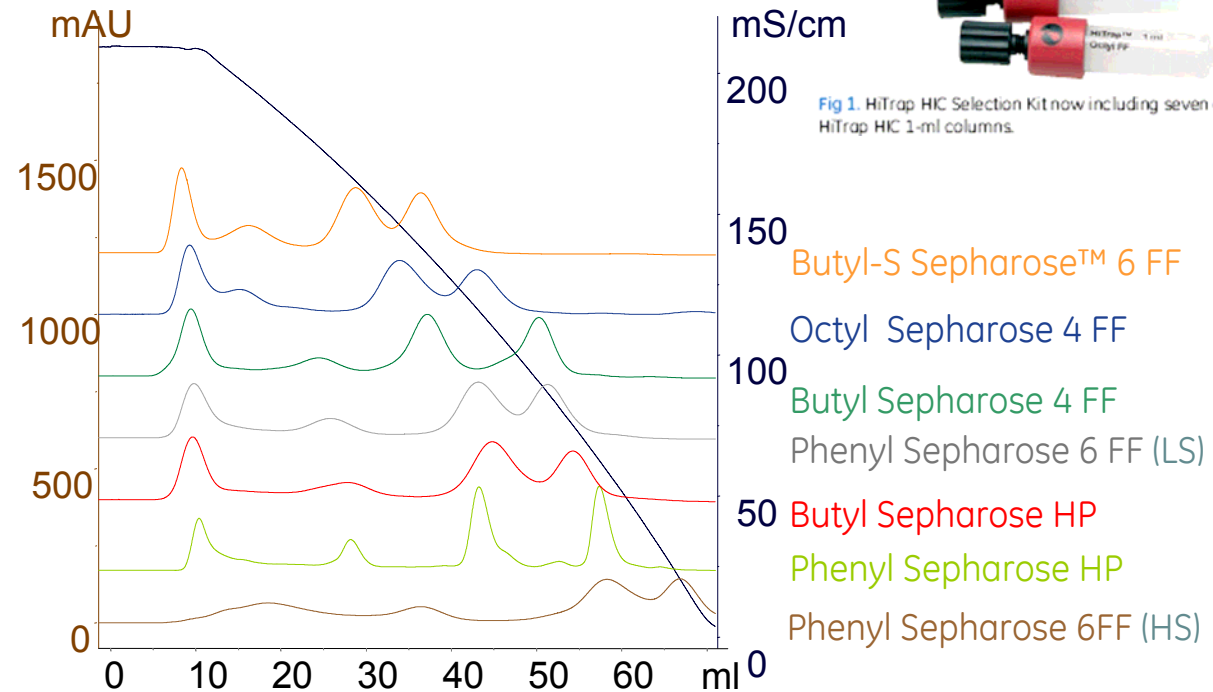
Columns: RESOURCE™
ISO
ETH
PHE

Sample: 10 ml DAOCS
purified on
Q Sepharose™ XL



筛选合适的选择性

HiTrap™ HIC screening kit



RESOURCE™ HIC test kit



Included in
the kit

如何优化？

- 针对样品建立“盐稳定的范围”
- 选择层析填料
- 选择结合条件
 - 盐的类型和浓度
 - pH
 - 温度
- 选择洗脱条件
- 优化策略



选择结合条件

盐的类型

不同盐增强疏水配基和蛋白质之间的相互作用的能力不同。

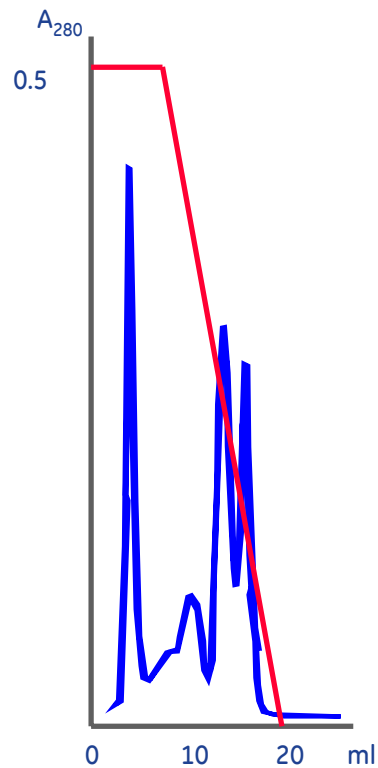
← 相互作用强度增强，载量提高



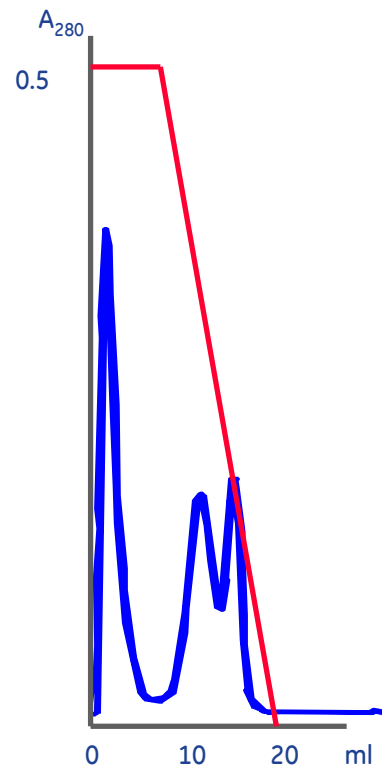
选择结合条件

盐类型的影响

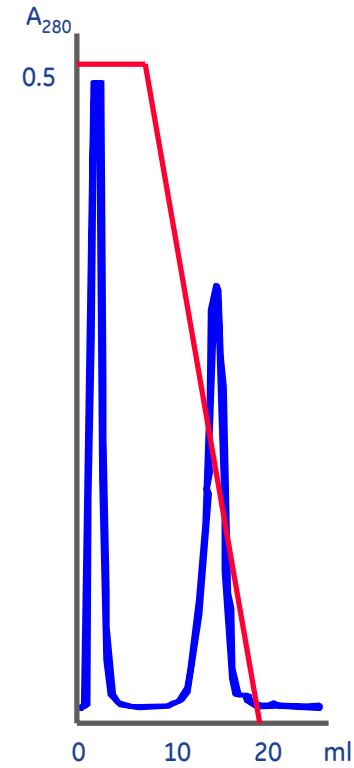
1.7 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$



