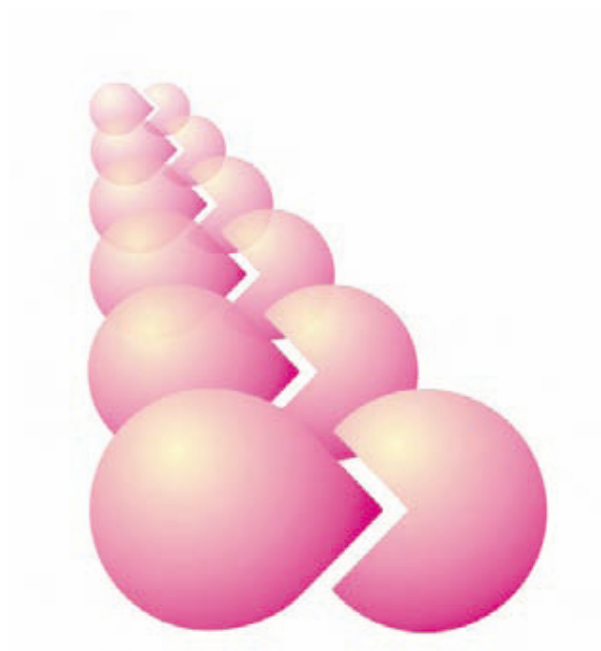


GE Healthcare



# 亲和色谱

原理和方法



# 来自GE Healthcare的手册



## **Protein Purification**

Handbook  
18-1132-29

## **Gel Filtration**

Principles and Methods  
18-1022-18

## **Affinity Chromatography**

Principles and Methods  
18-1022-29

## **Antibody Purification**

Handbook  
18-1037-46

## **Percoll**

Methodology and Applications  
18-1115-69

## **Ion Exchange Chromatography & Chromatofocusing**

Principles and Methods  
11-0004-21

## **Purifying Challenging Proteins**

Principles and Methods  
28-9095-31

## **GST Gene Fusion System**

Handbook  
18-1157-58

## **Hydrophobic Interaction and Reversed Phase Chromatography**

Principles and Methods  
11-0012-69

## **2-D Electrophoresis**

using immobilized pH gradients  
Principles and Methods  
80-6429-60

## **Microcarrier Cell Culture**

Principles and Methods  
18-1140-62

## **Challenging Protein Purification**

Handbook  
28-9095-31

## **Recombinant Protein Purification Handbook**

Principles and Methods  
18-1142-75

# 亲和色谱

## 原理和方法

# 目 录

引言 .....	8
符号和缩写 .....	9
 <b>第一章</b>	
亲和色谱法简介 .....	10
大规模制备的生物加工介质 .....	13
用户定制设计介质和柱子 .....	13
在亲和色谱中通用术语 .....	14
 <b>第二章</b>	
实际操作中的亲和色谱法 .....	15
纯化步骤 .....	15
介质的选择 .....	16
介质和缓冲液的准备 .....	16
样品准备和应用 .....	17
洗脱 .....	18
流速 .....	21
结果分析和进一步纯化 .....	21
设备选择 .....	21
解决问题 .....	22
 <b>第三章</b>	
特殊分子集团的纯化 .....	25
免疫球蛋白 .....	25
IgG, IgG片段和亚基 .....	26
HiTrap Protein G HP, Protein G Sepharose 4 Fast Flow, MabTrap Kit .....	28
HiTrap Protein A HP, Protein A Sepharose 4 Fast Flow, HiTrap rProtein A FF, rProtein A Sepharose 4 Fast Flow, MabSelect .....	33
来自杂交瘤细胞培养的单克隆IgM .....	38
HiTrap IgM 纯化 HP .....	38
来自蛋黄的禽类IgY .....	40
HiTrap IgY 纯化 HP .....	40
重组融合蛋白 .....	42
GST融合蛋白 .....	42
GST MicroSpin 纯化模式, GSTrap FF, GSTPrep FF 16/10, 谷光苝肽 Sepharose 4 Fast Flow, 谷光苝肽Sepharose 4B .....	42
聚组氨酸(His) 融合蛋白质 .....	47
His MicroSpin 纯化模式, HisTrap Kit, HiTrap 螯合 HP, 螯合的 Sepharose Fast Flow .....	47
Protein A 融合蛋白 .....	52

IgG Sepharose 6 Fast Flow.....	52
纯化或者去除丝氨酸酶，例如凝血酶和胰酶和酶原 .....	54
HiTrap 苯甲脒 FF (high sub), 苯甲脒 Sepharose 4 Fast Flow (high sub) .....	54
丝氨酸蛋白酶与酶原与精氨酸的亲纯化58	
精氨酸 Sepharose 4B .....	58
DNA 结合蛋白质.....	60
HiTrap 肝素 HP, HiPrep 16/10肝素FF, 肝素Sepharose 6 Fast Flow.....	60
凝血因子 .....	65
HiTrap 肝素HP, HiPrep 16/10肝素FF, 肝素Sepharose 6 Fast Flow.....	65
生物素和生物素化的物质 .....	66
HiTrap 抗生物素蛋白链霉素HP, 抗生物素蛋白链霉素 Sepharose High Performance .....	66
纤维结合蛋白的纯化或者去除.....	69
明胶 Sepharose 4B.....	69
白蛋白的纯化或者去除 .....	70
HiTrap Blue HP, Blue Sepharose 6 Fast Flow.....	70
NAD <sup>+</sup> -依赖的脱氢酶和ATP-依赖的激酶 .....	73
5' AMP Sepharose 4B, HiTrap Blue HP, Blue Sepharose 6 Fast Flow .....	73
5' AMP Sepharose 4B.....	74
HiTrap Blue HP, Blue Sepharose 6 Fast Flow .....	75
NADP <sup>+</sup> -依赖的脱氢酶和其它亲和NADP <sup>+</sup> 的酶 .....	75
2' 5' ADP Sepharose 4B, Red Sepharose CL-6B .....	75
2' 5' ADP Sepharose 4B .....	77
Red Sepharose CL-6B.....	78
糖蛋白或者多糖.....	80
Con A Sepharose 4B, 扁豆凝集素 Sepharose 4B, Agarose麦胚外源凝集素.....	80
Con A 对分支的甘露糖的结合, 带有甘露糖和葡萄糖末端的碳水化合物 ( $\alpha$ Man > $\alpha$ Glc > GlcNAc) .....	80
扁豆凝集素结合甘露糖分支并且通过海藻糖 $\alpha$ (1,6) 连接到N-乙酰基葡萄糖胺, ( $\alpha$ Man > $\alpha$ Glc > GlcNAc) N-乙酰基葡萄糖胺结合凝集素 .....	83
麦胚外源凝集素结合N-连接寡糖的壳二糖核 [GlcNAc $\beta$ 1,4GlcNAc] <sub>1-2</sub> > $\beta$ GlcNAc].....	84
钙调节蛋白结合蛋白质: 三磷酸腺苷酶, 腺苷酸化酶, 蛋白激酶 磷酸二酯酶, 神经递质.....	86
钙调节蛋白 Sepharose 4B.....	86
带有氨基酸暴露的蛋白质和多肽: 组氨酸, 半胱氨酸, 色氨酸, 和/ 或对金属离子具有亲和性的物质 (也就是所说的IMAC, 固定化金属螯合亲和色谱) .....	88
HiTrap 螯合 HP, 螯合 Sepharose Fast Flow, His MicroSpin 纯化模式, HisTrap Kit.....	88
含有巯基的物质 (共价色谱进行纯化) .....	92
活化的巯基Sepharose 4B, 丙基硫氧嘧啶 Sepharose 6B .....	92

## 第四章

亲和介质的组成 .....	97
基质 .....	97
配基 .....	98
间隔臂 .....	99
偶合配基 .....	100
特异性配基 .....	100

## 第五章

使用预活化基质设计亲和介质.....	101
选择基质 .....	101
选择配基和间隔臂 .....	101
选择偶联方法 .....	101
偶联配基 .....	103
结合容量、配基浓度和偶联效率 .....	104
结合和洗脱条件 .....	105
通过配基中的伯胺进行偶联 .....	106
HiTrap NHS-活化的 HP, NHS-活化的Sephacrose 4 Fast Flow.....	106
CNBr-活化的 Sepharose .....	109
免疫亲和色谱 .....	113
通过一个间隔臂偶联小的配基通过氨基或者羧基基团.....	114
EAH Sepharose 4B and ECH Sepharose 4B .....	114
通过12-碳间隔臂偶联羟基、氨基或者巯基 .....	117
Epoxy-活化的 Sepharose 6B .....	117
通过巯基偶联 .....	121
丙基硫氧嘧啶 Sepharose 6B .....	121
通过其它功能基团偶联 .....	122

## 第六章

亲和色谱和Cipp.....	123
应用 Cipp.....	124
纯化技术的选择和组合 .....	124

## 附录 1 .....

样品准备 .....	128
样品稳定性 .....	128
样品澄清 .....	129

特殊样品的准备步骤 .....	130
蛋白质沉淀物的可溶性 .....	133
缓冲液的交换和脱盐 .....	133
脂蛋白的去除 .....	136
酚磺酞的去除 .....	136
低分子量污染物的去除 .....	136
<b>附录 2 .....</b>	<b>137</b>
纯化设备的选择 .....	137
<b>附录 3 .....</b>	<b>138</b>
柱子的装填和制备 .....	138
<b>附录 4 .....</b>	<b>140</b>
从线性流速(cm/hour)到体积流速(ml/min)和从体积流速到线性流速的转换 .....	140
<b>附录 5 .....</b>	<b>141</b>
数据转换: 蛋白质、柱压 .....	141
柱压 .....	141
<b>附录 6 .....</b>	<b>142</b>
氨基酸表 .....	142
<b>附录 7 .....</b>	<b>144</b>
亲和色谱的动力学 .....	144
<b>附录 8 .....</b>	<b>149</b>
纯化过程的分析 .....	149
<b>附录 9 .....</b>	<b>151</b>
生物样品的储存 .....	151
<b>产品索引 .....</b>	<b>152</b>
<b>补充材料 .....</b>	<b>153</b>
<b>参考 .....</b>	<b>153</b>
<b>排序 .....</b>	<b>154</b>

# 序言

根据生物分子特性的差异，使用纯化技术分离纯化生物分子，如下表所示

分子特性	纯化技术
生物性识别 (配基特异性)	亲和色谱法
电荷	离子交换色谱法
分子大小	凝胶过滤色谱法(有时称作排阻色谱法)
疏水性	疏水性相互作用色谱法
	反相色谱法

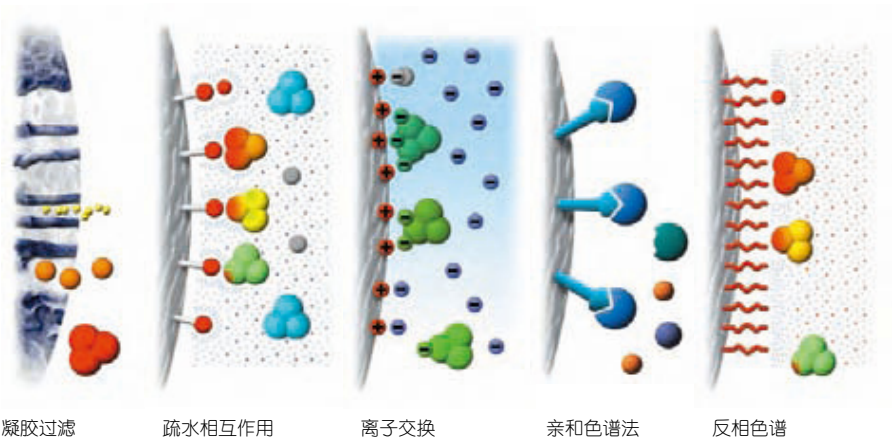


图. 1. 色谱纯化的分离原理

亲和色谱分离蛋白是以一个蛋白（或者一组蛋白）与特异性配基配对到色谱基质上，并且与配基具有可逆的相互作用为基础的一种纯化技术。这个技术具有高的选择性，因此可以达到高的分辨率，并且对于感兴趣的蛋白具有高的容量。纯化可以达到上千倍并且对活性物质的回收一般来说是非常高的。在所有的纯化技术中，亲和色谱是唯一的以生物分子的生物功能或者个体的化学结构为纯化依据，对生物分子进行纯化的方法。使用亲和色谱可以使纯化很容易进行，并且达到所要求的纯度，然而如果使用其它的纯化技术可能是很费时的，或者很困难或者用其它方法根本不可能对物质进行纯化。这项技术可以用于从变性的或者功能不同的形式中分离具有活性的生物分子，在大体积低浓度的原始样品中分离低浓度的纯物质并且也可以除去特殊的污染物。

GE Healthcare提供了宽范围的多种预装柱，可用于配基偶联的即时可用的介质和预活化介质。这一手册描述了亲和色谱在生物分子纯化中的作用、技术使用原则、可以使用的介质以及如何



选择它们、应用示例和普通操作步骤地详细的指导。为了获得最好的纯化效果，在手册指南中给出了实际操作的详细信息。在封面内的图解，说明了GE Healthcare出版的手册的使用范围，确保在任何规模和在任任何实验室，用任一色谱技术纯化成为一个简单和有效的步骤。

## 符号和缩写



这一符号表示一般的忠告，可以提高操作效率或者提供在特殊条件下对操作者的建议。



这一符号表示一个被认为是应该强制执行的忠告和应该特殊注意的警告。



这一符号强调解决问题的忠告，帮助分析解决可能出现的困难。



化学试剂、缓冲液和仪器设备、实验步骤。



PBS      磷酸盐缓冲液 (140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1.8 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.4 . ).

# 第一章

## 亲和色谱法简介

亲和色谱分离蛋白是以一个蛋白（或者一组蛋白）与特异性配基配对到色谱基质上，并且蛋白质与配基之间具有可逆的相互作用为纯化基础的。亲和色谱纯化在样品的捕获阶段或者中间产物阶段的纯化阶段是一个理想的技术，只要感兴趣的蛋白质有适宜的配基，就能够使用亲和色谱法纯化。由于亲和色谱法具有高的选择性，因此对感兴趣的蛋白质具有高的分辨率和高的容量，纯化水平可以达到几千倍，并且对活性物质可以获得很高的回收率。目标蛋白质最终以浓缩、纯化的形式被收集起来。目标蛋白质与配基之间的生物学相互作用，可能是由于静电学的相互作用或者分子疏水性的相互作用，范德华力和/或氢键结合力等产生的。由于亲和介质与目标分子之间的相互作用是可逆的，因此可以从亲和介质中将目标分子洗脱，或者是使用一个特异性竞争的配基，或者用非特异性洗脱，如改变pH值、离子强度或者极性。在一个单一的步骤中，使用亲和纯化能够节省大量的纯化时间，使用更少的纯化步骤。亲和纯化所具有的浓缩效果可以处理大体积的样品。使用亲和色谱可以使目标蛋白质从复杂的生物混合物中被纯化，将物质的天然形式从同样物质的变性的形式中分离，小量的生物性物质从高浓度的污染物中分离纯化。对于一个高纯度要求的纯化，或者对于一个没有适宜的配基进行亲和纯化的目标物，必须要使用捕获、中间产物纯化和精制三阶段纯化策略(Cipp)，形成一个有效的多步骤纯化流程。当使用这一纯化策略时，对于捕获阶段的纯化或者中间产物阶段的纯化，在任何纯化步骤中，亲和色谱纯化法都是非常理想的纯化方法，只要有针对感兴趣的蛋白质适宜的配基，就可以使用亲和色谱法纯化。成功的亲和纯化需要一个特异性的生物配基，并且可以共价的吸附到色谱基质上。共价结合的配基必须保持它对于目标蛋白的特异性亲和力和在洗涤掉非结合物质后，配基与目标蛋白质的结合必须是可逆的，可以使目标分子以活性的形式被移走。任何组分都可以被用作配基来纯化与它特异性结合的物质。一些典型的生物间的相互作用，经常被用于亲和色谱纯化，如下列所述：

- 酶 ⇌ 底物类似物，抑制剂，辅助因子。
- 抗体 ⇌ 抗原，病毒，细胞
- 凝集素 ⇌ 多糖类，糖蛋白，细胞表面受体，细胞。
- 核酸 ⇌ 互补碱基序列，组蛋白，核酸聚合酶，核酸结合蛋白
- 激素，维生素 ⇌ 受体、载体蛋白
- 谷胱甘肽 ⇌ 谷胱甘肽-S-转移酶或者 GST融合蛋白
- 金属离子 ⇌ 聚(His)融合蛋白，天然蛋白具有组氨酸，蛋白表面有半胱氨酸和/或色氨酸残基

亲和色谱法也可以用于特殊污染物的去除，例如，Benzamidine Sepharose™ Fast Flow 能够去除丝氨酸蛋白酶，例如凝血酶和凝血因子Xa。下图所示在亲和纯化中的关键阶段。

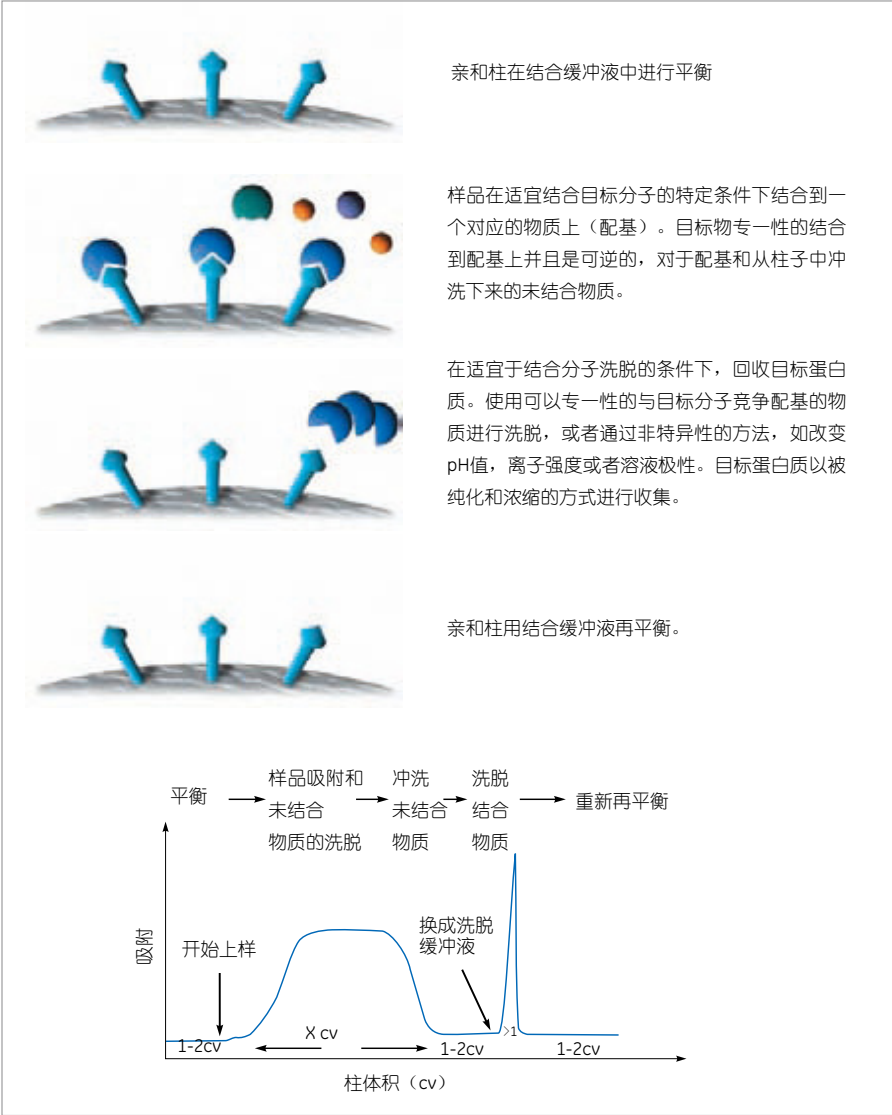


图. 2. 典型的亲和纯化

亲和色谱具有的高选择性，能够使许多物质的分离纯化在一步中完成，包括，例如，单克隆抗体的纯化或者融合蛋白的纯化等普通的操作。预装柱的多样性、即时可用的介质和通过不同的功能基团，用于偶联配基的预活化的介质，使亲和色谱纯化很容易适用于一个广阔的应用范围。就节省纯化时间而言，HiTrap™ column的适用范围（表1）对于常规实验室规模的应用和对于来自原始样品的纯化或者在扩大规模纯化前的快速纯化方法的研制，是非常适用的，在样品纯化过程中，必须去除两个样品间的交叉污染风险。HiTrap 柱子可以用一个注射器、一个蠕动泵或者任何ÅKTA™设计的色谱系统进行操作。一些HiTrap柱子能够相互连接来增加纯化的容量，所有被使用的柱子都有详细的使用说明。



表 1. 实验室规模应用的亲和色谱柱HiTrap和 HiPrep™

应用	HiTrap 和 HiPrep 柱子
分离人免疫球蛋白	
IgG, 片段 and 亚基	HiTrap rProtein A FF, 1 ml 和 5 ml
IgG, 片段 and 亚基	HiTrap Protein A HP, 1 ml 和 5 ml
IgG, 片段 and 亚基 包括人 IgG <sub>3</sub>	HiTrap Protein G HP, 1 ml 和 5 ml
具有强亲和性的鼠源性单克隆 IgG and大鼠 IgG	MABTrap™ Kit
来源于卵黄的禽类 IgY	HiTrap IgY 纯化HP, 5 ml
鼠和人的 IgM	HiTrap IgM 纯化 HP, 1 ml
融合蛋白的纯化	
(His) 融合蛋白	HisTrap™ Kit
	HiTrap 螯合 HP, 1 ml 和 5 ml
GST 融合蛋白	GSTrap™ FF, 1 ml 和 5 ml
	GSTPrep™ FF 16/10, 20 ml
其它具有专一性集团的介质	
白蛋白和需要核苷酸的酶	HiTrap Blue HP, 1 ml 和 5 ml
暴露组氨酸，半胱氨酸或者色氨酸的蛋白质和多肽	HiTrap 螯合 HP, 1 ml 和 5 ml
生物素酰化的物质	HiTrap 生物素蛋白链霉素 HP, 1 ml
DNA 结合蛋白质和凝血因子	HiTrap 肝素HP, 1 ml 和 5 ml
	HiPrep 16/10 肝素 FF, 20 ml
胰蛋白酶相似物、丝氨酸蛋白酶包括凝血因子Xa、	HiTrap 苯甲胍FF (high sub),
凝血酵素和胰岛素	1 ml 和 5 ml
基质，用于亲和介质的准备。通过伯胺进行偶联	HiTrap NHS-活化的 HP, 1 ml 和 5 ml

## 应用于大规模生产的BioProcess™介质

特殊的 BioProcess™ 介质已经被设计并应用于从捕获到精制的每一色谱阶段。将清晰的排序和日常的生产程序整合到大规模的生产中，保证 BioProcess 介质在正确的数量，正确的地方，正确的时间下是有效的。GE Healthcare 能够确保BioProcess 介质将来的供应，能够保证它们长期生产投资的安全性。介质是采用证明有效的方式进行生产的，在严格控制的条件下进行测试，能够达到很高的性能规范。每一批订购的分析证明书都是有效的。常规支持文件包含操做、稳定性、可提取化合物和分析方法的细节。在这些材料中的基本信息为工序验证提供了一个非常重要的开端，同样为调控专家提供了支持。在每一阶段都使用BioProcess介质，能够很容易的使处理方法有效。高流速、高容量和高回收率有利于产业化生产的整体经济。所有的BioProcess介质都具有化学稳定性，能够允许有效的净化处理和清洁卫生处理。建立的包装方法可以有效地适用于一个宽范围的纯化规模和兼容大规模的柱子和设备。更为详细的可以应用于大规模生产的产品和服务资料，请参考近期出版的来自GE Healthcare的 BioProcess 产品目录。

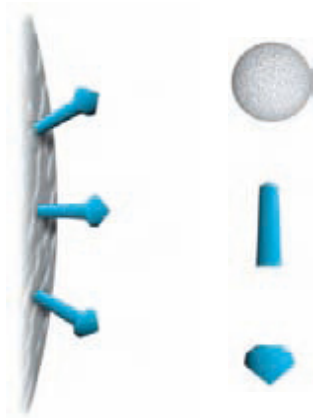


## 用户定制设计的介质和柱子

按照用户从GE Healthcare的目录中选择的柱子和介质定制的预装柱，能够从客户产品组获得供应。为了满足特殊的工业分离过程，但是适宜的介质又不能从标准化生产的产品目录中获得，客户设计的介质（CDM）可以通过客户产品组被制备。GE Healthcare 的CDM组队员与产品的使用者密切合作，设计、制造、测试和递送介质，用于特殊分离的需求。当一个色谱分离步骤作为生产过程的一个整体部分被研制，柱子的选择是非常重要的，确保整个过程的一致性和操作的可靠性。GE Healthcare对柱子的选择提供了很宽的选择范围，保证来自我们的纯化介质具有最高的性能和满足现代药物生产对纯度的要求。

更为详细的关于CDM产品和服务的信息请询问你所在地方的产品代表。

## 在亲和色谱中的通用术语



基质:使配基附着在基质上, 基质应该具有理化的惰性。

间隔臂:克服任何可能存在的空间位阻效应, 改善配基和目标分子的结合。

配基: 能够可逆的结合特定的目标分子或者目标分子基团的分子。

结合: 通过优化缓冲液条件, 确保目标分子和配基分子能够有效的相互作用, 同时目标分子能够很好的保留在亲和介质上而其它分子则流出色谱柱。

洗脱: 通过改变缓冲液条件使目标分子和配基间的结合反相(弱化), 达到目标分子可以从色谱柱上被洗脱下来。

冲洗: 利用缓冲条件冲洗除去未结合到色谱柱上的物质, 但是保留目标蛋白或者对色谱柱进行再平衡, 达到开始的条件(在大多数条件下结合缓冲液也被用于冲洗缓冲液)

配基偶联: 配基共价结合到一个适宜的经过预处理的基质上, 生成亲和介质。

预活化基质: 基质经过化学修饰后, 易于偶联特殊形式的配基。

# 第二章

## 亲和色谱的实际应用

本章所提出的指导和建议通常情况下可以应用于任何亲和纯化。要进行成功纯化的第一步是确定一个可以应用的适宜的配基，该配基应该可以与目标分子或目标分子基团进行可逆的相互作用。对于那些即时可用的亲和介质，通常会提供完整的分离步骤，并且这些分离纯化步骤已经经过很多次的验证。这本手册的目录部分按照分子的特性或者分子基团的特性列出了来自GE Healthcare亲和介质的全部适用范围。对于这些介质的专一性的应用和专一性的产品信息和建议在本手册的其它章节中给出。专门针对于使用预活化处理的基质准备亲和介质的实用信息，将在第五章有详细的介绍。

### 纯化步骤

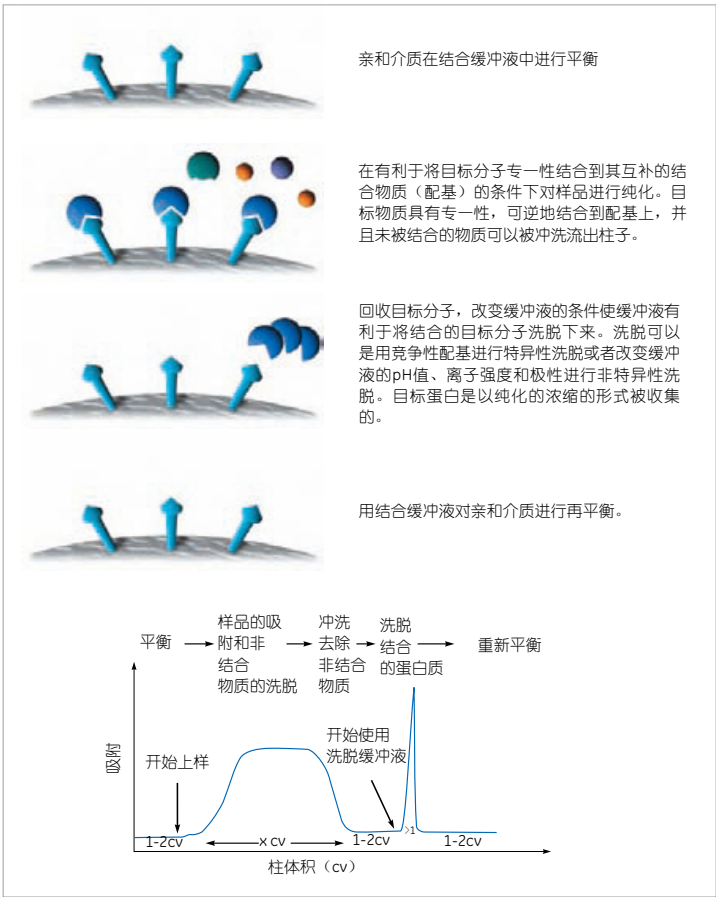


图 3. 典型的亲和色谱纯化

图4所示的是利用预装的HiTrap 柱子进行简单的亲和纯化步骤。

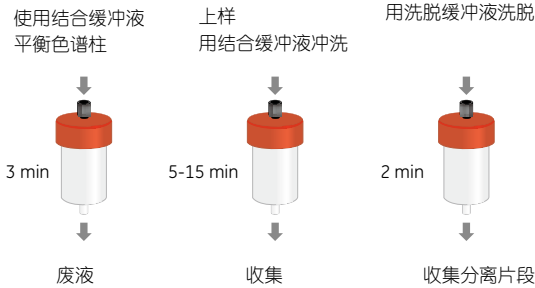






图. 4.

HiTrap 柱子可以和一个注射器、一个蠕动泵或者一个液相色谱系统（见附录纯化设备的选择）连接，并且提供一个详细的操作步骤保证得到最佳的结果。

### 介质的选择

选择已经将配基偶联到基质上的介质是最简单的途径。选择预装柱如HiTrap或 HiPrep A不仅更加方便，同时也节省时间，不必对它们进行方法的优化，因为这些柱子都有详细的优化操作指导说明。如果一个配基是适用的、有效的，但是需要将其偶联到预活化的基质上，请参考第五章。如果没有适宜的配基可用，那么我们需要决定是否有必要投入时间和精力来获得一个理想的配基并且研制出一个特异性的亲和介质。在许多情况下，使用其它可以选择的纯化技术例如离子交换技术或者疏水性相互作用色谱技术会更加方便的。

### 介质和缓冲液的准备

-  在使用任何亲和介质进行纯化时，亲和介质的存放液和防腐剂应该被彻底清洗掉。再溶胀亲和介质提供了存在于合适缓冲液的冻干粉末的形式，如指导说明所推荐的那样。
-  使用高质量的水和化学试剂。溶液应该用直径为0.45μm或者0.22μm的滤膜进行过滤。
-  亲和介质的再次使用取决于样品的天然特性，并且应该仅仅在加工处理同一样品时考虑使用，这样可以避免样品间的交叉污染。
-  如果常规的使用一个亲和介质，那么需要确保来自原样品中的任何污染物在操作中能够被去除，并且不会损坏配基。每一种亲和介质，结合和洗脱缓冲液是专一性的，因为缓冲液可以影响它们之间的相互作用，即目标分子和易于对该目标分子进行亲和分离的配基间的相互作用。一些亲和介质需要特殊的缓冲液为了使介质再次即时使用。避免使用磁力搅拌器，因为这样可以损坏基质。使用温和的转动混合或者上下颠倒混合。



## 样品制备和应用

样品应当被净化和去除颗粒物质。在开始纯化前用简单的步骤去净化样品将会避免在纯化过程中阻塞柱子，可以减少苛刻的冲洗步骤和延长色谱介质的使用寿命。在附件中有关于样品制备技术的概述。



如果可能的话，检测配基的亲合力：即与目标分子间的相互作用强度。太低的亲合力将会导致目标蛋白质的产量很低，因为目标蛋白很可能被洗掉或者从柱子中泄漏出去。太高的亲合力也会导致很低的产量，因为目标蛋白在洗脱过程中不能与柱子上的配基分离。



通过将样品调节到组成和pH值相同的结合缓冲液中，目标蛋白质的结合可能更有效：用脱盐柱进行缓冲液的交换或者用结合缓冲液中稀释样品（见133页）。当样品与亲和介质的相互作用非常弱时，很慢达到平衡，在上样完毕后停止流动一段时间是非常有用的，这样在用洗液冲洗柱子前，可以有更多的时间使目标蛋白和配基相互作用。在一些情况下，将样品分成几份分别上样是有利的。

在样品制备期间，应该确保样品中已知的对结合（目标蛋白和配基之间的相互作用）有干扰作用的组份被去除。

由于亲和色谱是一个结合技术，只要在选定的条件下能够保证目标蛋白很强的与配基结合，样品的体积不会影响色谱柱的分离效果。

在样品应用过程中，可能需要对样品的流速进行测试，特定的流速可以增加样品的结合效果，这一参数可以根据目标蛋白和配基之间专一性的相互作用和它们的浓度的不同而变化。

在开始上样前，色谱柱必须在结合缓冲液中进行预平衡。对于那些配基和目标蛋白之间存在很强的亲和相互作用的纯化，目标蛋白可以很快达到平衡，可以用很高的流量进行上样。然而，对于那些配基和目标蛋白之间的相互作用较弱的亲和纯化，目标蛋白与配基之间需要经过很慢的过程才能达到平衡，应该使用更低的流速上样。根据目标蛋白和配基之间专一性的相互作用，使目标蛋白能够有效的结合到配基上，样品的最佳流速是不同的，并且当必要的时候要决定采用什么样的样品流速最为适宜。关于目标蛋白结合到亲和柱上或者从亲和柱上洗脱下来更详细的动力学细节，参考附件。

当目标蛋白和配基之间的相互作用非常弱时，很慢才能达到平衡，那么在上样之后停止流速，让目标蛋白与亲和介质之间有更多的时间相互作用，然后再继续洗脱，是非常有用的。在一些案例中，将样品分成不同的等份，分别上样是有利的。



在所有的未结合的物质都被结合缓冲液冲洗出柱子后（由280nm的紫外吸光度决定），再开始对目标物质进行洗脱。这样将会提高被洗脱的目标物的纯度。

# 洗脱

对于所有的亲和介质而言，没有普遍适用的洗脱方案。参考操作指南，科学文献和一些简单的原理，这样可以形成一个有效的洗脱方法，对目标蛋白进行洗脱并浓缩。洗脱方法可以是选择性的也可以是非选择性的，如图5所示。

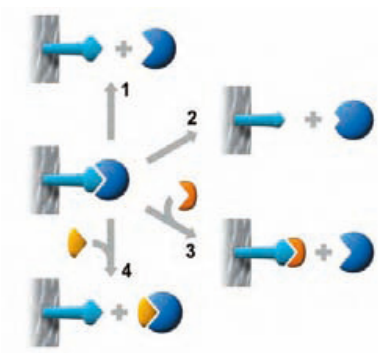


图. 5. 洗脱方法

当目标物质与亲和介质的结合非常紧密时，在开始进行洗脱后（经常在10分钟到2小时之间），停止流动一段时间可能会很有用，然后继续进行洗脱。这样将会有更多的时间使目标蛋白与配基之间解吸附，可以提高结合物质的回收率。

选择性洗脱方法适用于特异性基团配基的解吸附，而非选择性洗脱方法经常用于洗脱那些结合到具有很高的特异性配基物质的洗脱。注意那些维持复合物存在的静电相互作用、疏水性相互作用和氢键的力。能够减弱这些力的相互作用的因子可以被期望用作有效的洗脱因子。

达到有效洗脱的最佳流速可以是不同的，这主要依据目标物质与配基之间的相互作用，当需要的时候应该确定最佳洗脱流速。关于目标蛋白结合到亲和柱上或者从亲和柱上洗脱下来更详细的动力学细节，参考附件。

在需要用条件苛刻的洗脱液对目标物进行洗脱，和被洗脱物质有变性的危险或者对亲和介质上的配基有伤害作用，两者之间产生一个折中的方案。GE Healthcare提供即时可用的亲和介质并且附带推荐的最适宜的洗脱缓冲液来逆转配基和目标蛋白间的特异性的相互作用。每种推荐条件是以下列洗脱方法中的一种为依据的：

## 方法1

最简单的例子. 缓冲液组分的改变可以洗脱结合到柱子上的物质同时不会对目标物质或者配基产生伤害。

## 方法2

在洗脱过程中需要极端pH值或者高浓度的促溶剂，但是这些可能会导致目标物质或者配基产生永久的或者短暂的损害。

## 方法3和4

通过加入某一物质与已经结合在配基上的目标物质竞争结合配基位点。这些方法可以增强用作特异性基团配基的介质的特性。

## pH 值洗脱

pH 值的变化可以改变带电荷的配基基团和/或结合蛋白的离子化程度。这一改变或许可以直接影响它们的结合位点，降低它们之间的亲和性，或者通过改变构象导致间接的改变它们之间的亲和性。

通过降低pH值洗脱结合的目标物质是最经常使用的方法。基质的化学稳定性、配基和目标蛋白共同决定所使用的洗脱缓冲液的 pH值的范围。



如果必须使用低的pH值，将片段收集到中和缓冲液中，例如 1M Tris-HCl, pH9( 60– 200  $\mu$ l 每毫升洗脱的片段)，使片段还原到中性的pH范围。色谱柱也应该立即平衡到中性pH值范围。

## 离子强度洗脱

通过改变离子强度进行洗脱的确切机制取决于配基和目标蛋白之间的特殊的相互作用。这是一个温和的洗脱方法，使用逐渐增加的离子强度缓冲液（一般用氯化钠），一般在洗脱中用线性梯度洗脱或者阶梯式洗脱。



酶经常在浓度为1M或者更低的氯化钠溶液中洗脱。

## 竞争性洗脱

选择性的洗脱经常用于分离一组特殊的培养基物质或者当配基/目标蛋白的亲合力相对较高时。洗脱剂或是与目标蛋白竞争结合配基的位点或者与配基竞争结合目标蛋白的结合位点。目标物通过单一的浓度梯度被洗脱或者通过阶梯式进行洗脱，见22页。



当用竞争的方式进行洗脱时，竞争化合物的浓度应该与配基的浓度相似。然而，如果竞争的化合物与配基的结合力比目标分子与配基的结合力更弱时，应该使用高于配基浓度十倍的竞争化合物的浓度进行洗脱。

## 降低洗脱液的极性

在更低的洗脱液极性的条件下对目标物洗脱，可以有助于目标洗脱物不失活。二氧杂环己烷（10%）或者乙二醇（50%）是典型的这一类型的洗脱液。

## 促溶洗脱

如果其它的洗脱方法都失败了，使用改变的缓冲液形式，可以使蛋白结构发生改变，例如促溶剂，如盐酸胍、尿。如果能够用其它的方法进行洗脱，因该尽量避免使用促溶剂，因为它可能使洗脱的蛋白发生变性。

梯度和阶梯式洗脱

图6所示是样品进行阶梯式洗脱或者梯度洗脱的条件。对于预装亲和柱HiTrap，提供预先设定的洗脱条件，对于一步洗脱可以使用简单的注射器。HiTrap 柱子也能够用于色谱系统，如ÅKTAprime plus 。当需要进行梯度洗脱时，必须使用色谱分离系统。

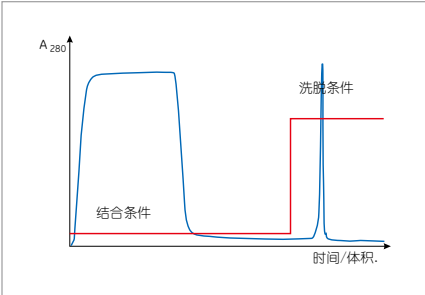


图. 6a. 梯度洗脱

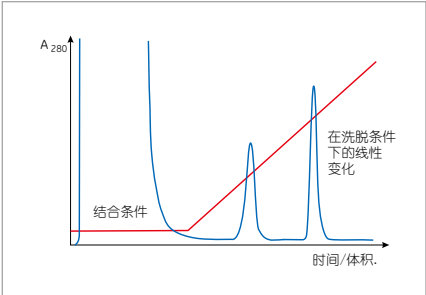


图. 6b. 线性洗脱

对亲和纯化进行研制和优化时，使用梯度洗脱，并进行扫描，选择最佳的结合和洗脱条件。如图7和图8所示。

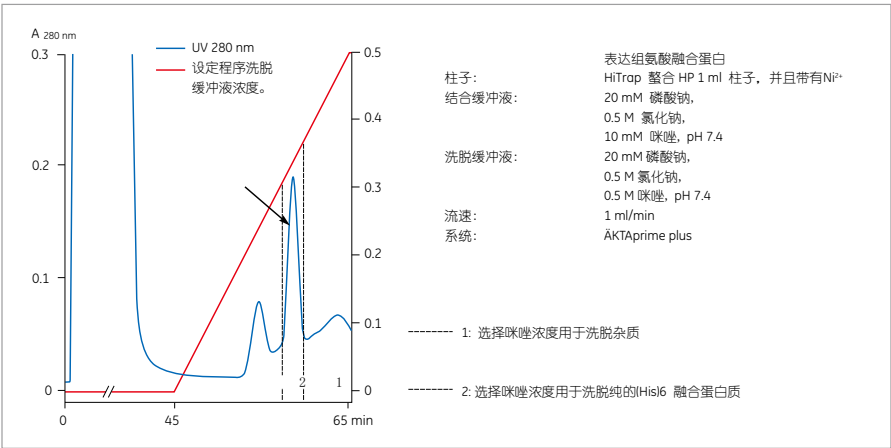


图. 7. (His) 6融合蛋白的梯度洗脱

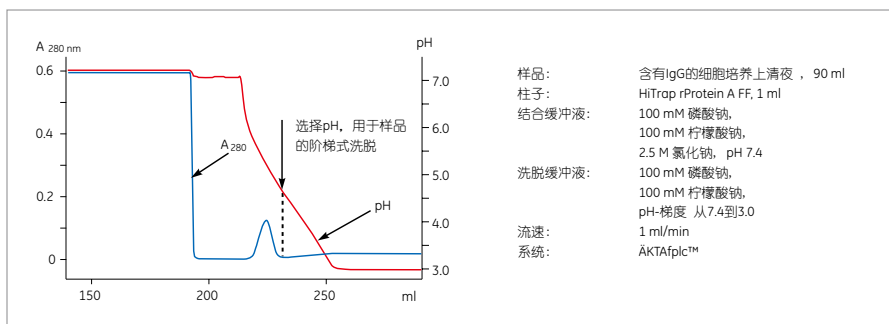


图. 8. 用HiTrap rProtein A FF 对单克隆抗体IgG1洗脱, 使用pH 梯度洗脱, 监测最佳的洗脱pH 条件.

