

蛋白质纯化

手册



Handbooks from Amersham Pharmacia Biotech



Antibody Purification

Handbook
18-1037-46

The Recombinant Protein Handbook

Protein Amplification and Simple Purification
18-1142-75

Protein Purification

Handbook
18-1132-29

Ion Exchange Chromatography

Principles and Methods
18-1114-21

Affinity Chromatography

Principles and Methods
18-1022-29

Hydrophobic Interaction Chromatography

Principles and Methods
18-1020-90

Gel Filtration

Principles and Methods
18-1022-18

Reversed Phase Chromatography

Principles and Methods
18-1134-16

Expanded Bed Adsorption

Principles and Methods
18-1124-26

Chromatofocusing

with Polybuffer and PBE
18-1009-07

Microcarrier cell culture

Principles and Methods
18-1140-62

蛋白质纯化 手册

目 录

前言.....	6
第一章	
纯化策略-- 一个简单的方法.....	7
样品准备.....	8
三步纯化策略.....	8
蛋白质纯化的总体指导原则.....	10
第二章	
样品准备.....	11
纯化开始之前.....	11
样品的提取和净化.....	14
第三章	
三步纯化策略.....	17
原理.....	17
纯化技术的选择组合.....	18
样品状态.....	24
第四章	
捕获.....	26
第五章	
中度纯化.....	34
第六章	
精细纯化.....	37
第七章	
蛋白纯化策略的例子.....	41
重组酶的三步纯化.....	41
重组抗原结合片段的三步纯化.....	45
单克隆抗体的两步纯化.....	50
膜内蛋白质的一步纯化.....	53

第八章

储存条件	55
提取和净化步骤	56

第九章

纯化技术的原理和标准条件	65
离子交换 (IEX)	65
疏水性相互作用 (HIC)	71
亲和作用 (AC)	76
凝胶过滤作用 (GF)	78
反相作用 (RPC)	82
膨胀床吸附作用 (EBA)	85

前言

蛋白质纯化技术和方法的进展一直是推动生物技术进步的最基本的前提条件。本手册为顺利进行蛋白质的纯化提供了一些建议和例子。蛋白质纯化方式多种多样，从简单的一步沉淀操作到大规模的有效的生产过程。经常采用一步以上的纯化步骤达到想要得到的纯度。对蛋白质进行成功有效的纯化的关键是选择最适宜的纯化技术，优化它们的操作过程来满足所要求达到的纯度，并且将它们以合乎逻辑的方式组合起来，使用最少的纯化步骤达到蛋白质产量的最大化。大部分的纯化方案都包含一些色谱技术。因此作为研究结果，色谱技术在那些需要进行蛋白纯化的实验室里已经成为了一个基本的工具。不同的色谱技术有不同的选择性，它们可以形成强大的组合来纯化任何活质分子。重组DNA技术的发展使蛋白质的产量得到很大的提高。重组蛋白的制备经常以方便后续的色谱纯化的形式存在。然而，这仍然不能解决所有的问题。宿主污染问题仍然存在，与样品的可溶性，蛋白结构的完整性和生物活性等的相关问题仍然存在。尽管在纯化过程中可能需要考虑大量的参数，但是按照一些简单的指导原则和应用三步纯化策略，仅仅需要了解一些色谱技术基础知识的细节，就可以使整个纯化过程能够简单容易的设计和完成。

建议符号:



对于纯化的一般建议



大规模纯化的建议



小规模纯化的建议



捷径



对于介质选择的建议

第一章

纯化策略——一个简单的方法



应用系统化处理方法来研究纯化策略。第一步是描述基本的纯化方案。一般需要考虑回答的问题，例如：制备产品的目的是什么？什么样的原材料是可以使用的和如何处理它？纯度问题与材料的来源有什么样的关系，和终产品的预期使用由什么联系？什么东西必须去除？什么东西必须完全去除？最终纯化的规模是什么？如果需要扩大规模，用已选择的纯化技术将会产生什么样的后果？在经济方面的限制是什么？什么样的资源和设备是可以利用的。

多数纯化步骤需要经过一步以上的方法来达到预期想要的产品纯度。这包括任何需要改变样品条件的限制性步骤，即将产品从一种纯化技术转移到另一种适合于进行下一步纯化操作的状态，这一过程中的每一步都将会导致产物的丢失。例如，假定每一步能够获得80%的产量，那么如图1所示，经过8个纯化步骤后，总产率将被减少到仅仅20%。因此，使用最少的步骤和最简单可行的设计来达到预期的产量和纯度，增加步骤是无效的，除非已经完全满足了纯化所需要达到的产量。在某些特殊的情况下，通过简单的增加重复步骤就可以很容易使样品达到可以使用的纯度。但是经验表明，即使是那些最具挑战性的样品纯化，高纯度和高产量的制品也是可以通过恰当的选择并有效的组合少于四步的纯化步骤高效率的完成。各种技术应该以逻辑的顺序组合起来，避免改变样品条件的步骤，恰当的选择色谱技术使纯化步骤尽可能的少。