1 M Na_2SO_4

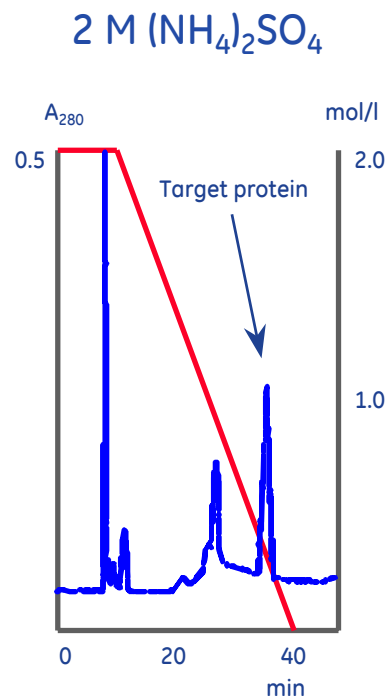


3 M NaCl

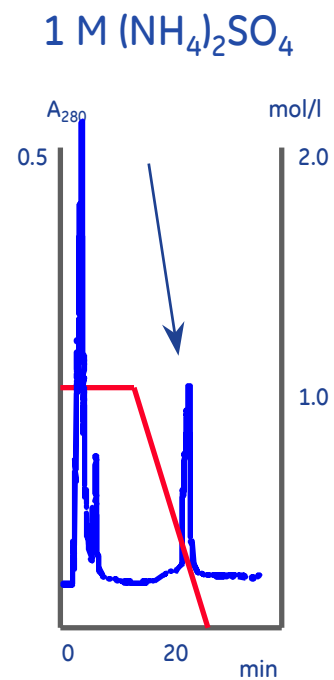


选择结合条件

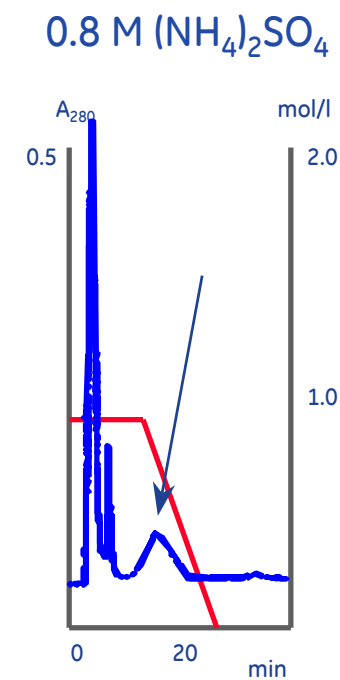
盐浓度的影响



太高



合适



太低

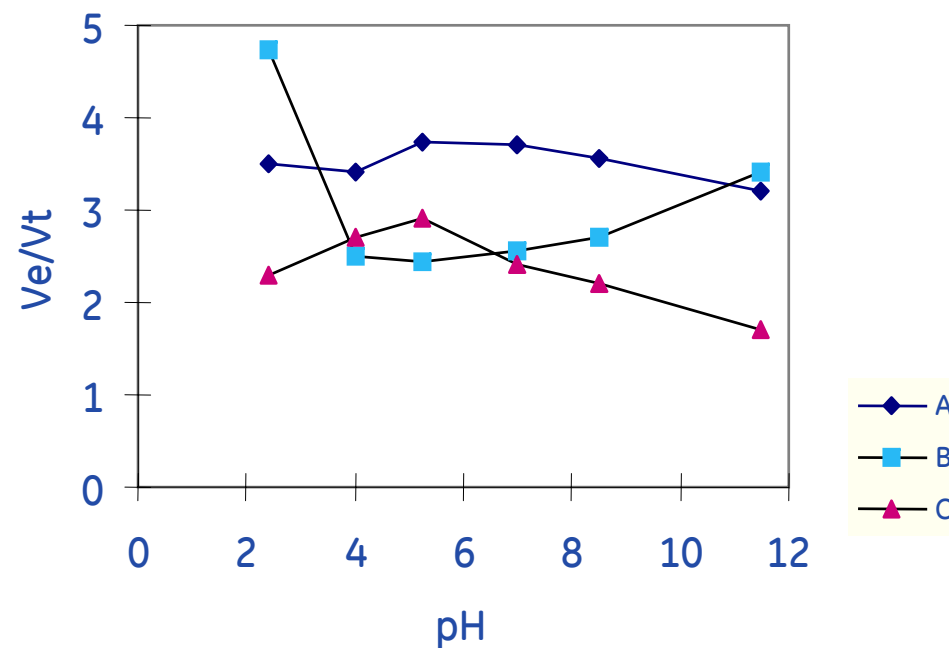


GE imagination at work

选择合适的结合条件