## 流速

在亲和色谱中指定单一的优化的流速是不可能的, 因为配基与目标分子相互作用的解离速率差异非常大。

对于即时可用的亲和介质应该按照手册指南和在必要条件下进行进一步的优化:

- 决定最佳的上样速率达到有效的结合
- 决定最佳的洗脱速率达到对目标蛋白的最大化的回收
- 决定最大的速率使柱子再平衡, 使总运行时间最短。

为了获得锐利的洗脱曲线和最大化的回收率, 并且使被分离的分子达到最小程度的稀释, 使用最低的可以接受的速率。

## 结果分析和进一步处理步骤

从第一次分离结果的分析能够指示是否需要纯化步骤进行完善来提高产量、达到更高的纯度、提高分离速率或者在一次的运行过程中增加样品上样量。通常使用的分析方法在附录8中列出。

在完成任何亲和纯化步骤后经常推荐使用另外一种纯化技术, 例如高分辨率的凝胶分离技术, 去除可能存在的凝聚物或者从介质上脱落下来的配基。例如, Superdex™可以根据分子的大小对不同的分子进行分离, 并且将样品转移到储存缓冲液中, 去除多余的盐和其它小分子物质。被纯化样品的均一性将会由色谱图给出。

另外, 脱盐柱的分辨率很低, 但是具有较高的样品容积, 能够被用于将样品快速转移到储存缓冲液中和去除多余的盐类。(见133页)

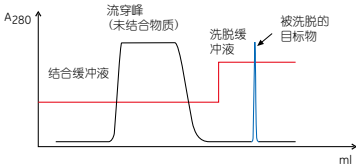
## 选择设备

附录2给出了纯化系统选择指南

解决问题

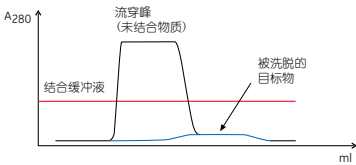
本章主要针对在运行色谱柱时可能会出现的问题。下面的图表给出的是在亲和纯化过程中，一个色谱图是如何偏离理想状态的，并且需要采取什么样的措施能够提高纯化结果。

目标物的洗脱形成一个尖锐峰，可以获得令人满意的结果



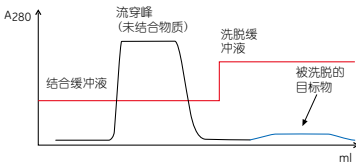
- 当获得上述令人满意的结果时，如果不能维持目标物的生物活性或者很难维持目标物的生物活性，可以使用新的洗脱条件或者必须找到一个新的配基
- 如果使用低的pH值洗脱，应该在中和缓冲液中收集片段 (60–200 μl 1M Tris-HCl, pH 9.0 per ml 洗脱的片段)。

当使用结合缓冲液洗脱时，目标物形成一个宽的低峰



- 寻找更好的结合条件

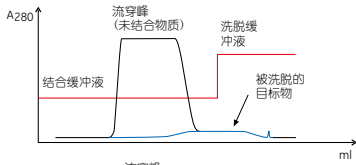
目标物的洗脱形成一个宽的低峰



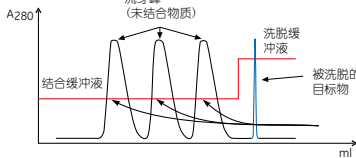
- 试着使用不同的洗脱条件
- 如果使用竞争性洗脱，增加洗脱缓冲液中竞争物的浓度
- 在洗脱期间停止流速，使目标分子有足够的时间进入到洗脱缓冲液中，并且脉冲式的收集目标蛋白。（参考下面的第二个图）

注意：如果目标蛋白已经变性和聚集到柱子上或者存在非特异性结合，也可能出现这个结果。

一些目标分子的洗脱会出现一个宽的低峰，但是目标分子仍然在结合状态之下，



- 提供足够的时间让样品结合到柱子上或者等分样品上样，在两次上样之间停止流速几分钟。（见下面的第二个图）



情况	原因	补救措施
蛋白不结合或者不能按照期望的那样被洗脱	样品没有被适当的过滤	清洗柱子、过滤样品、重复操作 制备新鲜的样品
	在储存期间样品发生了改变 样品的pH值不对或者缓冲液不对 条件不正确. 溶液的pH值不对. 色谱柱没有被平衡在充足的缓冲液中 蛋白或者配基已经沉淀到色谱柱上 上样过多使色谱柱超负荷 在色谱柱中出现了微生物 在色谱柱滤膜中发生蛋白的沉淀和/或在柱床顶端发生蛋白沉淀	使用脱盐柱将样品转移到正确的缓冲液中（见133页） 用pH计进行校正，准备新的溶液并再次试验。  重复或者延长洗脱步骤。 对色谱柱进行净化和再生或者使用一个新的色谱柱。 减少上样量。 微生物的生长在柱子的使用过程中很少发生，但是为了预防预制柱生长微生物，当条件允许时，柱子应该在20%的乙醇缓冲液中存放。净化柱子交换或者净化滤膜，或者使用新的色谱柱。
活性物质低的回收率， 但是对蛋白质而言， 回收率正常.	蛋白质可能不稳定或者 在洗脱液中没有活性 将酶从辅助因子或者相似物中分离	确定pH 值和蛋白在盐溶液的稳定性。  用具有中和性质的缓冲液如1 M Tris-HCl, pH 9(60–200 µl 每部分) 收集分离得到的片段。 将收集到的片段混合进行测试并且重复分析
比预期的产量更低。	蛋白质可能已经被蛋白酶变性	向样品中加入蛋白酶抑制剂和缓冲液，防止蛋白质降解。 样品在苯甲胍4等介质中快速流过柱子，去除丝氨酸蛋白酶。 使用其它类型的滤膜。
	在样品制备期间吸附到过滤器上 样品沉淀  疏水性蛋白. 蛋白仍旧附着在配基上	可能是因为去除盐类或者在不适宜的缓冲条件下引起的。使用促溶剂，极性还原剂或者去污剂。
比上样钱有更多的活性蛋白 恢复	在采取色谱分离步骤之前或者之后 试用不同的分析条件， 在分离过程中去除抑制因子	在纯化方案设计中使用同样的分析条件进行分析
经过柱子的流速不合适	存在脂类蛋白或者蛋白聚集物 在分离过程中，蛋白由于去除剂或者稳定剂的影响沉淀到色谱柱上。 适配器或者管道的末端阻塞	在样品制备期间去除脂蛋白和聚集物（见附录1） 对洗脱液进行修改，维持洗脱液的稳定性  替换滤膜或者使用一个新的柱子。 在使用前过滤样品和缓冲液。 去除杂质、净化柱子或者使用新的柱子。
	沉淀的蛋白  柱床被压缩  微生物生长	使用推荐的方法净化柱子或者使用新的柱子。 如果可能的化重新装柱子或者使用新的柱子。 在色谱柱使用期间，微生物很少在柱子中生长，但是要防止柱子在存放期间感染。如果可能的话，柱子应该放在20%的乙醇溶液中存放。

情况	原因	补救措施
在一次运行或者连续运行过程中有反压	混浊的样品	改善样品的制备质量（见附录1） 通过添加聚乙二醇、去污剂和有机溶剂改善样品的可溶性。
	蛋白在柱中、滤器和柱床顶端沉淀。	用推荐的方法净化柱子。交换或者净化滤膜或者使用新的柱子。包括任何添加剂在内的，在样品开始期间使用的增加样品在溶液中的可溶性，用于色谱纯化。
在柱床上有气泡。	柱子的填充或者储存应该在低温下使用时预热到室温	使用脱气的缓冲液向上流过柱子去除小的气泡 如果缓冲液在柱子存放到冰箱或者冷室后使用，应该特别小心。 不能让柱子置于阳光下使柱子升温或者加热使柱子升温。 如果可能的话，重新装柱子。（见附录3） 缓冲液完全脱气。
	缓冲液没有适当的除气	
柱床上产生裂缝。	大量气体进入柱子	检查所有的联接点是否有泄漏。 如果可能的话重新装柱子。
当样品流入柱床时产生扭曲的条带	在柱子上端的气泡或者在适配器的进气口有气泡。缓冲液中有颗粒、在适配器上端的滤网有阻塞或者损坏。	重新安装适配器，应该小心避免气泡。 对样品过滤或者离心。 防止缓冲液污染灰尘。 拆出适配器设备，净化或者替换滤网。 去除样品和洗脱液中的颗粒。
当样品流过柱床时产生扭曲的条带	柱子的填充质量差。	悬浮液太粘稠或者太稀薄。在一个温度下填充的柱床与运行不同。 柱床不够填充（太低的填充压力，太短的平衡） 柱子在很高的压力下进行填充。



# 第三章

## 具有特异性基团的分子的纯化

一组特异性的介质与一组相关的物质具有亲和力，而不是对于一个单一形式的分子。同样的配基可以被用于纯化几种物质（例如一类酶），不需要为这一组物质中的不同成分而分别准备新的介质。在每一组内的不同物质，或者在结构上或者在功能上是相似的。亲和介质的特异性是来自配基的选择性和选择性的应用洗脱条件。

### 免疫球蛋白

抗体与抗原相互作用的多样性使抗体和抗体片段产生多种用处。抗体和抗体片段被用于治疗 and 诊断，同样也用于免疫化学技术等广泛的研究。重组技术的使用大大扩展了我们的能力，按照有利于我们的方向来操纵这些分子的特性。在免疫球蛋白和带有标记的免疫球蛋白片段和其它被选择的蛋白之间，存在创造无穷数量的重组体的潜在能力。对于纯化抗体和它们的片段的一个显著的优势在于目标分子和主要的污染物的特性的大量信息是有效的，无论分子是在它天然的状态或者已经经过遗传工程重组和无论来源于什么样的物质。

这本《抗体纯化手册》来自GE Healthcare，呈现给读者针对样品的制备和实验室应用的许多抗体和抗体片段的不同形式的纯化，提供最有效的和最经常用的纯化策略。这本手册也包含有关于抗体结构的更为详细的信息和分类，图9和图10是关于抗体的简要的图解说明

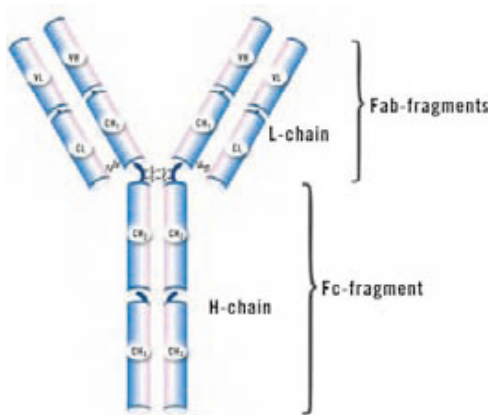


图. 9. H2 L2 典型的免疫球蛋白的结构。

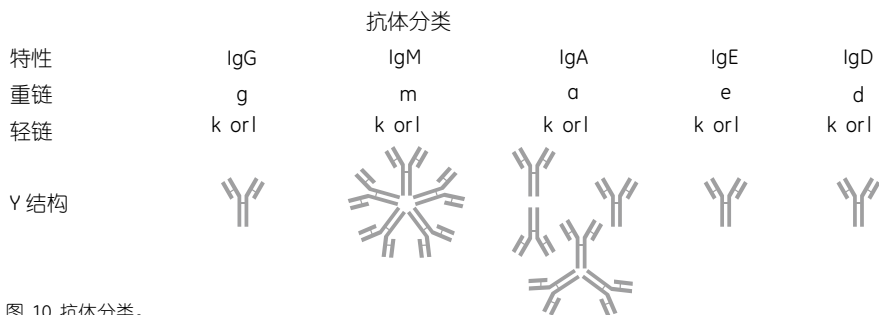


图. 10. 抗体分类。

## IgG, IgG 片段和亚类

纯化IgG, IgG 片段和亚类的基础是蛋白A和蛋白G对IgG-类型的多克隆抗体和单克隆抗体的Fc段具有很高的亲和力。见图9。

蛋白A和蛋白G来源于细菌蛋白(分别来自金黄色葡萄球菌和链球菌), 当它与Sephrose偶联时, 产生非常有用的, 非常易于使用的介质, 用于常规的纯化。使用的例子包括IgG-型的单克隆抗体的纯化, IgG 亚类的多克隆抗体的纯化和包括IgG. IgG 亚类免疫复合物的吸附和纯化, 能够使上述抗体从腹水中、细胞培养上清和血清中分离出来。

表2所示的是关于蛋白A和蛋白G对于不同的免疫球蛋白相对结合力的一个比较, 这一比较的数据来自不同的文章。

关于这一内容的一个有用的参考资料也包括: 链球菌蛋白G结合区的结构, EMBO J., 5,1567-1575 (1986)。



结合力是用游离的蛋白A 或者蛋白G来进行测试的, 这一结果可以用作预测蛋白A 或者蛋白G亲和介质结合行为的指导。然而, 当结合到亲和基质上, 物质间的相互作用可能会改变。例如, 兔子的IgG 不能结合蛋白A, 但是可以结合到蛋白A Sepharose 上。

表 2. 蛋白A和蛋白G 对不同的免疫球蛋白的结合力。没有结合力: -, 相对结合力: +, ++, +++, +++++.

免疫球蛋白来源	亚类	结合力	结合力
人类	IgA	可变的	-
	IgD	-	-
	IgE		
	IgG <sub>1</sub>	++++	++++
	IgG <sub>2</sub>	++++	++++
	IgG <sub>3</sub>	-	++++
	IgG <sub>4</sub>	++++	++++
禽类蛋黄	IgM*	可变的	-
	IgY**	-	-
牛		++	++++
狗		++	+
羊		-	++
豚鼠	IgG <sub>1</sub>	++++	++
	IgG <sub>2</sub>	++++	++
地鼠		+	++
马		++	++++
考拉		-	+
美洲驼羊		-	+
猴子 (恒河猴)		++++	++++
鼠	IgG <sub>1</sub>	+	++++
	IgG <sub>2a</sub>	++++	++++
	IgG <sub>2b</sub>	+++	+++
	IgG <sub>3</sub>	++	+++
	IgM*	可变的	-
猪		+++	+++
兔	没有差异	++++	+++
大鼠	IgG <sub>1</sub>	-	+
	IgG <sub>2a</sub>	-	++++
	IgG <sub>2b</sub>	-	++
	IgG <sub>3</sub>	+	++
羊		+/-	++

\* 使用HiTrap IgM 纯化HP 柱子纯化

\*\* 使用HiTrap IgY 纯化 HP柱子纯化






依据Fc区域的特异性结合单一步骤的纯化将使宿主IgG类蛋白和微量的血清蛋白发生共纯化。要避免宿主IgG蛋白微量的污染，考虑选择其它技术，例如免疫特异性亲和（使用抗宿主IgG抗体作为配基来去除宿主IgG或者使用目标特异性抗原来避免宿主IgG的共纯化），离子交换或者疏水相互作用色谱（见第六章）。



蛋白A和重组蛋白A 都是可用的，对于IgG的Fc区域都具有相似的特异性。重组蛋白A通过基因工程生产，包含一个C-端的半胱氨酸，可以通过单点偶联到Sepharese上。单点偶联经常可以增强结合容量。遗传学上的基因工程抗体和抗体片段能够改变物质的生物学特性，也能够通过物质特性的改变，使纯化更为容易。例如，“tag”能够引入到目标分子中，使以前没有亲和介质的目标分子，通过融合一个可以有效地进行亲和纯化的蛋白，使目标分子能够有效的利用亲和色谱进行纯化。如何对被标记蛋白进行纯化，在重组融合蛋白章节中有详细说明。见本手册第42页。关于重组蛋白纯化的一般信息，请参考“重组蛋白质手册：蛋白质扩增和简单纯化”和来自GE Healthcare的“GST融合系统手册”。

## HiTrap 蛋白 G HP, 蛋白 G Sepharose 4 Fast Flow, MAbTrap Kit

蛋白质G, 来自G链球菌组的细胞表面蛋白, 是III Fc-受体型蛋白。蛋白质G通过非免疫机制结合抗体的Fc区域。如同蛋白A一样, 蛋白质G 特异性的结合IgG的Fc区域, 但是对于一些多克隆抗体IgGs (表2) 对人源的IgG抗体能够有更强的结合。在标准缓冲液条件下, 蛋白质G能够结合所有人源性的亚类抗体和所有鼠源性的IgG亚类抗体, 包括鼠的IgG。蛋白质G也能够结合兔的IgGa和IgGb, 这两种蛋白质与蛋白质A的结合或者很弱, 或者根本不结合蛋白质A。GE Healthcare 提供了蛋白质G的重组形式, 将蛋白质G中天然的与白蛋白结合的区域被从遗传学上删除, 因此可以避免与白蛋白发生不希望的反应。重组蛋白质G包含有两个Fc结合区域。

-  使用蛋白质G Sepharose 对于普通的抗体捕获是一个更好的选择, 因为它能够结合来自真核生物的更宽的IgG范围和结合更多的IgG类型。一般情况下, 蛋白质G对IgG比蛋白质A有更强的亲和力和显示出与白蛋白有更小的结合力, 最终能制备出纯度更高的样品和得到更高的产量。蛋白质G 对于IgG的结合力取决于种属的来源和免疫球蛋白的亚类。动态的结合容量取决于结合力, 同时也取决于其它的一些因素, 例如在上样过程中的流速。
-  许多抗体也通过Fab区域相互作用, Fab区域与蛋白质G有较低的亲和力位点。蛋白质G没有显示出能够结合人类骨髓瘤IgM, IgA 或者 IgE的特性, 尽管其中的一些能够很弱的结合到蛋白质A上。
-  配基从亲和介质上泄漏是经常可能发生的事情, 特别是如果用很苛刻的洗脱条件对样品进行洗脱。蛋白质G通过多位点吸附到Sepharose 上, 能够在很宽的洗脱条件范围内将蛋白质G的泄漏降到最低的水平。

### 蛋白质纯化选项

	结合容量	最大操作流速	注释
HiTrap	人 IgG, > 25 mg/柱子	4 ml/min (1 ml 柱子)	IgG的纯化, IgG片段和亚类的纯化fragments and 包括人的IgG <sub>3</sub> 。 对于小鼠的IgG <sub>1</sub> 和大鼠的IgG有强的亲和性 预装柱。 IgG、片段和亚类的纯化,包含人的IgG <sub>3</sub> 。 对小鼠的IgG <sub>1</sub> 和大鼠的单克隆抗体有很强的亲和作用。 完整的试剂盒含有HiTrap Protein G HP (1 x 1 ml), 配件, 预制缓冲液可以进行10次纯化, 并且含有详细的实验步骤。
Protein G HP	人 IgG, >125 mg/柱子	20 ml/min (5 ml 柱子)	
MAbTrap Kit	人 IgG, > 25 mg/柱子	4 ml/min	
Protein G Sepharose 4 Fast Flow	人 IgG, > 20 mg/ml 介质 牛 IgG, 23 mg/ml medium 山羊 IgG, 19 mg/ml medium 豚鼠 IgG, 17 mg/ml medium 小鼠 IgG, 10 mg/ml medium 大鼠 IgG, 7 mg/ml medium	400 cm/h*	提供可以用于装柱的混悬液

\* 见附录4, 将线性流速转换成体积流速。最大的操作流速是通过测量带有柱床的10cm高和5cm直径的装填好的柱子, 经过计算而获得的。

纯化示例

图11所示的是小鼠单克隆抗体IgG的纯化，使用HiTrap Protein G HP 1ml柱子。被纯化的单克隆抗体来自杂交瘤细胞的培养上清液。

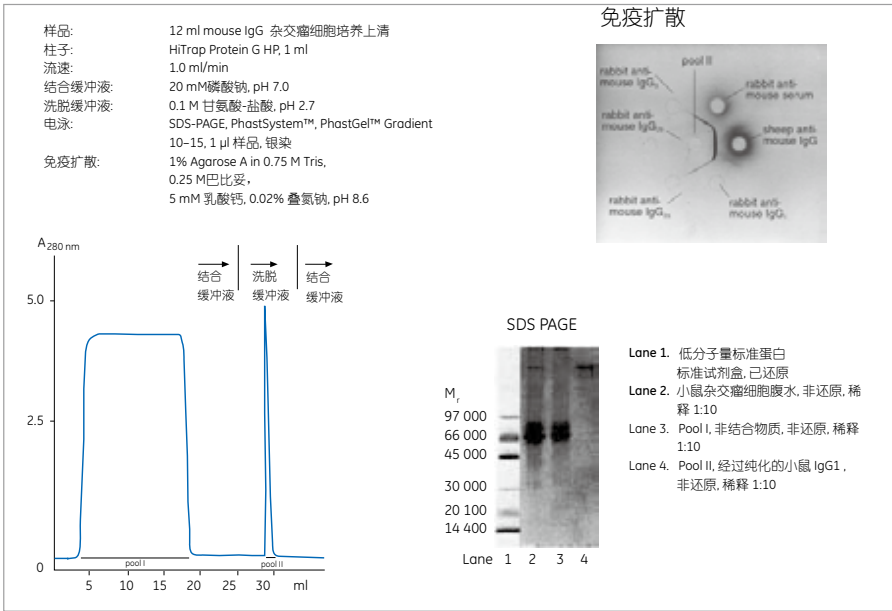


图. 11. 小鼠单克隆抗体IgG的纯化，使用HiTrap Protein G HP 1ml柱子。

图12所示的是重组小鼠Fab 片段的纯化，用E. coli 表达，用蛋白质G Sepharose 4 Fast Flow 。嵌合抗体、非免疫原性的“人源化”小鼠Fab, Fab’ 和 Flab’ 12片段在肿瘤治疗领域能够引起很大的兴趣，因为它们与完整大小的抗体分子相比较，能够更加快速的穿透肿瘤细胞，并且也能够很快的从血液循环中被去除掉。

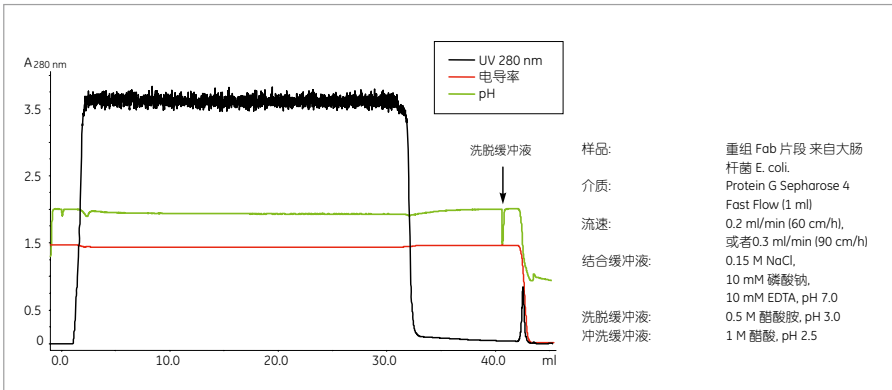



图. 12. 重组Fab片段的纯化，Fab 片段直接针对HIV 的包膜蛋白gp120 （抗-gp120 Fab），在E. coli表达


## 进行一个分离操作


柱子:	HiTrap Protein G HP, 1 ml 或者 5 ml
推荐的流速:	1 ml/min (1 ml 柱子)或者5 ml/min (5 ml 柱子)
结合缓冲液:	0.02 M 磷酸钠, pH 7.0
洗脱缓冲液:	0.1 M 甘氨酸-盐酸, pH 2.7
中和缓冲液:	1 M Tris-HCl, pH 9.0


 样品离心 (10 000 g 离心10分钟) 去除细胞和细胞碎片。将离心下来的上清经过一个0.45μm 的滤膜过滤。如果需要的话, 将样品状态调整到适宜的pH值和离子强度的结合缓冲液中, 可以通过脱盐柱进行缓冲液交换或者通过样品稀释和pH值调整。(见第133页)。


1. 用5倍柱体积的结合缓冲液平衡柱子。
2. 上样。
3. 用5-10倍柱体积的结合缓冲液冲洗柱子, 去除杂质和未结合到柱子上的物质。继续冲洗柱子直到在洗脱液中不能检测出蛋白质为止 (用紫外检测器在280nm波长检测)。
4. 用5倍柱体积的洗脱缓冲液进行样品的洗脱\*。
5. 立即用5-10倍柱体积的结合缓冲液重新平衡柱子。


\*如果洗脱条件非常粗糙, 推荐使用中和缓冲液收集片段(60 μl – 200 μl 1 M Tris-HCl, pH 9.0每毫升馏分)因此最终的片段的pH值大约为中性的。

 来自多数物种的IgGs 和亚类, 在接近生理pH值和离子强度的条件下, 可以结合到蛋白质G上。对于来自特别物种IgG的最佳的结合条件, 应该查阅近期的文献, 可以获得有价值的信息。如果蛋白质和配基之间的相互作用较弱, 应该避免过度的冲洗, 因为这样可能会减少最终的产量。

 当pH值为2.7或者低于2.7时, 大多数种类的免疫球蛋白才能从蛋白质G Sepharose 上被洗脱下来。如果由于洗脱液需要更低的pH值进行洗脱, 使得抗体或者抗体片段的生物活性丧失, 试着用蛋白A Sepharose进行亲和纯化, 洗脱的pH值可能会更加缓和。

 脱盐和/或将纯化好的IgG片段用脱盐柱转移到更加适宜的缓冲液中 (见133页)。

 蛋白质G Sepharose 的再生取决于样品的特性并且应该考虑当处理同样的样品时要避免发生交叉污染。

 要增加容量, 可以将几个HiTrap 蛋白质 G HP 柱子 (1ml或者5ml) 连接。  
HiTrap柱子能够与注射器一起使用, 或者蠕动泵或者连接到液体色谱系统, 例如 ÄKTAprime plus. 用蛋白质G Sepharose 4 Fast Flow 装填一个更大的柱子来获得更大的容量 (见附录3)

MABTrap Kit



图. 13. MABTrap Kit, 即时可用。

MABTrap Kit 包含有一个 HiTrap 蛋白质G HP 1ml 柱子,结合缓冲液的储存液,洗脱缓冲液和中和缓冲液，一个带有配件的注射器和优化好的纯化步骤，如图15所示。试剂盒包含有足够的材料，使用一个注射器，能够进行20次的单克隆抗体和来自血清的多克隆抗体IgG 的纯化，或者对来自细胞培养上清，或者腹水中的IgG 抗体进行纯化。亲和柱也能连接到蠕动泵上，如果那是首选的话。图14所示的是一个用注射器对来自细胞培养上清的小鼠单克隆抗体IgG<sub>1</sub>纯化的结果和用蠕动泵进行相似纯化的结果。洗脱下来的片段用SDS-PAGE分析，如图15所示。

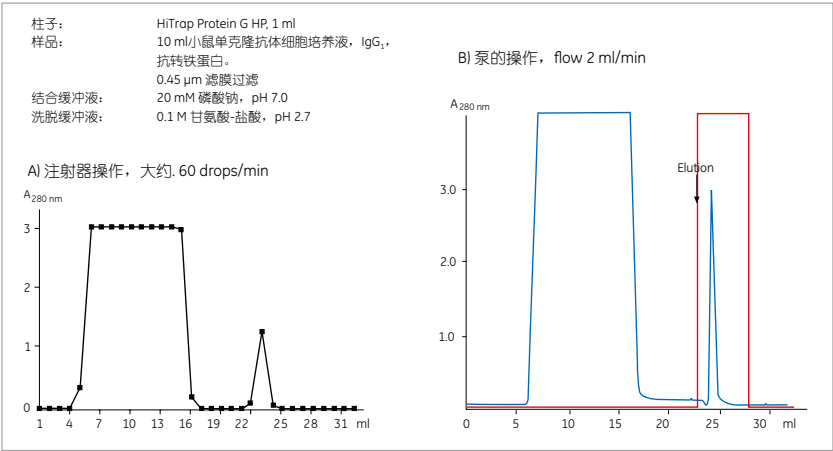


图. 14. 来自细胞培养液上清的小鼠单克隆抗体IgG<sub>1</sub>的纯化。A. 用注射器操作 B. 用蠕动泵操作

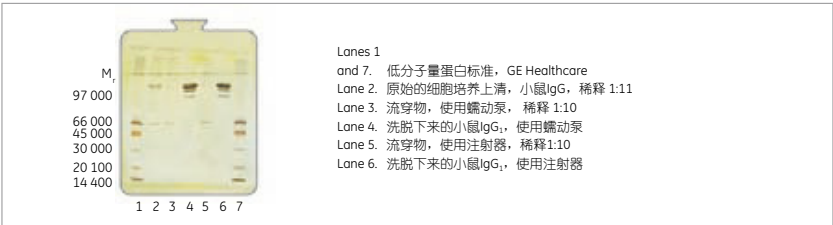


图. 15. SDS-PAGE 在 PhastSystem 使用 PhastGel 10-15，非还原的，并且使用银染

## 进行分离操作

柱子:	HiTrap Protein G HP, 1 ml
推荐的流速:	1 ml/min
结合缓冲液:	10倍稀释缓冲液浓度
洗脱缓冲液:	10倍稀释缓冲液浓度
中和缓冲液:	在收集IgG馏分的试管中加入中和缓冲液，每毫升馏分加入60–200 $\mu$ l 中和缓冲液



离心样品 (10 000 g 离心10分钟) 去除细胞和细胞碎片。将上清液通过0.45 $\mu$ m的滤膜进行过滤。如果需要的话，利用脱盐柱进行缓冲液交换 (见133页) 或者稀释缓冲液并调整缓冲液的pH值，将样品溶液调整到适宜的pH值和离子强度的结合缓冲液中。



图. 16. 使用带有注射器的HiTrap Protein G HP柱子。A:稀释缓冲液并且准备样品。去除柱子顶部的盖子并且在末端扭断。B:平衡柱子，加载样品和开始收集片段。C:冲洗和洗脱，连续收集片段。

1. 将柱子和缓冲液预热到室温状态。
2. 稀释结合缓冲液和洗脱缓冲液。
3. 使用luer 适配器将注射器连接到柱子上。
4. 用5ml蒸馏水平衡柱子，接下来用3ml稀释的结合缓冲液平衡柱子。
5. 上样。
6. 用5-10ml稀释的结合缓冲液冲洗柱子，直到在洗脱液中检测不出任何物质。
7. 用3-5ml稀释的洗脱缓冲液洗脱。将碎片收集到中和缓冲液中。
8. 立即用5ml稀释的结合缓冲液再次平衡柱子。



介质特性

	配基密度	组成	pH 稳定性*	颗粒平均大小
HiTrap Protein G HP (MABTrap Kit)	2 mg/ml	配基通过N-羟基琥珀酰亚胺 连接到Sepharose HP (通过烷基胺和醚键能够稳 定附着在基质上)。	长期 3-9 短期 2-9	34 µm
Protein G Sepharose 4 Fast Flow	2 mg/ml	配基通过溴化氢活化能够附着 在Sepharose 4 Fast Flow	长期 3-9 短期 2-10	90 µm

\* 长期是指pH的间隔范围，在这一范围内，介质经过长期的存放仍然是稳定的，对于随后进行的色谱操作没有任何不利的影响；短期是指pH在介质的再生、净化和清洁处理步骤之间的间隔范围。

化学稳定性

在通常使用的水溶性缓冲液中都是稳定的。


储存

用20%的乙醇冲洗介质和柱子。(对于装填好的介质，使用大约5倍柱体积的20%的乙醇)，亲和柱的存放温度在+4到+8℃。


HiTrap Protein A HP, Protein A Sepharose 4 Fast Flow, HiTrap rProtein A FF, rProtein A Sepharose 4 Fast Flow, MabSelect

蛋白质A 来自金黄色葡萄球菌属，包含有5个区域，可以用来结合IgG 的Fc区域。作为一个亲和配基，蛋白质A偶联到Sepharose 上，使得这些区域可以结合游离的IgG分子。一分子的蛋白质A可以至少结合两分子的IgG。

来自GE Healthcare 的蛋白质A和重组蛋白质A都是有效的。这些分子都能够与IgG的Fc区域发生特异性的结合，但是重组蛋白质A是通过基因工程制备的，包含有C端的半光胺酸，能够通过单点偶联到Sepharose 上。单点偶联经常可以增强亲和色谱的结合容量。

 蛋白质A对IgG的结合强度取决于免疫球蛋白的来源，同样也取决于IgG的亚类（见表2）。动力学的结合容量取决于结合强度，同时也依赖于一些其它的因素，例如在上样期间的样品流速。

尽管蛋白质A主要是与人类免疫球蛋白IgG进行结合，一些其它类型的免疫球蛋白也显示出能够结合蛋白质A。蛋白质A能够与人初乳IgA发生相互作用，同时也可以和人类的骨髓瘤IgA<sub>2</sub>发生反应，但是不能与IgA<sub>1</sub>发生反应。一些人类的单克隆抗体IgMs和一些来自正常的和巨球蛋白血症血清中的IgMs能够结合蛋白质A。

 来自亲和介质配基的泄漏会经常可能发生，特别是如果在一个非常苛刻的条件进行洗脱。蛋白质A多位点附着在Sepharose 上，能够在一个宽范围的洗脱条件下，使配基的泄漏降到非常低的水平。

纯化选项

	结合容量	最大的操作流速	注释
HiTrap	人 IgG, > 20 mg/柱子	4 ml/min (1 ml 柱子)	IgG和片段、亚类的纯化
Protein A HP	人 IgG, > 100 mg/柱子	20 ml/min (5 ml 柱子)	预装柱。
Protein A	人 IgG, > 35 mg/ml 介质	400 cm/h**	提供即时可用的混悬液用于装柱
Sepharose 4 Fast Flow*	小鼠 IgG, 3–10 mg/ml 介质		suspension
HiTrap	人 IgG, > 50 mg/柱子	4 ml/min (1 ml 柱子)	IgG和片段、亚类的纯化
rProtein A FF	人 IgG, > 250 mg/柱子	20 ml/min (5 ml 柱子)	增强结合容量
			预装柱。
rProtein A	人 IgG, > 50 mg/ml 介质	300 cm/h**	增强结合容量
Sepharose 4	小鼠 IgG, 8–20 mg/ml 介质		提供即时可用的混悬液用于装柱
Fast Flow*			柱
MabSelect™ (重组 protein A配基)	人 IgG, 大约. 30 mg/ml 介质	500 cm/h**	用于大样品体积的快速处理
			在高流速的情况下保持高结合能力。
			提供即时可用的混悬液用于装柱

\* 蛋白 A Sepharose 4 Fast Flow和 重组蛋白 A Sepharose Fast Flow 具有更高的结合容量，更坚硬的基质和提供更方便的选择，蛋白A Sepharose CL-4B,在装填柱子前必须要再水合。

\*\* 见附录4，将线性流速转化为体积流速。最大的操作流速是通过测量带有柱床的10cm高和5cm直径的装填好的柱子，经过计算而获得的。

纯化示例

图17所示的是利用1ml注射器和HiTrap rProtein A FF 1ml 色谱柱对来自腹水的小鼠IgG2b进行纯化。被洗脱液中含有1mg的IgG2b，用SDS-PAGE胶和银染确证蛋白质纯度水平超过95%。

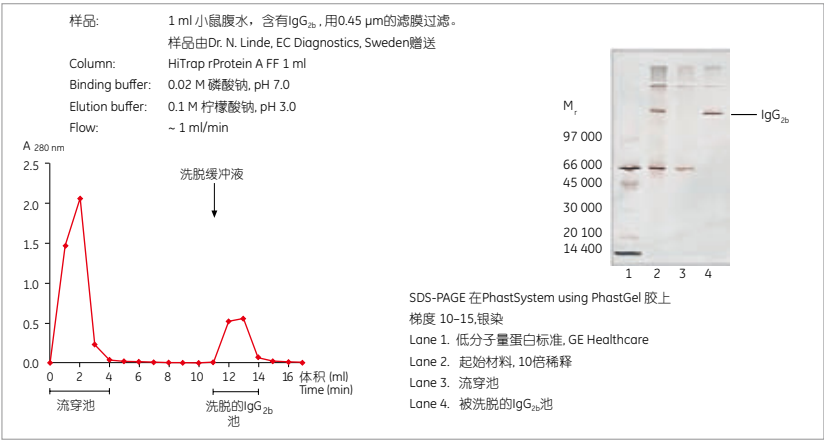


图 17. 来自小鼠腹水的IgG2b, 用 rProtein A FF1 ml 柱子，使用注射器进行纯化。

图18所示的是一个利用rProtein A Sepharose Fast Flow亲和柱对小鼠IgG2a单克隆抗体进行大规模的纯化，样品来源于经过澄清的杂交瘤细胞培养上清液。样品的上样量超过9mg IgG/ml，高纯度抗体的回收率达到95%。

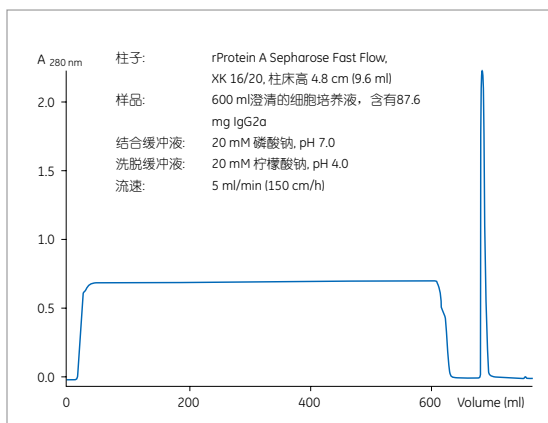


图. 18a. 来自澄清的细胞培养液中的单克隆抗体IgG2a，用 rProtein A Sepharose4 Fast Flow进行纯化。

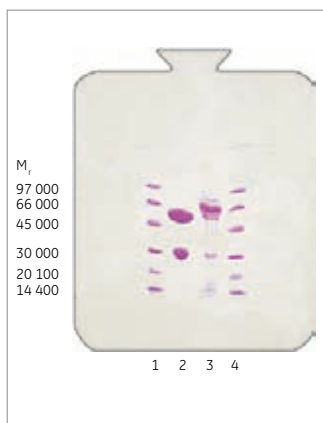



图. 18b. SDS-PAGE 的实验结果  
开始的原液(lane 2)和洗脱液(lane 3)。样品被浓缩10倍并且被还原。Lane 1和 Lane 4是低分子量标准。PhastSystem, PhastGel Gradient10-15。

## 进行分离操作

柱子:	HiTrap Protein A HP, 1 ml or 5 ml, or HiTrap rProtein A FF, 1 ml or 5 ml
推荐的流速:	1 ml/min (1 ml columns) or 5 ml/min (5 ml columns)
结合缓冲液:	0.02 M sodium phosphate, pH 7.0
洗脱缓冲液:	0.1 M citric acid, pH 3-6
中和缓冲液:	1 M Tris-HCl, pH 9.0

 离心样品 (10 000 g 离心10分钟) 去除细胞和细胞碎片。将上清液通过0.45μm的滤膜进行过滤。如果需要的话，利用脱盐柱进行缓冲液交换（见133页）或者稀释缓冲液并且调整缓冲液的pH值，将样品溶液调整到适宜的pH值和离子强度的结合缓冲液中。


 HiTrap 柱子可以与注射器、蠕动泵一起使用，或者连接到液相色谱系统，例如KTAprime plus。


1. 用5倍柱体积的结合缓冲液平衡柱子。
2. 上样。
3. 用5-10倍柱体积的结合缓冲液冲洗柱子，去除杂质和未结合到柱子上的物质。继续冲洗柱子直到在洗脱液中不能检测出蛋白质为止（用紫外检测器在280nm波长检测）。
4. 用5倍柱体积的洗脱缓冲液进行样品的洗脱\*。
5. 立即用5-10倍柱体积的结合缓冲液重新平衡柱子。


\* 如果洗脱条件非常苛刻，推荐用中和缓冲液收集片段(60 μl – 200 μl 1 M Tris-HCl, pH 9.0每毫升收集液)因此最终收集的片段的pH值大约为中性的。


表3 给出一些IgG与蛋白质A的典型结合和能够针对蛋白质A Sepharose使用的洗脱条件


种类	亚类	结合游离的 protein A	Protein A Sepharose 结合 pH	Protein A Sepharose 洗脱 pH
				一般在pH 3时洗脱
人	IgG <sub>1</sub>	++	6.0–7.0	3.5–4.5
	IgG <sub>2</sub>	++	6.0–7.0	3.5–4.5
	IgG <sub>3</sub>	–	8.0–9.0	< 7.0
	IgG <sub>4</sub>	++	7.0–8.0	使用阶梯洗脱
牛	IgG <sub>2</sub>	++		2
	IgG <sub>2</sub>	+		5.8
山羊	IgG <sub>1</sub>	++		4.8
	IgG <sub>2</sub>	++		4.3
豚鼠	IgG <sub>1</sub>	+	8.0–9.0	5.5–7.5
	IgG <sub>2a</sub>	+	7.0–8.0	4.5–5.5
	IgG <sub>2b</sub>	+	7	3.5–4.5
	IgG <sub>3</sub>	+	7	4.0–7.0
小鼠	IgG <sub>1</sub>	+	> 9.0	7.0–8.0
	IgG <sub>2a</sub>	–	> 9.0	< 8.0
	IgG <sub>2b</sub>	–	> 9.0	< 8.0
	IgG <sub>3</sub>	+	8.0–9.0	3–4 (使用硫氰酸盐)


- 


结合强度是通过游离的蛋白质A进行测试。它们用于指导预测蛋白质A免疫亲和介质的结合行为。然而，当蛋白质A偶联到亲和基质上后，其与免疫球蛋白的相互作用可能会发生改变。例如，大鼠的IgG1不能结合游离的蛋白质A，但是可以结合蛋白质A Sepharose。
- 

来自大多数物种的IgGs 和亚类，在接近生理pH值和离子强度的条件下，可以结合到蛋白质A上。如果蛋白质和配基之间的相互作用较弱，应该避免过度冲洗，因为这样可能会减少最终的产量。
- 

对于一些抗体，例如小鼠IgG，当使用蛋白质A进行纯化时，可能需要向结合缓冲液中加入3M的氯化钠，达到最有效的结合，例如1.5M的甘氨酸和3M的氯化钠，pH为8.9。
- 

选择洗脱缓冲液包括: 1M 乙酸, pH3.0 或者 0.1M 甘氨酸-盐酸, pH3.0或者3M的异硫氰酸钾。
- 

异硫氰酸钾能够对免疫球蛋白的活性和结构产生很大的影响。
- 

当易变性的抗体被分离后，使用温和的洗脱方式进行洗脱。用洗涤缓冲液反向流过亲和柱，用0.1M的glycyltyrosine 的2M的氯化钠溶液，pH7.0在室温状态下洗脱。用脉冲的方式进行洗脱。（注: glycyltyrosine 在检测蛋白质的波长范围内有很强的吸收）。这种特殊的洗脱是非常温和的以至于被纯化的抗体不可能被变性。
- 

为了 增加样品容量，可以将几个HiTrap Protein A HP 或者 HiTrap rProtein A FF 柱子（1ml或者5ml）串联起来使用，或者用Protein A Sepharose Fast Flow 或者 rProtein A Sepharose Fast Flow亲和介质装填大柱子使用（见附录3）。



脱盐和/或用脱盐柱将纯化后的IgG片段转移至适宜的缓冲液中。（见第133页）。



Protein A Sepharose and rProtein A Sepharose 介质的重复使用取决于样品的性质，并且当对同一的样品进行纯化时，应该考虑要避免交叉污染的发生。

## 介质特性

产品	配基 密度	组成	pH稳定性*	颗粒的平 均大小
HiTrap Protein A HP	3 mg/ml	配基通过活化N-羟基琥珀酰 亚胺 与Sepharose HP连接 通过烷基胺和醚键形成稳定 的连接	短期 2-10 长期 3-9	34 µm
Protein A Sepharose 4 Fast Flow**	6 mg/ml	配基通过溴化氢活化与 Sepharose 4 Fast Flow 偶联	短期 2-10 长期 3-9	90 µm
HiTrap rProtein A FF	6 mg/ml	配基通过环氧树脂活化和硫 醚键与Ligand coupled to Sepharose 4 Fast Flow	短期 2-11 长期 3-10	90 µm
rProtein A Sepharose 4 Fast Flow**	6 mg/ml	配基通过环氧树脂活化和硫 醚键与Ligand coupled to Sepharose 4 Fast Flow 偶联	短期 2-11 长期 3-10	90 µm
MabSelect 详细的指导请联系当地 的pecialist专家。				

\* 长期是指pH的间隔范围，在这一范围内，介质经过长期的存放仍然是稳定的，对于随后进行的色谱操作没有任何不利的影响；短期是指pH在介质的再生、净化和清洁处理步骤之间的间隔范围。

\*\* 蛋白 A Sepharose 4 Fast Flow和 重组蛋白 A Sepharose Fast Flow 具有更高的结合容量，更坚硬的基质和提供更方便的选择，蛋白A Sepharose CL-4B在装填柱子前必须要再水合。

## 化学稳定性

介质和柱子能够耐受高浓度的尿素、盐酸胍和促溶剂。

## 储存

用20%的乙醇冲洗介质和柱子。(对于装填好的介质，使用大约5倍柱体积的20%的乙醇)，亲和柱的存放温度在+4到+8℃。

来自杂交瘤细胞培养液的单克隆抗体IgM

HiTrap IgM Purification HP

在这里所描述的技术被优化用于纯化来自杂交瘤细胞培养上清的单克隆抗体IgM，但是它也可以被用于作为一个起始点决定其它IgM制备时所需要的结合和洗脱条件。

纯化选项

	结合容量	最大 操作流速	注释
HiTrap IgM 纯化 HP	人 IgM, 5 mg/柱子	4 ml/min	单克隆抗体的纯化和人IgM的纯化。 预装柱 1 ml 柱子。

HiTrap IgM 纯化 HP 亲和柱用thiophilic 吸附介质装填，（2 -mercaptopyridine偶联到高效 Sepharose ）。蛋白质和配基间的相互作用被认为是由于结合物提供电子和配基接受电子而产生的，并且还混有亲水-疏水间的相互作用模式。

纯化示例

图19所示结果是对杂交瘤细胞培养上清 α -Shigella IgM 单克隆抗体进行纯化的结果。SDS-PAGE的分析结果显示其纯度超过80%。ELISA 结果（未显示）表明纯化后抗体片段仍然具有很高的活性。

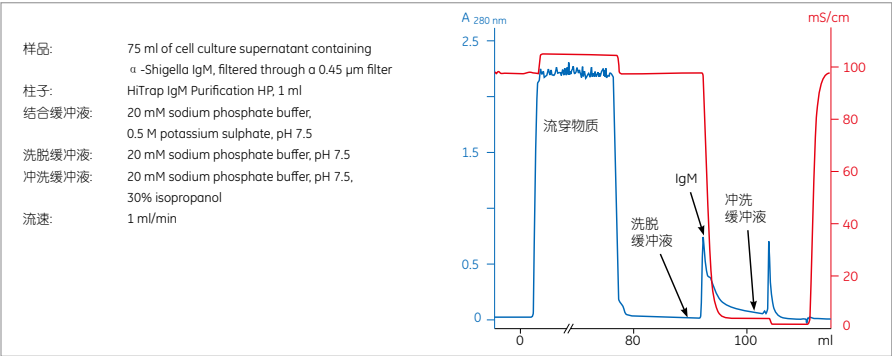


图. 19a. α -Shigella IgM 在 HiTrap IgM Purification HP亲和柱上进行纯化。

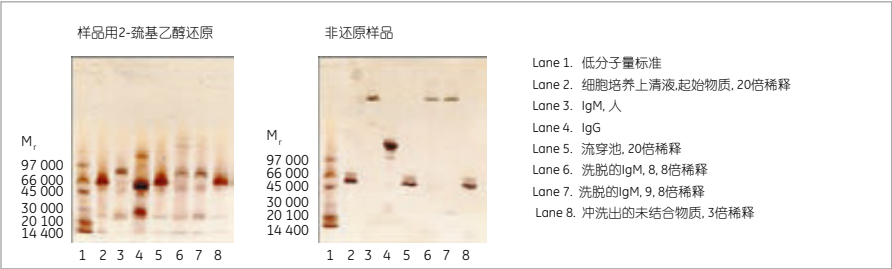


图. 19b. SDS-PAGE on PhastSystem, 使用PhastGel 4 – 15, 银染。

## 进行分离操作

柱子: HiTrap IgM 纯化 HP

推荐的流速: 1 ml/min

结合缓冲液: 20 mM 磷酸钠, 0.8 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , pH 7.5

洗脱缓冲液: 20 mM 磷酸钠, pH 7.5

洗涤缓冲液: 20 mM 磷酸钠, pH 7.5 with 30%异丙醇

样品溶液中硫酸铵的浓度必须与结合缓冲液中硫酸铵的浓度相同。缓慢加入少量的固体硫酸铵到细胞培养上清的样品中, 直到最终的浓度达到0.8M。缓慢的连续的进行搅拌。立即将样品通过0.45 $\mu\text{m}$ 的滤膜, 然后上样。一些IgM的单克隆抗体在0.8M的硫酸铵浓度下或许不会结合到亲和柱上。通过增加硫酸铵的浓度到1.0M, 样品中IgM的结合状况能够被提高。

为了避免IgM的沉淀, 缓慢的将硫酸铵加入到培养液的上清中是非常重要的。溶液中硫酸铵的浓度增加将会导致有更多的IgG结合到亲和柱上, 因此如果血清被加入到细胞培养上清中就会出现这个问题。如果已经被纯化的IgM中存在IgG, IgG 能够通过HiTrap Protein A HP, HiTrap rProtein A FF, 或者HiTrap Protein G HP柱子被去除。

## 纯化

1. 用至少5倍柱体积的结合缓冲液、洗脱缓冲液和洗涤缓冲液连续地冲洗柱子。
2. 用5倍柱体积的结合缓冲液平衡柱子。
3. 上样
4. 用15倍柱体积的结合缓冲液冲洗柱子, 或者直到没有其它物质出现在洗脱液中 (在A280nm处检测)
5. 用12倍柱体积的洗脱缓冲液洗脱
6. 用7倍柱体积的冲洗缓冲液冲洗柱子。
7. 用5倍柱体积的结合缓冲液立即再平衡柱子。

硫酸钾 (0.5M) 能够被用于替代硫酸铵。大多数单克隆抗体IgM在0.5M硫酸钾存在下可以结合到亲和柱上, 用0.5M硫酸钾纯化的IgM抗体的纯度与用0.8M硫酸铵纯化的IgM抗体的纯度相比基本一致。

一些IgM的单克隆抗体在结合缓冲液中可以很牢固的结合到亲和柱上。残留在亲和柱上的IgM用冲洗缓冲液可以被洗脱下来, 但是高浓度的异丙醇将导致IgM的沉淀。应该立即进行缓冲液交换 (见第133页) 或者将样品液稀释到可以维持IgM不沉淀的状态。低浓度的异丙醇可以洗脱IgM和降低IgM被沉淀的风险。

为了 增加样品容量, 可以将几个HiTrap IgM 纯化 HP柱子串联起来使用。HiTrap柱子可以连接注射器对样品进行纯化, 或者连接一个蠕动泵或者连接到液相色谱系统中, 例如Aprime plus.



HiTrap IgM 纯化 HP柱子的重复使用取决于样品的性质, 当进行同一种样品的纯化时, 因该考虑避免交叉污染。

介质特性

	配基和密度	pH 稳定性*	颗粒的平均大小
HiTrap IgM 纯化 HP	2-mercaptopyridine	长期 3~11	34 μm
	2 mg/ml	短期 2~13	

\* 长期是指pH的间隔范围，在这一范围内，介质经过长期的存放仍然是稳定的，对于随后进行的色谱操作没有任何不利的影响；短期是指pH在介质的再生、净化和清洁处理步骤之间的间隔范围。

储存

用5倍柱体积 20%的乙醇冲洗介质和柱子。存放温度在+4到+8℃.