在纯化过程中限制纯化步骤数

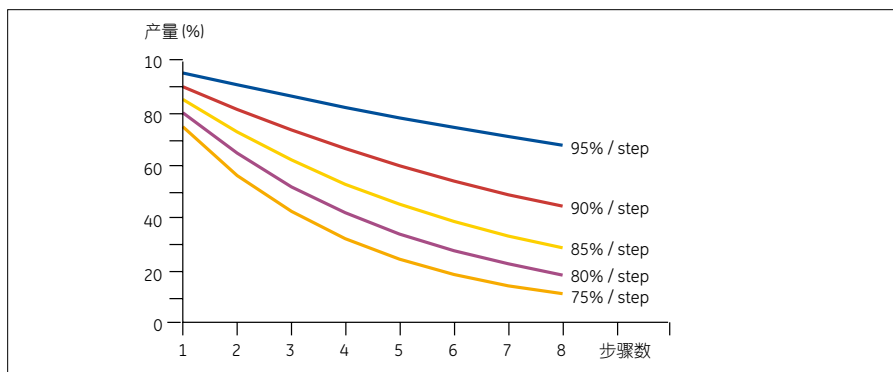



图1. 多步骤纯化的产量。

样品制备

为了高效、经济的获取足够纯度和数量的蛋白，我们可以使用每一种纯化方法。设定纯化物的纯度、数量和维持生物活性和限定经济的框架和工作时间框架是非常重要的。所有涉及到目标蛋白的特性和污染物的信息都会对纯化的进展有所帮助的。用一些简单的实验来反映样品和目标分子的特性是一个非常好的方式。随着纯化技术的进展和评价纯化效果的需要，发展快速的和值得信赖的分析方法是最非常重要的。样品的制备和提取过程的发展应该优先于使用色谱技术进行第一步纯化。在有样品背景信息的情况下，分析样品和样品制备步骤可以放在三步纯化策略中考虑。

三步纯化策略

 想象纯化样品要经历三个阶段，样品捕获，中度纯化和样品的精细纯化。

在三步纯化策略中特定的目标物在纯化过程中的每一步都要进行分配。

在目标物捕获阶段，样品经过分离、浓缩并且对目标物进行稳定化处理。

在中度纯化阶段，样品中大量杂质被去除，例如其它的蛋白和核酸、内毒素和病毒。

在样品精细纯化阶段，通过去除任何残留的微量杂质或者密切相关的物质来达到较高的纯度。

选择和优化组合纯化技术对于样品的捕获、中度纯化和样品的精细纯化是非常关键的，确保快速纯化方法的研制，在更短的时间里完成产物的纯化并且实现经济节约的目标。

最终的纯化过程应该包括样品的制备，当需要时应该有样品的提取和净化，接下来是三种主要的纯化步骤理想的组合在一起，如图2所示。纯化的步骤数主要依赖于对纯度的要求和蛋白最终的使用目的。

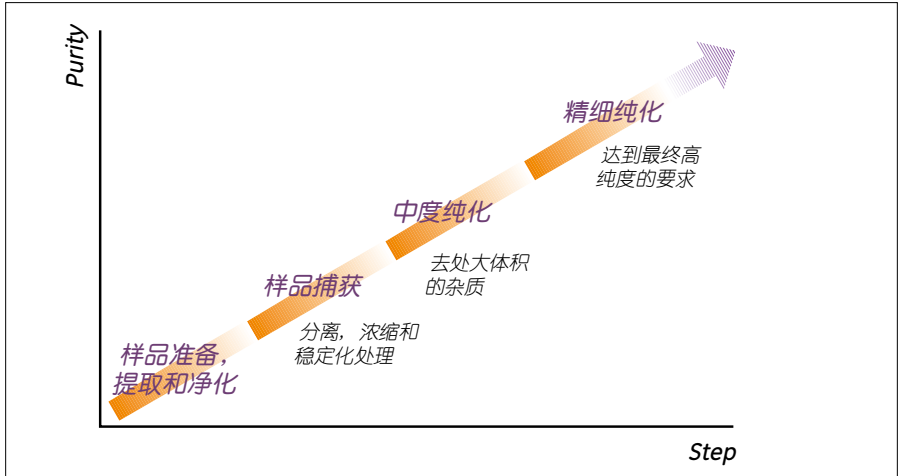


图. 2. 样品制备和三步纯化策略。

蛋白质纯化的指导原则

在这里所示的蛋白质纯化指导原则可以被用于任何纯化过程，并且可以作为如何系统化处理样品的建议，用来研制任何有效的纯化策略。作为一个提醒，这些纯化方法将在下面适当的章节进行重点强调。