pH 的影响

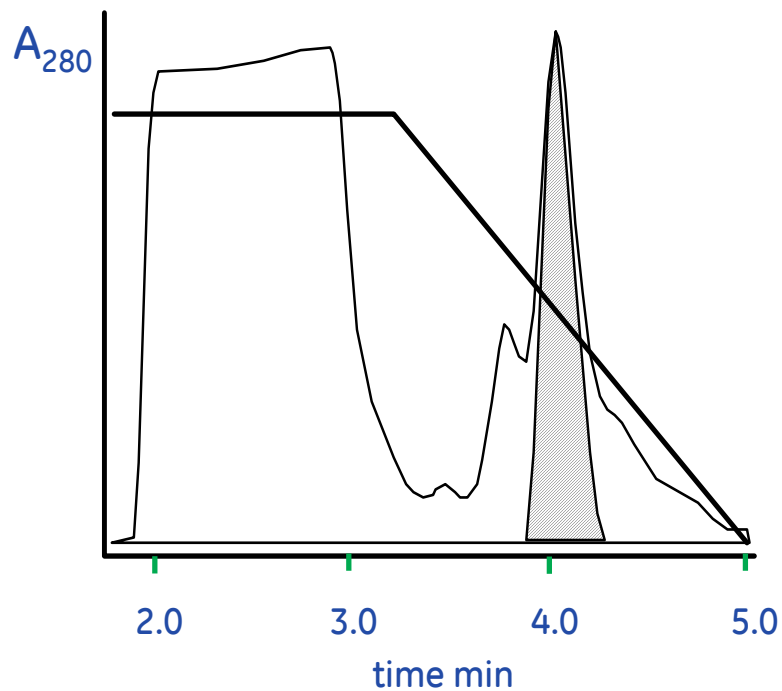
在 pH 5 and 8.5 之间，蛋白和疏水填料的吸附几乎没有变化



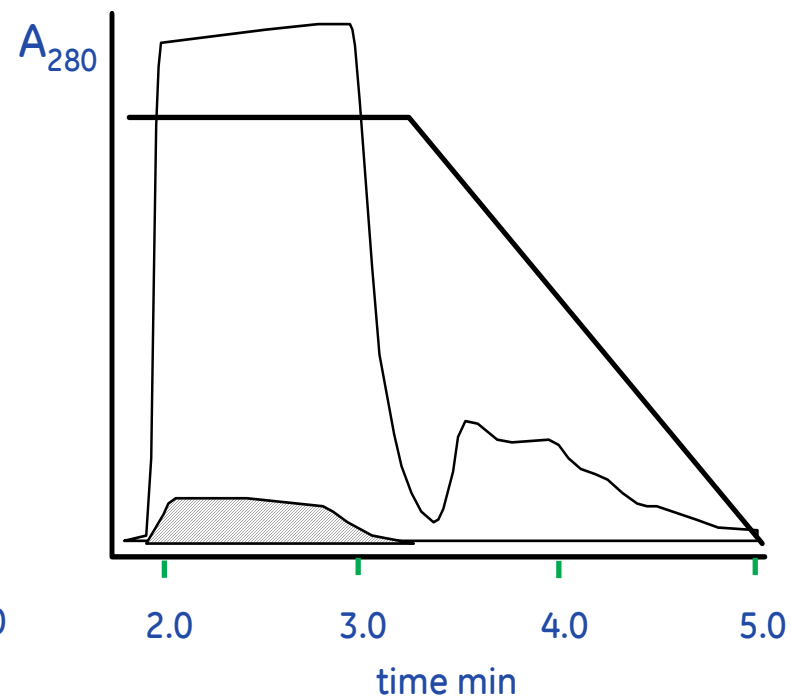
选择结合条件

温度的影响

23°C 样品 & 系统



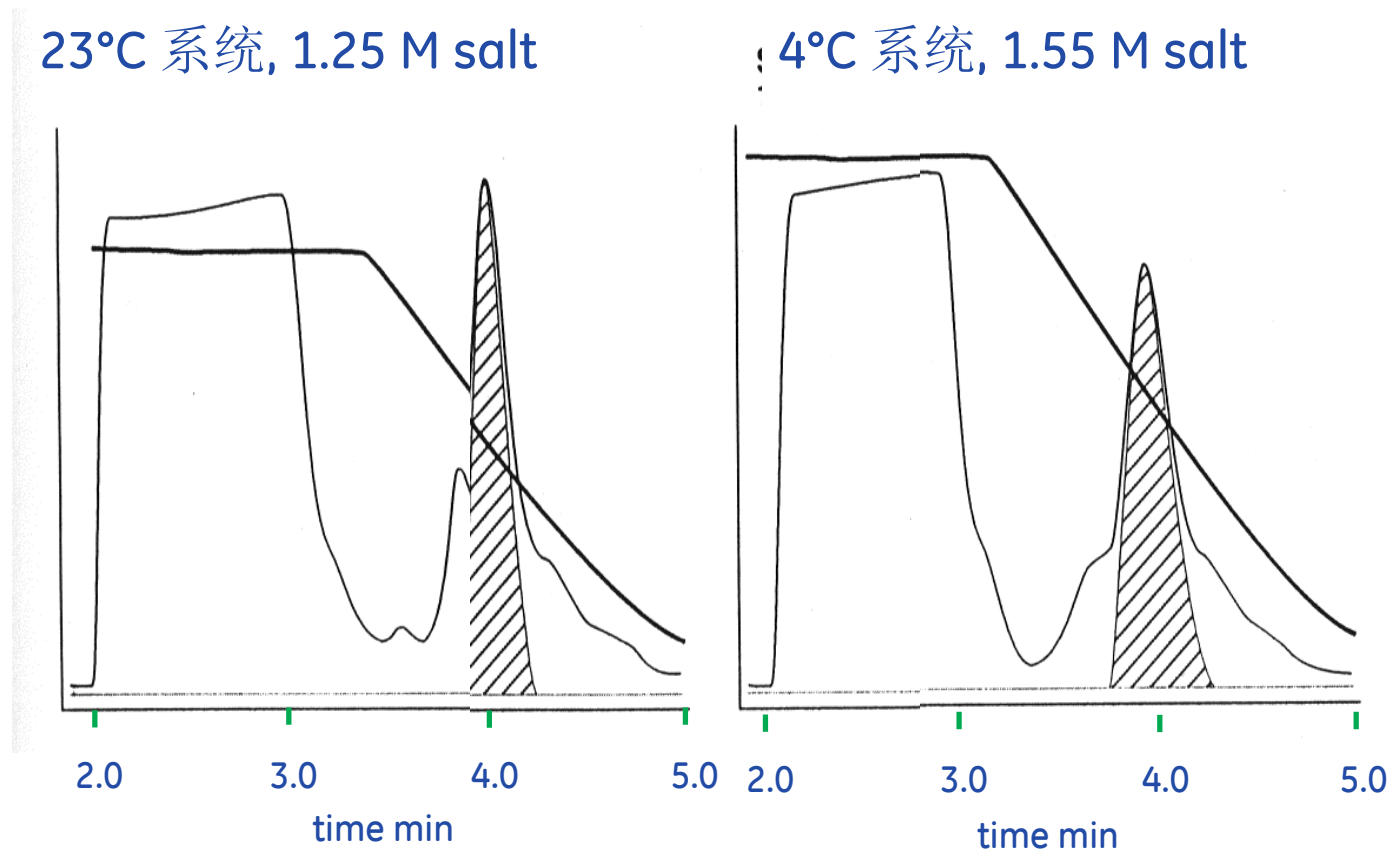
4°C 样品, 23° C 系统



SOURCE™ 15 ISO

选择结合条件