来自蛋黄的禽类抗体IgY

HiTrap IgY 纯化 HP

纯化操作

	结合容量	最大 操作流速	注释
HiTrap IgY 纯化 HP	100 mg 纯化的 IgY/柱子	20 ml/min	来自卵黄IgY的纯化 预装柱 5 ml 柱子

HiTrap IgY Purification HP 亲和柱是用thiophilic 吸附介质装填柱子，( 2-mercaptopyridine 偶联到 Sepharose High Performance)。蛋白与配基之间的相互作用被认为是由于提供电子的结合蛋白与接受电子的配基之间的静电相互作用，并混有亲水与疏水间相互作用的模式。

纯化示例

图20所示，是纯化来自于45ml卵黄提取物的 α -Hb IgY 抗体（相当于四分之一的卵黄）。图21是用SDS-PAGE分析纯化后抗体的纯度，由图可见，其纯度可以达到70%以上水平。

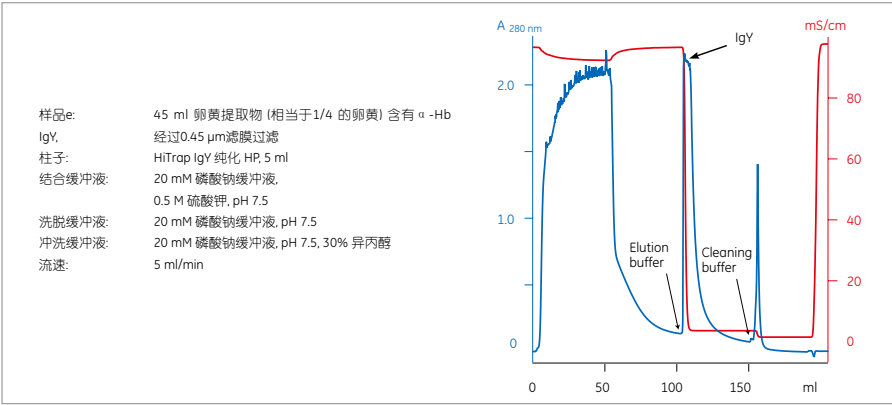


图 20. 在HiTrap IgY 纯化 HP柱子上进行禽IgY的纯化。



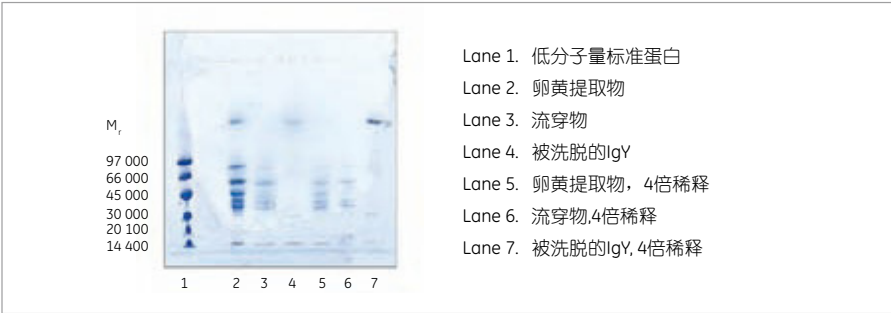


图. 21. 非变性样品的SDS-PAGE PhastSystem, 使用PhastGel 4 – 15 %, 考马斯亮蓝染色。

## 分离操作

柱子: HiTrap IgY 纯化 HP  
推荐的流速: 5 ml/min  
结合缓冲液: 20 mM 磷酸钠 0.5 M K<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>, pH 7.5  
洗脱缓冲液: 20 mM 磷酸钠, pH 7.5  
洗涤缓冲液: 20 mM 磷酸钠, pH 7.5 with 30%异丙醇



在进行纯化前, 尽可能的将卵黄液体去除。水或者聚乙二醇可以被用于沉淀脂类。下面描述的是用水沉淀脂类的步骤。

## 用水沉淀卵黄脂类

1. 从蛋白中分离卵黄。
2. 在每份卵黄中加入9份蒸馏水。
3. 混合后, 在4 °C 条件下缓慢的搅拌6小时。
4. +4 °C, 10 000 g离心25分钟沉淀脂类。
5. 收集含有IgY的上清。
6. 向样品中缓慢加入硫酸钾, 连续搅拌, 使最终的浓度为0.5M。
7. 调节pH 到 7.5。
8. 立即将样品通过0.45 μm的滤膜进行过滤, 然后上样。

## 纯化

1. 用至少5倍体积的结合缓冲液、洗脱缓冲液和洗涤缓冲液冲洗柱子。
2. 用5倍柱体积的结合缓冲液平衡柱子。
3. 上样。
4. 用至少10倍体积的结合缓冲液冲洗柱子或者直到没有物质出现到洗脱液中为止, 在A280处检测。
5. 用10倍柱体积的洗脱缓冲液洗脱IgY。
6. 用8倍柱体积的洗涤缓冲液冲洗柱子。
7. 用5倍柱体积的结合缓冲液立即平衡柱子。



为了提高总IgY的回收率或者某一特定IgY抗体的回收率，用 0.6—0.8 M硫酸钠替代0.5M硫酸钾。样品中硫酸钠的浓度应该与结合缓冲液中硫酸钠的浓度相一致。



增加盐的浓度将会降低洗脱下来的IgY的浓度。



使用梯度洗脱，例如线性梯度洗脱，洗脱缓冲液从0—100%，用超过10个柱体积进行洗脱，接下来用100%洗脱缓冲液洗脱几个柱体积，这样可以提高被洗脱IgY抗体的纯度。



为了增加容量，将几个HiTrap IgY 纯化 HP 柱子进行串联。HiTrap 柱子可以连接注射器、可以连接蠕动泵或者可以连接到色谱系统，例如 ÄKTAprime plus。



重复使用HiTrap IgY 纯化 HP 取决于样品的特性。当进行同一种样品的纯化时，因该考虑避免交叉污染。

介质特性

	配基和密度	pH 稳定性*	颗粒平均直径
HiTrap IgY 纯化 HP	2-mercaptopyridine	长期 3–11	34 µm
	3 mg/ml	短期 2–13	

\* 长期是指pH的间隔范围，在这一范围内，介质经过长期的存放仍然是稳定的，对于随后进行的色谱操作没有任何不利的影响；短期是指pH在介质的再生、净化和清洁处理步骤之间的间隔范围。

存放

用5倍柱体积的20%的乙醇冲洗柱子，并且储存在+4° C到+8°C。

重组融合蛋白

由于我们可以利用基因工程技术将一个已知大小的“tag”融合到蛋白质上，因此重组蛋白质的纯化经常可以被简单化。同样也为重组蛋白的表达提供了一个标记物并且使重组蛋白质的检测更加容易。“tag”的一个重要作用是能够利用亲和和色谱进行简单的纯化。两个最经常使用的“tag”是谷胱苷肽-S-转移酶（GST）和6个组氨酸残基。蛋白质A融合蛋白也被制备出来，利用IgG与蛋白质A的亲合作用进行蛋白纯化。

GST 融合蛋白

GST MicroSpin 纯化模式, GSTrap FF, GSTPrep FF 16/10, 谷胱苷肽

Sepharose 4 Fast Flow, 谷胱苷肽 Sepharose 4B

谷胱苷肽S-转移酶是一种经常被使用的“tag”，可以使含有谷胱苷肽S-转移酶的重组蛋白的纯化和检测更加容易，为了使产物的纯化更为简单，GST融合蛋白的一步纯化是可用的。(见纯化操作)。

当它们被表达成包含体时，GST-tag的融合蛋白的纯化和检测，与关于如何处理融合蛋白的信息一起，在GST Gene Fusion System Handbook和 The Recombinant Protein Handbook: Protein Amplification and Simple Purification中有详细的论述，这些材料来自GE Healthcare，是有效可用的。

纯化选项

	结合容量	最大 操作流速	注释
GST MicroSpin™ 纯化 模式	400 µg/柱子	n.a.	即时可用的预装柱。 缓冲液和化学试剂。 当使用MicroPlex™ 24 Vacuum时 可以达到高通量（达到同时处理 48 个样品）。
GSTrap FF 1 ml	10–12 mg 重组 GST/柱子	4 ml/min	预装柱，即时可用
GSTrap FF 5 ml	50–60 mg重组 GST/柱子	15 ml/min	预装柱，即时可用
GSTPrep FF 16/10	>200 mg 重组GST/柱子	>10 ml/min	预装柱，即时可用
谷光甘肽 Sepharose 4 Fast Flow	10–12 mg 重组 GST/ml 介质	450 cm/h*	用于高效纯化系统 和规模化生产
谷光甘肽 Sepharose 4B	8 mg 马肝 GST/ml 介质	75 cm/h*	装填小柱和其它的形式

\* 见附录4，将线性流速转化为体积流速。最大的操作流速是通过测量带有柱床的10cm高和5cm直径的装填好的柱子，经过计算而获得的。

纯化示例

图22所示，是对GST融合蛋白的典型纯化，用GSTrap FF 1ml柱子，纯化后的蛋白用SDS-PAGE进行纯度分析。

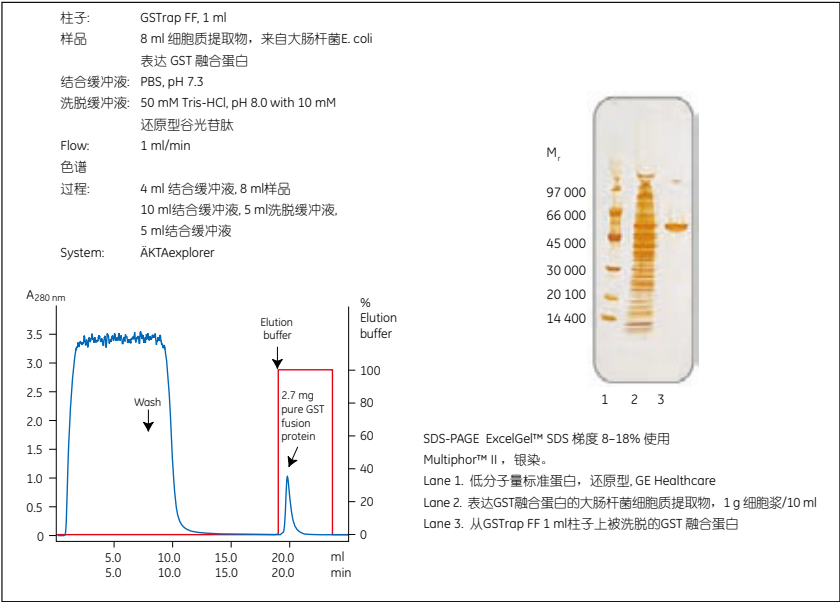


图. 22. GST 融合蛋白的纯化

图23所示的是 GST融合蛋白纯化规模扩大20倍，从GSTrap FF 1ml到GSTPrep FF 16/10柱子。

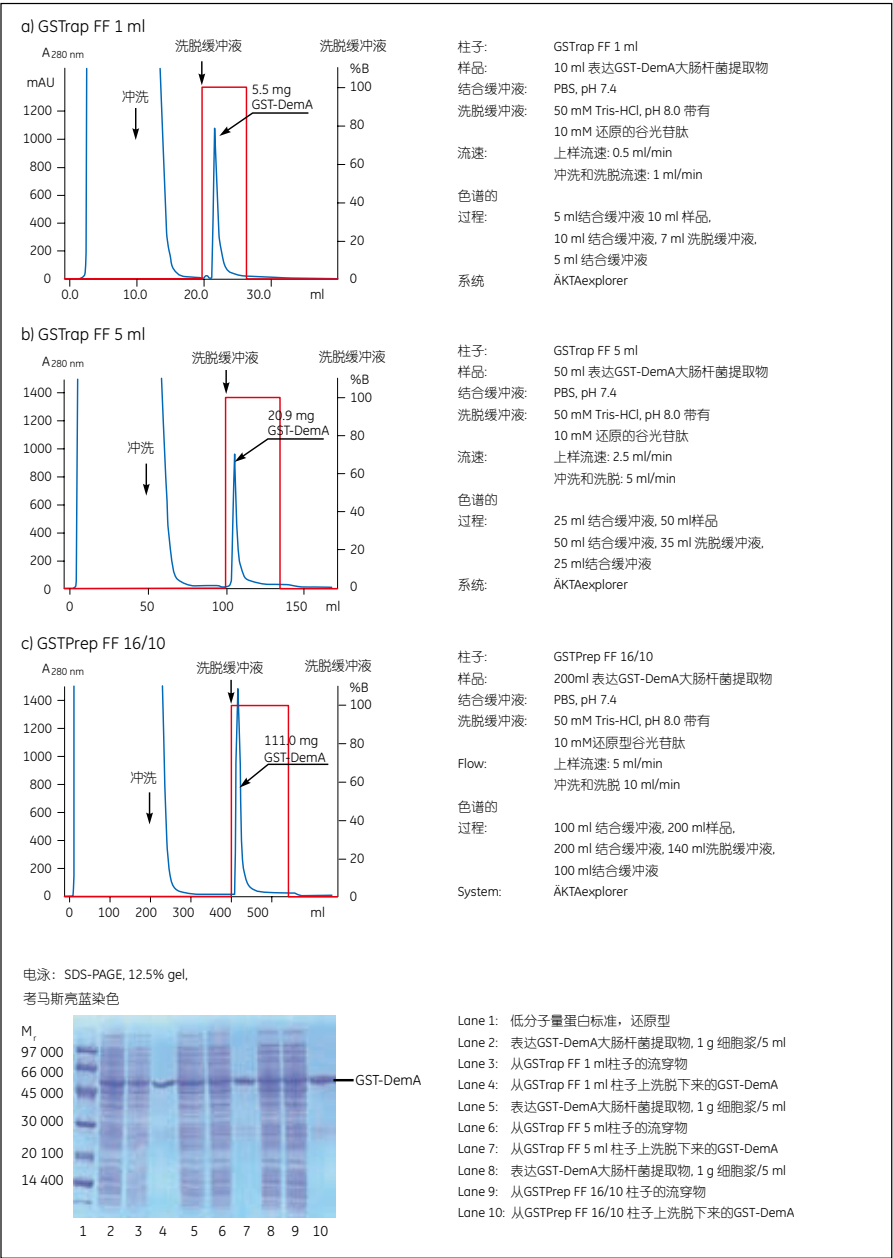


图. 23. GST 融合蛋白纯化规模扩大化

## 分离操作

结合缓冲液: 140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub>, 1.8 mM KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub>, pH 7.3

洗脱缓冲液: 50 mM Tris-HCl, 10 mM 还原型谷胱甘肽, pH 8.0



图. 24. 使用GSTrap FF 和一个注射器连用。A: 准备样品和缓冲液。除去柱子顶部的盖子并且在末端扭断。B: 平衡柱子，加载样品并且开始收集片段。C: 冲洗和洗脱，连续收集片段。

1. 用5倍柱体积的结合缓冲液平衡柱子。
2. 上样。
3. 用5-10倍柱体积的结合缓冲液冲洗柱子。
4. 用5-10倍柱体积的洗脱缓冲液进行洗脱。
5. 用5-10倍柱体积的结合缓冲液冲洗柱子。

在样品上样期间和洗脱期间，保持较低的流速是非常重要的，因为GST和谷胱甘肽相互间的结合动力学作用是相对较低的。其结合容量是依赖于蛋白质的特性，因此其产量是依赖于蛋白质的类型而变化的。使用较低的流速或者将样品反复流过柱子几次，或许可以提高产量。

对于少量产品单一的纯化或者对于一个高通量的监测，使用GST MicroSpin 柱子是方便的和简单的，使用离心的方式或者MicroPlex 24 Vacuum对样品进行纯化。

为了增加容量，将几个GSTrap FF 柱子 (1ml 或 5ml) 串联起来使用。为了更大的增加容量，使用GSTPrep16/10 FF 柱子或者用Glutathione SepharoseFast Flow亲和介质装填适当大小的柱子（参照附录3）。GSTrap FF柱子能够连接到注射器上、蠕动泵上或者连接到色谱系统上使用。

酶特异性的识别位点经常包含在GST tag上，如果需要的话，可以用酶切的方法去除GST tag。凝血酶是经常使用的酶法分析产物，并且当酶切完成后，必须将其从重组产物中去除。HiTrap Benzamidine FF (high sub)1ml 或者5ml 柱子，对于这一过程，提供了一个简单的、即时的解决方法。（见第54页）



GSTrap FF 柱子的重复使用取决于样品的特性。在对同一样品重复使用时，需要考虑避免交叉污染的问题。

净化

下列步骤可以应用于谷光苷肽 Sepharose 4Fast Flow 和谷光苷肽 Sepharose 4B的净化。

- 1. 用2-3倍柱体积的，高端pH值为 (0.1 M Tris-HCl, 0.5 M NaCl, pH8.5) 和低端pH值为(0.1 M 醋酸钠, 0.5 M NaCl, pH4.5) 的缓冲液交替冲洗柱子。
- 2. 重复循环3次。
- 3. 立即用3-5个柱体积的结合缓冲液再平衡柱子。

如果介质失去了结合容量，这可能是由于沉淀物、变性的蛋白质或者非特异性结合蛋白质等沉淀物的积累导致的。

为了去除沉淀物或者变性物质：

- 1. 用2倍柱体积的6M的盐酸胍冲洗柱子。
- 2. 随后立即用5倍柱体积的结合缓冲液冲洗柱子。

为了去除通过疏水性相互作用结合到亲和柱上的物质：

- 1. 用3-4倍柱体积的70%的乙醇冲洗柱子(或者2倍柱体积的非离子型去污剂(Triton™ X- 100 1%) 冲洗柱子)。
- 2. 随后立即用5倍柱体积的结合缓冲液冲洗柱子。

介质特性

	间隔臂	配基和密度	pH 稳定性*	颗粒平均大小
谷光苷肽 Sepharose 4	10 碳链	谷光苷肽	短期3-12	90 μm
Fast Flow (GSTrap FF, GSTPrep FF 16/10)		120-320 μmoles/ml	长期3-12	
谷光苷肽 Sepharose 4B		谷光苷肽	短期4-13	
		7-15 μmoles/ml	长期 4-13	

\* 长期是指pH的间隔范围，在这一范围内，介质经过长期的存放仍然是稳定的，对于随后进行的色谱操作没有任何不利的影响；短期是指pH在介质的再生、净化和清洁处理步骤之间的间隔范围。

化学稳定性

当介质在室温状态下暴露在0.1 M 柠檬酸盐 (pH4.0), 0.1 M NaOH, 70% 乙醇或者6M盐酸胍2小时后，其结合能力没有显著的丢失。当介质暴露在1%SDS 14天后，其结合能力没有明显的丢失。

储存

用20%在中性pH值条件下的乙醇冲洗介质和柱子（对于已经装柱的介质使用大约5倍的柱体积冲洗），并且储存在+ 4到+8 °C。

Poly (His) 融合蛋白质

His MicroSpin 纯化模式， HisTrap Kit， HiTrap 整合 HP， 整合 Sepharose Fast Flow (His)<sub>6</sub> tag 是一种最普通的 “tags”， 可以使融合蛋白的纯化和检测更为容易， 并且使产物的范围更为简单， (His)<sub>6</sub> 融合蛋白的一步纯化是可用的、有效的（见纯化操作）。多组胺酸tags， 例如(His)<sub>4</sub> 或(His)<sub>10</sub>也被使用。他们可以提供更多的选择， 提高纯化的结果。例如， 由于(His)<sub>10</sub>可以更加牢固的结合到亲和介质上， 因此在洗脱前的冲洗过程中， 可以使用更高浓度的洗脱液（咪唑）。这样可以非常容易的去除污染物， 否则这些污染物可能会与(His)<sub>6</sub>的融合蛋白被一同纯化。

整合的Sephacrose, 当带有Ni<sup>2+</sup> 离子时， 如果形成氨基酸残基的复合物， 特别是组氨酸残基被暴露 在蛋白质表面时， 可以选择性的结合蛋白质。(His)<sub>6</sub>融合蛋白可以很容易的结合到亲和柱上， 然后用含有咪唑的缓冲液进行洗脱。 His-tagged 蛋白质的纯化和检测， 与如何处理被表达到包 含体上的融合蛋白的信息一起， 在The Recombinant Protein Handbook: Protein Amplification and Simple Purification有很详细的论述， 这些来自GE Healthcare的材料都是可用的。

纯化选项

	结合容量	最大操作 流速	注释
His MicroSpin 纯化 Module	100 µg/柱子	n.a.	即时可用的预装柱, 缓冲液和化学试剂。 当使用MicroPlex 24 Vacuum 时可以达到高通量（达到同时处理48个样品）
HisTrap Kit	12 mg*/柱子	4 ml/min	与上面相同，但是需要指出，使用注射器 纯化，缓冲液可以用12次
HiTrap 整合 HP 1 ml	12 mg*/柱子	4 ml/min	预装柱，即时可用
HiTrap 整合 HP 5 ml	60 mg*/柱子	20 ml/min	预装柱，即时可用
整合Sephacrose Fast Flow	12 mg*/ml 介质	400 cm/h**	提供混悬液用于装柱和规模化生产

\* 一个(His)<sub>6</sub>融合蛋白的分子量估计为27 600，结合容量根据蛋白质的特性的不同而不同。

\*\* 见附录4，将线性流速转换成体积流速。最大的操作流速是通过测量带有柱床的10cm高和5cm直径的装填好的柱子，经过计算而获得的。

纯化示例：

图 25和图26 所示，是表达的重组蛋白的纯化，被表达的蛋白以可溶的形式或者以包含体的形式存在。图27所示的例子是将被表达蛋白的包含体在柱子上进行纯化和重组蛋白质的重新折叠。

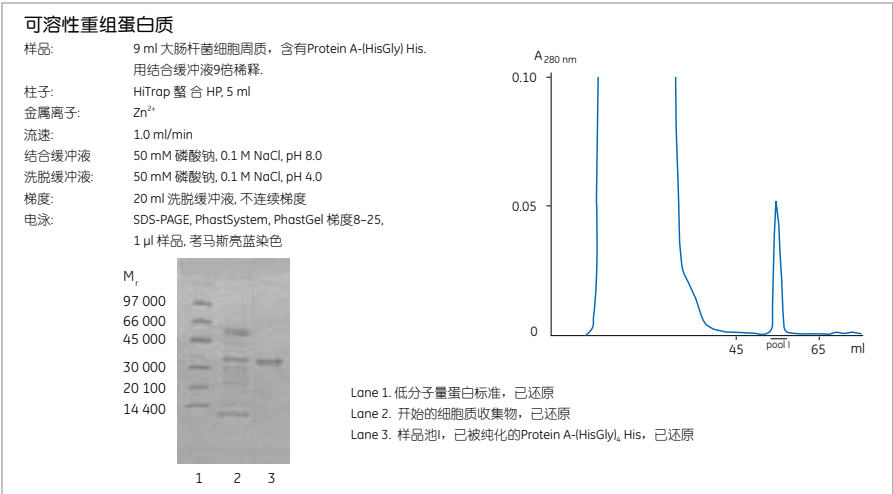


图. 25. 重组蛋白质用HiTrap 整合 HP, 5 ml, 带有Zn<sup>2+</sup>进行纯化

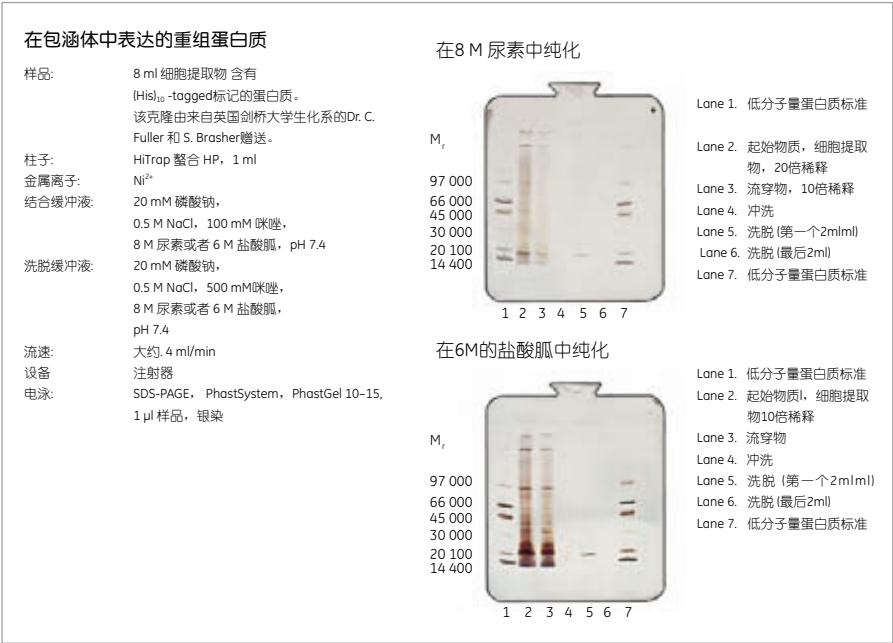


图. 26. 用HiTrap 整合 HP, 1ml, 带有Ni<sup>2+</sup> 纯化(His)<sub>10</sub>-tagged 的融合蛋白包涵体。



一步法，在柱子上，来自包涵体的重组蛋白的重新折叠和纯化

柱子:  $\text{Ni}^{2+}$ 加载 HiTrap 螯合 HP, 1 ml  
样品: N-末端 (His)<sub>6</sub> 重组蛋白质, 在大肠杆菌中  
流速: 0.1–1 ml/min, 上样和复性流速, 1 ml/min, 冲洗和洗脱流速  
结合缓冲液: 20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 5 mM 咪唑,  
6 M 盐酸胍,  
1 mM 2-巯基乙醇, pH 8.0  
冲洗缓冲液: 20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 20 mM 咪唑,  
6 M urea, 1 mM 2-巯基乙醇, pH 8.0  
复性缓冲液: 20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 20 mM 咪唑,  
1 mM 2-巯基乙醇, pH 8.0  
复性梯度: 30 ml  
洗脱缓冲液: 20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 500 mM 咪唑,  
1 mM 2-巯基乙醇, pH 8.0  
洗脱梯度: 10 ml  
馏分体积: 3 ml 样品载荷, 冲洗和复性, 1 ml 洗脱

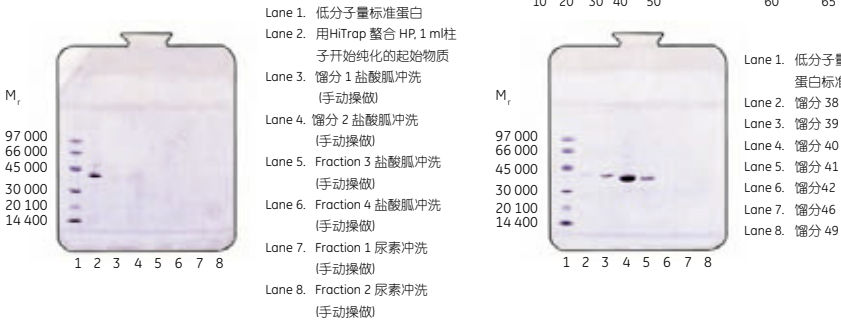
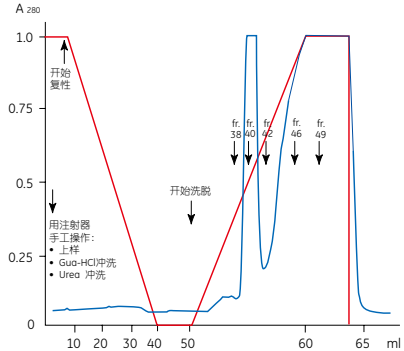


图. 27. 用HiTrap 螯合 HP, 1 ml, 带有 $\text{Ni}^{2+}$ 的亲柱对含有(His)<sub>6</sub>-tagged的重组蛋白质进行一步的纯化和复性。样品结合到亲和柱上，并且所有未结合的物质被冲洗下来。用6-0M的尿素溶液以线性梯度的方式流过柱子，使结合的蛋白质复性，开始时使用冲洗缓冲液，结束时使用复性缓冲液。使用30ml或者更高体积的梯度体积，并且流速为0.1–1.0 ml/min。最佳的复性流速应该依据每种蛋白质的特性来决定。经过复性的重组蛋白质使用10–20 ml的线性梯度进行洗脱，开始时使用复性缓冲液，结束时使用洗脱缓冲液。

分离操作

图28所示，是多组氨酸融合蛋白纯化的简单步骤，使用一个预装的HiTrap Chelating HP 柱子进行纯化。下面所描述的步骤已经被优化，(His)<sub>6</sub>的融合蛋白的纯化有很高的产量，并且可以用作扩大纯化规模的基础。另一个可以选择的优化步骤，是用所提供的HisTrap Kit，可以达到很高的纯度，这些步骤在The Recombinant Protein Handbook:Protein Amplification and Simple Purification的资料中有详细的描述，这些资料来自GE Healthcare。



图. 28. HiTrap 螯合 HP 和对多(His)的融合蛋白质纯化的简要概述

镍溶液: 0.1 M  $\text{Ni}_2\text{SO}$

结合缓冲液: 20 mM 磷酸钠, 0.5 M NaCl, 10 mM 咪唑, pH 7.4

洗脱缓冲液: 20 mM 磷酸钠, 0.5 M NaCl, 500 mM 咪唑, pH 7.4

1. 用5倍柱体积的蒸馏水冲洗柱子。



使用水，而不是缓冲液，冲洗柱子，冲洗去除柱子中的含有20%乙醇的储存液。这样可以避免镍盐在下一步骤中沉淀的危险。如果柱子中含有气泡，用蒸馏水冲洗柱子直到气泡消失。

2. 加入0.5个柱体积的0.1 M 镍溶液。
3. 用5倍柱体积的蒸馏水冲洗柱子。
4. 用10倍柱体积的结合缓冲液平衡柱子。
5. 上样，流速为1-4ml/min（1ml柱子）或者5 ml/min（5 ml 柱子）。收集流穿片段。  
在上样体积大于15ml时，用泵上样是更为合适的。
6. 用10倍柱体积的结合缓冲液冲洗柱子。收集冲洗下来的片段。
7. 用5倍柱体积的洗脱缓冲液进行洗脱。以1ml的体积收集洗脱片段，避免洗脱产物被稀释。
8. 用10倍体积的结合缓冲液冲洗柱子。亲和柱可以进行新一轮的纯化，并且几乎不需要再次加载金属，如果是纯化用同样的(His)<sub>6</sub>标记的融合蛋白。



咪唑在280nm处有吸收。当监测吸光度时，以洗脱缓冲液作为空白，如果需要去除咪唑，使用脱盐柱进行缓冲液交换。（见第133页）



对于少量产品的单一的纯化或者对于需要高通量的监测，使用His MicroSpin 色谱柱是方便的和简单的，不论是离心或者是使用MicroPlex24 Vacuum。



为了增加容量，可以将几个HiTrap 整合 HP (1 ml 或者5ml) 柱子串联起来使用。HiTrap 整合 HP (1 ml 或者5ml) 柱子可以和一个注射器连用、也可以和一个蠕动泵连用或者连接到色谱系统上。如果需要更大的容量，可以将整合的Sephacrose Fast Flow填充到一个合适的柱子中。（见附录3）



在较低的pH值条件下，金属离子的丢失是非常明显的。如果是对同样的蛋白质进行纯化，在每次纯化之间没有必要将柱子剥离，（例如去除所有金属）。在这种情况下，进行过5-10次纯化后，需要对色谱柱进行剥离和再充电。



重复使用柱子进行纯化，要取决于样品的特性，并且在对同一样品进行纯化时，要考虑避免交叉污染。

使用HisTrap Kit 进行纯化

HisTrap Kit 含有用注射器进行12次纯化用的每件东西。3个即时可用的HiTrap 整合 HP 1ml 柱子和即时稀释可用的浓缩缓冲液，并且有易于操作的说明指南。



净化

在重新充入新的离子或者储藏时，需要将镍离子除去。

- 1. 用5倍柱体积的20mM的磷酸盐，0.5M NaCl,0.05M EDTA, pH7.4冲洗柱子。
- 2. 用10倍柱体积的蒸馏水冲洗柱子。
- 3. 如果为了储存，用5倍柱体积20%的乙醇冲洗柱子。

沉淀蛋白质的去除:

- 1. 用1M的NaOH 填充柱子并且孵育2小时。
- 2. 用5倍柱体积的水和缓冲液pH7.0冲走溶解的蛋白质，直到流穿液体的pH7.0为止。

介质特性

	组成	金属离子容量	pH 稳定性*	平均的颗粒大小
螯合的高效 (HiTrap 整合HP)	亚氨二醋酸通过醚键偶联到 高效的Sepharose	23 $\mu\text{moles Cu}^{2+}/\text{ml}$ 长期3-13	短期2-14	34 $\mu\text{m}$
螯合 Sepharose Fast Flow	亚氨二醋酸 通过间隔臂，使用环氧 树脂偶联到Sepharose Fast Flow	22-30 $\mu\text{moles Zn}^{2+}/\text{ml}$ 长期 3-13	短期 2-14	90 $\mu\text{m}$

\* 长期是指pH的间隔范围，在这一范围内，介质经过长期的存放仍然是稳定的，对于随后进行的色谱操作没有任何不利的影响；短期是指pH在介质的再生、净化和清洁处理步骤之间的间隔范围。

化学稳定性

在所有常用的水溶性缓冲溶液中是稳定的，在6M的盐酸胍和8M的尿素中变性。

Storage

用20%的乙醇在中性pH 值的条件下冲洗介质和柱子（对于已经填充的柱子，大约使用5个柱体积的液体冲洗），在+4到 +8℃条件下储存。



经过长时间存放后，柱子必须重新装填金属离子，再次激活介质。

# 蛋白质A融合蛋白

## IgG Sepharose 6 Fast Flow

重组融合蛋白包括蛋白质A末端或者蛋白质A，能够用IgG Sepharose 6Fast Flow 进行纯化。

### 纯化选项

产品	结合容量/ml 介质	最大操作流速
IgG Sepharose 6 Fast Flow	2 mg protein A 在pH 7.5	400 cm/h*

\* 见附录4，将线性流速转换成体积流速。最大的操作流速是通过测量带有柱床的10cm高和5cm直径的装填好的柱子，经过计算而获得的。

### 纯化示例

图29所示，是一个在发酵期间分泌融合蛋白产物的自动在线检测。融合蛋白ZZ-IGF-1是一个胰岛素样生长因子1并融合了蛋白质A的衍生物（设计为ZZ），在大肠杆菌中表达。

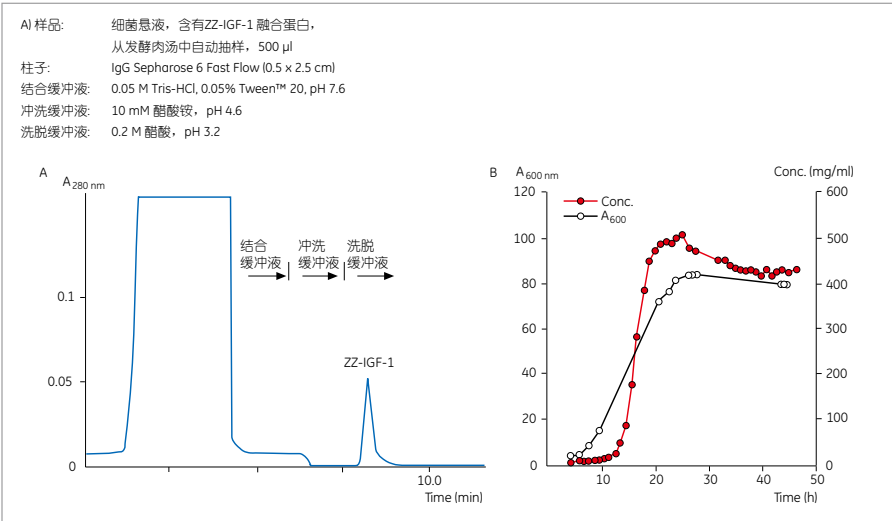


图. 29. A) 在发酵期间，在一个时间点所采集样品的色谱图。B) 在发酵期间产物浓度的自动监测结果。在每个色谱图分析中，ZZ-IGF-1 的浓度由ZZ-IGF-1 的色谱峰的积分获得。大肠杆菌的密度由A600的吸光度手工测量获得。

### 分离操作

结合缓冲液:	0.05 M Tris-HCl, 0.15 M NaCl, 0.05% Tween 20, pH 7.6
洗涤缓冲液:	5 mM 醋酸铵, pH 5.0
洗脱缓冲液:	0.5 M 醋酸, 用醋酸铵调节 pH 3.4
中和缓冲液:	1 M Tris-HCl, pH 9.0

1. 装柱（见附录3）并且用至少5倍柱体积的结合缓冲液冲洗柱子。
2. 用大约5倍柱体积的结合缓冲液平衡柱子。
3. 随后用2-3倍柱体积的乙酸液冲洗柱子。
4. 上样。
5. 用10倍柱体积的结合缓冲液冲洗柱子。
6. 用2倍柱体积的洗涤缓冲液冲洗柱子，直到没有物质出现，用A280nm紫外吸收进行监测。
7. 用2-5倍柱体积的洗脱缓冲液进行洗脱。\*
8. 立即用结合缓冲液再平衡柱子，直到流过柱子的结合缓冲液的pH 7.0 (如果将IgG置于更低的pH环境中，IgG可能会变性)。

\* 如果洗脱条件非常苛刻，推荐使用中和缓冲液收集片段(60 µl – 200 µl 1 M Tris-HCl, pH 9.0 per ml 片段)，因此最终收集的片段的 pH大约为中性。



使用这个方法，当提供的是一个浓缩的洗脱液，仅能当融合蛋白在酸性环境中是稳定的条件下使用。



一个可供选择的洗脱方法是0.1M 甘氨酸-HCl, pH3.0，在洗脱过程中也可能使用促溶剂。

介质特性

	配基	组成	pH 稳定性*	颗粒平均大小
IgG Sepharose 6 Fast Flow	人 多克隆I IgG	IgG 偶联到	短期 3-10	90 µm
	Sepharose Fast Flow		长期 3-10	
	同过溴化氰方法。			

\* 长期是指pH的间隔范围，在这一范围内，介质经过长期的存放仍然是稳定的，对于随后进行的色谱操作没有任何不利的影响；短期是指pH在介质的再生、净化和清洁处理步骤之间的间隔范围。

化学稳定性

避免使用还原剂。例如2-巯基乙醇或者 DTT，因为这样可能使IgG配基内部的2硫键断裂。

储存

用5倍柱体积的20%的乙醇在中性pH 条件下冲洗柱子，在 +4到+8 °C 条件下存放。

丝氨酸蛋白酶的纯化或者去除，例如 凝血酶、胰岛素和酶原

HiTrap 苯甲脒 FF (high sub), 苯甲脒 Sepharose 4 Fast Flow (high sub)

在样品的提取过程中经常会有蛋白酶进入溶液中，需要加入蛋白酶抑制剂来防止不希望出现的蛋白质水解作用。另外一种可供选择的蛋白酶去除方式是通过一组特异性的亲和介质从样品中把蛋白酶除去。使用同样的操作步骤，既可以用于特异性的去除蛋白酶也可以用于蛋白酶的纯化。合成抑制剂侧位氨基苯甲脒，被用于作为胰蛋白酶、类似于胰蛋白酶的丝氨酸蛋白酶和酶原的亲和配基。苯甲脒Sepharose4Fast Flow (high sub)经常被用于去除细胞培养上清、细菌的裂解产物或者血清中的分子物质。在重组蛋白的制备过程中，“tags”如GST等融合蛋白经常用于使目的蛋白质的纯化和检测更为容易。重组蛋白中含有酶特异性的识别位点，这样可以在需要的时候通过酶切反应将“tag”去除。凝血酶是通常使用的酶切反应物，通常需要从重组蛋白产物中去除。HiTrap 苯甲脒 FF (high sub)柱子为这一过程提供了一个简单的、即时可用的解决方案。图30所示是苯甲脒SepharoseFast Flow (highsub)的部分结构，表4给出的是不同丝氨酸蛋白酶的例子。

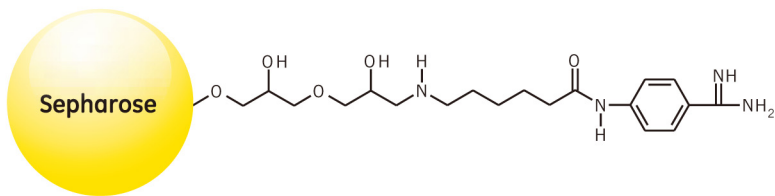


图. 30. 苯甲脒Sepharose 4 Fast Flow (high sub)部分结构。

表4. 不同丝氨酸蛋白酶的示例。

	来源	M <sub>r</sub>	pI
凝血酶	牛胰腺	23 345	10.5
胰蛋白酶	人血浆链 A	5 700	
	人血浆链 B	31 000	7.1
尿激酶	人尿	54 000	8.9
肠激酶	猪肠重链	134 000	4.2
	猪肠轻链	62 000	
纤维蛋白溶酶原	人血浆	90 000	6.4–8.5
前激肽释放酶	人血浆	nd	nd
激肽释放酶	人血浆	86 000	nd (血浆)
	人唾液	nd	4.0 (唾液)

纯化选项

	合容量	最大操作流速	注释
HiTrap苯甲脒 FF (high sub)	胰蛋白酶, > 35 mg/柱子	4 ml/min (1 ml 柱子)	预装柱**
	胰蛋白酶, > 175 mg/柱子	15 ml/min (5 ml 柱子)	
苯甲脒 Sepharose 4 Fast Flow (high sub)	胰蛋白酶, > 35 mg/ml 柱子	300 cm/h*	提供即时可用的混悬液 用于装柱子**

\* 见附录4，将线性流速转换成体积流速。最大的操作流速是通过测量带有柱床的10cm高和5cm直径的装填好的柱子，经过计算而获得的。

\*\* 提供0.05 M 醋酸盐, pH 4含有 20% 乙醇。

纯化示例

图31所示是为了防止人血浆组分的蛋白质水解，用低pH值洗脱液，从人血浆中去除胰蛋白酶类似物的例子。活性测试显示，几乎所有的胰蛋白酶类似物活性物质都被从样品中去除，并且结合到柱子上。

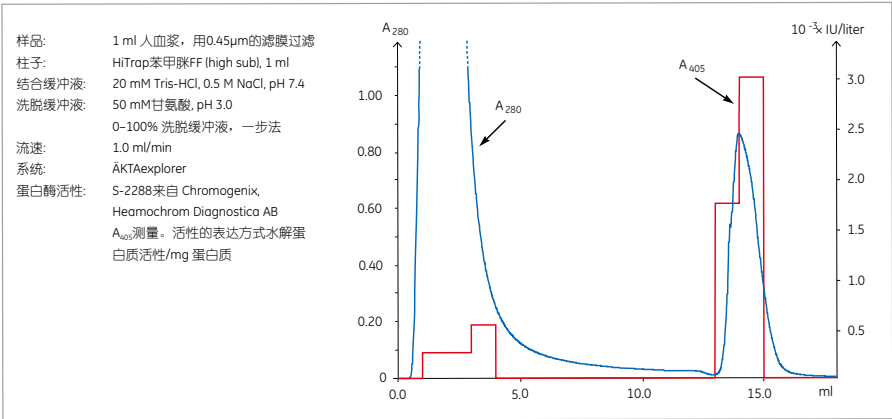
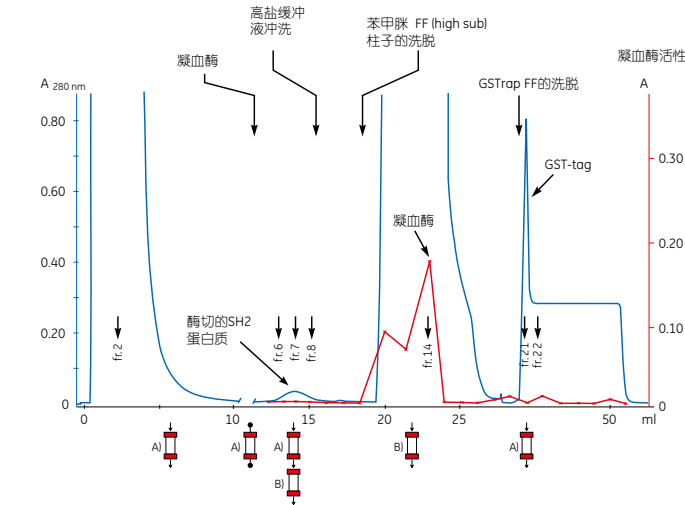


图. 31. 使用HiTrap苯甲脒FF (high sub), 1ml柱子，去除人血浆中类似胰蛋白的丝氨酸蛋白酶。

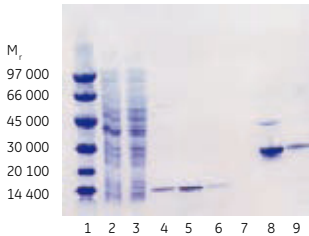
图32所示，是一个使用GSTrap FF 柱子和HiTrap苯甲脒FF (high sub) 纯化GST融合蛋白的例子，接下来是用凝血酶对GST融合蛋白上的凝血酶酶切位点进行酶切反应，去除GST “tag”。GST融合蛋白结合到GSTrap FF 柱子上，其它的蛋白质则流穿柱子。将凝血酶通过柱子，并且与柱子一起孵育2小时。

HiTrap苯甲脒FF (high sub) 柱子在结合缓冲液中进行预平衡，在GSTrap FF 柱子后被附着，两个柱子先用结合缓冲液冲洗，随后用高盐浓度缓冲液冲洗。酶切蛋白质和凝血素从GSTrap FF 柱子中流穿，凝血素结合到HiTrap 苯甲脒FF (high sub) 柱子上，洗脱下来的片段含有纯的被酶切的蛋白质。

样品: 2 ml 澄清的大肠杆菌匀浆, 表达一个分子量为M<sub>r</sub> 37 000的SH2-GST融合蛋白质, 并且带有凝血酶酶切位点  
柱子: GSTrap FF, 1 ml and HiTrap 苯甲脒 FF (high sub), 1 ml  
结合缓冲液: 20 mM 磷酸钠, 0.15 M NaCl, pH 7.5  
高盐冲洗液: 20 mM 磷酸钠, 1.0 M NaCl, pH 7.5  
苯甲脒洗脱缓冲液: 结合缓冲液中含有20 mM p-氨基苯甲脒  
GST洗脱缓冲液: 20 mM 还原型谷胱甘肽, 50 mM Tris, pH 8.0  
流速: 0.5 ml/min  
系统: ÄKTAprius plus  
蛋白酶处理: 20单位/ml 凝血酶 (GE Healthcare), 放置2 小时, 在室温条件下  
凝血酶活性: S-2238 (Chromogenix, Haemochrom Diagnostica AB) 被用作底物并且在405 nm处测量吸光度值



A) GSTrap FF, 1 ml  
B) HiTrap 苯甲脒 FF (high sub), 1 ml



Gel: ExcelGel SDS 梯度8-18%, 考马斯亮蓝染色  
Lane 1. 低分子量标准蛋白质 (LMW)  
Lane 2. 澄清的大肠杆菌匀浆, 大肠杆菌表达SH2-GST融合蛋白质  
Lane 3. 从GSTrap FF (馏分21)的流穿物  
Lane 4. SH2-GST-tag 酶切的, 用结合缓冲液冲洗掉的物质(馏分6)  
Lane 5. 同上 (馏分7)  
Lane 6. 同上 (馏分8)  
Lane 7. 凝血酶的洗脱, 使用HiTrap 苯甲脒 FF (high sub)  
Lane 8. GST-tag的洗脱和一些没有被酶切的SH2-GST, GSTrap FF (馏分21)  
Lane 9. 同上 (馏分22)

图32. GST融合蛋白的柱上整合, 在柱上整合后, 使用GSTrap FF 和 HiTrap 苯甲脒 FF (high sub)将凝血酶去除。

## 分离操作

结合缓冲液: 0.05 M Tris-HCl, 0.5 M NaCl, pH 7.4


可供选择的洗脱缓冲液:


- pH 洗脱: 0.05 M 甘氨酸-HCl, pH 3.0 或者 10 mM HCl, 0.05 M NaCl, pH 2.0
- 竞争洗脱: 在结合缓冲液中含有20 mM p-氨基苯甲脒
- 变性洗脱: 8 M 尿素或者6 M 盐酸胍



1. 用5倍柱体积的结合缓冲液平衡柱子
2. 上样。
3. 用5-10倍柱体积的结合缓冲液冲洗柱子或者直到被洗脱物中没有物质出现。  
用紫外吸光，在波长 $A_{280nm}$ 处监测
4. 用5-10倍柱体积的洗脱缓冲液进行洗脱。如果使用高pH值的洗脱缓冲液，需要将洗脱下来的片段收集到中性缓冲液中。纯化好的片段可以通过脱盐柱进行缓冲液交换。（见第133页）

\* 由于洗脱条件非常苛刻，需要将洗脱下来的片段收集到中和缓冲液中(60  $\mu$ l – 200  $\mu$ l 1 M Tris-HCl, pH 9.0 per ml 馏分),使片段的最终pH值接近中性。

 由于苯甲脒Sephacrose 4 Fast Flow (high sub)具有离子键相结合的特性，推荐使用0.5M NaCl 和洗脱液的pH值在7.4 – 8.0。如果使用更低的盐离子浓度的洗脱液，应该在样品上样完成后并且在洗脱前，增加一个用高盐离子浓度溶液冲洗的过程。

 被用来做竞争洗脱的洗脱缓冲液在280nm处有一个较高的吸收峰。被洗脱的蛋白质必须用其它的方法进行检测。例如活性分析、总蛋白质分析或者SDS-PAGE分析。使用竞争洗脱的优点是在整个的洗脱过程中pH保持一致。

## 净化处理

用3-5倍柱体积的0.1M Tris-HCl, 0.5M NaCl, pH8.5冲洗柱子，接下来是用3-5倍柱体积的0.1 M sodium acetate, 0.5M NaCl, pH4.5冲洗柱子，并且立即用3-5倍柱体积的结合缓冲液再平衡柱子。使用非离子型去污剂例如0.1 % Triton X-100 在 +37°C 冲洗1分钟，可以去除严重的污染物。

## 介质特性

	配基密度	组成	pH 稳定性*	颗粒的平均直径
苯甲脒	> 12 $\mu$ moles	配基的酰胺通过一个14个	短期 1-9	90 $\mu$ m
Sephacrose 4	p-氨基苯甲脒/ml	碳原子的间隔臂偶联到	长期 2-8	
Fast Flow		高度交联的4%的		
(high sub)		琼脂糖上		

\* 长期是指pH的间隔范围，在这一范围内，介质经过长期的存放仍然是稳定的，对于随后进行的色谱操作没有任何不利的影响；短期是指pH在介质的再生、净化和清洁处理步骤之间的间隔范围。

## 化学稳定性

在所用通常被使用的水溶性缓冲液中都稳定。

## 储存

用20%的乙醇，0.05M 醋酸钠，pH4.0溶液冲洗介质和柱子（对于已经装填好的柱子，使用大约5个柱体积的液体冲洗柱子）。柱子储存于+4到 +8°C 环境中。

# 用亲和的精氨酸纯化丝氨酸蛋白酶和酶原

## 精氨酸Sepharose 4B

精氨酸Sepharose4B 是Sepharose4B 的左旋型精氨酸的衍生物，能够被用于亲和纯化任何对精氨酸具有生物专一性的生物活性分子或者对精氨酸具有电荷依赖的生物活性分子，例如丝氨酸蛋白酶和酶原。特殊的例子包括前激肽释放酶、梭菌蛋白酶、凝血素、纤维蛋白溶酶原和纤维蛋白溶酶原活化因子。L-精氨酸通过它的  $\alpha$  -氨基基团与基质偶联，留下胍基和  $\alpha$  -羧基基团可以自由的与样品发生相互作用。静电力和立体特异性的效应可以有助于对样品的结合与洗脱过程，这些都取决于样品的特殊性。图33所示是精氨酸Sepharose4B的部分结构。

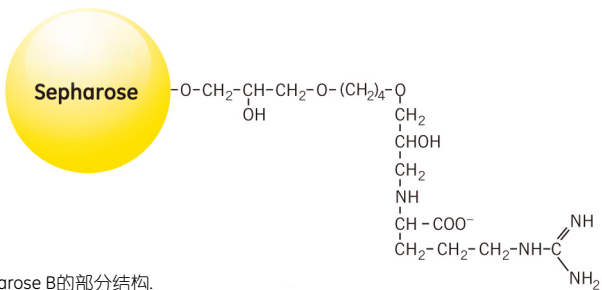


图. 33. 精氨酸Sepharose B的部分结构.

## 纯化选项

	结合能力/ml 介质	最大操作流速	注释
精氨酸Sepharose 4B	没有数据可以利用	75 cm/h*	提供即时可用的混悬液用于装柱

\* 见附录4，将线性流速(cm/h)转换成体积流速。最大的操作流速是通过测量带有柱床的10cm高和5cm直径的装填好的柱子，经过计算而获得的。

## 分离操作

一个宽范围的不同的pH和流速决定介质对感兴趣的样品的结合容量。在每一个实验中，样品溶液必须与结合缓冲液具有一致的pH值。

1. 装柱(见附录)并且用5倍柱体积的结合缓冲液冲洗柱子。
  2. 用10倍柱体积的结合缓冲液冲洗柱子。
  3. 上样。
  4. 用最少10倍柱体积的结合缓冲液冲洗柱子或者在洗脱物中没有其它物质存在，用紫外吸光，在A280nm处监测吸光度。
  5. 用10-20倍柱体积的洗脱缓冲液洗脱。



生物活性分子非特异性结合，可以通过下面的方式洗脱：

- 用增加离子强度的方式阶梯式或者梯度洗脱。(达到1M NaCl浓度)
- 增加尿素或者盐酸胍的浓度(达到0.7M)



特异性结合的生物活性分子可以通过竞争洗脱的方式，用含有精氨酸或者其它可以与目标蛋白竞争的试剂的进行竞争洗脱。

## 净化

用2-3倍柱体积的缓冲液，高pH缓冲液为(0.1M Tris-HCl, 0.5M NaCl, pH8.5 )和低pH缓冲液为(0.1M 醋酸钠, 0.5M NaCl, pH5.0)交替轮流冲洗柱子。重复3次。用5倍柱体积的结合缓冲液立即再平衡柱子。用2-3倍柱体积的0.5M的NaOH或者含有8M的尿或者6M的盐酸胍的正常冲洗缓冲液使附着降到最低。

通过用非离子型去污剂，例如Triton X-100 (0.1%)，37℃1分钟，去除严重的污染物。之后，立即用结合缓冲液再次平衡色谱柱。

## 介质特性

	配基密度	组成	pH 稳定性*	平均颗粒大小
精氨酸	14–20 $\mu$ moles/ml	氨酸通过环氧树脂偶联	短期 2–13	90 $\mu$ m
Sepharose 4B		方法，通过一个长的亲水	长期 2–13	
		间隔臂进行偶联，并且具有稳定的醚键和烷基铵键		

\* 长期是指pH的间隔范围，在这一范围内，介质经过长期的存放仍然是稳定的，对于随后进行的色谱操作没有任何不利的影响；短期是指pH在介质的再生、净化和清洁处理步骤之间的间隔范围。

## 化学稳定性

在所有通常使用的水溶性的缓冲液中是稳定的。

## 储存

用20%的乙醇在中性pH条件下，冲洗介质和色谱柱。（对于已经填装好的柱子，使用大约5个柱体积的液体冲洗），并且储存温度在+4到+8℃。

# DNA 结合蛋白

## HiTrap 肝素HP, HiPrep 16/10 肝素 FF, 肝素 Sepharose 6 Fast Flow

DNA 结合蛋白形成一个极端多种多样的蛋白质分类，并且具有一个共同的特性，它们能够结合 DNA。从功能上，这组物质能够分成一组负责DNA的复制和定向，例如组蛋白、核小体和复制酶，和另一组含有转录入RNA/DNA酶、转录激活因子和抑制物和限制性内切酶。它们能够被作为融合蛋白生产，能够进行更加特异性的纯化（见第42页），但是它们结合DNA的能力也能够使用肝磷脂作为配基进行一组特异性亲和纯化。肝磷脂是一个高的葡萄糖胺聚糖硫酸盐，有能力结合一个非常宽范围的生物活性分子，包括：

- DNA结合蛋白，例如起始因子、延伸因子、限制性内切酶、DNA连接酶、DNA和RNA聚合酶。
- 丝氨酸蛋白酶抑制剂，例如抗纤维蛋白酶III，蛋白酶连络素。
- 酶，例如肥大细胞蛋白酶，脂蛋白脂肪酶、凝血酶、过氧化物歧化酶。
- 生长因子，例如成纤维细胞增殖因子、神经鞘细胞生长因子、内皮细胞生长因子等。
- 细胞外基质蛋白，例如纤维连接蛋白、玻璃粘连蛋白、层粘连蛋白、血小板凝血酶敏感蛋白、胶原。
- 激素受体，例如雌二醇和雄激素受体。
- 脂蛋白质。

肝磷脂的结构如图34所示。肝磷脂与蛋白质之间的相互作用有两种模式，并且在这两种模式中，通过增加离子强度都能够弱化这两种模式的相互作用。

1. 在与DNA 结合蛋白质间的相互作用中，肝磷脂可以模拟核酸的多阴离子结构。
2. 在与凝血因子，例如抗纤维蛋白酶III的相互作用中，肝磷脂作为亲和配基。

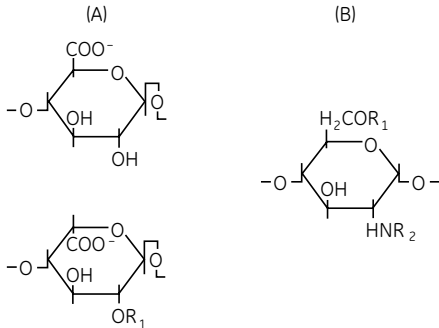


图. 34. 含有交互转换的抗坏血酸的肝磷脂多糖的结构(A) 和 D-葡萄糖糖胺基(B). 抗坏血酸即可以是D-葡萄糖醛酸（上端）结构，或者是它的C-5差向异构体，L-艾杜糖醛(下端).

R<sub>1</sub> = -H 或者 -SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, R<sub>2</sub> = -SO<sub>3</sub><sup>-</sup> 或者 -COCH<sub>3</sub>.

纯化选项

	结合容量	最大操作流速	注释
HiTrap	牛抗凝血酶 III, 3 mg/column	4 ml/min (1 ml 柱子)	预装柱
肝素 HP	牛抗凝血酶III, 15 mg/column	20 ml/min (5 ml 柱子)	
HiPrep 16/10	牛抗凝血酶 III, 40 mg/column	10 ml/min	预装的 20 ml 柱子
肝素 FF			
肝素	牛抗凝血酶III, 2 mg/ml medium	400 cm/h*	提供即时可用的混悬液用于装柱
Sepharose 6			
Fast Flow			

\* 见附录4，将线性流速(cm/h)转换成体积流速。最大的操作流速是通过测量带有柱床的10cm高和5cm直径的装填好的柱子，经过计算而获得的。

纯化示例

图35、36和37所示的例子是纯化不同的DNA结合蛋白质的使用条件。

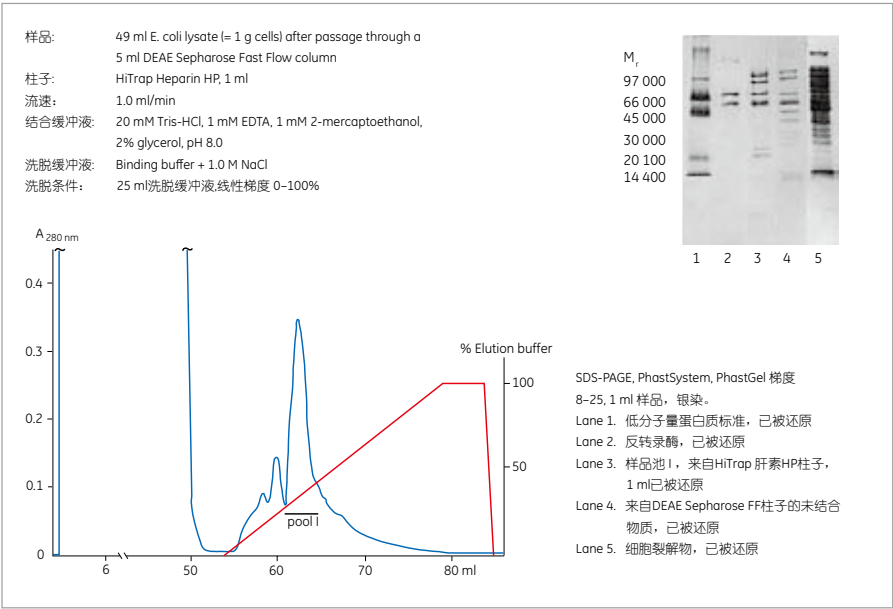


图. 35.用HiTrap 肝素 HP纯化部分重组HIV-逆转录因子

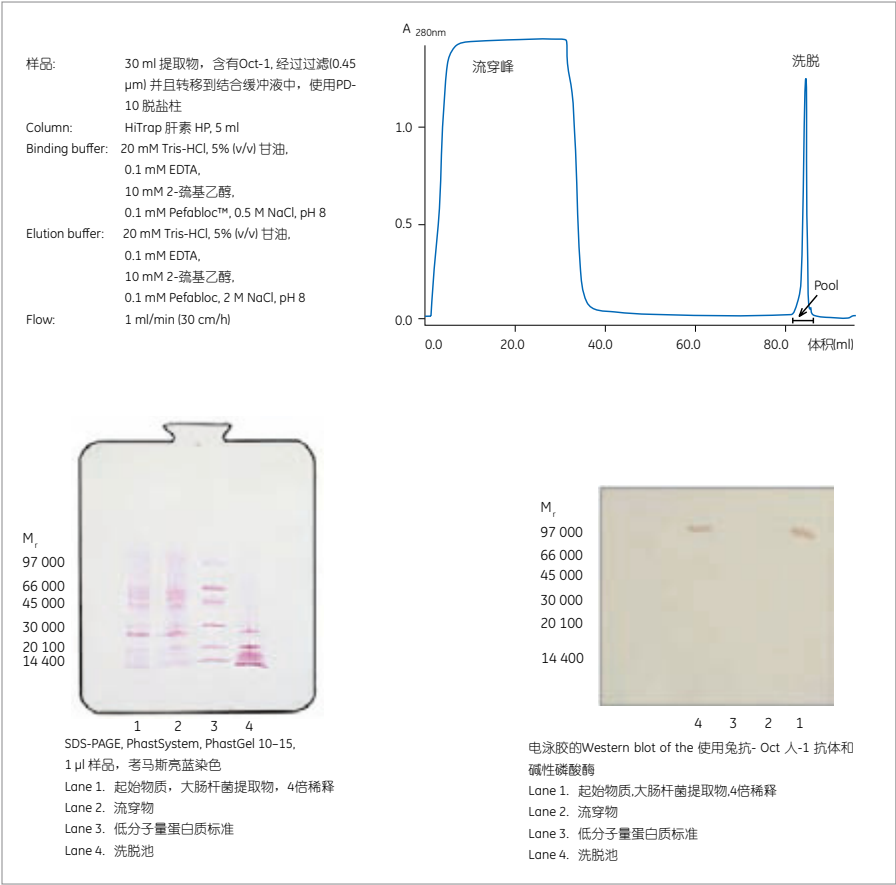


图 36. 使用HiTrap 肝素 HP, 5ml柱子对重组DNA结合Oct-1蛋白质进行部分纯化。

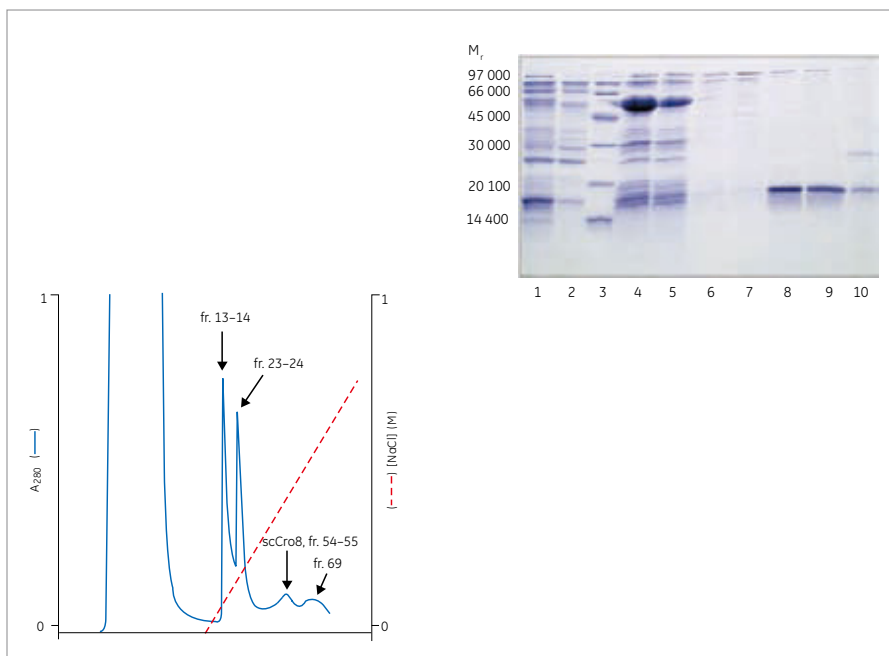


图. 37. scCro8在HiPrep16 /10 肝素 FF柱子上的纯化。

## 分离操作

结合缓冲液: 20 mM Tris-HCl, pH 8.0或者10 mM 磷酸钠, pH 7.0

洗脱缓冲液: 20 mM Tris-HCl, 1-2 M NaCl, pH 8.0 或者10 mM 磷酸钠, 1-2 M NaCl, pH 7.0

1. 用10倍柱体积的结合缓冲液平衡柱子。
2. 上样
3. 用5-10倍柱体积的结合缓冲液冲洗柱子或者洗脱物中没有出现任何物质。用紫外吸光在 $A_{280nm}$ 处监测。
4. 用5-10倍柱体积的洗脱缓冲液进行洗脱，使用连续的或者阶梯式的梯度洗脱，洗脱缓冲液的浓度从0%-100%。



通过改变缓冲溶液的pH值或者离子强度来修饰肝磷脂的选择性。洗脱时使用连续的或者阶梯式的洗脱方式，用NaCl, KCl 或者  $(NH_4)_2SO_4$  溶液，浓度可以高达1.5 – 2 M。

## 净化

用0.5个柱体积的2M的NaCl 冲洗10分钟去除离子键结合蛋白。

通过用4倍柱体积的0.1 M NaOH溶液冲洗柱子1-2小时去除沉淀物或者变性蛋白或者用2倍的柱体积的6M的盐酸胍冲洗柱子30-60分钟，或者用2倍柱体的6M的尿素冲洗30-60分钟。

用4倍柱体积的0.1%-0.5%的Triton X-100冲洗1-2小时，去除疏水键结合的蛋白质。

介质特性

	配基密度	组成	pH stability*	Mean particle size
HiTrap 肝素 HP	10 mg/ml	肝素偶联到 高效Sephacrose，通过还原的 氨基化作用，即使在碱性条 件下也能够产生一个稳定的附着，	短期 5-10 长期 5-10	34 µm
肝素 Sepharose 6 Fast Flow	5 mg/ml	肝素偶联到 Sepharose 6 Fast Flow，通过还原的氨基化 作用，即使在碱性条件下也能够 产生一个稳定的附着，	短期 4-13 长期 4-12	90 µm
HiPrep 16/10 肝素 FF				

\* 长期是指pH的间隔范围，在这一范围内，介质经过长期的存放仍然是稳定的，对于随后进行的色谱操作没有任何不利的影响；短期是指pH在介质的再生、净化和清洁处理步骤之间的间隔范围。

化学稳定性

0.1M NaOH (1周在 + 20 ° C)，0.05M 醋酸钠, pH4.0, 4M NaCl, 8M 尿, 6M 盐酸胍。

储存

用0.05M的醋酸钠并且含有20%的乙醇冲洗介质（对于已装柱使用大约5个柱体积的液体冲洗），储存在+4到+8℃。



凝血因子

HiTrap 肝素 HP, HiPrep 16/10 肝素 FF，肝素 Sepharose 6 Fast Flow

凝血因子形成了一个非常重要的蛋白质基团应用于研究领域，医学和临床领域。关于DNA结合蛋白质的纯化的信息（第60页）同样也应用在纯化凝血因子上。

纯化示例

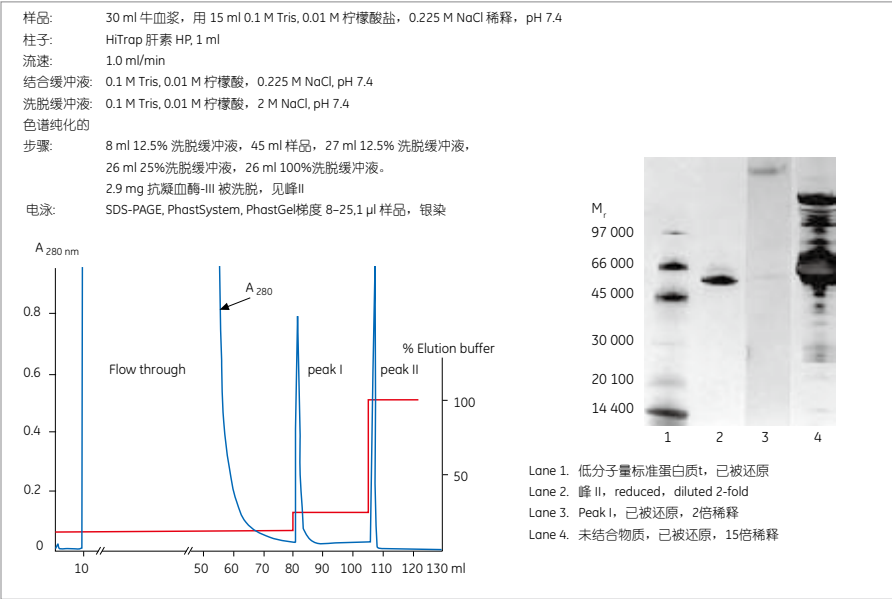


图. 38. 使用HiTrap 肝素 HP, 1 ml 柱子从牛血浆中纯化对抗纤维蛋白酶III。

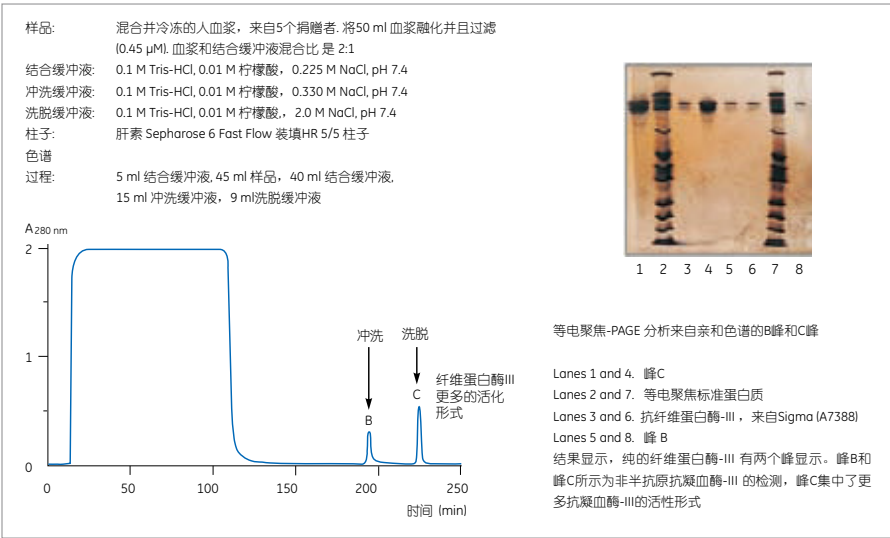


图. 39. 用肝素 Sepharose 6 Fast Flow 从人血浆中纯化凝血酶-III。峰B为在洗涤缓冲液中的洗脱物。峰C为洗脱缓冲液中的洗脱物, 并且含有更多的凝血酶-III活性形式。

## 分离操作

与DNA结合蛋白相同, 见第63页。

- 对于凝血因子而言, 肝磷脂作为亲和配基, 在结合缓冲液中含有一个低浓度的0.1M的NaCl 是合适的。
- 如果增加盐离子浓度的梯度产生一个令人不满意的结果, 使用肝磷脂 (1 - 5 mg/ml) 在洗脱缓冲液中作为一个竞争性试剂。

## 生物素和生物素酰化的物质

### HiTrap Streptavidin HP, Streptavidin Sepharose High Performance

生物素和生物素酰化的物质结合到抗生物素蛋白链霉素上 (从链霉素生物素蛋白中分离出来的一种分子), 它们之间具有很强的相互作用, 在洗脱过程中需要变性的条件才能将结合蛋白洗脱下来。通过将抗生物素蛋白链霉素偶联到Sepharose 上, 可以产生一个具有高特异性的亲和介质, 与用生物素基化的抗体之间产生很强的相互作用, 可以被用于抗原的纯化。生物素酰化的抗原抗体复合物牢固的结合在抗生物素蛋白链霉素Sepharose 上, 然后抗原可以在更加缓和的洗脱条件下被分别洗脱, 剩下生物素基化的抗体。另一种可以选择的用亲和素标记抗体的方法是使2-亚胺甲磺酸在pH高于9.5时结合到抗生物素蛋白链霉素上, 在pH为4时进行洗脱。(见图40)。

纯化选项

	结合容量	最大操作流速	注释
HiTrap	生物素 > 300 nmol/柱子	4 ml/min	预装柱1 ml 柱子
抗生物素蛋白链霉素HP	生物素酰化的 BSA, 6 mg/柱子		
抗生物素蛋白链霉素	生物素, > 300 nmol/介质	150 cm/h*	提供即时可用的混悬液
Sepharose	生物素酰化的 BSA, 6 mg/介质		装柱子
High Performance			

\* 见附录4，将线性流速(cm/h)转换成体积流速。最大的操作流速是通过测量带有柱床的10cm高和5cm直径的装填好的柱子，经过计算而获得的。

纯化示例

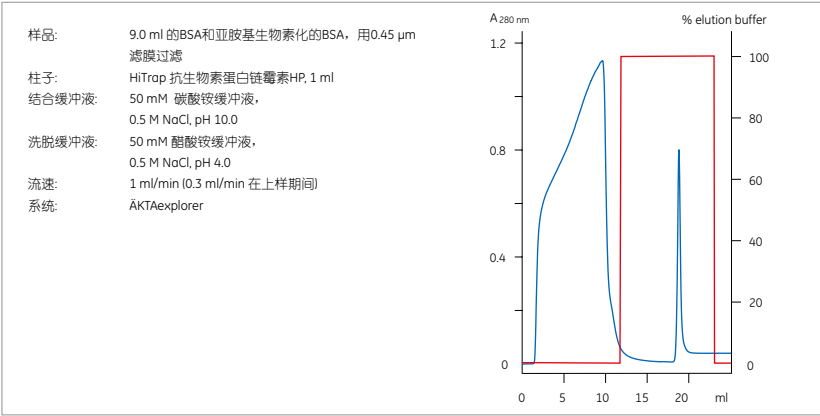


图. 40. 用HiTrap 抗生物素蛋白链霉素 HP, 1ml柱子纯化亚胺基生物素化的BSA。

分离操作:

**生物素酰化的物质**

结合缓冲液: 20 mM 磷酸钠, 0.15 M NaCl, pH 7.5

洗脱缓冲液: 8 M 盐酸胍, pH 1.5

**亚胺基生物素酰化的物质**

结合缓冲液: 50 mM 碳酸铵, 0.5 M NaCl, pH 10.0

洗脱缓冲液: 50 mM 醋酸铵, 0.5 M NaCl, pH 4.0

1. 用10个柱体积的结合缓冲液平衡柱子。
2. 上样。使用较低的流速0.1-0.5ml/min可以产生最好的结果。
3. 用至少10个柱体积的结合缓冲液冲洗柱子或者直到没有物质在洗脱物中出现（用紫外吸光监测，A<sub>280nm</sub>）
4. 用10-20倍柱体积的洗脱缓冲液进行洗脱。\*

\* 如果洗脱条件非常苛刻，推荐使用中和缓冲液收集片段(100 μl – 200 μl 1 M Tris-HCl, pH 9.0 每毫升馏分)，因此片段最终的pH大约在中性或者使用脱盐柱进行一个快速的缓冲液交换(见133页)。



如果需要比较苛刻的条件来破坏抗生物素蛋白链霉素-生物素键，可能会影响样品和配基。抗生物素蛋白链霉素Sephacrose 柱子在使用上述条件洗脱后就不能再次重新使用。

抗原纯化

抗原可以通过结合到抗生物素蛋白链霉素的生物素酰化的抗体-抗原复合物中进行纯化。下面的方法适用于HiTrap 抗生物素蛋白链霉素 HP， 来自Anal. Biochem. 163,270-277(1987), Gretch, D.R., Suter, M. and Stinski, M.F.的工作。

增溶缓冲液: 20 mM 磷酸钠, 150 mM NaCl, pH 7.5 with 0.1% SDS, 1.0% Nonidet™-P-40, 0.5% 去氧胆酸钠, 0.02% NaN3 , 100 µg/ml PMSF

洗脱缓冲液: 0.1 M 甘氨酸-HCl, pH 2.2

1. 用增溶缓冲液适当的增溶抗原的量，通过样品离心12 000 g 15分钟来净化样品。
2. 加入生物素基化的抗体并且调整溶液的体积至1 ml。
3. 将样品上下颠倒混合，孵育，最少1小时或者过夜。
4. 用10倍柱体积的增溶缓冲液平衡柱子。
6. 将抗体-抗原溶液加入到柱子中，用较低的流速，例如0.2 ml/min. 如果样品体积少于1ml，加入样品后，停留几分钟，使之相互结合。
7. 用10倍体积的增溶缓冲液冲洗出未结合的样品或者直到没有物质被洗脱下来为止（用紫外吸光监测，A<sub>280nm</sub>）。
8. 用5-10倍柱体积的洗脱缓冲液进行洗脱。\*

\* 如果洗脱条件非常苛刻，推荐使用中和缓冲液进行片段收集 (100 µl – 200 µl 1 M Tris-HCl, pH 9.0 每毫升馏分)，因此片段最终的pH大约在中性或者使用脱盐柱进行一个快速的缓冲液交换(see page 133)。

介质特性

	组成	pH 稳定性*	颗粒平均大小
抗生物素蛋白链霉素			
Sephacrose	抗生物素蛋白链霉素偶联	短期 2-10.5	34 µm
High Performance	到高效Sephacrose, 用N-羟基琥珀酰亚胺	长期 4-9	
HiTrap抗生物素蛋白链霉素HP	偶联方法		

\* 长期是指pH的间隔范围，在这一范围内，介质经过长期的存放仍然是稳定的，对于随后进行的色谱操作没有任何不利的影响；短期是指pH在介质的再生、净化和清洁处理步骤之间的间隔范围。

储存

用20%的乙醇溶液冲洗介质和柱子（对于已经装填的柱子，使用大约5倍柱体积的液体进行冲洗），并且储存在+4到 +8℃。

# 纯化或者去除纤维结合蛋白

## 明胶Sepharose 4B

纤维结合蛋白是一个高分子量的糖蛋白，它存在于许多类型细胞的表面，并且在许多细胞外液中存在，包括血浆。在生理pH和离子强度的条件下，纤维结合蛋白特异性的结合到明胶上。

### 纯化选项

	结合容量/ml介质	最大纤维流速	注释
明胶 Sepharose 4B	1 mg 人血浆纤维	75 cm/h*	提供即时可用的混悬液用于柱子装填。


\* 见附录4，将线性流速(cm/h)转换成体积流速。最大的操作流速是通过测量带有柱床的10cm高和5cm直径的装填好的柱子，经过计算而获得的。

### 分离操作

结合缓冲液: PBS: 140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub>, 1.8 mM KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub>, pH 7.4

可以选择的洗脱缓冲液:

- 0.05 M 醋酸钠, 1.0 M 溴化钠 (或者溴化钾), pH 5.0
- 结合缓冲液 + 8 M 尿素
- 结合缓冲液 + 精氨酸

 纤维结合蛋白具有结合玻璃的趋势。使用硅化处理的玻璃可以防止吸附作用。

### 净化

用2-3倍柱体积的缓冲液冲洗3次，使用高pH (0.1M Tris- HCl, 0.5 M NaCl, pH8.5 ) 和低 pH (0.1 M 醋酸钠, 0.5 M NaCl, pH4.5)的缓冲液交替冲洗。然后用3-5倍柱体积的结合缓冲液立即再次平衡柱子。用0.1 % Triton X-100 在 +37℃ 冲洗柱子1分钟，去除变性的蛋白质和脂质。立即用5倍柱体积的结合缓冲液再次平衡柱子。

### 介质特性

	配基密度	组成	pH 稳定性*	颗粒平均大小
明胶 Sepharose 4B	4.5–8 mg 明胶/ml	明胶连接到 Sepharose 使用CNBr 方法	短期 3–10 长期 3–10	90 μm

\* 长期是指pH的间隔范围，在这一范围内，介质经过长期的存放仍然是稳定的，对于随后进行的色谱操作没有任何不利的影响；短期是指pH在介质的再生、净化和清洁处理步骤之间的间隔范围。

### 化学稳定性

在所有的通常用的水溶性缓冲液中是稳定的。

### 储存

用20%的乙醇溶液在中性pH 条件下冲洗柱子和介质，（对于已经填充好的柱子用大约5倍柱体积的液体冲洗柱子），在+4到+8℃的条件下储存。

# 纯化或者去除白蛋白

## HiTrap Blue HP, Blue Sepharose 6 Fast Flow

在纯化步骤之前或者在纯化步骤之后，用同样的操作既可以用于纯化白蛋白也可以将白蛋白作为一种特殊的污染物去除。

白蛋白可以结合到Cibacron™ Blue F3G-A，这是一种合成的多环染料，其作用类似于芳香族的阴离子配基，通过电力和/或疏水性相互作用结合白蛋白。相似的相互作用也发生在凝血因子、脂蛋白和干扰素上。促皮质素Blue F3G-A 连接到Sepharose 上制备成Blue Sepharose 亲和介质。

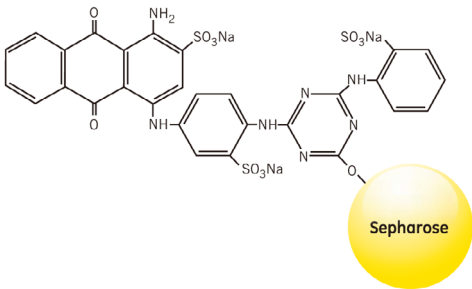


图. 41. Blue Sepharose Fast Flow 和 高效Blue Sepharose的部分结构。

- 使用HiTrap Blue HP 1ml 或者5ml 柱子从哺乳动物表达系统去除多数白蛋白，或者当样品已知含有高水平的白蛋白可能会掩盖利用紫外吸收对其它蛋白质吸收峰的观察。
- 在从腹水、细胞培养液或者血清中纯化免疫球蛋白的过程中，白蛋白可能会产生严重的污染，主要是由于它在起始的原料中大量存在。来自GE Healthcare 的技术手册The Antibody Purification Handbook 给出了相关的建议，在抗体纯化期间选择相关技术去除白蛋白。
- Cibacron Blue F3G-A 也显示出对于自然出现的分子，某种结构的相似性，例如辅助因子 NAD<sup>+</sup>，能够很强的、很特异性的结合宽范围的蛋白质，包括激酶、脱氢酶和很多含有腺(嘌呤核)苷酰(基)因子的其它酶。

## 纯化选项

	结合容量	最大操作流速	注释
HiTrap Blue HP	人血清白蛋白, 20 mg/柱子	4 ml/min (1 ml 柱子)	预装柱
	人血清白蛋白, 100 mg/柱子	20 ml/min (5 ml 柱子)	
Blue Sepharose 6 Fast Flow*	人血清白蛋白, > 18 mg/ml 介质	750 cm/h**	提供即时可用的混悬液，用于柱子装填

\* 由于再水化不是必需的，所以传统的选择是用Blue Sepharose CL-6B

\*\* 见附录4，将线性流速(cm/h)转换成体积流速。最大的操作流速是通过测量带有柱床的10cm高和5cm直径的装填好的柱子，经过计算而获得的。

纯化示例

图42所示，使用HiTrap Blue HP 柱子对逐渐增加的人血清白蛋白进行纯化。这一过程很容易放大生产，通过将几个1ml或者5ml的HiTrap柱子串联起来就可以了。

图43所示，使用Blue Sepharose 6 Fast Flow从干扰素  $\beta$  中分离人血清白蛋白。

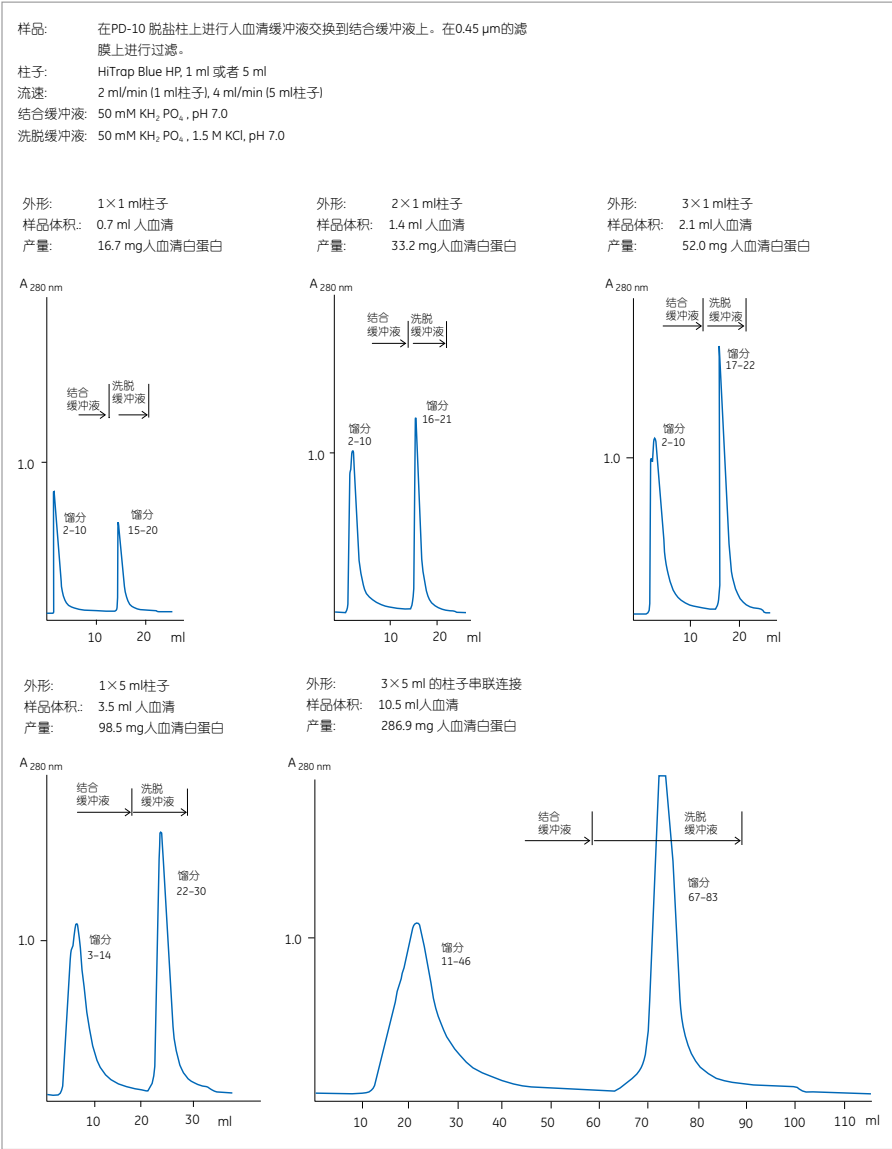


图. 42. 用HiTrap Blue HP 柱子可以扩大规模生产，并且预测分离和重现产量

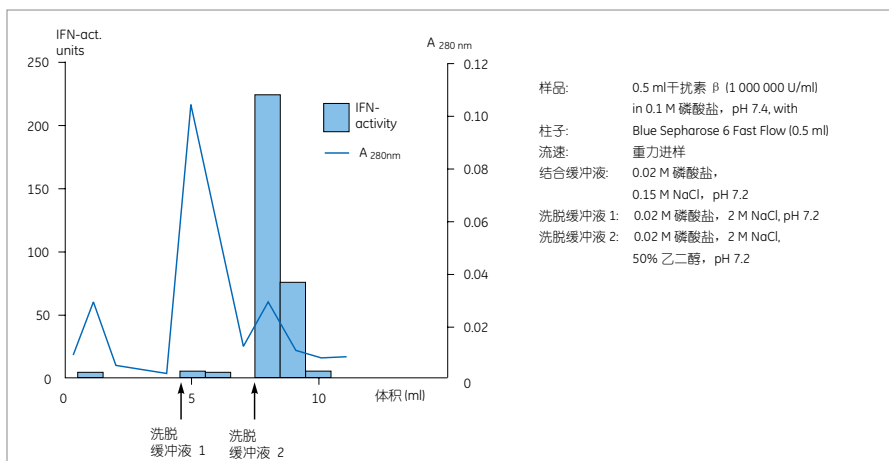


图. 43. 在Blue Sepharose 6 Fast Flow 柱子上分离纯化人血清白蛋白和干扰素  $\beta$  。

在这些例子中，通过增加缓冲液中离子强度或者改变缓冲液的极性来进行洗脱。改变缓冲溶液的pH 值也可以洗脱结合的目标蛋白，但是对于特异性结合蛋白的洗脱使用适当的辅助因子是较好的。

## 分离操作

结合缓冲液: 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.0 or 20 mM 磷酸钠, pH 7.0

洗脱缓冲液: 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.5 M KCl, pH 7.0 or 20 mM ; 磷酸钠, 2 M NaCl, pH 7.0

1. 用5倍柱体积的结合缓冲液平衡柱子。
2. 上样，使用注射器或者泵。
3. 用10倍柱体积的结合缓冲液冲洗柱子或者直到没有洗脱物被监测出来。  
(用紫外吸光进行监测， $A_{280\text{nm}}$ )
4. 用5倍柱体积的洗脱缓冲液进行洗脱。如果相互作用很难逆转，需要使用更多的体积冲洗。

## 净化

用5倍柱体积冲洗，使用高pH (0.1 M Tris-HCl, 0.5 M NaCl, pH8.5) 溶液冲洗，然后再使用低pH (0.1M 醋酸钠, 0.5M NaCl, pH4.5)冲洗。重复4-5次。立即再用结合缓冲液再平衡。

用4倍柱体积的0.1M NaOH在较低的流速下去除沉淀的蛋白质，接下来用3-4倍柱体积的70%的乙醇或者2M的硫酸钾冲洗。也可以选择用2倍柱体积的6M的盐酸胍冲洗柱子。立即用结合缓冲液再次平衡柱子。

通过用3-4倍柱体积的70%的乙醇或者30%异丙醇冲洗柱子，去除结合很强的疏水性蛋白、脂蛋白和脂质等物质。另外也可以选择2倍柱体积的碱性或者酸性去污剂溶液，例如0.1%的非离子去污剂在1M乙酸溶液中，以较低的流速流过柱子，接下来用5倍柱体积的70%的乙醇除去除残留的去污剂。立即用结合缓冲液再次平衡柱子。



介质特性

	配基和密度	组成	pH 稳定性*	平均颗粒大小
HiTrap Blue HP	促皮质素Blue F3G-A	配基通过三嗪的方法	短期 3-13	34 μm
	4 mg/ml	连接到Sepharose High Performance基质上。	长期 4-12	
Blue Sepharose 6	促皮质素 Blue F3G-A	配基通过三嗪的方法	短期 3-13	90 μm
Fast Flow	6.7-7.9 μmoles/ml	连接到Sepharose Fast Flw	长期 4-12	

\* 长期是指pH的间隔范围，在这一范围内，介质经过长期的存放仍然是稳定的，对于随后进行的色谱操作没有任何不利的影响；短期是指pH在介质的再生、净化和清洁处理步骤之间的间隔范围。

化学稳定性

在所有通常使用的水溶性缓冲液中是稳定的。在70%的乙醇、8M的尿和6M的盐酸胍中是稳定的。

储存

用20%的乙醇冲洗介质和柱子。(对于已经装填好介质的柱子，使用大约5倍柱体积的液体冲洗柱子)，并且存放在+4到+8℃的条件下。

依赖于NAD<sup>+</sup>的脱氢酶和依赖于ATP的激酶

5’ AMP Sepharose 4B, HiTrap Blue HP, Blue Sepharose 6 Fast Flow

依赖于NAD<sup>+</sup>的脱氢酶和依赖于ATP的激酶能与AMP发生强烈的相互作用，因此用梯度NAD<sup>+</sup> 或者 NADP<sup>+</sup>能够使脱氢酶的同工酶的混合物在5’ AMP Sepharos4B进行选择性的洗脱。

5’ AMP Sepharose4B的合成需要几步进行。Diaminohexane通过嘌呤环的N<sup>6</sup>被连接到AMP。衍生后的AMP通过aminohexane spacer偶联到Sepharose4B上。

依赖于NAD<sup>+</sup>的脱氢酶和依赖于ATP的激酶属于一个更大的蛋白组的成员，可以与Cibacron Blue F3G-A发生相互作用，Cibacron Blue F3G-A是一个合成的多环染料，与辅助因子NAD<sup>+</sup>有某些结构具有相似性。当作为亲和配基附着在Sepharose6Fast Flow 或者 Sepharose HP，促皮质素Blue F3G-A 将会很强烈的和特异性的结合宽范围的蛋白质。对一些蛋白质特异性的结合是由于它们对核苷酸因子的需要，然而，其它的蛋白质，例如白蛋白、脂蛋白质、凝血因子和干扰素等，通过与芳香族阴离子配基以静电力和/或疏水相互作用的方式进行非特异性的结合。

纯化选项

	结合容量	最大操作流速	注释
5' AMP Sepharose 4B	乳酸脱氢酶， 10 mg/ml 介质 (0.1 M磷酸缓冲液， pH 7.0 at +20℃)	75 cm/h*	对于能与NAD <sup>+</sup> 发生亲和作用的蛋白质具有高度的特异性。提供冻干的粉末需要再水化才能使用
HiTrap Blue HP	人血清白蛋白， 20 mg/柱子	4 ml/min (1 ml柱子)	对于能与NAD <sup>+</sup> 发生亲和作用的蛋白质具有普遍的特异性。
	人血清白蛋白， 100 mg/柱子	20 ml/min (5 ml柱子)	对其它蛋白质的反应缺少特异性。提供预装柱。
Blue Sepharose Fast Flow	人血清白蛋白， > 18 mg/ml 介质	750 cm/h*	对于能与NAD <sup>+</sup> 发生亲和作用的蛋白质具有普遍的特异性。对其它蛋白质的反应缺少特异性。提供即时可用的混悬液用于柱子的装填。

\* 见附录4，将线性流速(cm/h)转换成体积流速。最大的操作流速是通过测量带有柱床的10cm高和5cm直径的装填好的柱子，经过计算而获得的。

5' AMP Sepharose 4B

分离操作

在0.1M 磷酸盐缓冲液中，pH7.0的条件下，将需要的粉末膨胀15分钟。(每克干粉末需要100 ml 缓冲液)，并且在烧结玻璃滤器中冲洗。填装柱子。

(见附录3).

结合缓冲液: 10 mM磷酸盐, 0.15 M NaCl, pH 7.3

如果感兴趣的蛋白质通过离子键结合到介质上，可能需要降低结合缓冲液中NaCl的浓度。

洗脱缓冲液:  
• 使用低浓度的游离的辅助因子，NAD<sup>+</sup> 或者NADP<sup>+</sup> (一直到 20 mM)进行阶梯式或者线性梯度洗脱。

如果在纯化过程中使用了去污剂或者变性剂，它们也可以在高pH洗脱液中或者低pH 洗脱液中使用。

净化

用2-3倍柱体积的缓冲液冲洗三次，交替使用高pH(0.5M NaCl, 0.1M Tris-HCl, pH8.5 ) 的缓冲液和低pH (0.5M NaCl, 0.1M 醋酸钠, pH4.5)的缓冲液冲洗柱子。立即用3-5倍柱体积的结合缓冲液再次平衡柱子。

用2倍柱体积的去污剂，例如0.1 % Triton X-100冲洗1分钟，去除变性蛋白质或者脂质。立即用5倍柱体积的结合缓冲液再平衡柱子。

介质特性

	配基密度	组成	pH 稳定性*	颗粒平均大小
5' AMP Sepharose 4B	2 µmoles/ml	N <sup>6</sup> (6-aminohexyl-) 5' AMP 通过CNBr 连接方法 偶联到Sepharose 4B**	短期 4-10 长期 4-10	90 µm

\* 长期是指pH的间隔范围，在这一范围内，介质经过长期的存放仍然是稳定的，对于随后进行的色谱操作没有任何不利的影响；短期是指pH在介质的再生、净化和清洁处理步骤之间的间隔范围。

\*\* 配基通过烷基链附着到N6氨基基团上，可以形成一个很稳定的产物，在构象上是适合大多数5' AMP- 或者腺（嘌呤核）苷酸辅助因子需要的酶。

化学稳定性

在所有通常使用的水溶性缓冲液中和添加剂例如去污剂中是稳定的。避免高浓度的EDTA、尿素、盐酸胍和强氧化剂。暴露在pH>10条件下可以导致磷酸基团的丢失。

储存

冻干，在干燥的条件下，低于+8℃条件下存放。

用20%的乙醇溶液在中性 pH条件下冲洗介质和 柱子（对于已经装好的柱子，使用大约5倍柱体积的液体冲洗），在+4到+8℃条件下存放。


HiTrap Blue HP, Blue Sepharose 6 Fast Flow

用亲和配基NAD<sup>+</sup>对白蛋白的纯化或者去除所提供的信息（见70页）也可以用于纯化酶。

分离操作

关于白蛋白的分离操作，见第72页。但是注意下列事项：

在洗脱中使用低浓度的含有游离的辅助因子，NAD<sup>+</sup> 或者 NADP<sup>+</sup> (1-20 mM)，或者增加离子强度(使用2M NaCl 或者 KCl,在通常情况下，1M是足够的)。

 为了减少非特异性结合蛋白，使用更高浓度的辅助因子或者盐或者更加苛刻的洗脱液，例如尿素或者异硫氰酸钾。降低试剂的极性，可以使用下列试剂，例如二噁烷（可以高达10%）或者乙二醇（可以高达50%）。

依赖于NADP<sup>+</sup>的脱氢酶和其它能与NADP<sup>+</sup>发生亲和作用的酶

2' 5' ADP Sepharose 4B, Red Sepharose CL-6B

依赖于NADP<sup>+</sup>的脱氢酶能与2' 5' ADP发生强烈的相互作用。用NAD<sup>+</sup> 或者 NADP<sup>+</sup> 的浓度梯度对结合到2' 5' ADP Sepharose4B的脱氢酶同工酶的混合物的溶液进行选择洗脱。

介质的合成需要进行几个步骤。Diaminohexane通过嘌呤杂环上的N6被连接到2' 5' ADP上。被衍生化的ADP然后通过aminohexane 的间隔臂偶联到Sepharose4B上。图44所示是2' 5' ADP Sepharose4B的部分结构。

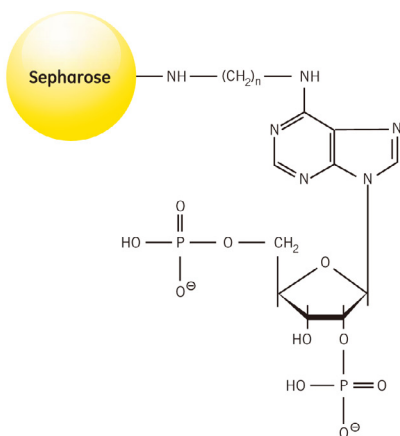


图 44. 2' 5' ADP Sepharose 4B 的部分结构。

依赖于 NADP<sup>+</sup> 的脱氢酶是一个更大的蛋白质家族的成员，可以与 Procion™ Red 发生相互作用，Procion™ Red 是一个合成的多环染料，与自然发生的 NADP<sup>+</sup> 具有某些结构上的相似性。当被使用的亲和配基吸附到 Sepharose CL-6B 上，Procion Red HE-3B 可以强烈的并且特异性的结合宽范围的蛋白质。一些特异性的结合蛋白质是由于它们需要核苷酸辅助因子，然而其它的蛋白质，例如白蛋白、脂蛋白质、凝血因子和干扰素，以非特异性的方式结合，如与芳香环阴离子的配基的静电力的相互作用和/或疏水键的相互作用。

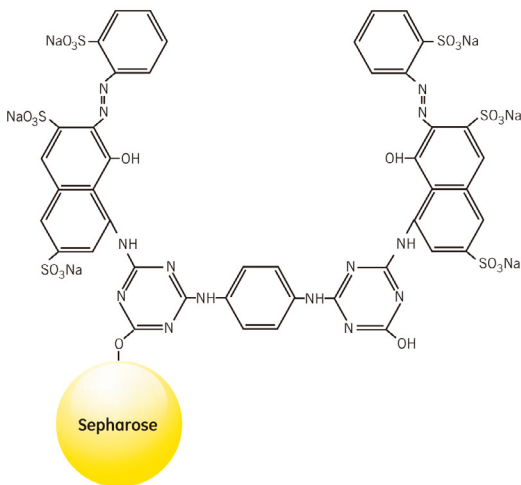


图. 45. Red Sepharose CL-6B 的部分结构。

纯化选项

	结合容量/ml 介质	最大操作流速	注释
2' 5' ADP Sepharose 4B	葡萄糖-6-phosphate, 0.4 mg(0.1 M Tris-HCl, 5 mM EDTA, 1 mM 2-巯基乙醇 缓冲液, pH 7.6).	75 cm/h*	对于能够与NADP <sup>+</sup> 亲和的s 脱氢酶, 蛋白质具有高度的特异性。 提供冻干粉末, 需要再水化
Red Sepharose CL-6B	兔乳酸脱氢酶, 2 mg	150 cm/h*	对于能够与NADP <sup>+</sup> 发生亲和 作用的蛋白质有普遍的特异性 对于其它蛋白质缺少特异性反应。 提供冻干粉末, 需要再水化

\*见附录4，将线性流速(cm/h)转换成体积流速。最大的操作流速是通过测量带有柱床的10cm高和5cm直径的装填好的柱子，经过计算而获得的。

2' 5' ADP Sepharose 4B

纯化示例

图46所示是将依赖于NADP<sup>+</sup>的酶从来源于Candida utilis的粗制提取物中，使用线性梯度洗脱进行分离。

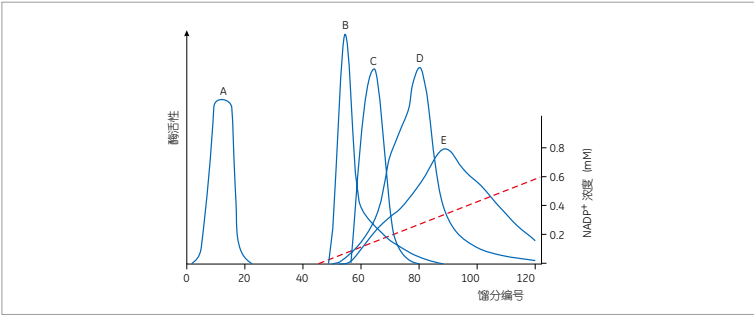


图. 46. 用0–0.6 mM NADP<sup>+</sup>梯度洗脱。A: 非干扰蛋白质, B: 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶。  
C: 谷氨酸脱氢酶, D: 谷光甘肽还原酶, E: 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶。 (Brodellius et al., Eur. J. Biochem. 47, 81 –89 (1974)).