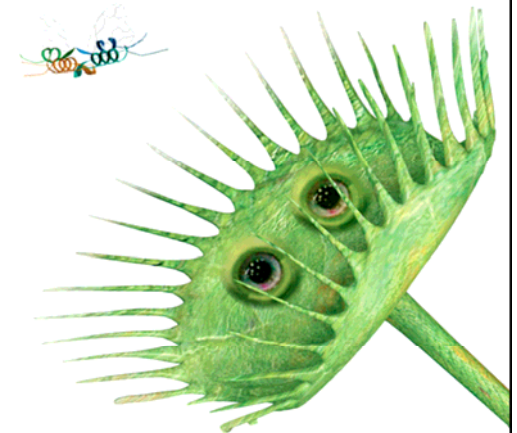
温度的影响



SOURCE™ 15 ISO

如何优化？

- 针对样品建立“盐稳定的范围”
- 选择层析填料
- 选择结合条件
- 选择洗脱条件
 - 缓冲液
 - 流速
 - 洗脱梯度
- 优化策略



选择洗脱条件

缓冲液

缓冲液

低盐浓度

有机溶剂

去垢剂

影响

极性
表面张力
三维结构

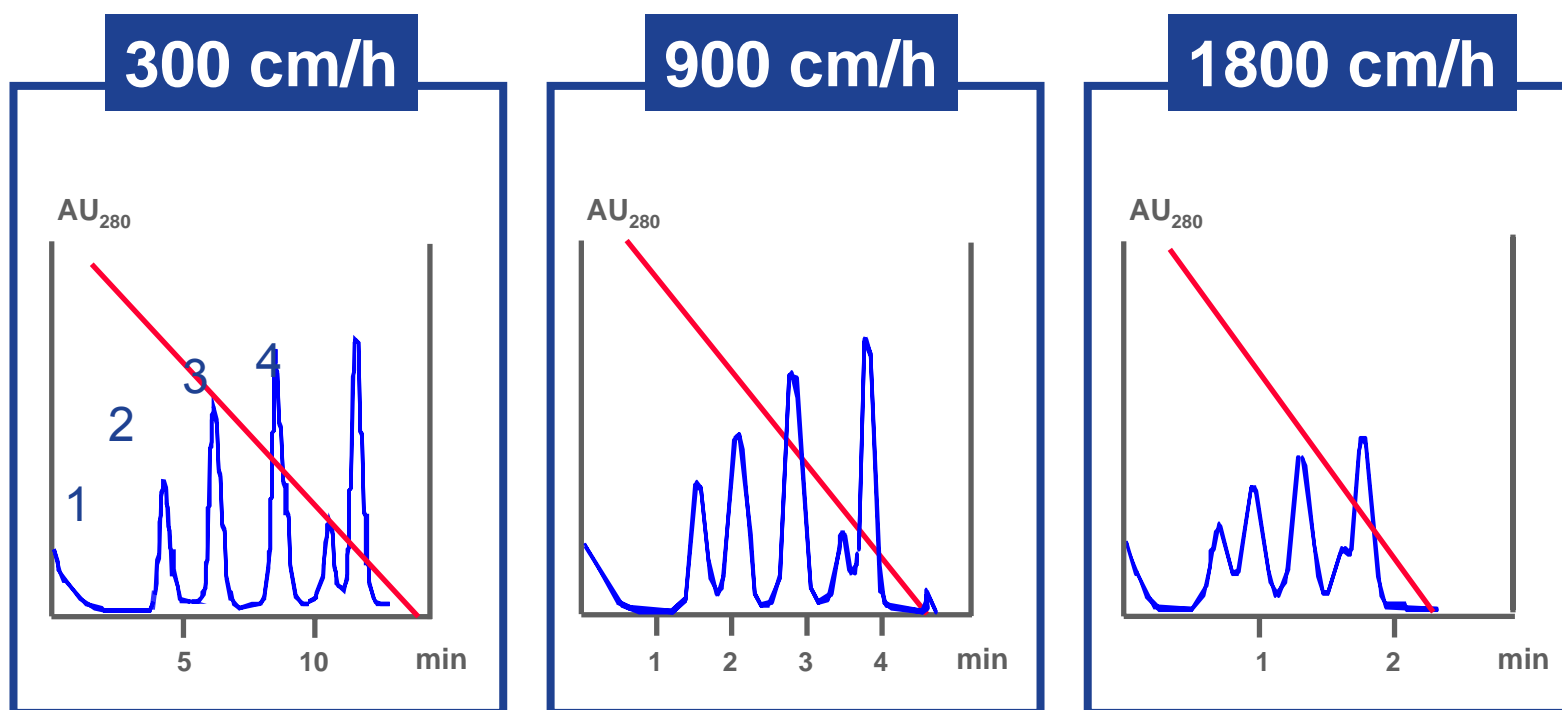
变性
同蛋白相互作用
同配基相互作用
胶束