分离操作

在0.1M 磷酸盐缓冲液中，pH7.3的条件下，将所需要的粉末浸泡膨胀15分钟。(每克干粉末需要100 ml 缓冲液)，并且在烧结玻璃滤器中冲洗(多空度 G 3)。填装柱子。  
(见附录3)。

结合缓冲液: 10 mM 磷酸盐, 0.15 M NaCl, pH 7.3



如果感兴趣的蛋白质通过离子键结合到介质上，可能需要在结合缓冲液中降低NaCl 的浓度。

提取缓冲液:

- 使用低浓度的含有游离的辅助因子，NAD<sup>+</sup> 或者 NADP<sup>+</sup> (高达 20 mM)，用阶梯或者梯度方式洗脱。



如果在纯化过程中使用了去污剂或者变性剂，也可以在低pH值或者高pH值的冲洗缓冲液中使用。

净化

用2-3个柱体积的缓冲液冲洗3遍，使用高pH(0.1M Tris-HCl, 0.5M NaCl, pH8.5) 和低pH (0.1 M 醋酸钠, 0.5M NaCl, pH4.5 )缓冲液交替冲洗。然后立即用3-5个柱体积的结合缓冲液冲洗柱子。

用2倍柱体积的去污剂，如0.1 % Triton X-100 冲洗1分钟。然后立即用5倍柱体积的结合缓冲液再平衡柱子。

介质特性

	配基密度	组成	pH 稳定性*	平均颗粒大小
2' 5' ADP Sepharose 4B	2 µmoles/ml	N <sup>6</sup> -(6-aminohexyl)腺苷 2' 5' 二磷酸盐通过CNBr 偶联到Sepharose 4B**	短期 4-10 长期 4-10	90 µm

\* 长期是指pH的间隔范围，在这一范围内，介质经过长期的存放仍然是稳定的，对于随后进行的色谱操作没有任何不利的影响；短期是指pH在介质的再生、净化和清洁处理步骤之间的间隔范围。

\*\* 通过NADP<sup>+</sup> 的类似物、腺苷2' 5' 二磷酸盐的N<sup>6</sup>的位置偶联，给出一个配基在立体结构上适于大多数NADP<sup>+</sup>-依赖的酶。

化学稳定性

在所有通常使用的水溶性缓冲液中和添加剂如去污剂中是稳定的。避免使用高浓度的EDTA、尿素、盐酸胍、离液序列高的盐和强氧化剂。暴露在pH>10的液体中可能会导致磷酸基团的丢失。

贮存

在冻干状态、低于8℃的条件下，干燥的环境中存放。

用20%的乙醇溶液在中性pH条件下冲洗介质和柱子（对于已经装填好的柱子，使用大约5倍柱体积的液体冲洗柱子），在+4到+8℃的条件下存放。

Red Sepharose CL-6B

分离操作

将所需要的粉末浸泡膨胀15分钟，并且在烧结玻璃滤器中用蒸馏水冲洗(多孔径 G3 )。每克干粉未需要100 ml 水，分装成几个等份。每克冻干物质的最终体积大约是4ml。填装柱子。(见附录3)。

结合缓冲液: 使用pH值在中性左右的缓冲液，在这个pH值条件下，蛋白质可以特异性的结合到Red Sepharose CL-6B。



结合容量取决于一些参数，例如样品浓度、流速、pH值、缓冲组分和温度。就纯化的容量而言，为了得到最佳的纯化效果，不同的pH值和流速决定了结合容量。

洗脱缓冲液:

- 使用低浓度的游离的辅助因子,  $\text{NAD}^+$  或者  $\text{NADP}^+$  (高达 20 mM), 或者增加离子强度, 可以高达 2 M NaCl 或者 1 M KCl。



如果在纯化过程中使用了去污剂或者变性剂, 这些试剂也可以在低pH值或者高pH值的冲洗缓冲液中使用。

### 净化

用2-3个柱体积的缓冲液冲洗3次。交替使用高pH(0.1M Tris-HCl, 0.5M NaCl, pH8.5) 和低pH (0.1M 醋酸钠, 0.5M NaCl, pH4.5)缓冲溶液冲洗柱子。随后立即用3-5倍柱体积的结合缓冲液再次平衡柱子。

通过使用2个柱体积的6M的盐酸胍或者8M的尿素冲洗柱子, 去除变性的蛋白质或者脂质。另外也可以选择使用2个柱体积的去污剂在碱性或者酸性溶液中去去除变性的蛋白质或者脂质, 例如 0.1% Triton X-100 在1M 的醋酸溶液中。使用5个柱体积的70%的乙醇冲洗柱子去除残留的去污剂。随后在这两种情况下均用5倍柱体积的结合缓冲液立即冲洗柱子。

### 介质特性

	配基和密度	组成	pH 稳定性*	颗粒平均大小
Red Sepharose CL-6B	Procion Red HE 3B	通过三嗪的方法偶联到	短期 3-13	90 $\mu\text{m}$
	2 $\mu\text{moles/ml}$	Sepharose CL-6B	长期 4-12	

\* 长期是指pH的间隔范围, 在这一范围内, 介质经过长期的存放仍然是稳定的, 对于随后进行的色谱操作没有任何不利的影响; 短期是指pH在介质的再生、净化和清洁处理步骤之间的间隔范围。

### 化学稳定性

在通常使用的水溶性缓冲液中和一些添加剂如8M的尿素和6M的盐酸胍是稳定的。

### 储存

以冻干粉未存放, 在干燥状态下, 存放在低于+8℃的条件下。

用20%的乙醇在 0.1M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH8.0 的条件下冲洗柱子 (对于已经填装好的柱子使用大约5倍柱体积的缓冲液冲洗柱子), 并且存放在+4到+8℃的条件下。

糖蛋白或者多糖

Con A Sepharose 4B, 扁豆凝集素 Sepharose 4B, Agarose 麦胚外源凝集素

糖蛋白和多糖通过特殊的糖残基与一组叫做外源凝集素的蛋白发生可逆的反应。作为纯化介质的配基，外源凝集素被用作分离糖蛋白，糖脂类，多糖，亚细胞颗粒和细胞，纯化去污剂增溶细胞膜组分。结合到凝集素上的物质用梯度盐离子浓度或者竞争性结合物质进行洗脱。

介质筛检

选择最佳的凝集素进行纯化，可能需要筛选不同的介质。对于配基，Con A、扁豆凝集素和麦胚外源凝集素提供了一个波长参数来分离糖蛋白。表5给出了它们的特异性。

表 5. 配基的特异性.

凝集素	特异性
甘露糖/葡萄糖结合外源凝集素	
Con A, 刀豆属 ensiformis	分支的甘露糖，末端为甘露糖或者葡萄糖的碳水化合物( $\alpha$ Man > $\alpha$ Glc > GlcNAc)。
扁豆凝集素, Lens culinaris	分支的甘露糖，具有海藻糖连接 $\alpha$ (1,6) to N-乙酰基-葡萄糖胺, ( $\alpha$ Man > $\alpha$ Glc > GlcNAc).
N-乙酰葡萄糖胺结合外源凝集素	
麦胚外源凝集素, 小麦属	N-连接寡糖的壳二糖核 [GlcNAc( $\beta$ 1,4GlcNAc) <sub>1-2</sub> > $\beta$ GlcNAc]。

Con A 结合分支的甘露糖，末端为甘露糖或者葡萄糖的碳水化合物  
( $\alpha$  Man >  $\alpha$  Glc > GlcNAc)

Con A 是一个四聚体的金属蛋白质，从刀豆属 ensiformis (刀豆)中分离出来。Con A 能够结合的分子包括  $\alpha$  -D-mannopyranosyl、 $\alpha$  -D-glucopyranosyl 和与其立体空间相关的残基。结合的糖蛋白需要具有C-3 , C-4 和C-5 羟基用来与ConA发生反应。Con A 能够用于下列方面，例如：

- 糖蛋白、多糖和糖脂类的分离和纯化。
- 检测含有碳水化合物的物质中组分的变化，例如在生长发育过程中。
- 在去污剂增溶的膜中，对细胞表面糖蛋白进行分离。
- 膜囊分离进入 “inside out” 和 “right side out” 部分。



纯化选项

	结合容量/ml 介质	最大操作流速	注释
Con A Sepharose 4B	猪的甲状腺球蛋白, 20-45 mg	75 cm/h**	提供即时可用的混悬液用于柱子装填

\* 提供醋酸盐缓冲液(0.1 M, pH 6), 含有1 M NaCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM MnCl<sub>2</sub>, 20%乙醇。  
\*\* 见附录4, 将线性流速(cm/h)转换成体积流速。最大的操作流速是通过测量带有柱床的10cm高和5cm直径的装填好的柱子, 经过计算而获得的。

纯化示例

图47所示的是人细胞表面同种抗原在Con A Sepharose4B柱子上的纯化。

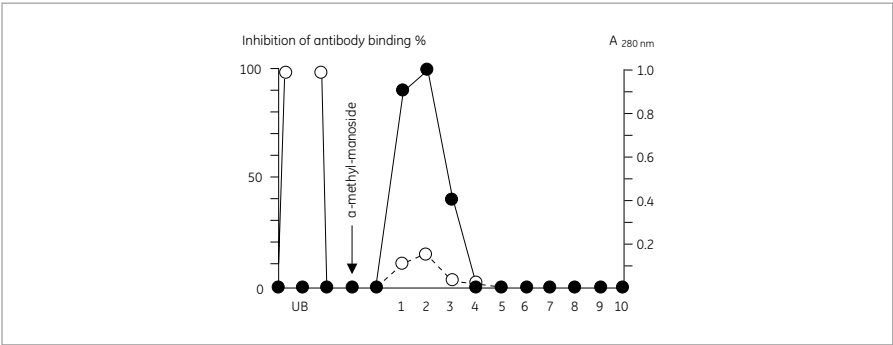



图. 47. Con A Sepharose 4B 纯化细胞表面抗原。实心圈表示抗原活性，空心圈表示蛋白质结构。  
参考: 新的异型的人细胞表面同种 (异体) 抗原 gp60, 由人的单克隆抗体确定: Schadendorf, D. et al., J. Immunol. 142,1621 (1989)。

分离操作

结合缓冲液: 20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 1 mM MnCl, 1 mM CaCl, pH 7.4

洗脱缓冲液: 0.1-0.5 M 甲基-  $\alpha$  -D-glucopyranoside (甲基-  $\alpha$  -D-葡萄糖苷)或者甲基-  $\alpha$  -D-mannopyranoside (甲基-  $\alpha$  -D-甘露糖苷), 20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, pH 7.4

1. 装填柱子(见附录3), 用至少10倍柱体积的结合缓冲液冲洗柱子, 去除储存剂。
2. 用10倍柱体积的结合缓冲液平衡柱子。
3. 上样, 在上样期间使用一个较低的流速15 cm/h。(流速是获得最大结合的最为关键的因素)。
4. 用5-10倍柱体积的结合缓冲液冲洗柱子或者直到在洗脱液中没有物质出现为止 (在280nm处用紫外吸光度法进行监测)
5. 用5倍柱体积的洗脱缓冲液进行洗脱。

 在去污剂存在的条件下, 用Con A Sepharose4B对样品进行回收可能会减少产量。如果感兴趣的糖蛋白与去污剂同时存在, 并且对扁豆凝集素或者麦胚外源凝集素有亲和作用, 那么扁豆凝集素Sepharose4B 亲和介质或者 Agarose 麦胚外源凝集素亲和介质可以用于一个适宜的可以选择的配基来提高回收率。



对于含有糖蛋白的复杂样品，并且与凝集素有不同的亲和作用，使用连续的梯度洗脱或者阶梯式洗脱可以提高分辨率。在洗脱过程中暂停流速几分钟在有些时候可以提高样品的回收率。



通过降低pH值可以洗脱紧密结合的物质。注意不推荐使用pH值低于4.0的洗脱也并且当pH值低于5.0时， $Mn^{2+}$ 开始从ConA中溶解下来，在重新使用前柱子需要重新装载 $Mn^{2+}$ 。

净化

用10个柱体积的 0.5M NaCl, 20 mM Tris-HCl, 在pH8.5时冲洗柱子,接下来用0.5M NaCl, 20 mM 醋酸盐, 在pH4.5时冲洗柱子。重复3次，然后用结合缓冲液重新平衡色谱柱。

用下述条件去除紧密结合的物质:

- 用0.1M 的硼酸盐在pH6.5时，用较低的流速冲洗柱子
- 用20% 的乙醇或者50%乙二醇冲洗柱子
- 用0.1% Triton X- 100 在 +37℃条件下冲洗柱子1分钟

在上述任何冲洗步骤之后立即用5倍柱体积的结合缓冲液再次平衡柱子。

介质特性

	介质密度	组成	pH 稳定性*	颗粒的平均大小
Con A Sepharose 4B	10-16 mg/ml	Con A 偶联到 Sepharose 4B 通过CNBr 方法	短期 4-9 长期 4-9	90 μm

\* 长期是指pH的间隔范围，在这一范围内，介质经过长期的存放仍然是稳定的，对于随后进行的色谱操作没有任何不利的影响；短期是指pH在介质的再生、净化和清洁处理步骤之间的间隔范围。

化学稳定性

在任何通常使用的水溶性缓冲液中都是稳定的。避免使用8M的尿素、高浓度的盐酸胍，螯合剂，如EDTA或者pH值小于4.0的溶液，因为这样会造成锰离子从凝集素或者ConA中被去除，结果会导致活性丢失。

储存

用20%的乙醇在0.1M的醋酸盐、1M NaCl, 1mM  $CaCl_2$  , 1mM  $MnCl_2$  , 1mM  $MgCl_2$  , 在pH6.0的条件下冲洗介质和柱子, (对于已经装填柱子的介质，使用大约5个柱体积的液体冲洗)，并且储存在+4到+8℃。

扁豆凝集素用于结合分支的甘露糖并且具有海藻糖连接的  $\alpha$  (1,6)到N-乙酰葡萄糖胺, ( $\alpha$  Man >  $\alpha$  Glc > GlcNAc), N-乙酰葡萄糖胺结合凝集素

扁豆凝集素结合  $\alpha$  -D-葡萄糖 和  $\alpha$  -D-甘露糖的残基, 是一个亲和配基用于纯化糖蛋白, 包括去污剂增溶的糖蛋白、细胞表面抗原和病毒糖蛋白。扁豆凝集素是一种血球凝集素, 来自普通的扁豆 *Lens culinaris*。当与ConA比较时, 它在葡萄糖残基和mannosyl 残基两者间的区别更小, 结合简单糖蛋白的能力会更弱。在1%的去氧胆酸钠存在时, 它仍然会保留它的结合能力。扁豆凝集素Sephacrose4B对于纯化去污剂增溶膜蛋白, 能够提供高的容量和非常高的回收率。

纯化选项

	结合容量/ml 介质	最大操作流速	注释
扁豆凝集素 Sepharose 4B	猪的甲状腺球蛋白, 16-35 mg	75 cm/h*	提供即时可用的混悬液用于装填柱子。

\* 见附录4, 将线性流速(cm/h)转换成体积流速。最大的操作流速是通过测量带有柱床的10cm高和5cm直径的装填好的柱子, 经过计算而获得的。

分离操作

结合缓冲液:	20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 1 mM MnCl <sub>2</sub> , 1 mM CaCl <sub>2</sub> , pH 7.4.
洗脱缓冲液:	0.1-0.5 M 甲基- $\alpha$ -D-glucopyranoside (甲基- $\alpha$ -D-葡萄糖苷), 20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, pH 7.4


可溶性糖蛋白的缓冲液:

结合缓冲液:	20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 1 mM MnCl <sub>2</sub> , 1 mM CaCl <sub>2</sub> , pH 7.4
洗脱缓冲液:	0.3 M 甲基- $\alpha$ -D-mannopyranoside, 20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, pH 7.4

去污剂增溶糖蛋白缓冲液:

用缓冲液20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 1 mM MnCl <sub>2</sub> 1mM的CaCl <sub>2</sub> 在pH 7.4条件下平衡柱子, 确保Mn <sup>2+</sup> 和 Ca <sup>2+</sup> 达到饱和。	
结合缓冲液:	20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 0.5%去氧胆酸钠, pH 8.3
洗脱缓冲液:	0.3 M 甲基- $\alpha$ -D-mannopyranoside, 20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 0.5%去氧胆酸钠, pH 8.3

- 1. 填装柱子(见附录3), 同时用至少10个柱体积的结合缓冲液冲洗柱子去除防腐剂。
- 2. 用10个柱体积的结合缓冲液平衡柱子。
- 3. 上样, 使用较低的流速15 cm/h, 在上样期间/流速是最显著的因素用来获得最大的结合)。
- 4. 用5-10个柱体积的结合缓冲液冲洗柱子或者直到没有物质出现在洗脱缓冲液中 (用紫外吸光监测, 在280nm处)。
- 5. 用5个柱体积的洗脱缓冲液进行洗脱, 使用阶梯式洗脱或者使用梯度洗脱。

 当pH值低于5时, 过量的Mn<sup>2+</sup>和Ca<sup>2+</sup> (1 mM) 对于保持结合活力, 是非常重要的。如果在某些条件下可以避免它们从偶联的配基上脱落, 那么在缓冲液中含有Mn<sup>2+</sup>和Ca<sup>2+</sup>则不是必需的。

对于那些含有糖蛋白的复杂样品，与配基具有不同的亲和力，连续梯度洗脱或者阶梯式梯度洗脱可以提高对样品的分辨率。在洗脱过程中可以通过暂停几分钟流速提高样品的回收率。

用较低的pH值可以洗脱与配基结合紧密的物质，但是pH值不能低于3.0。在一些情况下，与配基结合紧密的物质可以通过去污剂进行洗脱，例如用1.0%的脱氧胆酸盐。

净化

用10倍柱体积的0.5M NaCl, 20 mM Tris-HCl,在pH8.5条件下冲洗柱子;接下来用0.5M NaCl, 20 mM 醋酸盐, 在pH4.5条件下冲洗柱子。在用结合缓冲液再平衡前重复3次。

去除结合紧密的物质，用：

- 用0.1M borate 在pH6.5用较低的流速冲洗柱子。
- 用20% 的乙醇或者50%的乙二醇冲洗柱子。
- 用0.1% Triton X-100 在+37° C 条件下冲洗柱子1分钟。

在上述这些方法的任意一种方法冲洗完成后，立即用5倍柱体积的结合缓冲液再次平衡柱子。

介质特性

	配基密度	组成	pH 稳定性*	颗粒平均大小
凝集素Sepharose 4B	2.5 mg/ml	扁豆凝集素偶联到 Sepharose 4B, 通过 CNBr方法	短期 3-10 长期 3-10	90 μm

\* 长期是指pH的间隔范围，在这一范围内，介质经过长期的存放仍然是稳定的，对于随后进行的色谱操作没有任何不利的影响；短期是指pH在介质的再生、净化和清洁处理步骤之间的间隔范围。

化学稳定性

避免偶联的配基活性丧失，避免溶液的pH值低于3.0或者高于10.0，溶液中含有金属络合剂，例如EDTA或者高浓度的盐酸胍或者尿素。

储存

用20%的乙醇冲洗介质和柱子(对于已经填装好的柱子，使用大约5倍柱体积的20%的乙醇冲洗)并且存放在+4到+8℃条件下。

麦胚外源凝集素结合N-连接寡糖的壳二糖核[GlcNAc ( β 1, 4GlcNAc )<sub>1-2</sub>> β GlcNAc]

麦胚外源凝集素可以用于特异性亲和纯化糖蛋白和多糖。这个凝集素结合N-乙酰葡萄糖胺（N-乙酰葡萄糖胺）残基和与N-连接寡糖的壳二糖核发生强烈反应。它也能够与N-乙酰神经氨酸(糖)酸发生亲和反应。麦胚外源凝集素是一个二聚物，不含有碳水化合物的蛋白质，由两个相等的亚基组成，每一部分的分子重量大约为20 000。

纯化选项

	结合容量/ml 介质	最大操作流速	注释
Agarose 麦胚外源凝集素	没有资料可以利用	75 cm/h*	提供即时可用的混悬液用于柱子装填。

\* 见附录4，将线性流速(cm/h)转换成体积流速。最大的操作流速是通过测量带有柱床的10cm高和5cm直径的装填好的柱子，经过计算而获得的。

分离操作

结合缓冲液: 20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, pH 7.4
洗脱缓冲液: 0.5 M N-乙酰葡萄糖胺, 20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, pH 7.4

Agarose 麦胚外源凝集素能够用于去污剂，例如1.0% 的脱氧胆酸盐或者0.5% Triton X-100.

1. 填装柱子（见附录3）并且用最少10个柱体积的结合缓冲液冲洗柱子，除去防腐剂。
  2. 用10个柱体积的结合缓冲液平衡柱子。
  3. 上样，使用较低的流速15 cm/h，在上样期间(流速是影响最大程度的结合的最显著的因素)。
  4. 用5-10柱体积的结合缓冲液冲洗柱子或者直到洗脱物中没有其它物质出现(用紫外吸收在<sub>280nm</sub>处监测)
  5. 用5倍柱体积的洗脱缓冲液进行洗脱。

用0-0.5 M的N-乙酰葡萄糖胺（N-乙酰葡萄糖胺），20 mM Tris-HCl, 0.5M NaCl，在pH7.4的条件下用，根据凝集素对不同糖蛋白具有不同的亲和力，用连续梯度洗脱或者阶梯式梯度洗脱来提高含有糖蛋白样品混合物的分辨率。

用20 mM 的乙酸缓冲液在pH值为4.5的条件下洗脱紧密结合的物质或者可以选择用糖等 三氯化乙酰。

对于具有较高浓度的提取物质在洗脱期间使流速暂停几分钟可能是必要的，可以提高目标物的回收率。

净化

用5-10个柱体积的20 mM Tris-HCl,1M NaCl, 在pH8.5条件下冲洗柱子，并且立即用结合缓冲液再次平衡柱子。如果需要的话，可以在Tris-HCl缓冲液中使用低浓度的非离子型的去污剂，如0.1 % Nonidet P-40。

介质特性

	配基密度	组成	pH 稳定性*	平均颗粒大小
Agarose麦胚外源凝集素	1-2 mg/ml	麦胚外源凝集素偶联到	短期 4-9	90 μm
		Sepharose 4B, 通过 CNBr 方法	长期 4-9	

\* 长期是指pH的间隔范围，在这一范围内，介质经过长期的存放仍然是稳定的，对于随后进行的色谱操作没有任何不利的影响；短期是指pH在介质的再生、净化和清洁处理步骤之间的间隔范围。

化学稳定性

避免暴露在pH 低于4.0的环境中，这样可以导致麦胚外源凝集素的解离。

储存

用20%的乙醇冲洗介质和柱子(对于已经填装好的柱子，使用大约5倍体积的20%乙醇冲洗) 并且在+4到+8℃条件下储存。

**钙调节蛋白结合蛋白质: 三磷酸腺苷酶（ATPases），腺苷酸环化酶（adenylate cyclases），蛋白激酶（protein kinases），磷酸二酯酶（phosphodiesterases），神经递质（neurotransmitters）**

钙调蛋白Sepharose 4B

钙调节蛋白是一个高度保守的调节蛋白质，它存在于所有真核细胞中。这种蛋白质包含在许多细胞处理过程中，例如肝糖原的新陈代谢，细胞支架的控制，神经传递，磷酸盐活性和NAD<sup>+</sup>/NADP<sup>+</sup>比例的控制。钙调蛋白Sepharose4B 提供了包含这些通路在内的钙调素结合蛋白。

钙调素结合蛋白主要是通过它上面疏水位点的相互作用而形成。由于Ca<sup>2+</sup>与Ca<sup>2+</sup>-结合位点分离而引起分子构象的变化，使得这些位点被暴露。如果有酶作用底物存在，那么酶的结合反应可以被增强，并且酶-底物-钙调节蛋白质-Ca<sup>2+</sup>复合物的可以特别稳定的存在。

纯化选项

	结合容量/ml 介质	最大操作流速	注释
钙调蛋白 Sepharose 4B	没有资料可以利用	75 cm/h*	提供即时可用的混悬液用于柱子装填。

\* 见附录4，将线性流速(cm/h)转换成体积流速。最大的操作流速是通过测量带有柱床的10cm高和5cm直径的装填好的柱子，经过计算而获得的。

分离操作

结合缓冲液: 50 mM Tris-HCl, 0.05–0.2 M NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.5

洗脱缓冲液: 50 mM Tris-HCl, 0.05–0.2 M NaCl, 2 mM EGTA, pH 7.5

1. 填充柱子(见附录3)，并且用至少10倍柱体积的结合缓冲液去除防腐剂。
2. 用10倍柱体积的结合缓冲液平衡柱子。
3. 上样，在上样期间用较低的流速15 cm/h。（较低的流速是影响最大结合效果的最显著的因素。）
4. 用5–10倍柱体积的结合缓冲液冲洗柱子或者直到没有物质出现在洗脱液中为止。  
(用紫外吸光在<sub>280nm</sub>处监测)
5. 用5倍体积的洗脱缓冲液进行洗脱。



尽可能快的从样品中去除蛋白酶，因为蛋白质上的钙调节素位点对蛋白酶作用经常是非常敏感的。（见第54页）



在Ca<sup>2+</sup>存在状态下，通过疏水相互作用色谱HiTrap 苯基 FF (high sub)或者离子交换色谱HiTrap Q FF，从样品中去除游离的钙调节素。



由于可能发生一些非特异性的离子键的相互作用，推荐使用较低的盐离子浓度(0.05–0.20 M NaCl)来促进目标蛋白结合到配基上，同时消除其它的非特异性结合。



使用螯合剂来洗脱蛋白质。螯合剂可以从钙调节素中去除Ca<sup>2+</sup>，使构象发生反相变化，这样可以暴露蛋白质结合位点。Ca<sup>2+</sup>可以通过高盐离子浓度，如1M NaCl存在条件下被移走。

## 净化

### 方法 1

用3倍柱体积的0.05M Tris-HCl, 1.0 M NaCl, 2mM EGTA在pH7.5条件下冲洗柱子，然后立即用5-10倍柱体积的结合缓冲液冲洗柱子。

### 方法 2

用3个柱体积的0.1M的碳酸铵缓冲液，2mM EGTA 在pH值为8.6的条件下冲洗柱子，接下来用3个柱体积的1M的NaCl，2mM的CaCl<sub>2</sub> 冲洗柱子。紧接着用3个柱体积的0.1M的醋酸钠缓冲液，2mM的CaCl<sub>2</sub>在pH值为4.4的条件下冲洗柱子。然后再用3倍柱体积的结合缓冲液冲洗柱子。

用非离子型去污剂，如0.1%的Triton X-100 在 +37℃ 条件下冲洗1分钟，去除严重的污染物。

## 介质特性

	配基密度	组成	pH 稳定性*	平均颗粒大小
钙调节蛋白 Sepharose 4B	0.9–1.3 mg/ml	牛睾丸钙调蛋白	短期 4–9	90 μm
		偶联到 Sepharose 4B	长期 4–9	
		用CNBr方法连接。		

\* 长期是指pH的间隔范围，在这一范围内，介质经过长期的存放仍然是稳定的，对于随后进行的色谱操作没有任何不利的影响；短期是指pH在介质的再生、净化和清洁处理步骤之间的间隔范围。

## 化学稳定性

在通常使用的水溶性缓冲液中稳定。

## 储存

用20%的乙醇冲洗介质和柱子（对于已经填充好的介质，使用大约5倍柱体积的20%的乙醇冲洗），并且在+4到 +8℃的条件下存放。

带有暴露的氨基酸的蛋白质和多肽： 组氨酸，半胱氨酸，色氨酸，和 /或 与金属离子亲和反应（如已知的固定化金属离子亲和层析，固定化金属螯合物亲和层析）

**HiTrap 螯合 HP，螯合 Sepharose Fast Flow，His MicroSpin 纯化模式，HisTrap Kit**  
与金属离子具有亲和性的蛋白质和多肽能够使用金属螯合亲和色谱进行分离。金属离子通过螯合被固定在某种色谱介质上，某种氨基酸，例如组氨酸和半胱氨酸，在中性pH值条件下（pH6-8）可以与螯合的金属离子形成复合物，并且大部分是含有组氨酸的蛋白质，能够与被螯合的金属离子结合。

金属螯合亲和色谱非常适用于纯化含有重组组氨酸(His)<sub>6</sub>的融合蛋白质（见第47页），同样也适用于其它许多天然蛋白质。螯合Sepharose，是用于金属螯合的亲和色谱介质，通过偶联金属螯合物形成配基（亚氨二醋酸），并将配基偶联到Sepharose上而形成亲和介质。

在使用前，介质和一个二价的金属离子溶液，如Ni<sup>2+</sup> Zn<sup>2+</sup> Cu<sup>2+</sup> Ca<sup>2+</sup> Co<sup>2+</sup> 或者Fe<sup>2+</sup>混合。亲和介质与目标蛋白质的结合反应取决于pH值，并且结合的样品，在最通常的情况下，通过降低pH值来洗脱，并且增加缓冲液中的离子强度或者使用含有EDTA或者咪唑的缓冲液。配基的结构，亚氨二醋酸，如图48所示。

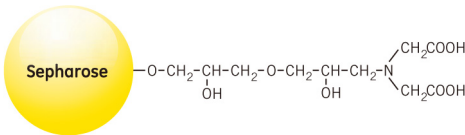



图. 48. 螯合的 Sepharose High Performance 和 螯合的Sepharose Fast Flow 的部分结构。

 金属蛋白质通常不适用于用螯合色谱进行纯化，因为它们倾向于从柱子中清除金属离子。

纯化选项

	结合容量	最大操作流速	注释
His MicroSpin 纯化	100 µg/柱子	Not applicable	即时可用的预装柱，缓冲液和化学试剂模式 用于纯化(His) <sub>6</sub> 的融合蛋白质
HiTrap 螯合 HP 1 ml	12 mg/柱子	4 ml/min	预装柱，即时可用。
HiTrap螯合 HP 5 ml	60 mg/柱子	20 ml/min	预装柱，即时可用。
HisTrap Kit	12 mg/柱子*	4 ml/min	即时可用的预装柱，缓冲液和化学试剂， 用于纯化(His) <sub>6</sub> 的融合蛋白质， 使用注射器可以进行12次纯化
螯合 Sepharose Fast Flow	12 mg/ml 介质	400 cm/h**	提供即时可用的混悬液用于填充柱子 和扩大规模生产。

\* (His)<sub>6</sub>融合蛋白，分子量M<sub>r</sub>27 600，根据蛋白质的不同有不同的结合容量。

\*\* 见附录4，将线性流速(cm/h)转换成体积流速。最大的操作流速是通过测量带有柱床的10cm高和5cm直径的装填好的柱子，经过计算而获得的。



## 纯化示例

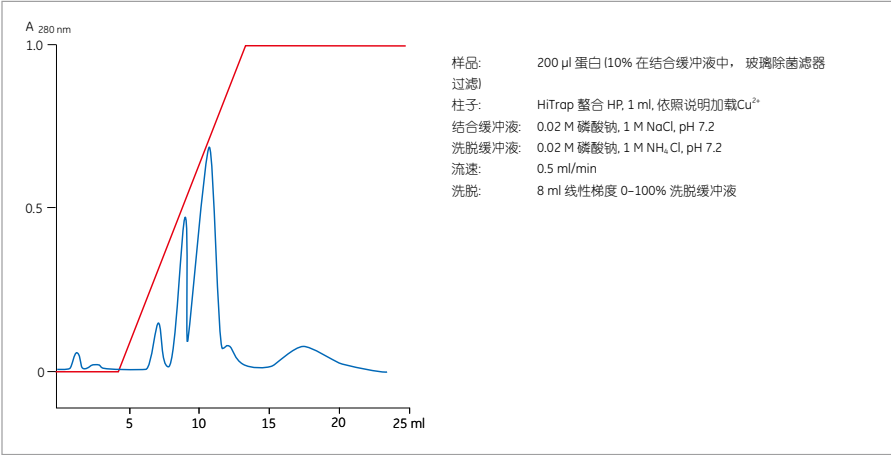


图 49. HiTrap 螯合 HP 1 ml 柱子纯化鸡蛋白蛋白, 使用金属离子 $\text{Cu}^{2+}$ 。

## 分离步骤的研制

特殊纯化步骤的细节在第50页中提供。这一步骤被用作研究用金属离子亲和纯化其它蛋白质和多肽方法的基础, 如图49所示。

重复使用亲和纯化柱取决于样品的天然特性, 并且当对同一个样品进行操作时, 应该考虑交叉污染。

## 选择金属离子

下面的指导原则可以用于预实验来选择金属离子, 这一方法对于一个给定的分离操作是非常有用。

- $\text{Cu}^{2+}$ 能够提供很强的结合, 并且一些蛋白质仅仅能够结合 $\text{Cu}^{2+}$ 。加载溶液与已装柱体积的60%相等, 避免在样品上样期间金属离子的泄漏。另外可以选择的方法, 介质被溶胀, 并且将一个短的不带电荷的HiTrap 螯合HP柱子或者已经填装的 螯合 Sepharose Fast Flow柱子串联到主要的柱子后面来收集过多的金属离子。
- $\text{Zn}^{2+}$ 能够提供较弱的结合, 并且在许多情况下, 它可以被用于获得选择性的洗脱蛋白质混合物。加载溶液相当于85%的已装柱体积, 用于使柱子带电荷。
- $\text{Ni}^{2+}$ 经常用于纯化带有多聚His的融合蛋白质。一般来说, 相当于一半柱体积的 $\text{Ni}^{2+}$ 溶液用于使柱子带有足够的电荷。
- $\text{Co}^{2+}$  和  $\text{Ca}^{2+}$ 也可以选择。

用适当的盐溶液流过柱子, 例如将0.1M的 $\text{ZnCl}_2$ 或者 $\text{NiSO}_4$ 或者 $\text{CuSO}_4$ 溶于蒸馏水中, 给柱子加载金属离子充电。盐酸盐可以用于其它的金属离子。

一些方法可以用于确定什么时候可以给柱子加载电荷。如果使用溶于蒸馏水的金属盐溶液加载电荷，最初的洗脱经历一个较低的pH值，最后回归到中性pH值，这是由于介质被金属离子饱和。用 $\text{Cu}^{2+}$ 给介质加载电荷的过程很容易用眼睛观察（柱子的内容物变成蓝色）。当用锌离子时，用碳酸盐来检测锌离子在洗脱液中的存在。

再给柱子加载完电荷后用结合缓冲液完全冲洗柱子。

## 结合缓冲液的选择

一个中性的或者偏碱性的pH值溶液有利于结合。Tris-醋酸(0.05M), 磷酸钠 (0.02 –0.05M) 和 Tris-HCl (0.02–0.05M) 是比较适宜的缓冲液。Tris-HCl 趋向于减少结合，只有在金属-蛋白质的亲和力非常高的时候才使用。



缓冲液中的高浓度的盐或者去污剂在通常情况下对蛋白质的吸附没有影响，并且维持高的离子强度是一个好的方式（例如0.5 – 1M NaCl），可以避免不想发生的离子交换效果。



螯合剂，例如EDTA或者柠檬酸盐不应该被包含在内，因为它们可以从介质上把金属离子剥离掉。

## 选择洗脱缓冲液

对于不同结合物质的洗脱，可以通过使用某种试剂的梯度洗脱来获得，这种试剂可以与配基竞争或者可以与目标分子竞争。一个逐渐增加的咪唑浓度（0–0.5M）、氯化铵浓度或者像组织胺、甘氨酸等与螯合金属具有亲和作用的物质能够被用作洗脱试剂。在恒定pH值的结合缓冲液中能够很好的用于梯度洗脱。

由于pH值可以控制结合位点上带电基团的离子化程度，对溶液的pH值进行梯度或者逐步阶梯式的减小，可以被用于对非特异性结合物的洗脱。pH值的范围7.0–4.0是正常的，对于多数蛋白质的提取，pH在6.0和4.2之间。对于变性洗脱，可以使用如8M的尿素或者6M的盐酸胍。



用EDTA (0.05M) 或者其它强的螯合剂将使金属离子和其它结合上去的物质被剥离下来。这种方法不经常用于分离不同的蛋白质。



如果使用苛刻的洗脱条件，我们建议将洗脱下来的碎片立即转移到更加缓和的溶液中（或者将它们收集到中性缓冲液中或者使用脱盐柱进行缓冲液交换（见第133页））。



在低pH值条件下金属离子的丢失会更加显著。如果将要纯化的是同样的样品，柱子没有必要被剥离，如图50所示。

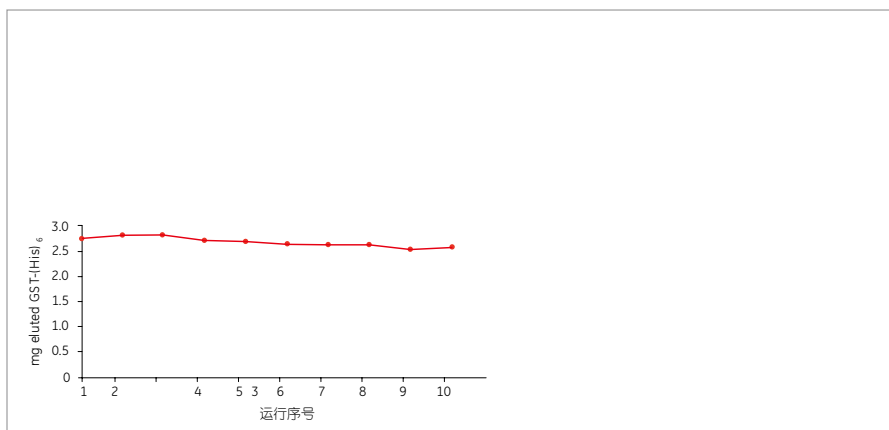


图 50. GST-(His)<sub>6</sub> 进行10次重复纯化，在柱子的运行之间没有重新加载Ni<sup>2+</sup>。



尽管金属离子的泄漏是非常低的，但是在被纯化产品中任何游离的金属离子都可以通过在蛋白质被洗脱前，在第一根柱子后面串联一个未加载电荷的HiTrap 螯合 HP 柱子被除去。当经过第二根柱子时，这个柱子可以结合任何金属离子并且从蛋白质中除去它们。

## 规模化操作



为了增加装载容量，将几个HiTrap 螯合HP 柱子 (1ml 或者5ml)串联起来，（注意反压将会增大）或者当需要更加大的装载能力,将 螯合Sephacrose Fast Flow 装填到更加适合的柱子里。(见附录3).

## 净化

用5倍柱体积的20 mM 磷酸钠、0.5M的氯化钠和0.05M的EDTA，在pH7.4的条件下冲洗柱子。

用1M的氢氧化钠充满柱子并且孵育2小时，可以除去沉淀的蛋白质。然后用5倍柱体积的水和缓冲液在pH7.0的条件下冲洗柱子，将溶解的蛋白质冲洗出来，直到流出柱子的缓冲液的pH值为7.0为止。

可以选择的其它方法是用非离子型去污剂如0.1 % Triton X-100 在 +37℃条件下冲洗1分钟。用70%的乙醇或者用锯齿梯度0%– 30%–0%的异丙醇/水冲洗柱子，去除脂质和具有非常强的疏水性蛋白质。

介质特性

	组成	金属离子容量	pH 稳定性*	颗粒平均大小
螯合高效 Sepharose	亚氨二醋酸偶联到高效 Sepharose 上, 通过 醚键	23 $\mu\text{moles Cu}^{2+}/\text{ml}$ 长期 3-13	短期 2-14	34 $\mu\text{m}$
螯合 Sepharose Fast Flow	亚氨二醋酸偶联到 Sepharose Fast Flow , 通过间隔臂, 使用环 氧树脂偶联方法。	22-30 $\mu\text{moles Zn}^{2+}/\text{ml}$ 长期 3-13	短期 2-14	90 $\mu\text{m}$

\* 长期是指pH的间隔范围, 在这一范围内, 介质经过长期的存放仍然是稳定的, 对于随后进行的色谱操作没有任何不利的影响; 短期是指pH在介质的再生、净化和清洁处理步骤之间的间隔范围。


化学稳定性

在所有通常使用的水溶性缓冲液中是稳定的, 在变性剂如6M的盐酸胍和8M的尿素和其它促溶剂中是稳定的。

储存

用20%的乙醇在中性pH值的条件下冲洗柱子和介质（对于已经装填好的柱子, 使用大约5倍柱体积的20%的乙醇溶液冲洗柱子）, 并且在+4到+8℃的条件下储存。

在进行长期的存放之前, 用5倍柱体积的20mM的磷酸钠, 0.5M的氯化钠, 0.05M的EDTA在pH值为7.4的条件下冲洗柱子。

 在长期存放之后, 柱子必须用金属离子重新装载电荷。

含有巯基的物质(用共价色谱进行纯化)

被活化的巯基 Sepharose 4B, 丙基硫氧嘧啶Sepharose 6B

通过共价结合到一个被活化的硫醇盐基质上, 含有巯基的物质能够被选择性的分离, 通过二硫化物的巯基交换, 形成一个混合的二硫化键。在冲洗出未结合的物质后, 含有巯基的物质通过逐渐还原二硫键进行洗脱。这一技术也就是我们所知道的共价色谱。反应式如下图所示:

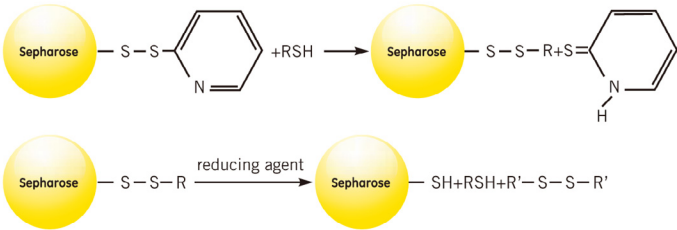


图. 51. 反应简图, 硫醇盐 (RSH) 在活化的巯基Sepharose 4B 或者 丙基硫氧嘧啶 Sepharose 6B 上纯化。B. 还原剂是低分子量的巯基, 例如二硫苏糖醇。

在被活化的巯基-Sepharose4B，亲水性的谷胱甘肽残基被用作一个间隔基团，籍此减少与末端巯基反应的立体空间的相互干扰。图52所示的是部分结构：

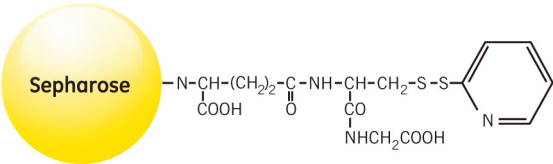


图. 52. 活化后的巯基Sepharose 4B的部分结构。

在丙基硫氧嘧啶Sepharose6B 中，2-羟丙基残基被用作一个亲水性的空间间隔基团。丙基硫氧嘧啶I Sepharose6B 的部分结构如图53所示

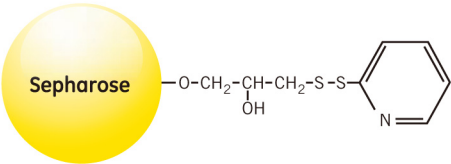


图. 53. 丙基硫氧嘧啶Sepharose 6B 的部分结构。

纯化选项

	结合容量/ml 介质	偶联条件	最大操作 流速	注释
活化的巯基 Sepharose 4B	Mercaptalbumin, 2-3 mg	pH 4-8, 3-16 小时, +4 °C -室温。	75 cm/h*	低容量衍生物适于偶联高分子 物质，提供冻干的粉末，需要 重新再水化。
丙基硫氧嘧啶 Sepharose 6B	血浆铜蓝蛋白， 14 mg	pH 4-8, 3-16小时， +4 °C - 室温。	75 cm/h*	高容量衍生物， 适于偶联低分 子量的物质。提供冻干的粉末， 需要重新再水化。

\* 见附录4，将线性流速(cm/h)转换成体积流速。最大的操作流速是通过测量带有柱床的10cm高和5cm直径的装填好的柱子，经过计算而获得的。

两种介质都可以发生自发的反应和在温和的还原条件下的可逆反应，或者在有变性剂和含有巯基共存条件下的可逆反应。

## 分离操作

结合缓冲液: 20 mM Tris-HCl, 0.1–0.5 M NaCl, pH 7.0.

如果需要, 可以含有8M的尿素或者6M的盐酸胍来使蛋白质变性, 所有巯基都可以发生反应。

可以加入1 mM EDTA 去除痕量的催化的重金属。

洗脱缓冲液可以选择:

共价结合的蛋白质: 0.025 M 半胱氨酸, 50 mM Tris-HCl, pH 7–8.

为了使分子内的二硫桥的还原性最小: 使用5–20 mM L-半胱氨酸, 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH8.0 或者20–50 mM 2-巯基乙醇, 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0.

注意: 当使用丙基硫氧嘧啶Sephacrose, 必须在蛋白质结合后去除2-thiopyridyl基团。

在开始洗脱样品前, 用0.1M的醋酸钠缓冲液、5mM的2-巯基乙醇, 在pH为4.0的条件下冲洗柱子。

N.B. Degas 所有缓冲溶液都要避免巯基的氧化作用。



如果被纯化的蛋白质含有二硫键, 二硫桥必须被还原, 例如用2-巯基乙醇(5mM)。



通过巯基滴定法分析样品中巯基的含量, 确保没有超过亲和介质的容量。



使用2,2'-联吡啶二硫化物进行预滴定研究, 来找到最佳的偶联条件。当样品(1–5mg 在1–3ml 结合缓冲液中)与2,2'-联吡啶二硫化物发生反应时, 使用分光光度计确定2-噁喃-ridone的浓度(吸收系数=8.08×10<sup>3</sup> M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> 在343nm)。选择适宜于特殊样品的条件。在pH值为4.5的标准条件下, 完全反应只需要几分钟就足够了。

1. 使用脱盐柱将预先溶解的样品转移到结合缓冲液中(见133页), 并且去除任何低分子量的巯基化合物、还原剂, 这些物质可能会干扰偶联反应。
2. 称出需要的粉末重量(1 g 粉末可以产生3 ml的活化的巯基 Sepharose 4B 和4 ml的丙基硫氧嘧啶 Sepharose 6B)。
3. 在烧玻璃滤器中冲洗和再次膨胀粉末(多孔径 G3), 使用脱气的纯水或者结合缓冲液(200 ml/g, 15 min 在室温条件下)去除添加剂。
4. 用结合缓冲液制备粘合剂, 其比例为75%的沉淀介质和25%的缓冲液。
5. 填充柱子(见附录3), 并且用结合缓冲液再次平衡柱子。
6. 在较低的流速下(5–10 cm/h)装载样品, 并且将样品与介质接触至少1个小时确保样品能够最大程度的结合到亲和介质上。
7. 用结合缓冲液冲洗柱子, 直到没有物质出现在洗脱液中。(用紫外吸光在280nm处监测)。
8. 用洗脱缓冲液在较低的流速(5–10 cm/h)下洗脱目标分子。



可以监测偶联反应的发生, 并且在一些情况下, 在纯化过程中, 可以通过在343nm的吸收峰监测洗脱液中的2-thiopyridone 的水平, 进行定量。



可以使用磷酸钠或者醋酸铵作为一个可选择的方法, 替代Tris-HCl。



通过连续的洗脱来分辨不同的巯基蛋白质。5–25mM L-半胱氨酸, < 0.05M谷胱甘肽, < 0.02–0.05M 2-巯基乙醇, < 0.02–0.05 M二硫苏糖醇在50 mM Tris- HCl, 1mM EDTA, pH7–8。

反应

用1到2个柱体积的饱和的2,2’-联吡啶二硫化物溶液，在pH为8.0的条件下（大约1.5mM）流过柱子。

准备 2,2’-dipyridyl 二硫化物:

1. 在室温条件下，加入40 mg 的2,2’-联吡啶二硫化物到50ml的缓冲液中，并且搅拌混悬液几个小时，制备成储备液。

2. 将不溶物质过滤除去。

3. 调整pH值。溶液中2,2’-联吡啶二硫化物的浓度为1.5mM。

净化

用非离子型去污剂冲洗柱子，例如用0.1% Triton X-100 在 +37℃条件下冲洗柱子1分钟。立即用5个柱体积的结合缓冲液再次平衡柱子。

介质特性

	巯基的密度	组成	pH 稳定性*	颗粒的平均大小
丙基硫氧嘧啶 Sephacrose 6B	25 μmoles/ml	混合二硫化物，含有 2-thiopyridyl 保护基团 通过化学性质稳定的醚键 附着到 Sephacrose 6B	短期 2-8  长期 2-8	90 μm
活化的巯基 Sephacrose 4B	1 μmole/ml	混合二硫化物形成 2,2’-联吡啶二硫化物 和谷胱甘肽，偶联到 CNBr-活化的 Sephacrose 4B。	短期 2-8 长期 2-8	90 μm

\* 长期是指pH的间隔范围，在这一范围内，介质经过长期的存放仍然是稳定的，对于随后进行的色谱操作没有任何不利的影响；短期是指pH在介质的再生、净化和清洁处理步骤之间的间隔范围。 当一个分子已经被偶联到硫醇盐基质上时，亲和介质长期和短期的pH值稳定性将取决于分子的天然性质。


化学稳定性

在所有常用的水溶性缓冲液中是稳定的，并且在去污剂等添加剂中是稳定的。避免叠氮化合物。

储藏

以冻干成粉末形式储藏于℃条件下。

用20%的乙醇在中性的条件下冲洗柱子和介质（如果对于已经填装好的柱子，使用大约5倍柱体积的20%的乙醇冲洗柱子），并且存放在+4到+8℃的条件下。推荐存放在氮气条件下，防止巯基被大气中的氧气氧化。



避免使用叠氮钠、硫柳汞或者苯基汞盐，例如制菌剂。尽管使用很低的浓度(0.04%)，叠氮化合物的离子也会与2,2’-联吡啶二硫化物的基团发生反应。



不要将游离的巯基形式在悬浊液中存放很长时间。巯基对空气中的氧气很敏感，特别是在碱性pH值的条件下。图54所示是还原丙基硫氧嘧啶Sephacrose6B 中游离巯基的含量，在三种不同的pH值条件下储存适当的一段时间。部分介质中被氧化的巯基的含量通过去除保护基团，再用还原剂处理可以再次被还原（见下图）。

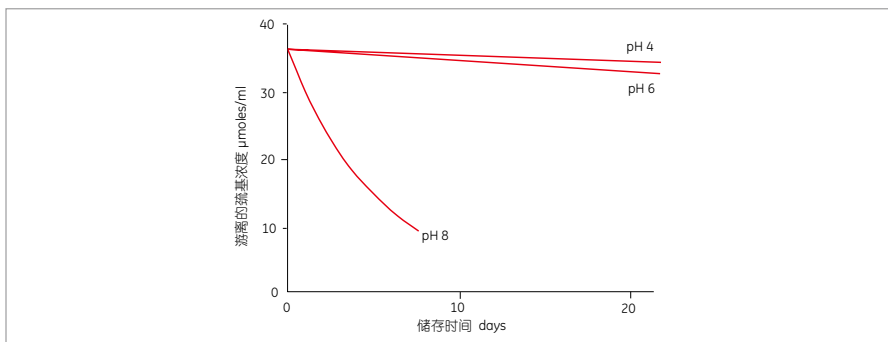


图. 54. 被还原的Sephacrose 6B 游离的巯基在4° C 条件下储存时发生的丢失现象。还原介质被存放在0.1M的醋酸钠缓冲溶液中或者磷酸盐0.3M氯化钠，1mMEDTA，在所指示的pH值中。

## 保护基团的去除

被活化的巯基Sephacrose4B 和 丙基硫氧嘧啶Sephacrose6B 可以很容易的被转换成游离的巯基形式(例如被还原) 通过用还原剂去除保护基团2-thiopyridyl。

1. 按照前面描述的方法准备介质。轻轻的去玻璃滤器中过剩的液体。(多孔性 G3).
2. 将介质悬浮在含有1% (W/W) 的二硫苏糖醇或者0.5M的2-巯基乙醇，0.3M的碳酸氢钠，1mMEDTA，pH为8.4中。
3. 每克冻干粉未使用4 ml 的溶液。
4. 轻轻混合并且在室温状态下反应40分钟。
5. 用0.5 M NaCl, 1 mM EDTA 在0.1M的乙酸溶液中完全冲洗介质。每克最初的冻干粉未使用总共400ml的溶液。在随后的几步中进行冲洗操作。





通过在343nm处测量吸光度的增加估计游离的巯基含量（见上面），这是由于在冲洗过程中2-thiopyridone被释放到冲洗缓冲液中。介质上巯基的总量可以被估计，通过过剩的2,2'-联吡啶二硫化物与介质发生反应，并且用343nm的吸光度测量被释放的2-thiopyridone的浓度。




# 第四章

## 亲和介质的组成






**基质：**用于吸附配基。基质应该具有化学惰性和物理学惰性。



**间隔臂：**通过克服任何空间位阻效应，提高基质和目标分子的结合。



**配基：**能够可逆的结合特定目标分子或者目标分子基团的分子。

### 基质

基质具有理化惰性，可以支持配基通过直接或者间接的方式偶联到基质上。下面所列出的是关于一个高效的色谱基质所应该具有的非常重要的特性。

- 具有相当低的非特异性吸附，其根本原因是由于一个亲和色谱的成功依赖于特异性的相互作用。
- 糖残基上的羟基基团容易被衍生化，可以使配基共价附着在上面，为形成亲和介质提供一个理想的平台。
- 具有开放的孔状结构，保证高容量结合，甚至可以结合大的生物分子，基质的惰性对于配基的吸附作用是有效的。
- 具有好的流动特性，适于快速分离。
- 在实验所需要的条件范围内具有稳定性，例如高和低的pH值，去污剂和裂解试剂。
- Sepharose是一种小球形状的琼脂糖（图55），具有许多这些特性。

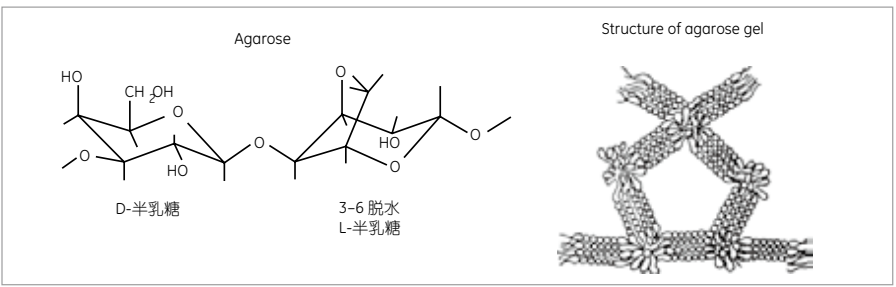


图. 55. 琼脂糖的部分结构。

Sepharose 经过修饰并且发展，进一步增强这些优秀的特性，最终使选择的基质可以适应于每次分离的特殊需要。（见表6）

在亲和色谱中，颗粒的大小和多孔性根据能够偶联配基可以使用的最大的表面积进行设计。一个具有高的多孔性和小的颗粒直径的基质可以增加表面积。基质交链程度的增加可以提高化学的稳定性，这样可以耐受潜在的苛刻条件下的提取和冲洗，并且可以生成一个硬质的配基基质，耐受较高的流速。

这些较高的流速，尽管在分离期间不经常被使用，但是在柱子平衡和净化步骤中是相当重要的。


表 6. 用于GE Healthcare 亲和介质的Sepharose 基质。

	Form	Mean particle size
Sepharose High Performance	6%高度交链的 agarose	34 $\mu\text{m}$
Sepharose 6 Fast Flow	6%高度交链的agarose	90 $\mu\text{m}$
Sepharose 4 Fast Flow	4%高度交链的agarose	90 $\mu\text{m}$
Sepharose CL-6B	6%高度交链的agarose	90 $\mu\text{m}$
Sepharose CL-4B	4%高度交链的agarose	90 $\mu\text{m}$
Sepharose 6B	6% agarose	90 $\mu\text{m}$
Sepharose 4B	4% agarose	90 $\mu\text{m}$


### 配基

配基是可以可逆的结合特定分子或者分子基团的分子，能够通过亲和色谱的方式进行纯化。

在亲和色谱纯化中，配基的选择受到两种因素影响：配基与目标物的结合必须具有特异性和可逆性，并且必须具有化学修饰基团，可以使它吸附在基质上，并且不损害它的活性。

 配基与目标分子复合物的解离常数( $k_D$ )，在游离溶液中，范围在 $10^{-4}$ 到 $10^{-8}$ M是理想的。

相互作用的解离常数大于 $10^{-4}$ M，例如结合反应发生在酶和弱的抑制剂之间，对于成功的亲和色谱来说可能是太微弱了。相反，如果解离常数低于大约 $10^{-8}$ M，例如亲和反应发生在荷尔蒙和荷尔蒙受体之间，那么在对结合物洗脱的时候，如果不使结合物失活，会很难被洗脱下来的。如果没有关于结合物结合常数的信息可以使用，必须进行反复的试验。更进一步的细节参考附录7，关于亲和色谱的动力学。

 当解理常数在可以使用的范围之外，可以选择其它的提取方法，可能会提高亲和色谱的成功率(见附录7)。

考虑配基用于附着在基质上的那部分是非常重要的。例如，许多蛋白质都具有一些相等的基团，通过这些基团配基与基质发生偶联，导致配基在基质上的随机趋向。这样在一个亲和纯化发生的过程中，可能会减少可用的以正确方向结合的配基的数量。

如果存在一些可以应用的功能基团，通过这些基团偶联配基，几乎不会涉及到特异性亲和的相互作用。为了配基通过不同的功能基团附着，可以应用一个预活化的过程（见表7）。

### 间隔臂

目标蛋白质的结合位点经常位于分子中较深的部位，并且一个亲和介质的制备是通过偶联小的配基，例如酶辅助因子，将其直接偶联到Sepharose 上，因此由于空间位阻的影响，目标蛋白质与配基仅能够展示出较低的结合能力，例如配基不能接近目标分子的结合位点，如图56a所示。在这些环境中，在基质和配基之间插入一个“间隔臂”可以使结合更加容易。间隔臂的设计必须使结合达到最大化，但是需要避免非特异性结合效应。图56所示，由于插入间隔臂可以产生一个更加有利于结合的有效的环境。

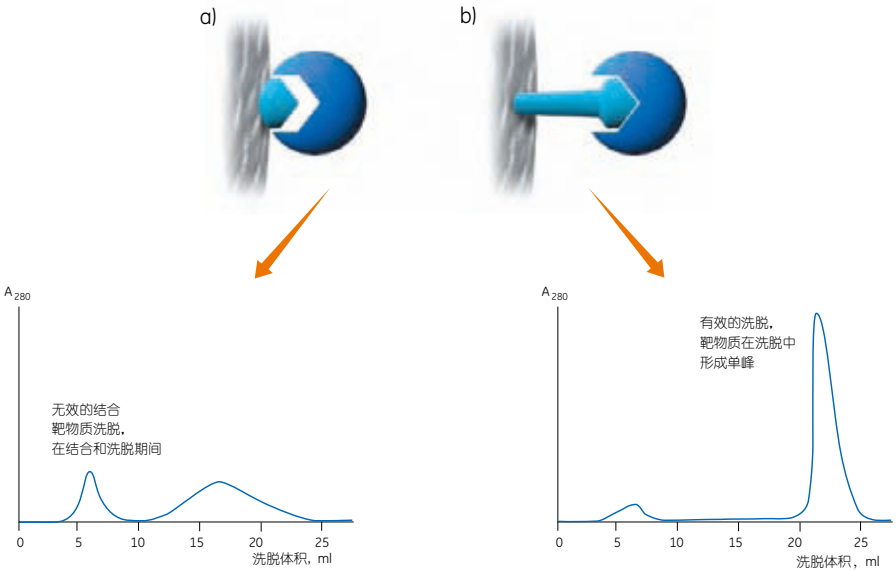


图. 56. 使用间隔臂 a) 配基直接附着在基质上. b) 配基通过间隔臂附着在基质上

间隔臂的长度是关键因素。如果太短，间隔臂是无效的，并且配基不能有效的结合样品中的物质。如果太长，蛋白质或许发生非特异性结合到间隔臂，并且减少分离的选择性。

作为一般的规则，当偶联的分子量小于1000时使用间隔臂。对于大的分子量来说，间隔臂不是必需的。表7所示是来自GE Healthcare 公司可用的带有不同间隔臂的类型的预活化的分子。

配基偶联

可以使用一些方法将配基偶联到预活化的基质上。偶联方法的正确选择取决于配基的特性。在这里推荐使用商业化的、预活化的基质，这样可以节约时间，并且可以避免在一些情况下需要使用潜在的危险的试剂。

表 7. 预活化基质示例。

NHS-活化的 Sepharose High Performance	12-原子亲水间隔臂通过氨基基团偶联。
NHS-活化的 Sepharose 4 Fast Flow	同上。
CNBr-活化的 Sepharose 4 Fast Flow	通过伯胺基团偶联。
EAH Sepharose 4B	通过氨基基团进行偶联，中间有10-原子间隔臂。
ECH Sepharose 4B	9-原子间隔臂进行偶联，通过羧基基团。
环氧树脂-活化的 Sepharose 6B	12-原子亲水间隔臂偶联，通过羧基、氨基或者巯基。
活化的巯基 Sepharose 4B	10-原子间隔臂通过巯基基团可逆的进行偶联。
丙基硫氧嘧啶Sepharose 6B	4-原子亲水间隔臂与蛋白质进行可逆的偶联，并且小分子的硫醇盐配基通过巯基偶联。也可以与中金属反应烷基和芳香基和卤化物等反应，并且与含有C=O, C=C和 N=N 化学键的化合物有额外的附加反应。

配基的特异性

对于特异性分子或者分子基团的纯化，许多配基偶联到适合的基质上是可用的（见第3章）。配基也可以被分离和纯化来制备一个特异性亲和介质来纯化一个目标分子。将配基偶联到预活化的介质上在第5章有详细的描述。

## 第五章

### 使用预活化基质设计亲和介质

在本手册的前述章节已经涉及到配基的很宽的范围，它可以偶联到Sephacrose 上制备成即时可用的亲和介质，用来纯化特殊基团的分子。然而也可能设计一种新的亲和介质用于特殊纯化目的。当无法找到一个即时可用的亲和介质时，可以将一个特定的配基偶联到一个预活化的色谱基质上，制备成一个可以纯化一种或者几种目标分子的亲和介质。例如，可以使用抗体、抗原、酶、受体、小的核酸或者多肽作为亲和配基，纯化与它们结合的相应的配体。

在设计亲和介质时，有三个关键的步骤：

- 选择基质
- 选择配基和间隔臂
- 选择偶联方法

#### 选择基质

Sephacrose 提供了一个大孔基质，并且具有很高的化学和物理学的稳定性，具有低的非特异性吸附，因此可以很容易达到高的结合能力和样品回收率，可以确保耐受潜在的苛刻的提取条件和冲洗条件。对于预先活化的Sephacrose 基质的选择取决于在配基上可以应用的功能基团和是否需要一个间隔臂。表8所示是可以选择的预活化的基质。

#### 选择配基和间隔臂

配基必须具有选择性和与目标分子具有可逆的相互作用，并且要与预期使用的结合条件和洗脱条件具有相容性。配基必须携带有可化学修饰的功能基团，通过这些功能基团可以使配基很容易的吸附到基质上并且不损失配基的活性。（见表8）

如果可能的话，检测配基的亲和力：目标分子与配基的相互作用。太低的亲和力会导致产量很低，因为目标蛋白质可能被冲洗下来或者在上样期间从色谱柱中泄露出来。太高的亲和力也会导致很低的产量，因为目标分子在洗脱过程中很难从配基上解离下来。

使用具有最高纯度的配基，因为目标物质最终的纯度取决于目标分子与配基的生物特异性的相互作用。

在第四章的讨论中，当使用较小的配基( $M_t < 5000$ )，可能存在配基和基质间空间位阻的影响的危险，这种影响限制了目标分子的结合。在这个例子中，选择一个预活化基质并且具有间隔臂。当配基的分子量 $M_t > 5000$ ，不需要存在间隔臂。

#### 选择偶联方法

配基通过其功能基团的反应偶联到基质上，例如氨基、羧基、羟基、巯基和醛基部分。当缺少配基与基质结合位点的信息时，需要进行系统的反复试验。

通过利用最少的配基的关键区域将配基偶联到基质上，使其对正常的相互作用产生最小的影响。例如，一种酶抑制剂含有氨基基团，能够通过氨基基团附着在基质上，如果与酶发生特异性结合基团的活性被保留。然而，如果氨基基团涉及到结合反应，必须使用另外一个可选择的、非实质的功能化基团。



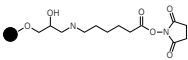
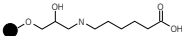
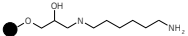
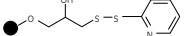
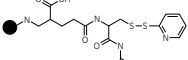
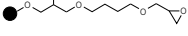
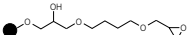
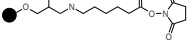
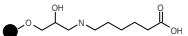
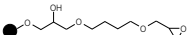
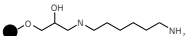
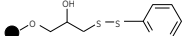
-  避免使用一个与结合位点相邻近的功能化基团或者在配基和目标蛋白质相互作用过程中具有这样相互作用的基团。
-  如果不存在这种合适的功能基团，考虑对配基进行衍生化处理来增加这样一个功能化的基团。

表 8.

配基上的化学基团	间隔臂长度	间隔臂的结构	产物
蛋白, 肽, 氨基酸			
氨基	10-atom		HiTrap NHS-活化的 HP NHS-活化的 Sepharose 4 Fast Flow
	None	-	CNBr-活化的 Sepharose 4B CNBr-活化的 Sepharose 4 Fast Flow
	10-atom		ECH Sepharose 4B
羧基	11-atom		EAH Sepharose 4B
巯基	4-atom		丙基硫氧嘧啶 Sepharose 6B
	10-atom		活化的巯基 Sepharose 4B
	12-atom		环氧树脂-活化的 Sepharose 6B
糖			
羟基	12-atom		环氧树脂-活化的 Sepharose 6B
氨基	10-atom		HiTrap NHS-活化的 HP
	10-atom		ECH Sepharose 4B
	12-atom		环氧树脂-活化的 Sepharose 6B
羧基	11-atom		EAH Sepharose 4B
多聚核苷酸			
氨基	None		CNBr-activated Sepharose 4B CNBr-activated Sepharose 4 Fast Flow
mercured base	4-atom		Thiopropyl Sepharose 6B
辅酶, 辅助因子, 抗生素, 类固醇			
氨基, 羧基, 巯基 或者羟基			用带有间隔臂的基质 (见上面)

## 偶联配基

1. 在偶联缓冲液中制备配基溶液，或者将配基溶解在偶联缓冲液中，或者通过脱盐柱交换缓冲液，使配基溶解在偶联缓冲液中。
2. 按照手册说明准备预活化基质。
3. 在偶联缓冲液中混合配基溶液和基质，直到偶联反应完全发生为止。
4. 终止任何剩余的反应基团。
5. 使用高pH值溶液或者低pH溶液冲洗基质，去除多余的偶联物和反应副产物。
6. 在结合缓冲液中进行平衡或者转移到储存溶液中去。

为了制备出一个有效的亲和介质，并不总是要将大量的配基偶联到基质上去。在偶联完成后，使用高pH值溶液或者低pH溶液彻底冲洗基质，去除非共价结合的基质。



对于亲和色谱来说，在高浓度的条件下偶联配基很可能具有相反效应。这是由于在活化位点间具有空间位阻影响（特别重要的是当大的分子例如抗体、抗原和酶与小的配基发生相互作用），亲和介质的结合效应可能会被降低。另外目标物质可能会更加紧密的结合到配基上，造成洗脱困难。如果配基的浓度非常高，可能增加非特异性结合的范围，这样就降低了介质的选择性。



要注意亲和介质有效的容量会受到流速的显著影响。



对于那些在纯化过程中需要较高的pH条件，当使用NHS-活化的Sephacrose 4B时，可以形成酰胺键，能够在pH为13的条件下仍然很稳定。

图57所示是最终偶联到基质上的配基浓度效果。

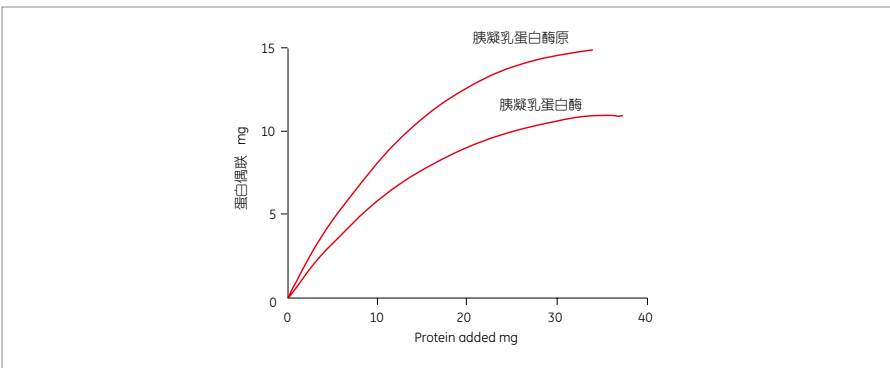


图. 57. 总蛋白量与偶联到基质上的蛋白质浓度效果。蛋白质被偶联到2ml 预活化的CNBr Sepharose 4B，在  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{NaCl}$  溶液, pH8.0

表9是按照试验条件简要的推荐了介质的使用浓度。

表 9.

试验条件	推荐的偶联浓度
有效的配基	比可用的配基基团多10-100 倍
小配基	1-20 $\mu\text{moles/ml}$ 介质 (一般情况下 2 $\mu\text{moles/ml}$ 介质)
蛋白质配基	5-10 mg 蛋白质/ml 介质
抗体	5 mg 蛋白质/ml 介质
非常低的亲和系统	最大的可能的浓度用来增加结合



使用某种预先活化的基质因子封闭任何在偶联完毕后还残留在基质上的活性基团。这些封闭因子例如乙醇胺和甘氨酸可以将少量的带电基团引入到基质中。这些带电基团的效应可以在亲和纯化过程中，在结合缓冲液中加入相对高浓度的盐溶液(0.5 M NaCl)来抑制。使用高pH值的溶液和低pH值的溶液进行一个冲洗循环是必要的，保证没有游离的配基通过离子键结合到基质上。这种冲洗循环不会导致以共价键结合到基质上的配基丢失。

### 结合能力、配基密度和偶联效率

在偶联后测试介质的结合能力，将会给出一个偶联过程是否成功的指标，并且制备了一个有用的新的亲和介质。



使用不同的方法来确定介质的密度( $\mu\text{moles/ml}$  介质)和偶联效率。

- 最快速和最有用，但是不太精确的方法是通过分光光度法确定溶液中的游离配基。在偶联前测量配基浓度，与偶联后未结合的配基的浓度进行比较。它们的差值就是偶联到基质上的配基的量。
- 如果配基已经被适宜的预先标记了，可以使用分光方法或者闪烁计数法。偶联的配基能够通过具有相同屈光率的悬浮在溶液中的亲和介质，用分光方法进行定量，例如50%的甘油或者乙二醇。偶联反应的副产品，例如在NHS-活化的基质中的副产品 N-羟基-琥珀酰亚胺，可以用分光方法进行定量。
- 可以通过对介质进行滴定来确定配基的浓度。滴定必须与配基相关。
- 决定配基浓度的最精确的方法是直接进行氨基酸分析或者对特殊元素的测定。要注意的是这些只是指导性的技术。



如果对目标物的结合能力不够，还有其它的方式来增加偶联效果：

- 保证偶联的配基具有高纯度。在配基中可能会存在污染物被优先的偶联到基质上。



- 通过增加基质上配基的密度来增加配基的浓度，但是要避免配基过量的附着在基质上，因为这样可能会导致空间位阻和降低结合能力。
- 修饰反应条件例如pH、温度、缓冲液或者接触时间。多数预处理的基质提供了最佳偶联反应条件的详细的信息，它可以作为进一步优化反应的基础。

## 结合和洗脱条件

结合和洗脱条件依赖于配基和目标蛋白相互反应的特性。在亲和纯化过程中，可以按照第二章提出的总的指导原则。



对于第一次使用，先运行一个空白样品，来确保结合不牢固的配基已经被去除了。



免疫专一性的相互结合是很强的，并且在一些条件下是很难可逆的。配基与目标物相互作用的特性决定了洗脱的条件。在将配基偶联到亲和介质上之前，总是要检查配基与目标物相互作用的可逆性。如果标准的洗脱液不能使目标物与配基的相互作用可逆，试着选择其它的洗脱液，例如：

- 低的pH (pH2.5以下)。
- 高的pH (pH11以上)。
- 可以降低缓冲液极性的物质，可以使洗脱更容易进行，并且不影响蛋白质的活性，例如二氧杂环己烷(可以到10%)，乙二醇(可以到50%)。

下面的步骤可以作为预试验分离的指导：

1. 制备柱子（空白运行）
  - a. 用2个柱体积的结合缓冲液冲洗柱子。
  - b. 用3个柱体积的洗脱缓冲液冲洗柱子。
2. 用10个柱体积的结合缓冲液平衡柱子。
3. 上样。最佳的流速取决于配基的结合常数，但是一个推荐的流速范围是，例如在HiTrap NHS-活化的HP 1 ml 柱子上的流速是 0.5-1 ml/ min。
4. 用5-10倍体积的结合缓冲液冲洗柱子，或者直到在洗脱缓冲液中没有物质出现为止，在280nm处检测吸光度值。
5. 用1-3个柱体积的洗脱缓冲液进行洗脱(可能会需要更大的体积)。
6. 如果需要的纯化片段能够被脱盐，使用预装脱盐柱，转移到选择性的缓冲液中。(见第133页)。
7. 使用5-10个柱体积的结合缓冲液立即冲洗柱子，重新平衡柱子。



如果感兴趣的蛋白质和配基之间的相互作用比较弱，要避免过度的冲洗，因为这样会降低产量。

## 通过配基的伯胺进行偶联

### HiTrap NHS-activated HP, NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow

NHS-活化的Sepharose 被设计成可以共价结合含有伯胺基团（经常地结合形式是附着）的配基（经常是抗原或者抗体），并且对于制备免疫亲和和介质来说经常是首选。基质是以具有高的铈链的agarose 小球为基础，间隔臂为10个原子长度( 6-氨基己酸)，通过环氧树脂氯丙烷附着，并且被N-羟基琥珀酰亚胺活化（见图58）。蛋白质的非特异性吸附（可以降低目标蛋白质的结合容量）是可以忽略不计的，这是由于基质具有很好的亲水特性。基质在高的pH值下是稳定的，允许苛刻的冲洗条件（偶联配基也具有pH值的稳定性）。

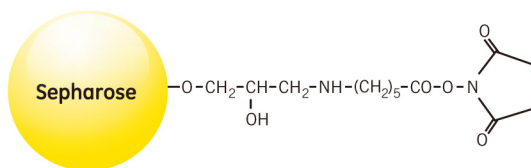


图 58. 可以支撑活化的间隔臂的NHS-活化的 Sepharose的部分结构

含有伯胺基团的配基快速的偶联，并且自发的在酯链上通过亲核攻击产生一个非常稳定的酰胺键（图59）。酰胺键在pH为13时仍然非常稳定，使得NHS-活化的Sepharose非常适用于需要高pH值条件的样品。

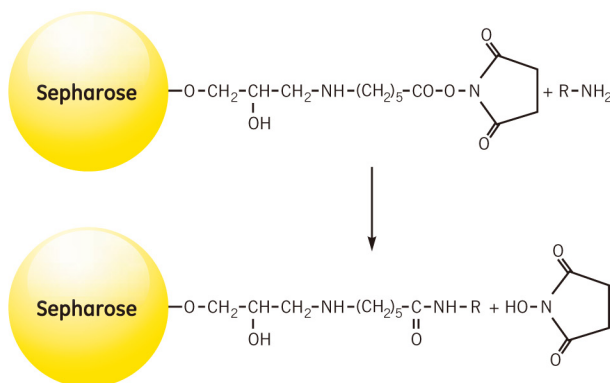


图. 59. 将配基偶联到NHS-活化的Sepharose.

操作

产品	间隔臂	偶联条件	最大操作流速	注释
HiTrap NHS-活化的 HP	10-原子	pH 6.5-9, 15-30 min 在室温条件下或者 4小时, 在+4 °C条件下。	4 ml/min (1 ml 柱子) 20 ml/min (5 ml 柱子)	预活化介质通过伯胺基团 偶联。预装柱1ml和5ml柱子
NHS-活化的 Sephacryl 4 Fast Flow	10-原子	pH 6-9, 2-16 小时, +4 °C - 室温条件。	300 cm/h*	提供即时可用的混悬液 装柱子。

\* 见附录4, 将线性流速(cm/h)转换成体积流速。最大的操作流速是通过测量带有柱床的10cm高和5cm直径的装填好的柱子, 经过计算而获得的。

图60所示的是超过30mg的IgG被偶联到一个1ml HiTrap NHS-活化的HP柱子上。整个偶联的过程用了不到15分钟。然后亲和介质就可以用于纯化抗原。

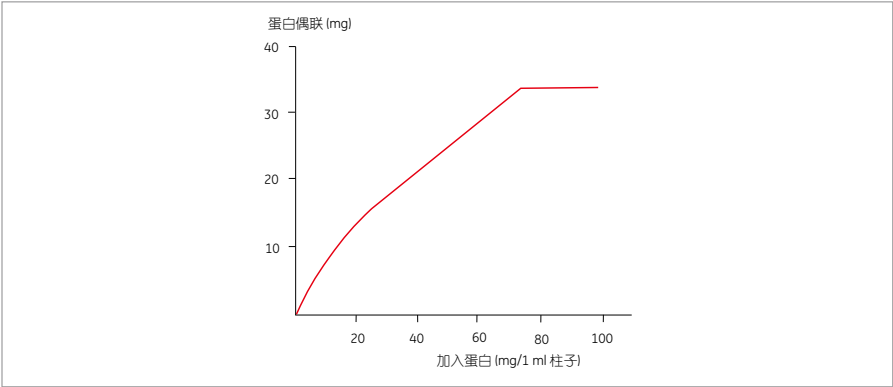



图. 60. 配基偶联到HiTrap NHS-活化的 HP。


制备HiTrap NHS-活化的HP

下面的步骤描述的是预装的HiTrap NHS-活化的HP柱子的制备, 并且一般情况下应用于HiTrap NHS-活化的Sephacryl 介质。在附录3描述的是普通柱子的装填过程。

 被活化的基质放在100%异丙醇中, 在偶联前保护它的稳定性。不能替换异丙醇直到开始偶联配基为止。

准备缓冲溶液

酸化溶液:	1 mM HCl (kept on ice)
偶联缓冲液:	0.2 M NaHCO <sub>3</sub> , 0. M NaCl, pH 8.3
封闭缓冲液:	0.5 M ehanolamine, 0.5 M NaCl, pH 8.3
冲洗缓冲液:	0.1 M 醋酸盐, 0.5 M NaCl, pH 4.0

 进行偶联时pH范围在6.5-9.0之间, 当pH在8左右时可以获得最大的产量。

## 配基和柱子的制备

1. 把配基溶解在偶联缓冲溶液中，使最终的浓度达到0.5–10 mg/ml (对于蛋白质配基)或者使用脱盐柱进行缓冲溶液交换(见第133页)。最佳的浓度依赖于配基。将配基溶解在一个柱体积的缓冲溶液中。
2. 将柱子上方的盖子去除，并且滴加冰冷的1 mM HCl 到柱子上方避免气泡。
3. 将柱子的顶端与注射器或者泵相联接。
4. 移走twist-off end。

## 配基偶联

1. 用3 × 2 个柱体积的冰冷的1 mM HCl 冲洗柱子，洗出异丙醇。
2. 将一个柱体积的偶联溶液注入柱子。
3. 密封柱子。在+25 °C 下静置15–30分钟 (或者在+4 °C 条件下静置4 小时)。



如果使用的是更大体积的配基溶液，可以再次循环使用溶液。例如，当使用的是注射器时，在柱子的出口处联接上第二根注射器，并且轻轻的来回吹打溶液15-30分钟，或者，如果使用蠕动泵，配基溶液循环通过柱子。



不能使用过大的流速(当使用HiTrap1ml柱子时，推荐的最大的流速是1 ml/min (当使用注射器时，相当于30滴/分钟) 当使用HiTrap5 ml 柱子时，推荐的最大流速是5ml/分钟 (当使用注射器时相当于120滴/分钟)。柱子的容量不可逆的被压缩。



通过比较配基溶液在偶联前和偶联后在A<sub>280</sub>的吸光度值来测量蛋白质配基的连接效率。值得注意的是在偶联过程中，N-羧基-琥珀酰亚胺释放出来，在280nm处有很强的吸收，应该在测量剩余配基浓度前，从偶联溶液中去除。使用一个小的脱盐柱(见第133页)从蛋白质配基中去除N-羧基-琥珀酰亚胺。另外可以选择的测量偶联效率的方法在第104页有详细的描述，并且在HiTrap NHS-活化的 HP上有指导说明。

## 冲洗和钝化

这一步骤可以钝化任何过度活化的并且没有与配基发生偶联的基团，并且将非特异性结合的配基冲洗下去。

1. 注射 3 × 2 柱体积的封闭缓冲液。
  2. 注射 3 × 2 柱体积的冲洗缓冲液。
  3. 注射 3 × 2 柱体积的封闭缓冲液。
  4. 让柱子静置15–30分钟。
  5. 注射 3 × 2柱体积的冲洗缓冲液。
  6. 注射 3 × 2 柱体积的封闭缓冲液。
  7. 注射3 × 2 柱体积的冲洗缓冲液。
  8. 注射2–5 柱体积的pH值中性的缓冲液。
- 柱子现在已经即时可用了

介质特性

产物	配基密度	组成	pH 稳定性*	颗粒平均大小
HiTrap NHS-活化的 HP	10 μmoles/ml	6-氨基己酸，通过环氧树脂偶联到 铰链的agarose，末端羧基与 NHS发生酯化。	短期 3-12 长期 3-12	34 μm
NHS-活化的 Sephacrose 4 Fast Flow	16-23 μmoles/ml	同上	短期 3-13 长期 3-13	90 μm

\* 长期是指pH的间隔范围，在这一范围内，介质经过长期的存放仍然是稳定的，对于随后进行的色谱操作没有任何不利的影响；短期是指pH在介质的再生、净化和清洁处理步骤之间的间隔范围。稳定性数据是指被偶联的介质，假设配基能够耐受pH值。

储存

将柱子存放在溶液中维持柱子上配基的稳定性，并且含有抑菌剂，例如PBS, 0.05 % NaN3 , pH7.2。

当偶联选定的配基时，亲和介质的稳定性依赖于配基本身的稳定性。

叠氮化钠能够干扰许多偶联的方法和一些生物分析方法。它可以通过脱盐柱被去除掉。（见第133页）

CNBr-活化的 Sepharose

CNBr-活化的 Sepharose 提供了一个最佳的、确定的操作，可以附着大的配基并且可以作为NHS-活化的 Sepharose的另外一种选择方法。

溴化氢与羟基在Sepharose 上反应，形成活化的氰酸酯基团。蛋白质、肽、氨基酸或者核酸可以被偶联到CNBr-活化的Sepharose上，在缓和的条件下，通过伯胺基团或者相似的亲合基团进行连接。被活化的基团与配基的伯胺基团发生反应形成异脲连接物（图61）。偶联反应是自发的，不需要特殊的化学试剂和设备。多点附着的结果确保了配基不会从基质上水解。这个活化步骤也交叉连接Sepharose，并且增强其化学稳定性，为选择洗脱条件提供了相当大的灵活性。

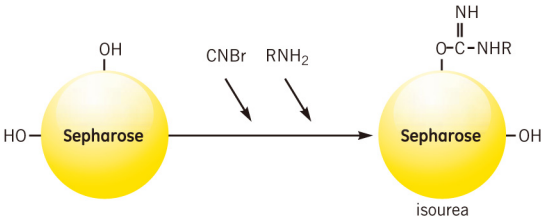


图. 61. 被溴化氰活化并且偶联到已经活化的基质上

操作选项

产品	间隔臂	偶联条件	最大操作流速	注释
CNBr-活化的 Sephacrose 4 Fast Flow	没有	pH 7-9, 2-16 小时, +4 °C - 室温。	400 cm/h*	提供冻干粉末。
CNBr-活化的 Sephacrose 4B	没有	pH 8-10, 2-16小时, +4°C - 室温。	75 cm/h*	提供冻干粉末。

\* 见附录4，将线性流速(cm/h)转换成体积流速。最大的操作流速是通过测量带有柱床的10cm高和5cm直径的装填好的柱子，经过计算而获得的。

在文献中有许多使用CNBr-活化的 Sepharose的例子。图62所示是对天然外包膜包装糖蛋白的分离，gp120，来自HIV感染的T细胞。Galanthus nivalis agglutinin (GNA)，一种来自雪花莲球茎的凝集素，被偶联到CNBr-活化的Sephacrose4Fast Flow，制备成一个适宜的亲和介质。

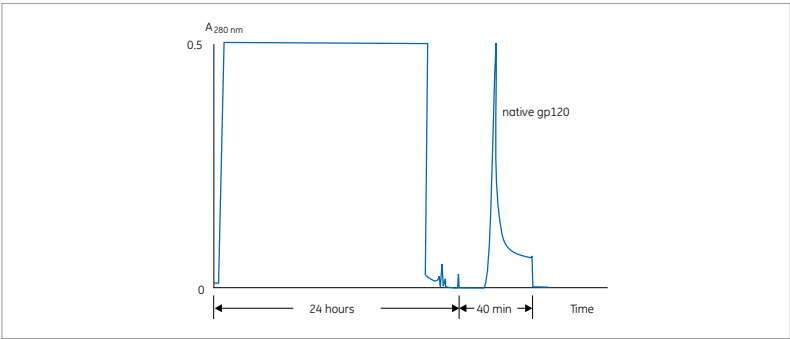


图. 62. GNA偶联到CNBr-活化的Sephacrose 4 Fast Flow，分离天然蛋白gp120。来自Gilljam, G. et al. 从HIV-1感染的T-细胞纯化天然蛋白质gp120。Poster 表示的是Biological Products VII的回收率, 9月24 -30, San Diego, CA, USA. 更加详细的关于CNBr-活化的Sephacrose 4 Fast Flow 纯化的数据,请参考GE Healthcare的产品说明。

缓冲液的制备

- 酸化缓冲液: 1 mM HCl（保持在冰上）
- 偶联缓冲液: 0.2 M NaHCO<sub>3</sub>, 0.5 M NaCl, pH 8.3
- 封闭缓冲液: 1 M氨基乙醇或者 0.2 M 甘氨酸, pH 8.0
- 冲洗缓冲液: 0.1 M 醋酸盐, 0.5 M NaCl, pH 4

制备CNBr-活化的 Sepharose 4 Fast Flow and CNBr-活化的 Sepharose 4B

- 1. 在冰冷的1 mM HCl 中悬浮所需要量的冻干的粉末。（HCl可以保护在高pH水解下反应基团的活性）。
- 2. 冲洗15分钟。在烧结玻璃滤器中（多孔性 G3），每克干粉末使用总共200 ml 1 mM HCl，反复吹打并且分成数等份。最终每等份1 mM HCl被吸入，直到团块中出现裂缝。
- 3. 将混合物立即转移到配基溶液中。



基质的制备应该是完整的并且没有延时，因为在基质上的反应基团在偶联pH值的条件下可以水解。



在这一阶段不能使用含有氨基基团的缓冲液，因为它们将偶联到基质上。

## 配基的制备

在偶联缓冲液中溶解配基直到终浓度为0.5–10 mg/ml (对于蛋白质配基)或者使用脱盐柱进行缓冲液交换(见第133页)，最佳的浓度依赖于配基。基质与缓冲液的比例为1：2。

## 配基偶联

1. 将配基溶液和混悬液进行混合，上下颠倒混匀或者使用相似的混合方法在室温下混合2小时或者在+4 °C条件下过夜。当基质与缓冲液的比例为2：1时，适合于混悬液的偶联。
2. 将介质转移到封闭缓冲液中在+4 °C条件下过夜或者在室温条件下放置2小时封闭任何活化的基团。另外可以选择的是将介质放在pH 8的Tris-HCl缓冲液中放置2小时。
3. 用偶联缓冲液冲洗柱子去除过剩的配基和封闭试剂，接下来用冲洗缓冲液冲洗柱子。上述操作重复4或者5遍。一个通用的柱子的装填过程在附录3中有详细的描述。



不能使用磁力搅拌，因为它们会使Sephacrose 基质破裂。

当配基上的氨基大部分处于非质子化的形式时，偶联反应的过程是非常有效的。当缓冲液的pH值在8.3时，经常用于偶联蛋白质。偶联缓冲液中高盐含量可以降低蛋白质与蛋白质间的相互吸附作用，这种吸附作用是由于蛋白质的高分子电解质的特性所产生的。

对于 $\alpha$ -胰凝乳蛋白酶原的偶联，使用在这里所描述的方法，可以制备大约90%的偶联蛋白质。降低基质上偶联基团的数量是需要的，这样可以保护不稳定分子的结合位点的结构，或者当空间位阻效应降低大分子配基的结合效应时，更易于洗脱。在进行偶联前，控制活化基质的水解作用来降低偶联活性，或者在较低的pH值条件下进行偶联。预先的水解作用降低了偶联过程中可以使用的活化基团的数量同时也降低了蛋白质和基质之间附着位点数量和被偶联的蛋白质的总体数量。用这种方法可以获得具有更高结合活性的产品。在pH值为3时，偶联活性缓慢的丢失，但是在pH值为8.3时，偶联活性的丢失非常迅速。在pH值为8.3的预水解条件下，在4小时的偶联过程中，大分子蛋白质仅有一半位点附着在基质上。（图63所示）

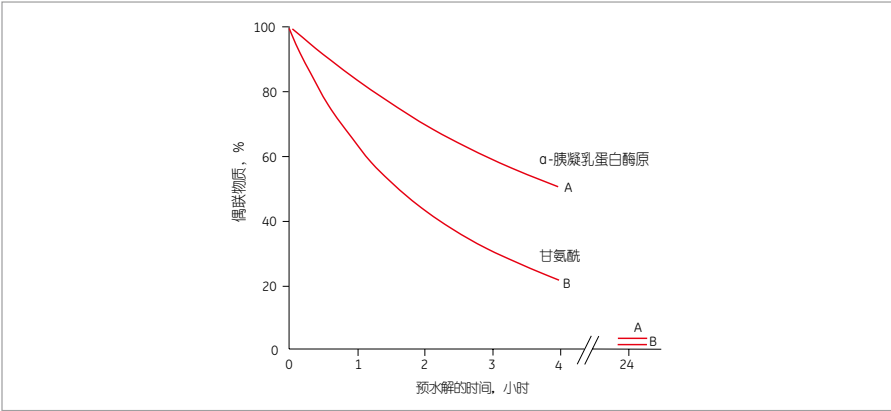


图. 63. 在pH值为8.3时, 随着预水解时间的延长, 偶联活性发生的变化。CNBr-活化的Sephacrose 4B 用pH 3.0的溶液冲洗并且转移到0.1 M NaHCO<sub>3</sub>, pH8.3进行预水解反应. 在不同的时间间隔后样品被移走, 检测与 α -胰凝乳蛋白酶原(A) 和 甘氨酸-亮氨酸 (B) 的偶联活性。

在低pH值条件下进行偶联效率比较低, 但是如果配基丢失了生物学活性, 被很牢固的固定在基质上, 可能是有利的。例如, 通过多点附着, 或者当高分子量的配基被偶联时, 在结合位点间发生空间位阻的影响。使用pH值大约为6的缓冲溶液。

IgG经常在稍微高的pH条件下进行偶联, 例如在0.2–0.25M NaHCO<sub>2</sub>, 0.5 M NaCl, pH8.5–9.0。

### 介质特性

产物	组成	结合容量 每毫升介质	pH 稳定性*	平均颗粒大小
CNBr-活化的 Sephacrose 4 Fast Flow	溴化氢与Sephacrose羟基基团 反应, 产生的反应产物 通过伯胺基团或者相似的亲核	α -胰凝乳蛋白酶原, 13–26 mg	短期 3–11 长期 3–11	90 μm
CNBr-活化的 Sephacrose 4B	基团反应, 偶联到配基上	α -胰凝乳蛋白酶原, 25–60 mg	短期 2–11 长期 2–11	

\* 长期是指pH的间隔范围, 在这一范围内, 介质经过长期的存放仍然是稳定的, 对于随后进行的色谱操作没有任何不利的影响; 短期是指pH在介质的再生、净化和清洁处理步骤之间的间隔范围。稳定性数据是指被偶联的介质, 假设配基能够耐受pH值。

### 储存

以冻干粉末的形式在+8℃以下的干燥的条件下储存。

将柱子存放在能够维持配基稳定的溶液中, 并且含有抑菌剂, 例如, PBS, 0.05 % NaN<sub>3</sub>, pH7.2或者20%乙醇在适宜的缓冲溶液中。