GE imagination at work

选择洗脱条件

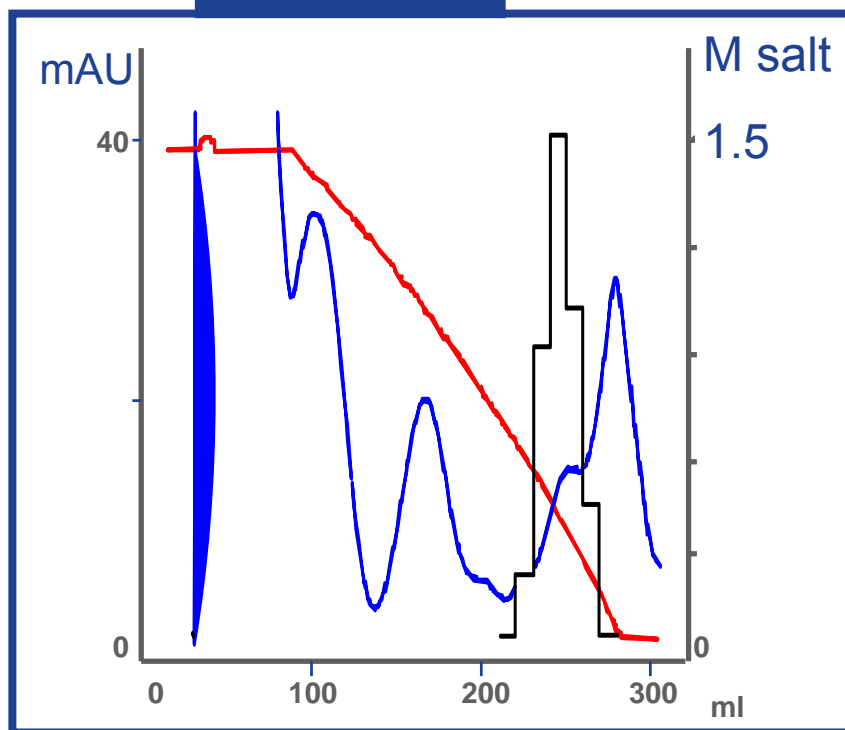
流速对分辨率的影响



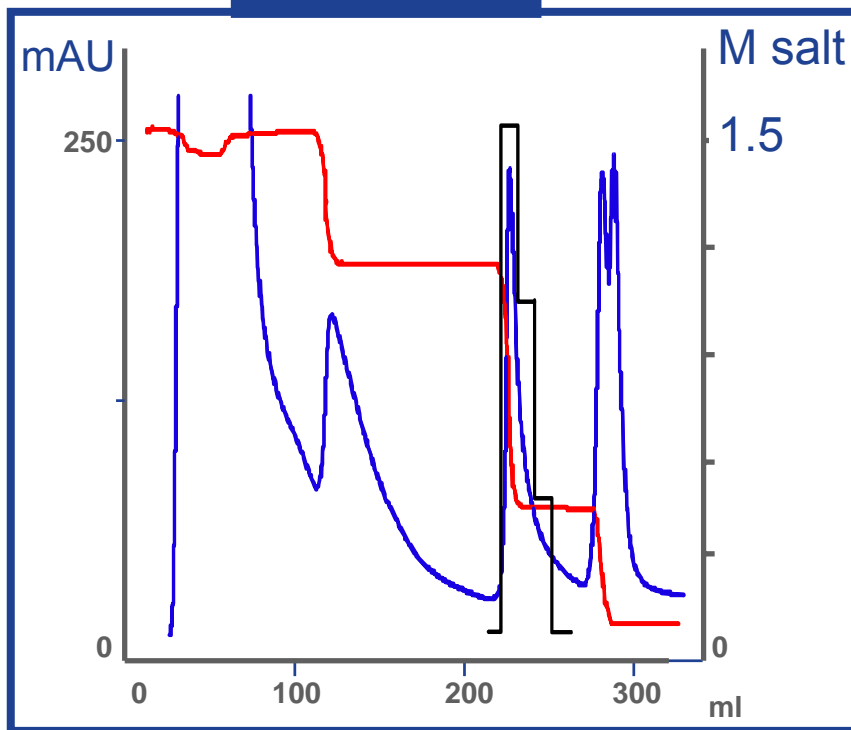
选择洗脱条件

梯度形状对分离的影响

线性梯度



步级梯度



如何优化？

- 针对样品建立“盐稳定的范围”
- 选择层析填料
- 选择结合条件
- 选择洗脱条件
- 优化策略



优化策略

分辨率差

- 如果蛋白洗脱得太晚，改变吸附的盐浓度
- 改变pH 值
- 采用不同的配基或配基的取代水平

洗脱得太早或太晚

- 改变盐浓度
- 采用不同的配基或配基的取代水平

优化策略

蛋白沉淀

- 试着用比吸附缓冲液低的浓度多次上样.
- 在上样之前, 才把样品和缓冲液混合

收率低

- 蛋白可能不可逆的结合到柱子上, 试着采用不同配基的填料和不同配基取代水平的填料.



优化策略总结

- 筛选合适选择性的填料
- 在吸附中，优化盐的浓度和类型
- 优化梯度形状，用以获得最大的分辨率和通量
- 如果柱效不理想, 继续优化 流速, 温度, 添加剂
或 调节pH