当将选择的配基偶联到介质上, 介质对pH值的稳定性依赖于配基自身的稳定性。



免疫亲和色谱

免疫亲和色谱使用抗原或者抗体作为配基，（有时参照吸附剂、免疫吸附剂）制备出具有高选择性的介质进行亲和纯化。

抗体作为配基来纯化抗原是非常有用的，特别是当某种被纯化的物质没有其它常用的互补配基。

相似的，高度被纯化的抗原或者抗抗体能够提供高度特异性配基来纯化抗体。来自GE Healthcare 的抗体纯化手册 详细覆盖了抗体的纯化和应用等细节。

通过将配基偶联到适宜的基质上制备出免疫亲和介质（一个纯的抗原、抗体或者抗抗体）。最简单的偶联方法是通过配基的伯胺基团，使用NHS-活化的Sephacrose 或者CNBr-活化的Sephacrose。图64阐述了典型的免疫亲和纯化。

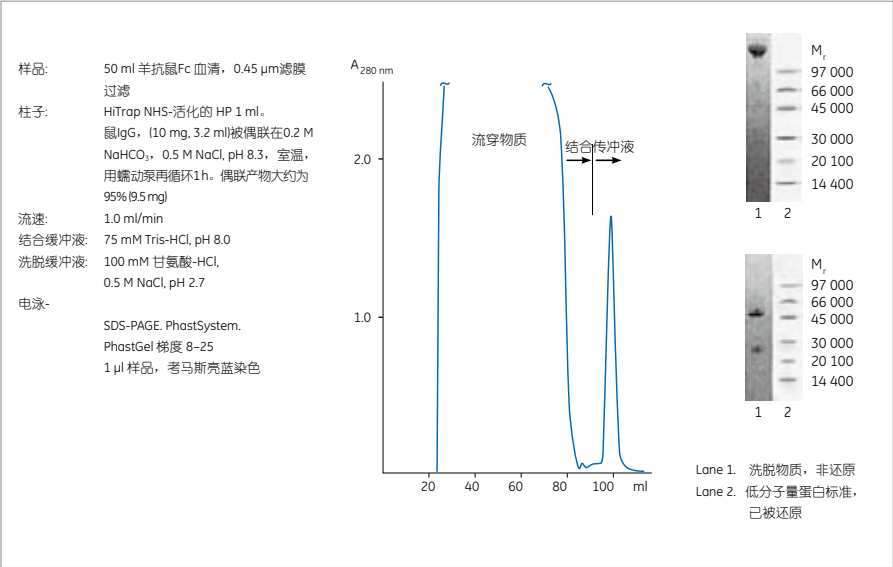


图. 64. 来自于羊血清的抗鼠Fc-IgG 的纯化。

如果没有伯胺基团可以使用（例如这个伯胺基团需要用来进行特异性相互作用），那么为了配基能够附着在基质上，可以考虑对基质上的羧基、巯基或者羟基进行预活化。

在本手册的第二章中已经给出了亲和色谱在实际应用中的指导，在第三章中给出了免疫球蛋白的纯化，可以应用免疫亲和色谱进行纯化。对于每一种免疫特异性反应，根据目标蛋白质与配基间相互作用的强度和目标蛋白质的稳定性，最佳的结合和洗脱条件将会有所不同。

通过氨基或者羧基经过间隔臂偶联小的配基

EAH Sepharose 4B and ECH Sepharose 4B

EAH Sepharose4B and ECH Sepharose4B的部分结构在图65中所示：

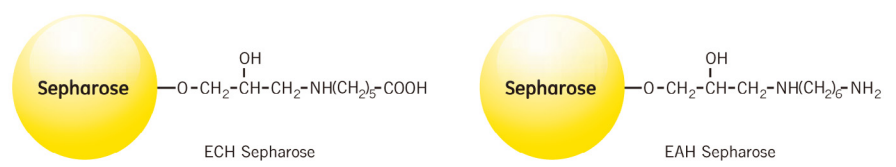


图. 65. ECH Sepharose 4B 和 EAH Sepharose 4B的部分结构。

在偶联试剂碳化二亚胺存在的条件下，配基通过简单的一步过程偶联到基质上。碳化二亚胺被用作脲的脱水产物。N,N’ di- 取代的碳化二亚胺促进了游离氨基和游离羧基的缩合，在酸催化下形成肽链，去除水分。这样 EAH Sepharose4B能够与含有氨基的配基进行偶联。碳化二亚胺在水合作用后产生一个异脲。偶联反应如图66所示。

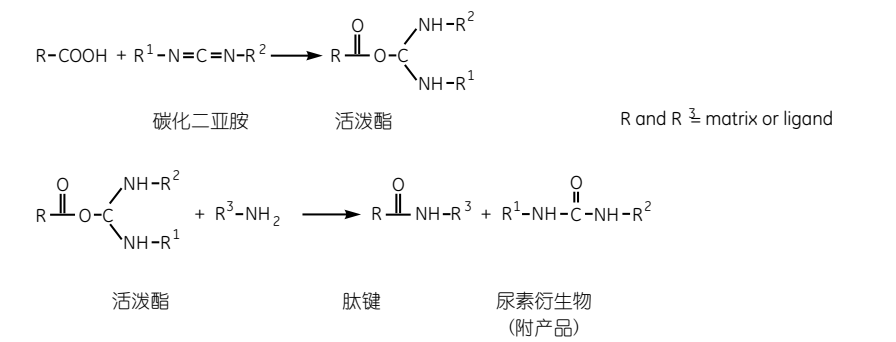


图. 66. 碳化二亚胺的偶联反应

操作选项

产品	间隔臂	替换物 每毫升基质	偶联条件	最大 操作 流速	注释
EAH Sepharose 4B	10-原子	7-11 μmoles 氨基团	pH 4.5, 1.5-24 小时, +4 ° C - 室温。	75 cm/h*	偶联含有游离的羧基基团的配基。 提供即时可用的混悬液。
ECH Sepharose 4B	9-原子	12-16 μmoles 羧基基团	pH 4.5, 1.5-24 小时, +4 ° C -室温。	75 cm/h*	偶联含有游离的羧基基团的配基。 提供即时可用的混悬液。

\* 见附录4，将线性流速(cm/h)转换成体积流速。最大的操作流速是通过测量带有柱床的10cm高和5cm直径的装填好的柱子，经过计算而获得的。

偶联试剂的准备


使用一个水溶性的碳化二亚胺例如 N-乙基-N’-(3-二甲氨基丙胺) 碳化二亚胺盐酸化物(EDC) 或者 N-环己基-N’-2-(4’-甲基-morpholinium) 乙基碳化二亚胺 p-甲苯磺化(CMC)。这两种碳化二亚胺已经被使用在多种实验条件下，并且适用的浓度范围很宽（见表10）。一般情况下EDC比CMC的偶联效果要更好些。

表 10. 被用于偶联过程中的碳化二亚胺的使用条件示例。


偶联配基	碳化二亚胺	碳化二亚胺的浓度 mg/ml	pH	反应时间
甲氨喋呤	EDC	18	6.4	1.5 h
UDP-尿苷二磷酸葡萄糖醛酸	EDC	32	4.8	24 h
p-氨基-, 苯甲脒	CMC	2	4.75	5 h
叶酸	EDC	5	6	2 h
Mannosylamine	EDC	19	4.5-6.0	24 h

使用碳化二亚胺的浓度高于化学计量浓度，经常高于间隔臂浓度的10-100倍。

偶联反应经常在蒸馏水中进行，调节pH值4.5-6.0，促进酸催化缩合反应。如果使用了过多的配基，在偶联反应结束后，一般情况下不需要使用封闭试剂。

 一般情况下要使用新鲜配制的碳化二亚胺试剂。

偶联缓冲液: 在水中溶解碳化二亚胺并且调节pH 4.5  
冲洗缓冲液: 0.1 M 醋酸盐, 0.5 M NaCl, pH 4


 避免氨基、磷酸盐或者羧基的存在，因为这些将与偶联反应发生竞争。

制备 EAH 和 ECH Sepharose 4B

在烧结玻璃滤器中(多孔性G3 )用HCl将蒸馏水的pH值调节到4.5，冲洗基质，接下来用0.5M的氯化钠冲洗。每毫升沉淀的基质用80ml液体冲洗。

配基的准备

溶解配基并且调节pH到4.5。最佳的浓度取决于配基。如果需要的话，可以使用有机溶剂溶解配基。如果使用有机溶剂和水的混合物，在将水和有机溶剂混合前，调节水的pH值到4.5。目前已经使用的有机溶剂包括二氧杂环己烷（可以达到50%）、乙二醇（可以达到50%）、乙醇、甲醇和丙酮。

 如果已经使用有机溶剂，用pH试纸检测pH值，因为溶液可能会损坏酸度计。

## 配基偶联

1. 向基质悬液中加入配基溶液，接下来再加入碳化二亚胺，将混合物上下颠倒混合或者进行相似的混合。基质与配基的使用比例为1：2，产生一个适宜进行偶联的混悬液。偶联反应可以在+4 °C 下过夜或者在室温条件下过夜。
2. 在反应的第一个小时内，加入氢氧化钠调整反应混合物的pH值（pH值将会下降）。
3. 在pH 8 和pH 4的条件下冲洗，去除多余的反应试剂和反应副产物。



如果使用的是水溶液和有机溶液的混合物，在步骤3中，使用这个混合物冲洗最终的产物。冲洗完毕后，在蒸馏水中，用在亲和纯化中使用的结合缓冲液冲洗。



不要使用磁力搅拌器，这样会破坏Sephacrose 基质。

## 介质特性

产品	组成	pH 稳定性*	颗粒平均大小
EAC Sepharose 4B	1,6-二氨基-己烷的共价键通过环氧树脂偶联产生一个稳定的，不带电的醚链连接10个碳原子的间隔臂和Sephacrose 4B。	短期3-14	90 µm
		长期3-14	
EAC Sepharose 4B	6-氨基己酸的共价键通过环氧树脂偶联产生一个稳定的，不带电的醚链连接9个碳原子的间隔臂和Sephacrose 4B。	短期 3-14	90 µm
		长期 3-14	

\* 长期是指pH的间隔范围，在这一范围内，介质经过长期的存放仍然是稳定的，对于随后进行的色谱操作没有任何不利的影响；短期是指pH在介质的再生、净化和清洁处理步骤之间的间隔范围。Stability data 是指被偶联的介质，假设配基能够耐受pH值。

## 储存

预活化基质储存在+ 4到 +8 °C，在20%的乙醇溶液中。

将柱子存放在溶液中，溶液需要能够维持配基的稳定性并且含有抑菌剂，例如PBS, 0.05 % NaN<sub>3</sub>, pH7.2或者20% 的乙醇在适宜的缓冲溶液中。



当偶联上配基后，介质对pH值的稳定性依赖于配基的稳定性。

## 操作分离

见第105页的预试验的分离步骤和第二章的一般指导原则。

# 利用羟基、氨基或者巯基通过12-碳间隔臂进行偶联

## 环氧树脂-活化的 Sepharose 6B

环氧树脂-活化的Sepharose6B 用于偶联含有羟基、氨基或者巯基的配基。由于存在很长的亲水性间隔臂，对于偶联小的配基是特别有用的，例如胆碱、氨基乙醇和糖。通过Sepharose6B 和双环氧乙烷，1,4 bis-(2,3 -epoxypropoxy-)丁烷的反应形成预活化的基质。图67所示的是部分结构。

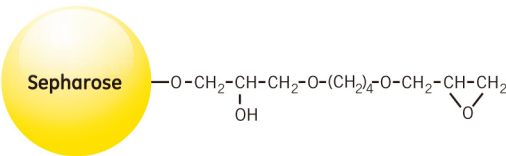


图. 67. 环氧树脂-活化的Sepharose 6B的部分结构。

在亲水性间隔臂和基质间形成一个稳定的醚键。游离的环氧乙烷基团通过稳定的醚键与含有羟基的分子如糖进行偶联，通过烷基胺与含有氨基的配基相连接，或者通过硫醚键与含有巯基的配基相连接。

## 选项

产品	间隔臂	替代物 每毫升基质	偶联条件	最大操作流速	注释
环氧树脂-活化的 Sepharose 6B	12-原子	19-40 μmoles 环氧树脂	pH 9-13, 16 小时 - 几天, +20 - +40 °C	75 cm/h*	提供冻干 粉末

\* 见附录4，将线性流速(cm/h)转换成体积流速。最大的操作流速是通过测量带有柱床的10cm高和5cm直径的装填好的柱子，经过计算而获得的。

## 纯化示例

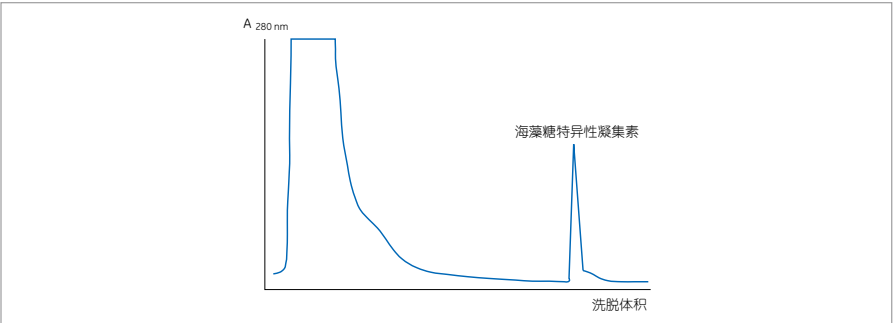


图. 68. Ulex europaeus粗提物的色谱图，用海藻糖偶联到环氧树脂-活化的Sepharose 6B亲和柱上，柱体积为11ml. 用0.9% 的NaCl进行提取。用5ml ( 50 mg/ml) 海藻糖溶液洗脱海藻糖特异性凝集素。

## 可以选择的偶联溶液:

蒸馏水或者带有糖和碳水化合物水溶性缓冲液是较好的。

可以使用高pH值的碳酸盐、硼酸盐或者磷酸盐缓冲溶液。

可以使用有机溶液例如二甲基甲酰胺（最高可达50%）和二氧杂环己烷（最高可达50%）溶解配基。

在偶联缓冲液中应该使用同样浓度的有机溶液。

## 偶联步骤:

1. 在蒸馏水中悬浮需要量的冻干的粉末（1 g 冻干的粉末能够产生出大约3.0ml的最终基质体积）。
2. 立即在烧结玻璃滤器中（多孔隙 G3）用大约每克冻干粉末200ml的蒸馏水冲洗1小时。
3. 用偶联缓冲液溶解配基，使最终的浓度为0.5-10 mg/ml，（对于蛋白质偶联物）或者用脱盐柱将溶解的配基转移到偶联缓冲液中（见第133页）。调整水相的pH值。
4. 将基质与缓冲溶液的比例调整为1: 2，在+25 到 +40 °C 的水浴的条件下，混合16小时，并且不断摇动。
5. 在+40 到 +50 °C 的条件下，用1M的氨基乙醇封闭过剩的基团至少4小时或者过夜。
6. 用偶联缓冲液冲洗过剩的配基，紧接着用0.1 M  $\text{NaHCO}_3$  , 0.5 M NaCl pH 8.0和0.1 M NaCl , 0.1 M 醋酸盐, pH 4.0的水溶液冲洗。



如果使用有机溶液，使用pH试纸测量pH值，因为有机溶液可能会损坏pH计。



使用较高的温度可以缩短偶联时间。



不能使用下列物质：Tris, 甘氨酸或者其它的亲核化合物，因为这些将会偶联到环氧己烷基团上。



不能使用磁力搅拌，因为它们可能会破坏Sepharose 基质。

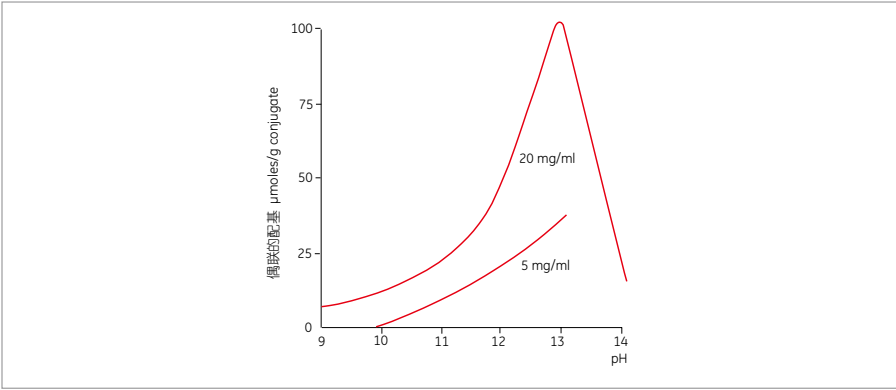


图. 69. pH 依赖于偶联N-乙酰基-D-半乳糖胺到环氧树脂-活化的Sephacrose 6B。碳酸盐/重碳酸盐缓冲液使用的pH范围 9-11，氢氧化钠溶液的pH范围 12 - 14。配基浓度：5mg/ml and 20 mg/ml。

当一个配基含有超过一种的基团(巯基，氨基和羟基)，偶联溶液的pH值将决定哪种基团被优先偶联上去。作为一个一般的规律，偶联的顺序是  $\epsilon$ -氨基 > 巯基 >  $\alpha$ -氨基 > 羟基，但是确切的结果依赖于配基详细的说明。

反应时间主要取决于偶联溶液的pH值、配基的特性和偶联温度。配基和基质上碳链的稳定性限制了能够使用的最大pH值。偶联时所需要的pH值范围9-13，如图69所示，产生最佳效果的偶联依赖于溶液的pH值和反应温度（图70所示）。

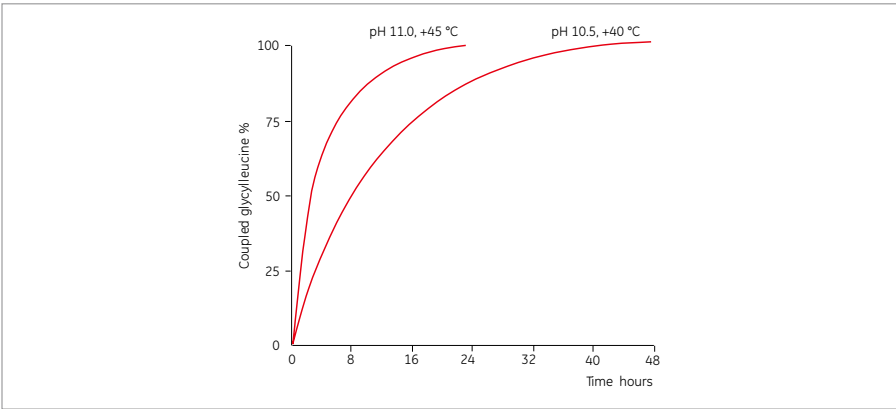


图. 70. 将甘氨酸偶联到环氧树脂-活化的Sephacrose 6B的偶联的效果。

介质特性

产品	组成	pH 稳定性*	颗粒平均大小
环氧树脂-活化的Sephacrose 6B	Sephacrose 6B 与	短期 2-14	90 μm
	1,4 bis-(2,3 epoxypropoxy-)	长期 2-14	
	丁烷反应形成一个稳定的醚键。		

\* 长期是指pH的间隔范围，在这一范围内，介质经过长期的存放仍然是稳定的，对于随后进行的色谱操作没有任何不利的影响；短期是指pH在介质的再生、净化和清洁处理步骤之间的间隔范围。稳定性数据是指被偶联的介质，假设配基能够耐受pH值。

储存

冻干粉末的储存在干燥的条件下，存放温度低于8℃。

柱子储存在能够维持配基稳定性的缓冲溶液中，并且含有抑菌剂，例如PBS, 0.05% NaN3 , pH7.2 或者20%乙醇的缓冲溶液中。

当偶联上配基以后，介质的稳定性将取决于配基的稳定性。



# 通过巯基进行偶联

## 丙基硫氧嘧啶Sepharose 6B

丙基硫氧嘧啶Sepharose6B中的巯基的活性 (见第92页产品的详细信息) 可以用于偶联许多小型的配基来合成亲和介质。

- 可以用于偶联重金属离子和它的衍生物, 因为配基能够与巯基反应形成硫醇盐。
- 烷基或者芳香基的卤素化合物配基可以提供硫醚衍生物。
- 含有C=O, N=N 的配基和在某种条件下C=C 键会有附加的反应。

就像以前所描述的那样, 在配基被偶联前, 介质被转换成三种巯基形式。羟丙基基团可以作为一个小的间隔臂。游离巯基的反应如下图所示。

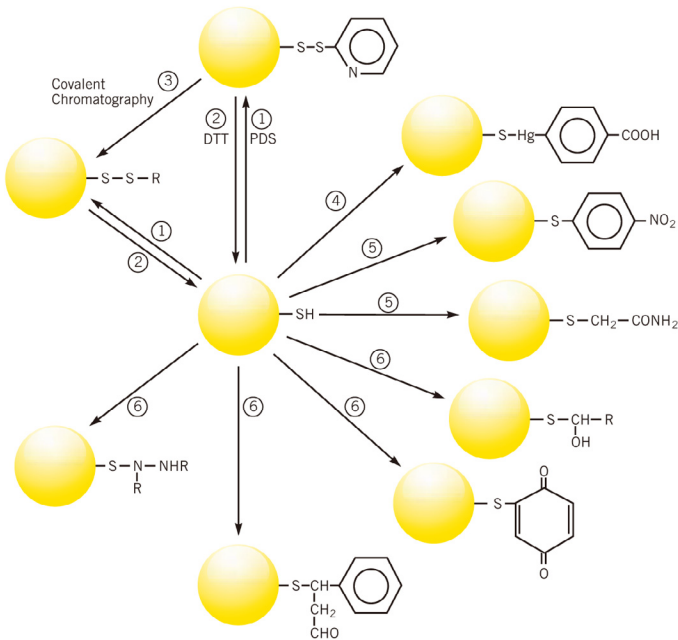


图. 71. 巯基的反应。混合二硫化合物(1), 可逆的被还原剂还原, 例如二硫苏糖醇(DTT) (2 )。将二硫化合物与2, 2'-联吡啶二硫化物混合, 产生一个2-thiopyridyl 衍生物, 适于进行共价的色谱结合 (3)。重金属和其它衍生物的反应, 例如对氯汞苯甲酸(4) 导致形成硫醇盐的形式。用烷基或者芳香基处理产生硫醚衍生物( 5 )。可能会存在各种各样的含有C=O, C=C 和 N=N键的附加的反应( 6 )。

使用丙基硫氧嘧啶Sepharose6B的活化形式偶联含有巯基的低分子量配基, 例如辅酶A。如果配基与蛋白质的反应非常强, 以至于需要变性的条件才能够被洗脱, 那么整个配基—蛋白质复合物可以通过对二硫苏糖醇或者2-巯基乙醇的还原进行洗脱。

含有氨基基团的配基能够通过少量的基团，通过双异官能团的硫醇盐试剂SPDP，多点附着或者偶联到丙基硫氧嘧啶Sephарose6B或者活化的巯基Sephарose4B上。偶联的分子可以用还原剂被还原洗脱。当使用其它方法进行洗脱非常困难时，这可能是非常有用的方式。整个配基—蛋白质复合物从介质上被洗脱下来。

偶联其它的官能团

EAH Sephарose4B 可以用于一个选择性的功能基团，作为偶联反应的起始材料（图72）。酚基通过用O- bromoacetyl-N-羟基琥珀酰亚胺处理EAH Sephарose4B，经过重氮基衍生物(VII) 或者通过bromoacetamidoalkyl衍生物(IV)来制备。这个衍生物也可以通过伯胺基团进行偶联。EAH Sephарose4B的间隔臂通过与琥珀酸酐在pH为6 (VI) 的条件下反应进行延伸，形成一个氨基，碳化二亚胺存在的条件下偶联到基团上。羧基通过碳化二亚胺反应偶联到基团上(III)。巯基衍生物，通过反应(IV)制备，在碳化二亚胺存在的条件下偶联羟基，并且使用羟胺可以特异性的分开硫脂键，这样提供了一个简单的和温和的方法来洗脱完整的配基—蛋白质复合物。

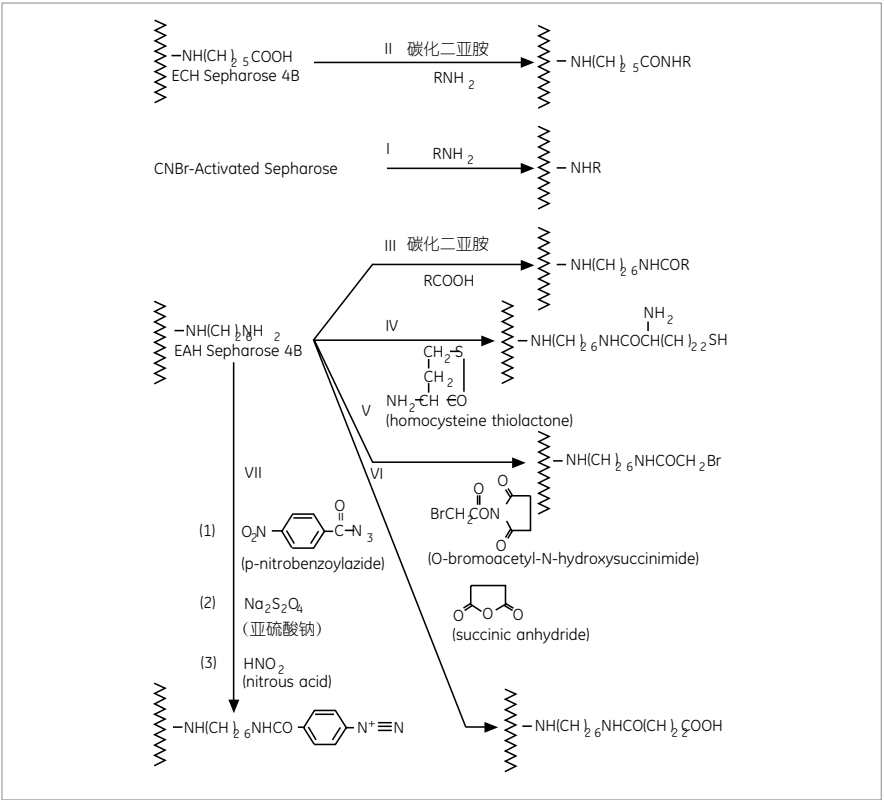


图.72. 将配基偶联到Sephарose的反应。

# 第六章

## 免疫亲和和Cipp

利用免疫亲和的方法分离蛋白质，是以一种蛋白质（或者一组蛋白质）与偶联到色谱基质上的特异性配基发生可逆的相互作用为基础的。对于某种感兴趣的蛋白质具有高度的选择性和高的分辨率，纯化水平可以达到几千倍，并且对活性物质具有较高的回收率。样品在结合的过程中被浓缩，目标蛋白质以纯化的、浓缩的形式被收集。

因此，与那些选择性较低的多步骤纯化相比较，亲和纯化能够节省大量的时间。一般的操作步骤，例如抗体的纯化或者融合蛋白质的纯化能够在单一的步骤中完成。亲和纯化中具有浓缩的特性，可以对大体积的样品进行纯化。目标分子可以从复杂的生物混合物中被纯化，能够从相同的物质中将天然的活性形式与变性形式相分离，可以从大量的高浓度的污染杂质中分离出少量的生物物质。亲和色谱也可以被用于去除特异性的污染物质，例如蛋白酶。

在许多的情况下，最多需要两步就可以达到高水平的纯化，其中第二个步骤就是经过一个凝胶过滤色谱去除不希望得到的小分子，例如盐或者聚合物。

对于更高纯度的纯化，或者当没有适宜的亲和配基用于亲和纯化时，必须使用捕获、中间产物的纯化和精制的纯化策略(Cipp)，研制出一个有效的多步骤的纯化方法，如图73所示。在任何的纯化步骤中，当应用这一纯化策略时，亲和纯化可以进行一个理想的捕获或者中间产物的纯化步骤，并且无论在任何时候如果存在一个适宜的配基，就可以用于对感兴趣的蛋白质进行亲和纯化。

Cipp 这一纯化策略可以被用于制药工业或者实验室的研究，确保研制出更快的纯化方法，使用更短的时间对产品进行纯化，产生更好的经济效益。亲和纯化可以和其它的色谱纯化技术联合使用，作为一个在Cipp 纯化策略中进行有效的捕获或者中间产物的纯化方法。

本章对这一方法进行简短的综述，推荐用于任何多步骤的蛋白质纯化。来自GE Healthcare的蛋白质纯化手册高度推荐将它作为一个指导原则，来设计经济、有效的蛋白质纯化策略和在每一步骤中选择正确的介质和纯化的规模。

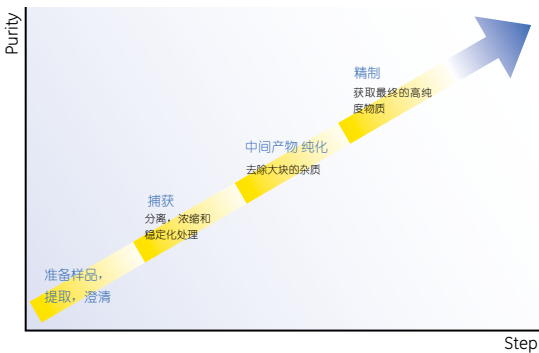



图. 73. 样品准备和Cipp。

应用 Cipp

设想纯化具有三个阶段：捕获、中间产物的纯化和精制阶段。

 在纯化步骤中，每一步中分配一个特定的物体。


纯化问题与特定的纯化步骤相关联，在很大程度上取决于目标物的特性。因此，物质的纯化步骤按照它在纯化过程中的位置会有很大的不同。

如图73所示，对于任何纯化来说，一个重要的步骤（第一步）是正确的样品制备并且在附录1中有详细的阐述。

在捕获阶段，需要对物质中的目标产物进行分离、浓缩和稳定化处理。产物应该被浓缩并且转移到能够保护目标物特性/活性的环境中去。

在中间产物纯化阶段，目标物中大部分的杂质被去除，例如其它的蛋白质、核酸、内毒素和病毒。

在精制阶段，除了痕量的物质或者结构上非常近似的物质，其它大部分的杂质已经被去除。通过去除任何痕量的残存杂质或者结构相类似的物质，被纯化物质获得最终的纯度。

 在捕获、中间产物的纯化和精制中纯化技术的最佳的选择和组合，对于有效的纯化来说是至关重要的。

纯化技术的选择和组合

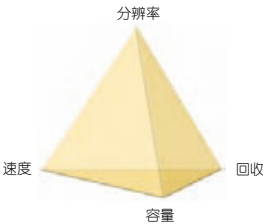
根据蛋白质的不同特性，使用纯化技术对蛋白质进行分离纯化，如表11所示：

表 11. 在纯化过程中使用的蛋白质的特性。

蛋白质特性	操作技术*
生物性识别（配基特异性）	亲和色谱纯化（AC）
电荷	离子交换（IEX）
大小	凝胶过滤（GF）
疏水性	疏水性相互作用（HIC），反相色谱（RPC）

\* 膨胀床吸附是一种用于大规模纯化的技术,蛋白质可以从原始样品中被纯化，不需要对原始样品进行分离净化处理，从浓缩和开始纯化到去除颗粒物质。

The STREAMLINE™ 吸附剂，用于膨胀床吸附，使用与亲和作用、离子交换作用或者疏水性相互作用色谱同样的原理，捕获目标分子。



每一种色谱技术在分辨率、捕获能力、速度和回收率之间提供了一个平衡。

分辨率，是通过对纯化技术的选择来获得的，同时还可以获得产生窄峰时色谱基质的效率。总的来说，如果在纯化的最后阶段，当杂质与目标蛋白质的特性非常相似时，很难获得很高的分辨率。亲和色谱具有很高的选择性能够获得很高的分辨率的结果。

容量，用简单的模式表示，是指在纯化过程中可以装载的总的目标蛋白质的含量。在一些情况下，能够装载的样品的总量，将会受到上样体积的限制（例如在凝胶过滤色谱中），或者受到样品中含有大量的杂质，而不是目标蛋白质的限制。因为亲和色谱是一种结合技术，并不受到样品体积的限制，只要在样品应用过程中维持正确的结合条件，并且目标蛋白质的装载总量没有超过柱子中亲和介质的结合总量。

速度，在纯化开始阶段是非常重要的，因为在被纯化物质中存在一些杂质，例如蛋白酶必须被尽快的去除。现代的亲和介质能够允许使用高的流速来运行样品，同时也可以可以在冲洗柱子和使柱子再平衡等步骤中使用高的流速。在每次运行样品时可以选择适宜的流速，在目标物的结合效率和目标物的洗脱之间达到最佳的平衡，达到快速的分离。

回收率，在纯化过程中它的重要性在逐渐增加，因为它可以增加纯化产物的价值。回收率受到样品的处理和在上柱子上使用不适宜的条件等破坏过程的影响。亲和介质提供了最佳的分离步骤，能够使目标蛋白质达到非常高的回收率。

选择能够满足物质纯化要求的技术。根据纯化技术主要的优点和每一步开始或者结束时，对样品条件的要求，合乎逻辑的组合纯化技术。

表12 给出了在Cipp 中每个阶段每种纯化技术的适用性的指导。

技术	主要特征	捕获	中间产物	精制	起始样品条件	样品结束条件
离子交换	高分辨率 高容量 高速度	★★★★	★★★★	★★★★	低离子强度 样品体积 没有限制	高离子强度 或者 pH变化 浓酥样品
疏水性相互作用	良好的分辨率 良好的容量 高速度	★★★	★★★★	★	高离子强度 样品体积 没有限制	低离子强度 浓缩样品
亲和色谱	高分辨率 高容量 高速度	★★★★	★★★★	★★★	特异性结合条件  样品体积 没有限制	特异性的洗脱条件  浓酥样品
凝胶过滤	高分辨率 使用Superdex		★	★★★★	限制样品体积和 (<5%总柱体积) 和流速范围	缓冲液 交换 (如果需要) 稀释样品
反相色谱	高分辨率		★	★★★★	样品体积 通常没有限制 可能需要添加剂	在有机溶剂中 有丢失生物活性的危险

表 12. Cipp中各种纯化技术的适用性。

- 通过几种纯化技术的组合使用，在纯化步骤间使样品的处理最小化，可以避免对样品条件的要求。产物应该从第一个柱子上被洗脱下来，洗脱缓冲液要适宜于下一个柱子的起始条件。（见表12）
- 硫酸铵，经常被用于样品的澄清和浓缩（见附录12），将样品置于高盐浓度的条件下。随后的疏水层析分离，需要高盐浓度，增强同介质的结合，在样品的捕获步骤中是非常理想的。当样品从疏水层析柱中被洗脱下来后，盐的浓度和总共的样品体积将会被显著降低。对分离样品进行稀释或者使用脱盐柱进行快速的缓冲液的交换将使样品适用于接下来的离子交换层析或者亲和色谱分离步骤。
- 凝胶过滤技术是一种非结合技术，不受缓冲条件的影响，但是受到样品体积的限制。凝胶过滤技术非常适用于在使用任何浓缩技术（IEX, HIC, AC）之后使用，因为目标蛋白质在一个减少的体积中被洗脱下来，并且这些来源于洗脱缓冲液的组分不会影响凝胶色谱的分离过程。最终纯化策略的选择总是取决于样品的特性需要达到的纯化水平。图74所示是将纯化技术进行逻辑的组合。

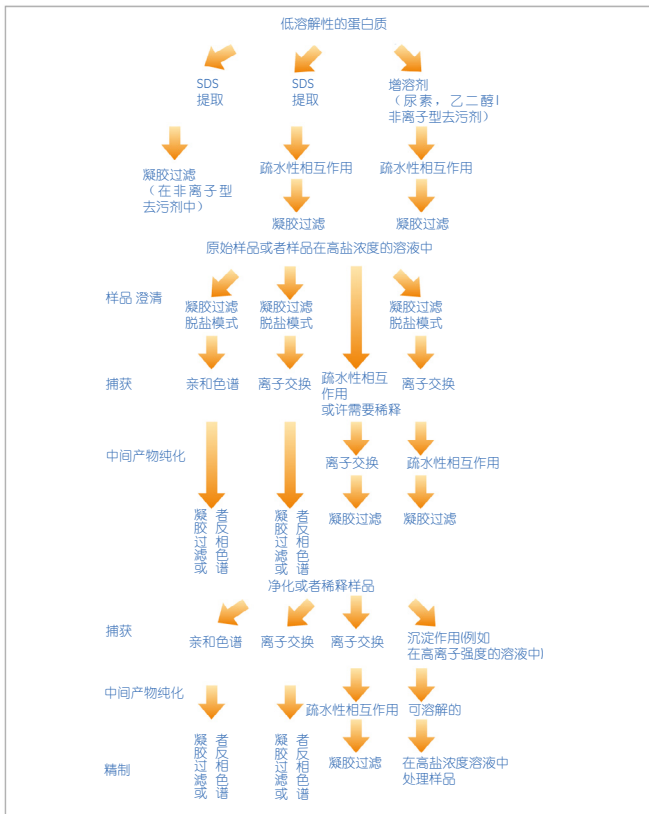


图. 74. 色谱技术的逻辑组合。



对于任何捕获步骤而言，选择能够最有效的结合目标蛋白质的技术，同时还能够尽可能少的结合杂质，例如，对于目标蛋白质具有高的选择性和/或高的容量。

使用组合的并且具有选择性的纯化技术对样品进行纯化。例如，在一个 IEX-HIC-GF 纯化策略中，在样品的捕获步骤中，根据电荷的不同来选择离子交换色谱，在中间产物的纯化步骤中，根据疏水性的不同来选择疏水层析色谱，在最终的精制阶段，根据样品的颗粒直径不同来选择凝胶过滤色谱。



如果对于目标蛋白质一无所知，则使用离子交换色谱-疏水层析色谱-凝胶过滤色谱。这种纯化技术的组合可以被认为是一个标准的步骤。考虑到可以使用阴离子和阳离子两种交换色谱，对于同样的纯化策略，产生不同的选择。离子交换色谱是一种纯化技术，可以使用阴离子和阳离子交换提供不同的选择。pH值可以通过改变样品组分的电荷特性被修饰。在一种纯化策略中也可以多次使用离子交换色谱，用于捕获、中间产物的纯化或者精制。在同样的纯化方案中，离子交换色谱可以被有效的使用，在样品捕获阶段进行低分辨率的快速纯化和在样品精制阶段进行高分辨率的纯化。如果目标蛋白质能够经受反相色谱的运行条件，考虑用反相色谱技术来进行样品精制。反相色谱分离蛋白质和多肽是以样品的疏水性为基础的。反相色谱是一种具有较高的选择性（高分辨率）的纯化技术，需要使用有机溶剂。这一技术被广泛的应用于纯度的检查分析，由于在纯度检查分析过程中，样品中活性物质的回收和样品的三级结构是不重要的。由于在有机溶剂中，许多蛋白质被变性，反相色谱技术一般不被推荐用于蛋白质的纯化，因为在样品变性后，活性物质的回收和重新恢复到原先的蛋白质的三级结构是很难达到的。然而，在样品的精制阶段，当蛋白类杂质的大部分已经被去除，使用反相色谱技术纯化样品是非常好的，特别是对于那些小的目标蛋白质，这些蛋白质在有机溶剂中经常是不变性的。Cipp并不是意味着总是必须要经过三个阶段的纯化。例如，捕获和中间产物的纯化可以在一个步骤中完成，同样中间产物的纯化和精制也可以在一个步骤中完成。相类似的，对于纯度的要求可以是非常低的，以至于经过快速的捕获步骤就能够足以获得想要的结果。对于治疗性蛋白质的纯化，可能需要进行四步或者五步的纯化，来达到最高纯度的纯化和安全要求。所使用的纯化步骤的数量总是取决于要求的纯度和蛋白质预期使用的目的。

## 附录1

### 制备样品

用于色谱纯化的样品应当纯净且不含颗粒物。纯化前进行澄清样品的简单步骤，可以避免阻塞柱子，并可能会减少对严格的洗涤程序的需要，并且可以延长色谱介质的使用寿命。

样品提取过程、选用的缓冲液、添加剂和去污剂均主要取决于材料的来源、靶分子的稳定性以及将要使用的色谱技术和终产品的用途。上述所涉及的这些问题在蛋白质纯化手册和更具体的根据靶分子分类的重组蛋白手册，蛋白质的扩增和样品纯化手册及抗体纯化手册中得到解答，这些手册可从通用电气医疗集团GE Healthcare获得。

### 样品稳定性

在大多数情况下，蛋白纯化后应保持其生物活性。纯化后目标蛋白活性的保留也是一大优势，因为对目标蛋白的检测通常是通过其生物活性来实现的。样品成分变性往往导致沉淀的产生或非特异性吸附增多，这两者都对柱子有损害。因此，检测样品的稳定界限有许多优点，并且对样品的纯化应保证在样品稳定的界限内进行。

在范德华力、离子和疏水相互作用以及氢键作用下，蛋白质通常含有高度折叠的三级结构。任何破坏这些作用力稳定性的条件都可能导致变性和/或沉淀。相比之下，多肽含有较低程度的三级结构。它们主体的二级结构主要靠氢键稳定。出于这个原因，多肽比蛋白能容忍更广泛的样品处理条件。自然结构的这一基本区别也反映在蛋白不容易复性而多肽容易复性。



建议在制定一种纯化策略前先进行稳定性试验，下述列表可作为试验基础：

- 测试蛋白PH稳定性，在pH值2到PH值9之间每次增加1个PH单位；
- 测试蛋白对盐稳定性，用0-2M NaCl和0-2M(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>，每次增加0.5M；
- 测试蛋白在乙腈和甲醇中的稳定性，在0-50%间每次增加10%；
- 测试蛋白对温度的稳定性，在+4℃—+40℃间每次增加10℃；
- 测试蛋白水解活性的稳定性和发生概率，方法是留一些样品在室温下过夜。样品离心后检测上清活性及在280nm处的紫外吸收值。



# 样本澄清

在处理小样本时离心和过滤是样品澄清最常使用的的标准实验室技术。  
强烈建议在进行色谱纯化前进行离心和过滤。

## 离心

离心去除血脂和颗粒物质，如细胞碎片。如果样本在离心后仍不澄清，则使用滤纸或5微米过滤器作为第一步过滤，下面所列的方法中，选择一项作为第二步使用方法：

- 对于小样本量或会吸附到过滤器的蛋白质，10000g离心15分钟。
- 对细胞裂解液，40 000–50 000 g离心30分钟。
- 血清标本可在离心后通过玻璃棉去除剩余的脂质。

## 过滤

过滤能去除颗粒物。非特异性结合蛋白质最少的滤膜是醋酸纤维素或聚偏二氟乙烯PVDF。  
为色谱步骤制备样品时，选择与色谱介质孔径相符的过滤器孔径。

滤膜的标准孔径大小	色谱介质颗粒的大小
1 µm	90 µm 和90 µm以上
0.45 µm	34 µm
0.22 µm	3, 10, 15 µm 或者需要额外的样品净化或者无菌过滤步骤



预实验检测靶蛋白的回收率。一些蛋白质可能非特异吸附到过滤器表面。

## 脱盐

脱盐柱适合任何样本量，并在一个单一步骤中迅速去除低分子量杂质，同时把样品转移到适宜的缓冲溶液中。仍然建议在脱盐前对样品进行离心和/或过滤。缓冲液交换和脱盐的详细程序见页133。

在实验室条件下，当样品离心过滤达到可接受的纯度后，可以避免缓冲液交换和脱盐步骤。对于亲和层析和疏水相互作用色谱，可通过调整样品pH值和，如果必要的话，稀释样品以减少溶液离子强度来提高效率。



不管样品量大小均需迅速处理样本。如果需要的话在纯化步骤进行前或进行中使用（请记住，每一个额外的步骤均可减少产量，脱盐也会稀释样本）。

去除分子量 $M_r > 5\,000$ 的盐

如果需要使用易挥发的缓冲液，使用100 mM醋酸铵或100 mM的碳酸氢铵。

### 特殊样品处理步骤

如果粗样中含有如血脂，脂蛋白或酚红之类可能堵塞柱子的杂质，可能需要特殊的样品处理步骤。或者当含有较大杂质时，也应在色谱步骤前处理样品以去除杂质。

### 分段沉淀

分段沉淀是实验室规模常用的技术，可在小样本量时去除较大杂质，也偶尔用在小规模的商业化生产。其根据溶解度的不同分段沉淀杂质。由于蛋白质种类不同其疏水性程度也不同，增加盐的浓度可提高蛋白质间的疏水相互作用，从而导致沉淀产生。分级沉淀可用于去除较大杂质，如下图所示有三种不同的方法。

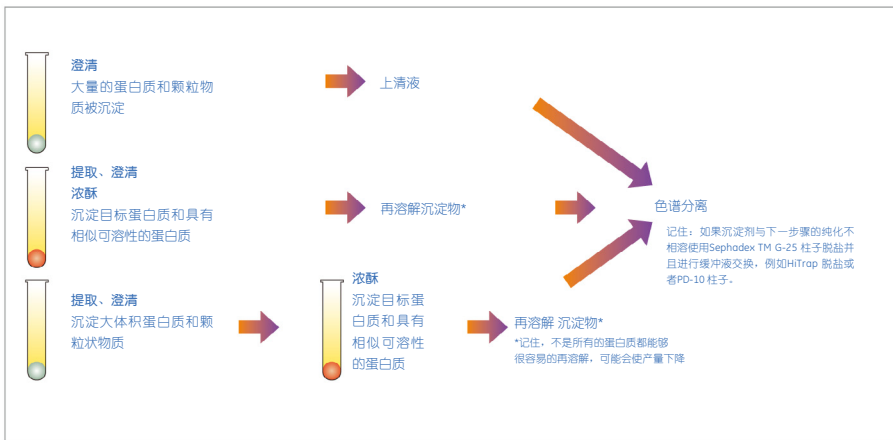


图. 75. 三种方式使用沉淀。

表13列有沉淀剂范例。最常见的硫酸铵沉淀法，下面有详细说明。




表 13. 沉淀技术示例。

沉淀试剂	典型的使用条件	样品类型	注释
硫酸铵	如下所述。	> 1 mg/ml 蛋白质 特别是免疫球蛋白	稳定化蛋白质, 没有 变性, 上清能够直接用于 疏水性相互作用 帮助减少脂质含量
硫酸葡聚糖	加入0.04 ml 10% 硫酸葡聚糖和 1 ml 1 M CaCl <sub>2</sub> 每毫升 样品, 混合15 min, 离心 10 000 g, 弃去沉淀物。	高脂蛋白的样品, 例如腹水	沉淀脂蛋白
聚乙烯吡咯烷	加入3% (w/v), 搅拌 4 小时, 离心 17 000 g, 弃去沉淀物。	高脂蛋白的样品, 例如腹水	可以选择加入硫酸葡聚糖
聚乙二醇 (PEG, M <sub>r</sub> > 4000)	大于20% 重量/体积	血浆蛋白质。	非变性, 上清可以直接用作 离子交换色谱和亲和色谱 完全去处聚乙二醇可能 会很困难, 稳定化处理蛋 白质。
丙酮 (冷的)	大于80% 体积/体积 在+0 ℃。 在全速离心后收集沉淀 Eppendorf™ 离心管中的沉淀		可能会使蛋白质产生 不可逆变性.用于多肽 沉淀或者浓缩样品进行 电泳
聚乙烯亚胺	0.1%重量/体积		沉淀聚集的核蛋白质
精蛋白硫酸盐	1%重量/体积		沉淀聚集的核蛋白质
硫酸链霉素	1%重量/体积		用于核酸的沉淀。
正辛酸	(X/15) g where X = 样品体积	抗体浓度应该> 1 mg/ml	从血清和腹水中, 沉淀大体积的蛋白质 溶液中只剩下免疫球蛋白

细节摘自:

Scopes R.K., 蛋白质纯化, 原理和实践, Springer, (1994), J.C. Janson and L. Rydén, 蛋白质纯化, 原理, 高分辨率方法和应用, 2nd ed. Wiley Inc, (1998)。个人通讯。

硫酸铵沉淀

-  硫酸铵可能会破坏一些蛋白质。当添加结晶硫酸铵时要小心：高浓度的硫酸铵可能会导致不需要的蛋白质沉淀从而产生杂质。
-  常规情况下，应避免使用硫酸铵重复纯化和沉淀蛋白质，以有利于色谱操作。
-  一般情况下，蛋白浓度低于1毫克/毫升时沉淀效果不佳。

沉淀所需溶液：

饱和硫酸铵溶液（添加100克硫酸铵至100毫升的蒸馏水，搅拌溶解）。  
1 M Tris-HCl, pH 8.0。  
第一个净化步骤所需缓冲液。

1. 样品经过0.45 μm滤器或（10 000 g，+4 ℃）离心。
2. 以1: 10比例加入1 M Tris-HCl（pH 8.0）以维持pH值。
3. 轻轻搅拌。逐滴添加硫酸铵溶液直至达到50 %饱和度\*。搅拌1小时。
4. 10 000 g离心20分钟。
5. 去上清液。用适宜体积相同浓度的硫酸铵清洗两次（该溶液既不会溶解蛋白质沉淀，也不会造成进一步的沉淀）。再次离心。
6. 用少量下一个步骤所用缓冲液溶解沉淀。
7. 用Sephadex G-25脱盐柱在澄清/缓冲液交换步骤中去除硫酸铵（见页133）。
8. \*可以通过调整%饱和度沉淀靶分子或沉淀污染物。

根据温度不同，硫酸铵达到某一饱和度所需量不同。表14显示在+20 ℃所需的数量。

表 14. 在20℃ 条件下，达到给定饱和度所需要的硫酸铵的量。

		所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	
起始百分比 饱和度		在+20 °C条件下每升溶液中需要加入的硫酸铵总量(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	

蛋白质沉淀的重溶

许多蛋白质很容易溶于少量的缓冲液中。然而，当蛋白溶解性较差时可能需要变性剂进行增溶。具体情况取决于特定的蛋白质。这些试剂应当最终被去除，以便完成蛋白质的折叠，并最大限度地恢复蛋白质的总量和活性。色谱过程通常可以去除纯化过程中所使用的变性剂。表15列举了常见的变性剂：

表 15.

变性试剂	使用的典型条件	去除/注释
尿素	2 M-8 M	使用Sephadex G-25去除尿素。
盐酸胍	3 M-6 M	使用Sephadex G-25 或者在离子交换过程中去除盐酸胍。
Triton X-100	2%	使用Sephadex G-25 或者在离子交换过程中去除盐酸胍。
十二烷基氨酸钠	1.5%	使用Sephadex G-25 或者在离子交换过程中去除盐酸胍。
N-辛基葡萄糖苷	2%	使用Sephadex G-25 或者在离子交换过程中去除盐酸胍。
十二烷基硫酸钠	0.1%-0.5%	在第一个色谱步骤过程中用非离子型去污剂进行交换，避免使用阴离子交换色谱。
碱性pH	> pH 9, NaOH	在色谱过程中可能需要调节pH 值来维持可溶性。

细节摘自:

Scopes R.K., 蛋白质纯化,原理和实践，Springer，(1994)，J.C. Janson and L. Rydén，蛋白质纯化，原理，高分辨率方法和应用，2nd ed. Wiley Inc，(1998) 和其它资源。

缓冲液交换和脱盐

文献中常提到用透析的方法去除盐或其它小分子，并交换样品缓冲液。然而，一般情况下透析是一种非常缓慢的技术，需要大量的缓冲液。在处理过程中或由于蛋白水解或由于蛋白非特异性结合到透析膜上，均有可能损失目标蛋白质的总量。更简单且更快捷的技术是使用Sephadex G-25 脱盐柱，分离高和低分子量的物质。将蛋白质与盐和其他小分子分开。

在快速一步过程中，样本脱盐，转移到一个新的缓冲液中，低分子量物质被去除。

脱盐柱不仅用来去除低分子量的杂质如盐，而且还用于在不同层析步骤之前或之后的缓冲液交换，或者用于迅速去除某种试剂以终止反应。

脱盐柱可以处理达到30%柱容积的样本量。使用一般水相缓冲液时只要蛋白浓度不超过70毫克/毫升，样品浓度不影响分离效果。样品应充分溶解。离心或过滤以去除颗粒物。



对小样本量的样品，可能需要使用色谱分离纯化的缓冲液稀释样品，但仍必须去除细胞碎片和颗粒物。



为了防止可能发生的离子相互作用，建议在脱盐和最终样品缓冲液中使用低盐浓度(25 mM NaCl)的溶液。



如果需要避免NaCl的存在，可使用挥发性缓冲液，如100 mM醋酸铵或100 mM 00毫米的碳酸氢铵盐。

图76展示了一个典型的缓冲液交流和脱盐分离过程。这一过程可以通过紫外吸收光谱和电导率的变化来监测。

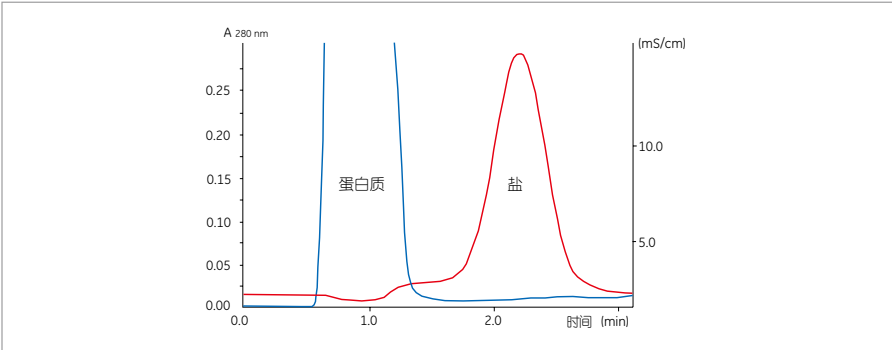


图. 76. 小鼠血浆在HiPrep 26 / 10 脱盐柱上进行缓冲液交换。

对于实验室规模的实验，表16显示了预填充好的，可用于脱盐和缓冲液交换的柱子。

表 16. 脱盐和缓冲液交换的选择性指导。

柱子	样品体积	样品洗脱体积
MicroSpin G-25	0.1-0.15 ml	0.1-0.15 ml
PD-10 （利用重力上样）	1.5-2.5 ml	2.5-3.5 ml
HiTrap 脱盐柱 5 ml	0.25-1.5 ml	1.0-2.0 ml
HiPrep 26/10 脱盐柱	2.5-15 ml	7.5-20 ml

对于大样本量的脱盐：

- 串联连接最多5个HiTrap 脱盐5 ml 柱子以增加样本容量，例如2个柱子：样本量3毫升；5个 柱子：样本量7.5毫升。
- 串联连接最多4个HiPrep 26/10 脱盐柱子以增加样本容量，例如2个柱子：样本量30毫升；4个柱子：样本量60毫升。即使串联4个柱子，样本依然可以在20-30min内处理完（室温，水相缓冲液）

每种柱子都有附带的说明书。脱盐和缓冲液交换耗时少于5min/每份样品，大多数蛋白质回收率大于95%。

备选方案1：HiTrap 脱盐5 ml柱子使用注射器手动脱盐

1. 注射器装满缓冲液。拔去针头。为避免空气进入柱体，采用水对水法连接注射器和柱子（通过提供的接头）。
  2. 移动柱塞。
  3. 用25毫升缓冲液洗柱（5 ml/min），以去除20%乙醇（作为存储缓冲液）。如果空气进入柱子，用经过脱气的缓冲液冲洗直至空气被排出柱子。上样时柱子中偶尔出现的气泡不影响分离效果。
  4. 用2-5毫升的注射器上样，流速为1-10 ml/min。舍弃从柱子中洗脱出来的液体。
  5. 如果样品量少于1.5毫升，换到缓冲液并切换到injection，直至1.5 ml全部洗脱。弃去洗脱液体。
  6. 以表16所示体积洗脱蛋白质。按指示量收集脱盐蛋白。

注：使用HiTrap 5 ml 柱子时，5 ml/min大约相当于120滴/分钟。

也可用一个简单的蠕动泵来上样和缓冲液。

建议的最大样本量为1.5毫升。减少上样量的影响见下表。

表 17. 用注射器或者Multipipette™时，推荐的样本量和洗脱体积。

样品载荷 ml	加入缓冲液 ml	洗脱和收集 ml	产量 %	保持盐分 %	稀释因子
0.25	1.25	1.0	> 95	0.0	4.0
0.50	1.0	1.5	> 95	< 0.1	3.0
1.00	0.5	2.0	> 95	< 0.2	2.0
1.50	0	2.0	> 95	< 0.2	1.3

也可用一个简单的蠕动泵来上样和缓冲液。

备选方案2：用ÄKTAprime plus 进行简单的脱盐

ÄKTAprime plus包含关于HiTrap Desalting 5 ml和HiPrep 26/10的预先设定好的操作模板。



缓冲液的制备

1. 准备至少500毫升所需要的缓冲液。
  2. 按照ÄKTAprime plus cue card上的指示连接柱子和用缓冲液加载系统。
  3. 选择应用模板。
  4. 启动方法。
  5. 输入样本数量，按OK。

下图显示了利用ÅKTAprime plus获得的一个典型的脱盐结果。观测紫外线（蛋白质）和电导率（盐）可显示脱盐过程。

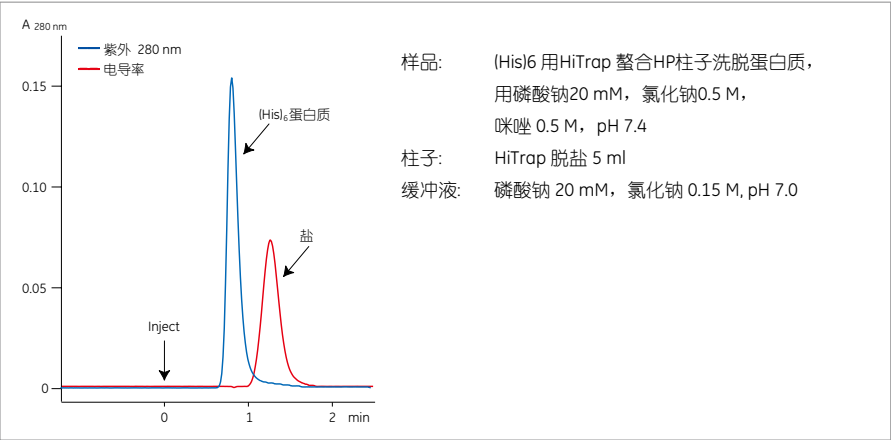


图. 77. ÅKTAprime plus 对(His) 6融合蛋白进行脱盐。

## 去除脂蛋白

脂蛋白和其他脂质物质能迅速堵塞层析柱，最好将它们去除后再开始纯化。推荐进行分段沉淀，使用沉淀剂如葡聚糖硫酸盐和聚乙烯吡咯烷，去除样本中高含量的脂蛋白，如腹水样品。

样品离心，以降低靶分子非特异性结合到滤器的概率。

样本如血清可以用玻璃棉过滤去除其余血脂。

## 去除酚红

酚红是常用的实验室规模下细胞培养的pH指示剂。虽然不直接干预纯化，酚红可以绑定到某些净化介质上，因此需要尽早去除酚红以避免受样品受到污染的风险。在pH > 7时，酚红结合阴离子交换介质。

使用脱盐柱同时去除酚红（一低分子量分子）并使样本转移到进一步纯化所用的缓冲液中，如缓冲液交换和脱盐部分所述。

## 去除低分子量杂质

如果样本含有高浓度的低分子量杂质，要在第一步色谱分离纯化前使用脱盐柱去除低分子量的杂质，如缓冲液交换和脱盐部分所述。



# 附录2

## 纯化设备的选择

许多亲和层析实验可使用最简单的方法和设备进行样品纯化，例如逐步梯度洗脱可使用注射器连接预填充的HiTrap柱。当需要更复杂的洗脱方法时，可使用大容量的柱子或将同一种柱子串联使用，最好使用专用系统。

工作方式	标准的 ÄKTA 设计构成					离心+ MicroSpin
	Explorer 100	Purifier 10	FPLC	Prime plus	注射器+ HiTrap	
快速筛选(谷光甘肽或者 组氨酸标记的蛋白质)						✓
简单的一步纯化	✓	✓	✓	✓	✓	
常规纯化的重复性操作	✓	✓	✓	✓		
对一步纯化进行优化 增加纯度	✓	✓	✓	✓		
系统控制和数据处理来调控 需求，例如GLP	✓	✓	✓			
自动方式的研制和 优化	✓	✓	✓			
缓冲液的自动准备	✓	✓				
pH 的自动监控	✓	✓				
柱子或者介质的自动监控	✓					
自动的多步骤纯化	✓					
扩大化生产, 方法的研制和转 换到生产规模	✓					



ÄKTAexplorer



ÄKTAprime plus



ÄKTApurifier



ÄKTAfPLC

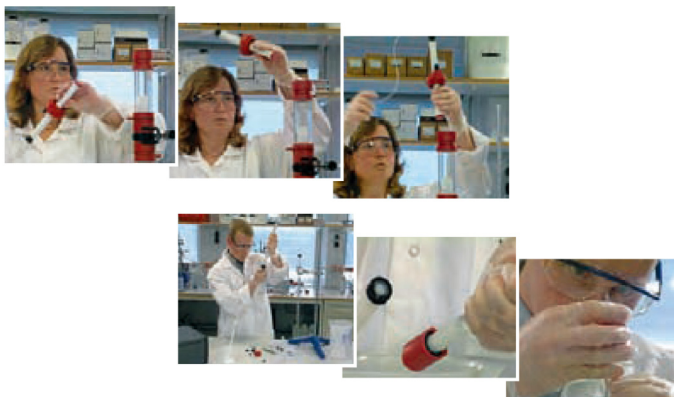
## 附录3

### 柱填充与准备

GE医疗集团的预填充柱能确保可重复性的结果和最高的纯化性能。但是，如果需要自行填充柱子，下列准则适用于任何规模操作：

- 对于高结合能力的介质，即使在低线性流速情况下，可使用短且宽的柱子对样品快速分离纯化。
- 对于准备使用的介质，要详细了解每毫升介质的结合能力。除非另有说明，先估计结合靶分子所需介质量，然后使用2至5倍该量来填充柱子。参照产品说明获取更具体的信息如相关缓冲液、流量等。
- 对于预激活基质制造的介质，检测其结合能力。估计结合靶分子所需介质量然后使用2至5倍该量来填充柱子。

亲和介质可以装在任何Tricorn™ 或 XK柱子里，可以从通用电气医疗集团购买此类产品。填充柱子的详细步骤演示可在CD内的“The Movie”看到（见订购信息）。



1. 使所有材料的温度均保持在分离所需条件下。
2. 用推荐的缓冲液冲洗柱子末端以排尽空气。确保柱子里没有空气。封闭柱子的出口，柱体内保留1-2厘米的缓冲液。
3. 轻轻重悬介质。



对于不以悬浮液形式提供的介质，用介质：缓冲液比率约为1：2混合经再水合作用形成悬浮液。



避免使用磁力搅拌器，因为它们可能损害基质。

4. 在推荐量的基础上估计所需要的浆液体积（介质悬液）。
5. 向柱子里倒入所需数量的浆液。用靠在柱壁的玻璃棒引流能尽量减少气泡。
6. 立即用缓冲液填充柱子。
7. 固定柱子上部零件并与一个泵连接。
8. 打开柱子通路，将泵设定为理想的流速。



如果不知道推荐的流速，使用泵可以提供的最大流速。



不要超过介质和柱子允许的最高工作压力。

9. 在柱床体积基本稳定后，保持至少3倍柱容量的装填流速。在柱子上标出柱床高度位置。



在任何纯化过程均不要超过75%的装填流速。

10. 关闭泵并封闭柱子出口。拿下上端零件，用缓冲液小心填充柱子剩余部分，在顶部形成一个向上的半月面。
11. 以一定角度插入接头，确保没有空气进入柱内。
12. 将接头缓慢滑下柱子（接头出口应打开），直至达到标记位置。锁定接头的位置。
13. 连接柱子和泵，并开始平衡柱子。如有必要重新定位接头。



必须彻底清洗介质，以消除存储液，通常是20%乙醇。残余乙醇可能干扰随后的过程。



许多介质需要用含有抗菌剂的无菌磷酸盐缓冲液平衡，该缓冲液可在4 °C存储最多一个月，但需始终遵循产品的存储说明。

## 柱子的选择

Tricorn和XK列完全符合现代介质高流速的需求，而且有广泛的柱尺寸可供选择。下面列出了最适合填充亲和介质的柱子。在大多数情况下亲和介质的容纳能力和样品纯化量决定所需柱子尺寸。

完整的清单请参阅GE医疗BioDirectory™或网页目录([www.gelifesciences.com/protein-purification](http://www.gelifesciences.com/protein-purification))。

表 18.

柱子	体积 (ml)	编号
Tricorn 5/20	0.31-0.55	18-1163-08
Tricorn 5/50	0.90-1.14	18-1163-09
Tricorn 10/20	1.26-2.20	18-1163-13
Tricorn 10/50	3.61-4.56	18-1163-14
XK 16/20	2-34	18-8773-01
XK 26/20	0-80	18-1000-72
XK 50/20	0-275	18-1000-71

## 附录4

### 从线性流速（厘米/小时）转换为体积流量

（毫升/分钟），反之亦然。

当比较不同尺寸柱子的流速时，以线性流速（厘米/小时）表示是比较方便的。然而，流速通常是以体积流量（毫升/分钟）测定的。在线性流速和体积流量之间的转换，使用如下的一个公式。

### 从线性流速(cm/hour)转换为体积流量(ml/min):

$$\begin{aligned}\text{流速 (ml/min)} &= \frac{\text{线性流速 (cm/h)}}{60} \times \text{柱子的横断面积 (cm}^2\text{)} \\ &= \frac{Y}{60} \times \frac{\pi \times d^2}{4}\end{aligned}$$

式中

Y = 线性流速cm/h

d = 柱子的内径cm

范例:

当 XK 16/70 column (i.d. 1.6 cm) 线性流速是150 cm/hour，其体积流速是多少？

Y = 线性流速cm/h = 150 cm/h

d = 柱内径cm = 1.6 cm

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

### 从体积流量(ml/min)转换为线性流速(cm/hour):

$$\begin{aligned}\text{线性流速 (cm/h)} &= \frac{\text{体积流量 (ml/min)} \times 60}{\text{柱子的横断面积 (cm}^2\text{)}} \\ &= Z \times 60 \times \frac{4}{\pi \times d^2}\end{aligned}$$

式中

Z = 体积流速ml/min

d = 柱内径

范例:

当HR 5/5 柱子 (直径 0.5 cm) 体积流速是 1 ml/min，线性流速是多少？

Z = 体积流量 = 1 ml/min

d = 柱子 内径= 0.5 cm

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

### 从 ml/min 到使用注射器

1毫升/分钟=约30滴/分钟 (HiTrap 1 ml column)

5毫升/分钟=约120滴/分钟 (HiTrap 5 ml column)

附录5

转换数据：蛋白质、柱压

物质的量 (g/mol)	1 μg	1 nmol	Protein	A <sub>280</sub> for 1 mg/ml
10 000	100 pmol; 6 × 10 <sup>13</sup> 分子	10 μg	IgG	1.35
50 000	20 pmol; 1.2 × 10 <sup>13</sup> 分子	50 μg	IgM	1.20
100 000	10 pmol; 6.0 × 10 <sup>12</sup> 分子	100 μg	IgA	1.30
150 000	6.7 pmol; 4.0 × 10 <sup>12</sup> 分子	150 μg	蛋白 A	0.17
			抗生物素蛋白	1.50
			抗生物素蛋白链菌素	3.40
			牛血清白蛋白	0.70
1 kb of DNA	= 333 编码容量的氨基酸			
	= 37 000 g/mol			
270 bp DNA	= 10 000 g/mol			
1.35 kb DNA	= 50 000 g/mol			
2.70 kb DNA	= 100 000 g/mol			
一个氨基酸的平均分子量 = 120 g/mol.				


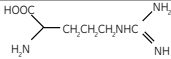
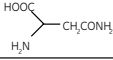
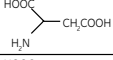

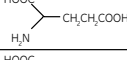
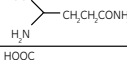

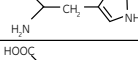
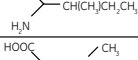
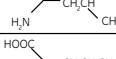
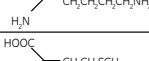
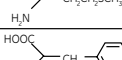
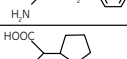


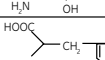
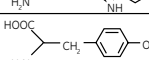
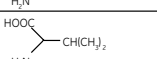
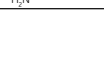
柱压

施加在柱内容物上的最高工作反压可能会导致介质被压缩。

压力单位以百万帕、bar或磅/每平方英寸表示， 这些单位可做如下转换： 1MPa =10 bar =145 psi

# 附录6

## 氨基酸表

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	

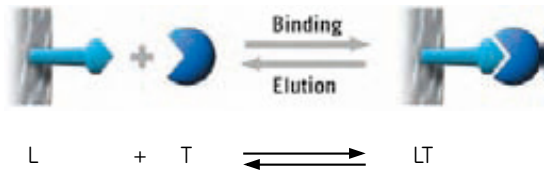
分子式	M <sub>r</sub>	中间单元 残基 (-H <sub>2</sub> O) 分子式	M <sub>r</sub>	在pH 6.0-7.0 电荷	亲水性 (非极性)	不带电荷 (极性)	亲水性 (极性)
C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub>	89.1	C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> NO	71.1	中性的	■		
C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	174.2	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub>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

附录7

亲和层析的动力学

靶蛋白(T)的结合（吸附）到亲和配体(L)和从亲和配体上洗脱（解吸）可视为以结合力的平衡形式进行，并结合吸附和解吸动力学。

结合力的平衡：通过改变K<sub>D</sub>，进行非特异性洗脱。



解离平衡常数K<sub>D</sub>的定义如下。游离的配体是指未结合到靶蛋白的配体。游离的靶蛋白是指未结合配体的靶蛋白。

平衡

$$K_D = \frac{[L][T]}{[LT]}$$

K<sub>D</sub> 是平衡解离常数  
[L] 是游离配基的浓度  
[T] 是游离的目标物的浓度  
[LT] 是游离配基和目标物复合物的浓度

平衡常数的标准定义

Graves和Wu在Methods in Enzymology 34, 140-163（1974）提到:

$$\frac{\text{结合的目标物}}{\text{总目标物}} \approx \frac{L_0}{K_D + L_0}$$

K<sub>D</sub> 是平衡溶解常数  
L<sub>0</sub> 是配基的浓度, 一般是10<sup>-4</sup> - 10<sup>-2</sup> M

有关该方程有很多假设和简化的衍生形式，尽管它不是一个确切的定义，但它的确给出了一个合理的定性描述。在结合过程中结合总的靶分子的比率必然会接近1，即几乎所有的靶分子都会结合到配体上。K<sub>D</sub>应该比配体浓度小，即当 L<sub>0</sub> 是 10<sup>-4</sup>-10<sup>-2</sup> M时，K<sub>D</sub>应当在10<sup>-6</sup>-10<sup>-4</sup> M间以实现有效的结合。

由于可以通过改变pH值、温度、离子强度和其它参数来改变K<sub>D</sub>，在亲和层析中可以修改这些参数进行洗脱。由于条件改变可以引起结合平衡改变，为得到一个合理的洗脱，必须通过一较强因子来增大解离常数（图78）。

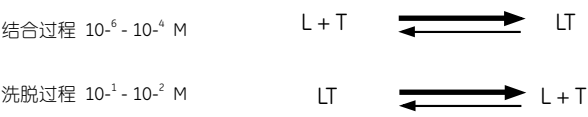
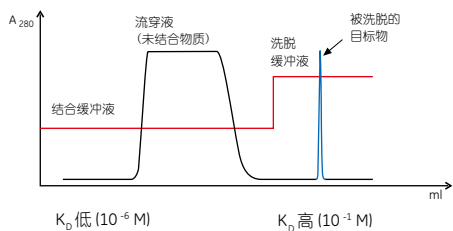


图. 78. 在结合和洗脱过程中改变K<sub>D</sub>的变化

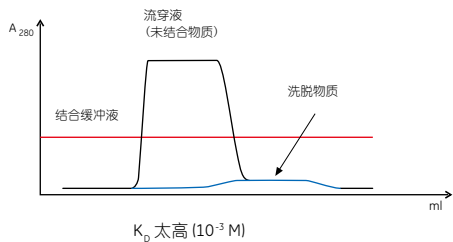


改变条件以改变 $K_D$ 值，理想的结果  
当pH, 离子强度或者温度发生变化时 $K_D$ 的变化。



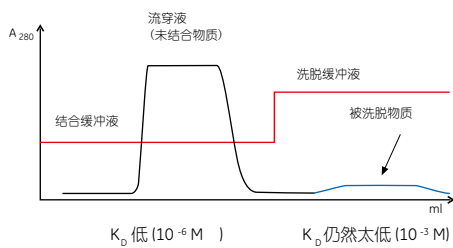
目标洗脱形成尖锐峰。

改变条件以改变 $K_D$ 值，不好的结果  
在结合期间 $K_D$ 太高。



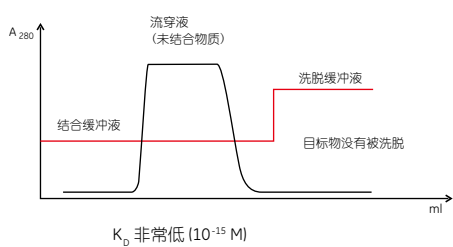
当目标物结合和洗脱时形成一个宽峰，  
当使用结合缓冲液时有一个低峰。  
- 寻找更好的结合条件来降低 $K_D$ 。

$K_D$ 在洗脱期间太低。



目标洗脱形成一个长的低峰。  
试着用不同的洗脱条件增加 $K_D$ 。

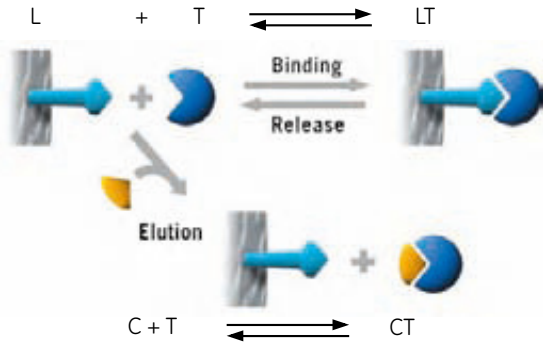
$K_D$ 在结合期间太低。



如果不破坏它，困难或者不可能增加 $K_D$ 。  
到足够的值来洗脱目标物

结合平衡：选择性洗脱或竞争性洗脱

这些例子显示了在亲和层析时，非特异性洗脱KD变化引起的结果。然而，竞争洗脱也可以用结合力的平衡解释，如以下例子显示的通过增加竞争性游离配体进行洗脱。增加竞争性结合物质时也有类似的情况。



竞争性配体的结合平衡

平衡

$$K_{Dcomp} = \frac{[CT]}{[C][T]}$$

$K_{Dcomp}$ 是平衡解离常数  
[C] 是自由竞争配基的浓度  
[T] 是游离目标物的浓度  
[CT] 是竞争配基和目标物的复合物的浓度

Graves和Wu在Methods in Enzymology 34, 140-163 (1974) 提到

$$\frac{\text{洗脱的目标物}}{\text{总共结合的目标物}} \approx \left( \frac{r}{r + 1} \right) \left[ \frac{r C_0}{r C_0 + \frac{K_{Dcomp} L_0}{K_D}} \right]$$

P 是加入的竞争配基的体积和在胶中的空隙容积的比例, 假设范围在1-10  
 $K_D$  是偶联配基的解离常数  
 $K_{Dcomp}$  是自由竞争配基的解离常数  
 $C_0$  是竞争配基的浓度, 经常是  $10^{-2}$  -  $10^{-1}$  M  
 $L_0$  是偶联配基的浓度, 经常是  $10^{-4}$  -  $10^{-2}$  M

根据一些假设和简化再次推导方程，试图明确在结合过程所发生的变化。并且给出在结合过程中所发生的质的变化的图片。

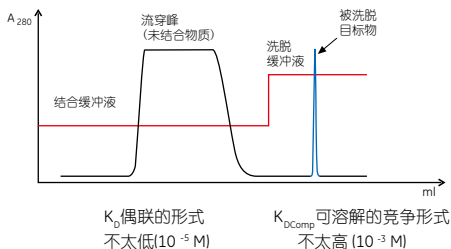
如果 $K_{Dcomp}$ 和 $K_D$ 值大致相同，那么竞争的配体和耦连的配体的浓度也应大致相同以实现有效的洗脱。

如果 $K_{Dcomp}$ 是十倍的 $K_D$ 值（即游离的竞争性配体结合更弱），则竞争配体将需要 $10\times$ 的浓度，以实现有效的洗脱。

如果竞争配体在低浓度条件下捕获靶蛋白不是很有效的话，则靶蛋白从柱子上洗脱时呈现一个非常宽的峰，因而需要更高浓度的竞争性配体以实现目标蛋白的有效洗脱。然而竞争配体往往比较昂贵，所以这是一个不理想的情况。

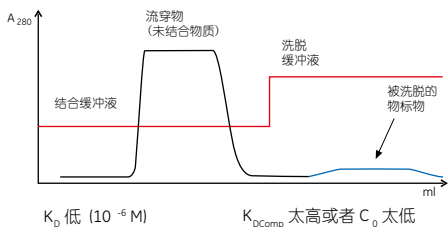
## 竞争性洗脱的理想情况

$K_{DComp}$  太高或者  $C_0$  太低。



目标物洗脱形成尖锐峰

## 竞争性洗脱的不理想情况

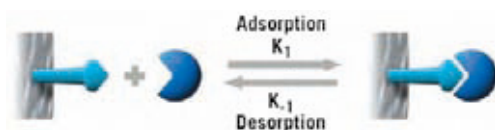


目标洗脱物形成一个长的，低峰。

增加竞争浓度或者使用更有效的竞争物

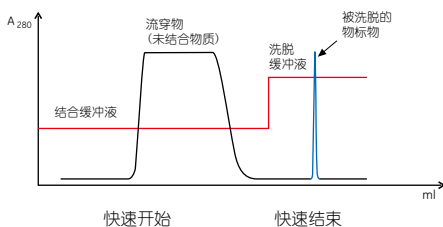
## 吸附和解吸的动力学

总体来说，动力学受扩散过程影响。吸附或解吸过程中动力缓慢可能会导致亲和分离时产生问题。较大靶分子对扩散的影响比较大-他们比较小的靶分子扩散的更慢，从而需要较长时间结合到凝胶深处的配体，因此使整个过程放缓。



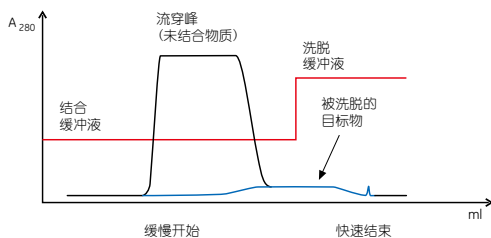
解吸是一级反应，即比率不会受到配体浓度影响。

希望得到的结果，快速开始/快速结束的动力学



目标物被洗脱形成尖峰

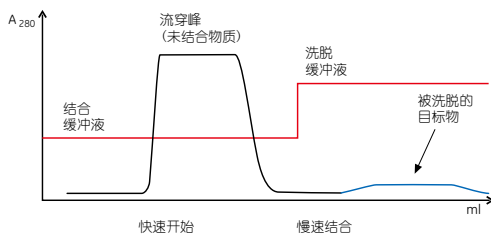
### 不希望发生的结果 - 慢速结合 (吸附作用)



S在结合状态下对目标物进行洗脱形成宽的低峰。

- 分成不同等份上样，使有足够的时间进行结合。

### 不希望发生的结果 - 慢速洗脱(解吸作用)



目标物的洗脱形成一个长的低峰。


- 改变洗脱方案。

- 使用脉冲式洗脱（见第22页）。

# 附录8

## 分离纯化中的分析实验

分析化验是纯化过程中必不可少的步骤。它们被用来评估每一步的产量、生物活性、回收率，并帮助优化实验条件。一个可靠的检测靶分子的方法，其重要性是不容置疑的。

 当分析色谱组分时，要确保用于纯化的缓冲液不干扰测定的结果。

### 总蛋白测定

Lowry 或 Bradford检测法是最常用的检测总蛋白含量的方法。Bradford法特别适合于测定高脂肪含量的样品中总蛋白的含量，而Lowry法的测定结果则会受脂肪的干扰。

### 纯度测定

通常用SDS-PAGE检测样品纯度。或者可选择等电聚焦、毛细管电泳、反相色谱法或质谱分析。

### SDS-PAGE分析

#### 所需试剂:

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(或者 5% 2-巯基乙醇), 0.012% (w/v) 溴酚蓝。分装0.5 ml /份, -80 °C 储存。

1. 在5–10 μl粗提物上清液（细胞裂解物、纯化组分）中加入2μl的6X SDS上样缓冲液。
2. 短暂漩涡振荡，90-100° C加热5min。
3. 加样到SDS-聚丙烯酰胺凝胶。
4. 凝胶跑好后用考马斯亮蓝染色（考马斯亮蓝 R Tablets）或银染色（附加一个银染试剂盒，蛋白质）。

应按照靶蛋白的分子量选择SDS凝胶中丙烯酰胺的百分比（见表19）。

表 19.

% 丙烯酰胺在分离胶的百分比		分离大小范围
单一百分比:	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%	14 000–200 000
	5–20%	10 000–200 000
	10–20%	10 000–150 000
* 较大的蛋白在凝胶中的移动显著落后		

## 功能分析

利用特异性免疫反应已经建立很多检测靶分子的生物活性的方法。

- 当SDS-PAGE分析（用考马斯亮蓝或银染法染色）敏感性不够时，使用Western blot分析。

1. SDS-PAGE分离蛋白质样品。
2. 从凝胶上分离蛋白质，转移至适当的膜，如Hybond™ ECL™（为之后的ECL检测准备）或Hybond P（为以后的ECL Plus™检测准备）。
3. 以适宜的特殊试剂浸泡膜。

可能需要一系列的设备和试剂完成电泳和蛋白质转移。如需进一步详细资料，请参阅蛋白质电泳技术手册和Hybond ECL 指导手册。

- ELISA是最常用的检测蛋白活性的方法。
- 功能分析使用表面等离子体共振检测特异性免疫反应（例如使用BIAcore™系统），可以测定活性浓度，绘制抗原表位图和进行反应动力学研究。

## 检测和分析标记蛋白

SDS-PAGE电泳，Western blotting和ELISAs还可以用于检测和分析特定标记的转基因分子。在某些情况下，可以在标记本身的基础上进行实验，例如GST Detection Module可以检测酶并对GST标记的蛋白质定量。有关GST 和 (His)标记蛋白的检测和定量见重组蛋白质手册：蛋白质纯化和简单纯化和 the GST 基因融合系统。

## 附录9

### 生物样品的贮存



这里所提出的意见仅供参考，不能适用于每一个生物样品。参考下列这些建议时要考虑具体样品的特性及用途。

#### 一般建议：

- 如果需要的话，添加稳定剂。保存纯化的蛋白质往往需要稳定剂。
- 血清、培养上清和腹水应分装后冻结在-20℃或-70℃保存
- 避免重复冻结/解冻或冷冻干燥/重新溶解，这样做可能降低生物活性。
- 避免样品处于不利于稳定的条件下，例如pH值、盐的浓度、还原剂或螯合剂。
- 保持在一个封闭的容器中，4℃冷藏，尽量减少细菌的生长和蛋白酶活性。处于4℃超过24H时，如果可能的话添加保存剂（例如0.01%merthiolate）。



叠氮钠可干扰耦合及一些生物分析进行且对人体有害。它可以使用脱盐柱去除（见页133）

#### 纯化蛋白质的一般建议：

- 以沉淀形式在高浓度的硫酸铵溶液中存储，例如4.0M。
- 冻存在50%甘油中，这特别适合于酶。
- 如果产品是用于生物检测，要避免使用保存剂。如果要进行体内实验，不应该添加保存剂。可将样品分装并保持冷冻状态。
- 无菌过滤以延长贮存时间。
- 添加稳定剂，例如：甘油（5-20%）、血清白蛋白（10 mg/ml）、配体（添加浓度根据活性蛋白的浓度），以帮助保持样品生物活性。请记住，任何添加剂都将降低蛋白质纯度，并且在以后可能需要除去。
- 避免蛋白重复冻结/解冻或冷冻干燥/重新溶解，以免降低生物活性。



叠氮钠可干扰耦合及一些生物分析进行且对人体有害。它可以使用脱盐柱去除（见页133）



Cryoproteins是一组蛋白，包括一些小鼠IgG<sub>3</sub>，它们不应该4℃保存，因为它们在此温度下沉淀。应该在添加保存剂的基础上室温保存。

# 产品索引

## A

活化的 CH Sepharose 4B	155
活化的琼基Sepharose 4B	3, 92–96, 100, 102, 122, 155
Agarose麦胚外源凝集素	3, 80, 81, 85, 154
精氨酸 Sepharose 4B	2, 58, 59, 154

## B

苯甲肽Sepharose 4 FF (high sub)	2, 54, 55, 57, 154
Blue Sepharose 6 FF	3, 70–75, 155

## C

钙调节蛋白 Sepharose 4B	3, 86, 87, 155
螯合 Sepharose FF	2, 3, 47, 50, 51, 88, 89, 91, 92, 155
CNBr-活化的 Sepharose 4 FF	100, 102, 110, 112, 155
CNBr-活化的 Sepharose 4B	95, 102, 103, 110, 112, 155
Con A Sepharose 4B	3, 80–82, 155

## E

EAH Sepharose 4B	4, 100, 102, 114, 116, 122, 155
ECH Sepharose 4B	4, 100, 102, 114–116, 122, 155
环氧树脂-活化的Sepharose 6B	4, 100, 102, 117, 119, 120, 155

## G

明胶 Sepharose 4B	3, 69, 155
谷光甘肽 Sepharose 4 FF	2, 42, 45, 46, 155
谷光甘肽Sepharose 4B	2, 42, 46, 155
GSTPrep FF 16/10	2, 11, 42–44, 154
GSTrap FF	2, 11, 42–46, 55, 56, 153, 154

## H

Heparin Sepharose 6 FF	3, 60, 61, 64–66, 155
HiPrep 16/10 Heparin FF	3, 11, 60, 61, 63–65, 154
HisTrap Kit	2, 11, 3, 47, 49, 51, 88, 153, 154
HiTrap Benzamidine FF (high sub)	2, 11, 45, 54–56, 154
HiTrap Blue HP	3, 11, 70, 71, 73–75, 153, 154
HiTrap 螯合 HP	2, 3, 11, 20, 47–51, 88, 89, 91, 136, 153, 154
HiTrap 肝素 HP	3, 11, 60–62, 64, 65, 153, 154
HiTrap IgM 纯化 HP	2, 11, 27, 38–40, 154
HiTrap IgY 纯化 HP	2, 11, 27, 40–42, 154
HiTrap NHS-活化的HP	4, 11, 102, 105–109, 113, 154, 155
HiTrap Protein A HP	2, 11, 33–37, 39, 153, 154
HiTrap Protein G HP	2, 11, 28–33, 39, 153, 154
HiTrap rProtein A FF	2, 11, 21, 33–37, 39, 154
HiTrap抗生物素蛋白链菌素HP	3, 11, 66–68, 154

## I

IgG Sepharose 6 FF	2, 52, 53, 155
免疫沉淀作用 Starter Pack	155

## L

扁豆凝集素Sepharose 4B	3, 80, 81, 83, 84, 155
-------------------	------------------------

## M

MabSelect	2, 33, 34, 37, 154
MabTrap Kit	2, 11, 28, 31, 33, 153, 154

## N

NHS-活化的Sepharose 4 FF	4, 100, 102, 106, 107, 109, 155
-----------------------	---------------------------------

## P

Protein A Sepharose 4 FF	2, 33, 34, 36, 37, 154, 155
Protein A Sepharose CL-4B	34, 37, 154
Protein G Sepharose 4 FF	2, 28–30, 33, 154, 155

## R

Red Sepharose CL-6B	3, 75–79, 155
rProtein A Sepharose FF	34, 35, 154

## S

抗生物素蛋白链菌素Sepharose HP	3, 66–68, 155
-----------------------	---------------

## T

丙基硫氧嘧啶Sepharose 6B	3, 4, 92–96, 100, 102, 121, 122, 155
--------------------	--------------------------------------

## 其它

2',5' ADP Sepharose 4B	3, 75–78, 154
5' AMP Sepharose 4B	3, 73–75, 154



# 附加材料

	Code No.
<b>纯化类</b>	
Antibody Purification Handbook	18-1037-46
Protein Purification Handbook	18-1132-29
Recombinant Protein Purification Handbook	18-1142-75
GST Gene Fusion System Handbook	18-1157-58
Gel Filtration Handbook: Principles and Methods	18-1022-18
Ion Exchange Chromatography & Chromatofocusing Handbook	11-0004-21
Hydrophobic Interaction & Reversed Phase Chromatography	11-0012-69
Reversed Phase Chromatography Handbook: Principles and Methods	18-1134-16
Expanded Bed Adsorption Handbook: Principles and Methods	18-1124-26
Protein and Peptide Purification Technique Selection Guide	18-1128-63
Fast Desalting and Buffer Exchange of Proteins and Peptides	18-1128-62
Gel Filtration Columns and Media Selection Guide	18-1124-19
Ion Exchange Columns and Media Selection Guide	18-1127-31
HIC Columns and Media Product Profile	18-1100-98
Affinity Columns and Media Product Profile	18-1121-86
Convenient Protein Purification, HiTrap Column Guide	18-1129-81
ÄKTA design Brochure	18-1158-77
GST Gene Fusion System Brochure	18-1159-30
Column Packing CD, “The Movie”	18-1165-33
Affinity Chromatography	18-1022-29
Microcarrier Cell Culture	18-1140-62
Percoll™	18-1115-69
Purifying Challenging Proteins	28-9095-31
<b>分析类</b>	
Gel Media Guide (electrophoresis)	18-1129-79
2-D Electrophoresis Handbook	80-6429-60
Protein Electrophoresis Technical Manual	80-6013-88
ECL Western and ECL Plus Western Blotting Application Note	18-1139-13

Many of these items can be downloaded from [www.gelifesciences.com/protein-purification](http://www.gelifesciences.com/protein-purification)

# 订购信息

产品	数量	货号
<b>预装柱子</b>		
HiTrap rProtein A FF	2 × 1 ml	17-5079-02
	5 × 1 ml	17-5079-01
	1 × 5 ml	17-5080-01
HiTrap Protein A HP	2 × 1 ml	17-0402-03
	5 × 1 ml	17-0402-01
	1 × 5 ml	17-0403-01
HiTrap Protein G HP	2 × 1 ml	17-0404-03
	5 × 1 ml	17-0404-01
	1 × 5 ml	17-0405-01
HiTrap Blue HP	5 × 1 ml	17-0412-01
	1 × 5 ml	17-0413-01
HiTrap 肝素 HP	5 × 1 ml	17-0406-01
	1 × 5 ml	17-0407-01
HiTrap NHS-活化的 HP	5 × 1 ml	17-0716-01
	1 × 5 ml	17-0717-01
HiTrap 螯合 HP	5 × 1 ml	17-0408-01
	1 × 5 ml	17-0409-01
HiTrap抗生物素蛋白链菌素HP	5 × 1 ml	17-5112-01
HiTrap IgM 纯化 HP	5 × 1 ml	17-5110-01
HiTrap IgY 纯化 HP	1 × 5 ml	17-5111-01
GSTrap FF	2 × 1 ml	17-5130-02
	5 × 1 ml	17-5130-01
	1 × 5 ml	17-5131-01
HiTrap苯甲脒FF (high sub)	2 × 1 ml	17-5143-02
	5 × 1 ml	17-5143-01
	1 × 5 ml	17-5144-01
GSTPrep FF 16/10	1 × 20 ml	17-5234-01
HiPrep 16/10 肝素 FF	1 × 20 ml	17-5189-01
<b>Kits</b>		
MABTrap Kit	HiTrap Protein G HP (1 × 1 ml), 配件, 预制的缓冲液, 进行10次纯化	17-1128-01
HisTrap Kit	3 × 1 ml HiTrap 螯合HP柱子 预制的缓冲液和配件能够 进行12次的纯化	17-1880-01
<b>介质</b>		
Protein A Sepharose CL-4B	1.5 g	17-0780-01
	25 ml	17-0963-03
Protein A Sepharose 4 FF	5 ml	17-0974-01
	25 ml	17-0974-04
rProtein A Sepharose FF	5 ml	17-1279-01
	25 ml	17-1279-02
MabSelect	25 ml	17-5199-01
	200 ml	17-5199-02
Protein G Sepharose 4 FF	5 ml	17-0618-01
	25 ml	17-0618-02
2' 5' ADP Sepharose 4B	5 g	17-0700-01
5' AMP Sepharose 4B	5 g	17-0620-01
Agarose麦胚外源凝集素	5 ml	27-3608-02
精氨酸 Sepharose 4B	25 ml	17-0524-01
苯甲脒Sepharose 4 FF (high sub)	25 ml	17-5123-01

产品	数量	货号
Blue Sepharose 6 FF	50 ml	17-0948-01
钙调节蛋白Sepharose 4B	10 ml	17-0529-01
螯合Sepharose FF	50 ml	17-0575-01
Con A Sepharose 4B	5 ml	17-0440-03
	100 ml	17-0440-01
明胶 Sepharose 4B	25 ml	17-0956-01
谷光甘肽Sepharose 4 FF	25 ml	17-5132-01
	100 ml	17-5132-02
	500 ml	17-5132-03
谷光甘肽 Sepharose 4B	10 ml	17-0756-01
肝素 Sepharose 6 FF	50 ml	17-0998-01
	250 ml	17-0998-25
IgG Sepharose 6 FF	10 ml	17-0969-01
扁豆凝集素 Sepharose 4B	25 ml	17-0444-01
Red Sepharose CL-6B	10 g	17-0528-01
抗生素蛋白链菌素 Sepharose HP	5 ml	17-5113-01
<b>预活化的介质和柱子，可以进行配基偶联</b>		
HiTrap NHS-活化的 HP	5 x 1 ml	17-0716-01
	1 x 5 ml	17-0717-01
NHS-活化的 Sepharose 4 FF	25 ml	17-0906-01
CNBr-活化的 Sepharose 4 FF	10 g	17-0981-01
CNBr-活化的 Sepharose 4B	15 g	17-0430-01
活化的CH Sepharose 4B	15 g	17-0490-01
ECH Sepharose 4B	50 ml	17-0571-01
环氧树脂-活化的Sepharose 6B	15 g	17-0480-01
EAH Sepharose 4B	50 ml	17-0569-01
活化的巯基Sepharose 4B	15 g	17-0640-01
丙基硫氧嘧啶 Sepharose 6B	15 g	17-0420-01
<b>免疫沉淀作用</b>		
免疫沉淀作用 Starter Pack	2 x 2 ml	17-6002-35
(Protein A Sepharose 4 Fast Flow and Protein G Sepharose 4 Fast Flow)		

见来自GE HEALTHCARE的 抗体纯化手册，关于免疫沉淀的更多的细节。

For local office contact information,  
please visit [www.gelifesciences.com/contact](http://www.gelifesciences.com/contact)

GE Healthcare Bio-Sciences AB  
Björkgatan 30  
751 84 Uppsala  
Sweden

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



imagination at work

GE, imagination at work and GE Monogram are trademarks of General Electric Company.

ÅKTA, ÅKTAexplorer, ÅKTA<sub>FLPC</sub>, ÅKTAprime, ÅKTApurifier, Biacore, BioDirectory, BioProcess, ECL, ECL Plus, ExcelGel, FPLC, GSTPrep, GSTRap, HisTrap, HiPrep, HiTrap, HiTrap, Hybond, MAbTrap, MabSelect, MicroSpin, Microplex, Multiphor, STREAMLINE, Sepharose, Percoll, PhastSystem, PhastGel, Sephadex, Superdex, and Tricorn are trademarks of GE Healthcare companies.

Purification and preparation of fusion proteins and affinity peptides comprising at least two adjacent histidine residues may require a license under US pat 5,284,933 and US pat 5,310,663, including corresponding foreign patents (assigne: Hoffman La Roche, Inc).

A license for commercial use of GST gene fusion vectors must be obtained from Chemicon International, Incorporated, 28820 Singel Oak Drive, Temecula, California 92590 USA.

The Tricorn column and components are protected by US design patents USD500856, USD506261, USD500555, USD495060 and their equivalents in other countries.

All third party trademarks are the property of their respective owners.

© 1988–2007 General Electric Company – All rights reserved.

First published 1988.

All goods and services are sold subject to the terms and conditions of sale of the company within GE Healthcare that supplies them. A copy of these terms and conditions is available on request. Contact your local GE Healthcare representative for the most current information.

GE Healthcare Europe GmbH  
Munzinger Strasse 5  
D-79111 Freiburg, Germany

GE Healthcare UK Limited  
Amersham Place  
Little Chalfont  
Buckinghamshire, HP7 9NA, UK

GE Healthcare Bio-Sciences Corp.  
800 Centennial Avenue  
P.O. Box 1327  
Piscataway, NJ 08855-1327, USA

GE Healthcare Bio-Sciences KK  
Sanken Bldg 3-25-1  
Hyakunincho Shinjuku-ku  
Tokyo 169-0073, Japan