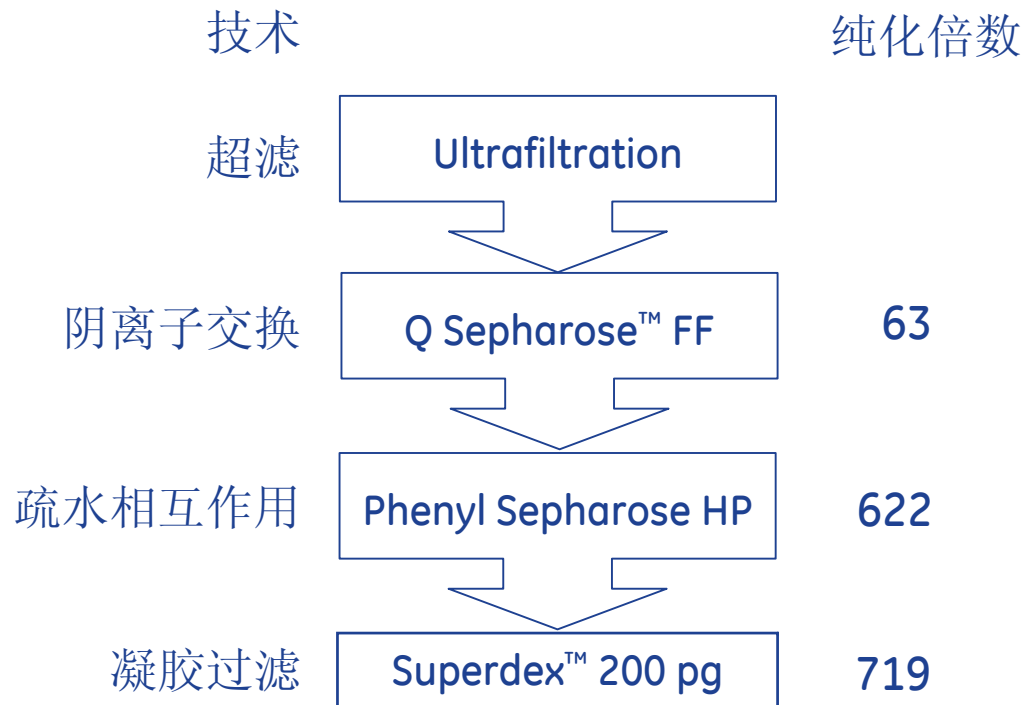
内容

- 介绍
- 机理和原理
- 纯化过程中的实际问题—优化
- 应用
- 总结



imagination at work

从毕赤酵母纯化重组 α -甘露糖苷酶

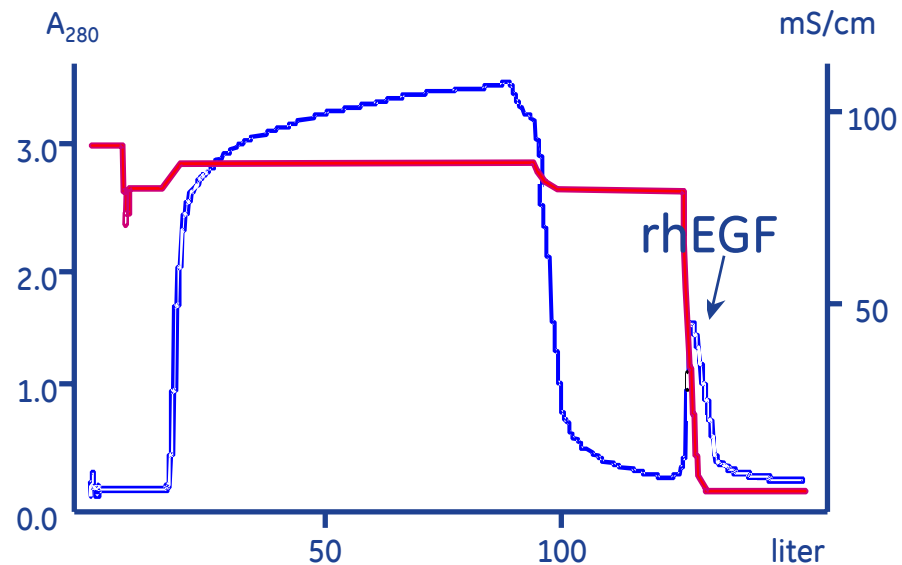


- 10倍纯化
- 82% 收率

*Y.-F. Liao et al. (1996)
J. Biol. Chem. 271, 28348*

重组人表皮生长因子的捕获

Column: BPG™ 300/500 packed with Phenyl Sepharose™
6 Fast Flow (high sub)
Sample: 80 l yeast supernatant
Load: 0.36 mg EGF/ml media
Buffer A: 20 mM sodium phosphate, pH 7.0 + 0.5 M
ammonium sulphate
Buffer B: 20 mM sodium phosphate, pH 7.0
Flow: 300 cm/h during loading, 50 cm/h during elution



纯化重组磷酸脂酶

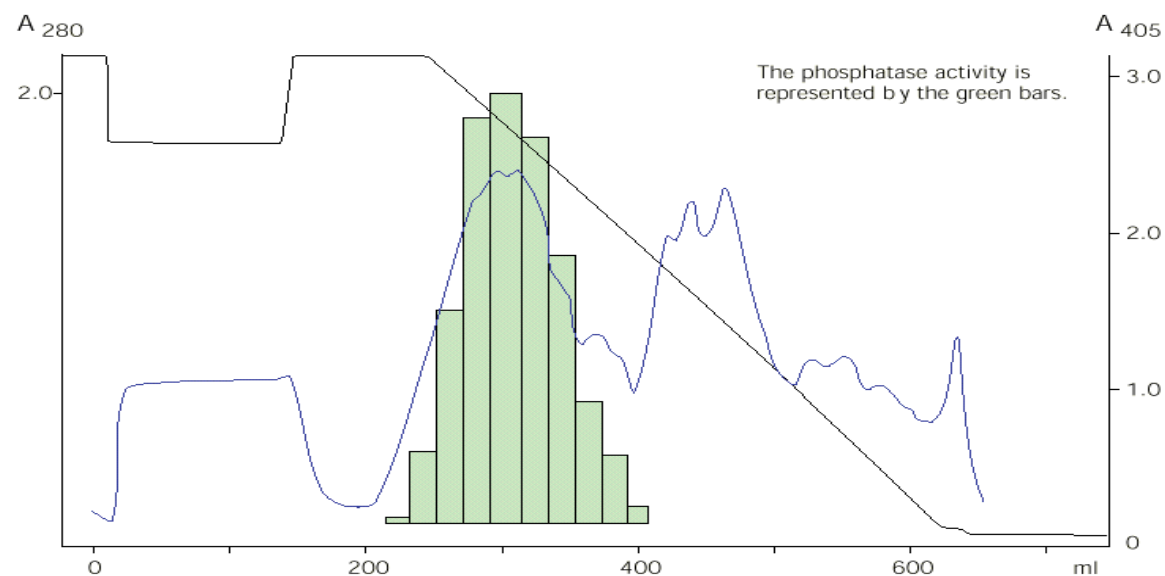
Sample: 170 ml eluate containing rPhosphatase from a DEAE Sepharose™ run, adjusted to 1.6 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 7.0

Column: HiLoad™ 16/10 Phenyl Sepharose High Performance

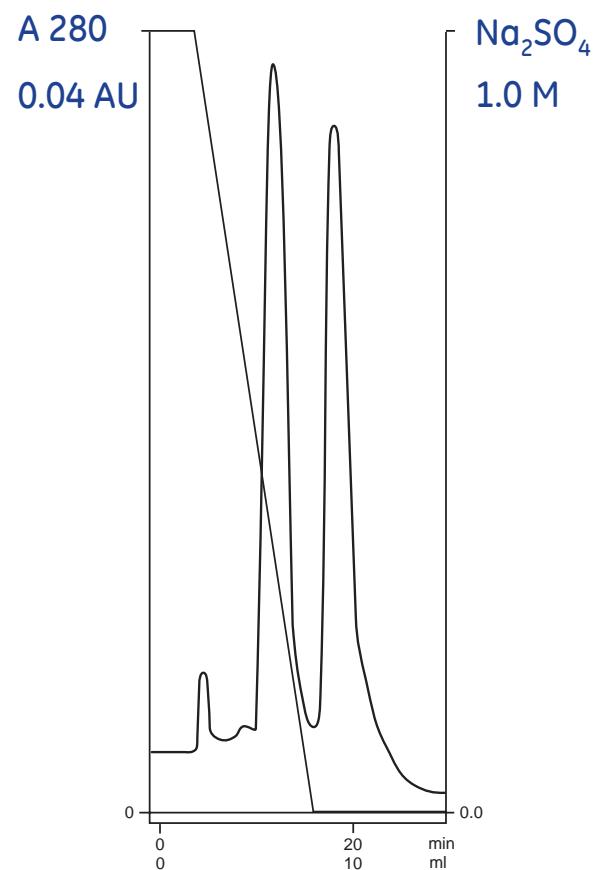
Buffer A: 25 mM Tris-HCL, 1.4 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 mM EDTA, 2 mM DTT, pH 7.4

Buffer B: 25 mM Tris-HCL, 10% glycerol, 1 mM EDTA, 2 mM DTT, pH 7.4

System: ÄKTAprime™, 5.0 ml/min (150 cm/h), 0-100%B in 20 CV



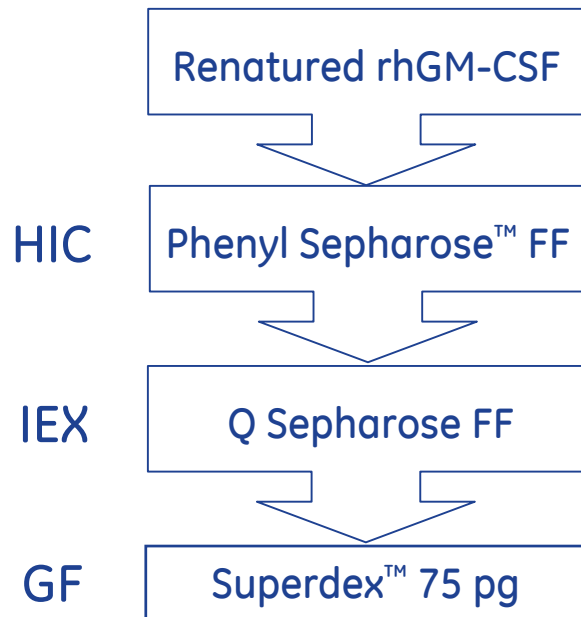
分离 α_2 -巨球蛋白异构体



column: Phenyl Sepharose™ High Performance
5 x 10 mm i.d. x bed height

sample: 60 μg active and 60 μg methylamine-treated, inactive α_2 -macroglobulin

从*E. coli*包涵体纯化 rhGM-CSF



去除缓冲液成分

Guanidine-HCl, Berol 185, glutathione etc

- 纯化倍数: 大约 2 倍
- 收率: 92% 的活性
- 浓缩倍数 大约 5 倍

Belew, M. et al. (1994)
J.Chromatogr. A, 679: 67-83



内容

- 介绍
- 机理和原理
- 纯化过程中的实际问题—优化
- 应用
- 总结



imagination at work

总结

- 和离子交换、凝胶过滤和亲和层析技术互补
- 温和，非变性
- 高选择性
- 高回收率
- 浓缩技术



谢谢

欢迎访问:

www.gehealthcare.com/protein-purification



imagination at work