明确目标

对于纯化样品，明确最终产品需要达到的纯度、活性和产量要求，要避免过度纯化或者使用的纯化不够，达不到要求的纯度。

明确需要纯化的目标蛋白质的特性和关键的杂质

对纯化技术的选择要简单化，并且要产生最佳的纯化效果。

发展检测分析技术

能够快速检测蛋白质的活性/回收率和关键的污染物。

使每一阶段处理的样品最小化

避免过多的处理步骤，过多的处理步骤有可能会损失样品活性/降低回收率。

尽可能少地使用添加剂

可能需要额外的纯化步骤去除添加剂，否则添加剂可能会干扰样品的活性分析。

尽早去除对样品有损伤的杂质

例如，蛋白酶

在每一步纯化过程中使用不同的纯化技术

充分利用样品的特性对样品进行分离纯化（样品大小、电荷、疏水性、配基的特异性）

使用的纯化步骤尽可能少

额外的纯化步骤将会减少目标蛋白的产量和增加纯化时间，要合乎逻辑的组合纯化步骤。

保持简单化！

第二章 样品准备

实验开始之前

为了能够有效的、经济的获取足够纯度和质量的某种蛋白质，使用任何有效的纯化方法，从样品的制备到富集蛋白，从提取样品为了获取样品的生物化学特性到大规模生产治疗性重组蛋白。设定目标蛋白要求达到的纯度和产量的目标，维持生物活性和以钱和时间方式来衡量的纯化过程的经济性，是非常重要的。对纯度的要求必须要考虑原料的性质，最终产品的预期使用目的和特殊的安全问题。例如，区分那些必须要去除的杂质和可以忍受的杂质是非常重要的。其它因素也能影响物质的优先次序。高产量通常是关键目标，但是对于那些样品很容易获得或者那些仅需要很少数量的产物，追求高产量就不是那么关键了。在缺少AKTA™设计色谱系统资源的条件下，要求多方面纯化方法的进展或许是不可能的。同样，时间压力与一个缓慢的分析流程相结合，将会引导蛋白质纯化朝向更少的监测和最优化的组合方向发展。所有涉及到靶蛋白特性和污染物的信息在纯化方法研究过程中都将会有帮助作用，使选择更快、更容易的纯化技术和优化纯化条件成为可能，同时可以避免那些可能使靶蛋白失活的因素。随着蛋白纯化方法和评价纯化效果（产量、生物活性，回收率）的进展，研制快速和可以信赖的分析方法已经成为必需。

明确目标

目标：为纯度和产量设定最少的目标，维持生物学活性和节约钱和时间。



按照对产品的最终使用来规定产品纯度要求

下面所示的是对纯度要求的例子。

纯度非常高 > 99%	用于治疗，体内试验
纯度高 95- 99 %	X(射线)衍射晶体分析法 和多数物理、化学特性鉴定方法
纯度适中 < 95 %	用于抗原来制备抗体、N端测序分析



明确“关键”污染物



尽可能快的鉴定可能残存的污染物的特性

有研究指出某种蛋白的纯度大于95%（即靶蛋白占总蛋白的95%）是远远不能保证这个纯度能够满足某种预期的应用。对于那些通常的注释，例如“蛋白经过考马斯亮蓝染色SDS-PAGE后，证明是同质的”同样是正确的。如果残留物由5%的无害的杂质组成，那么95%的纯度或许是可以接受的。然而，即使是很少量的可能存在生物学活性的杂质也可能在研究和治疗应用方面产生显著的问题。所以区分那些必须被完全去除的污染物和那些减少到一定水平就可以接受的污染物是非常重要的。既然不同的起始物质类型会含有不同的污染物种类，它们会产生不同的污染问题。



在所需要的纯度之上要优于在所需要的纯度之下。

尽管纯化步骤数应该最少化，但是最终产品的质量不能打折扣。如果纯化产物的纯度低并且污染物是未知的，随后的一系列研究结果的可信性将会受到怀疑。



那些能够使蛋白降解或者失活或者干扰分析结果的污染物应该尽可能早的去除。在整个纯化进展过程中，在纯化的每一个阶段都必须考虑维持蛋白活性的需要。如果在纯化的第一步蛋白酶就被除去，将靶蛋白转移到一个友好温和的环境中是特别有益的。



下游的生产过程是在限定的经济框架里完成的，用安全的和可以信赖的方法完成靶蛋白的纯化，达到需要的纯度和回收率。经济是一个非常复杂的问题。在商业化生产中，时间对于市场来说是非常重要的，它能够弱化一些问题，对纯化方法进行有效的组合，使回收率、容量或者速度三者达到最佳的组合。产品的稳定性和可靠性同样受到很大的关注，因为一个批次产品的失败会产生很多严重的后果。



生物制药方面的纯化或许涉及到一些特殊的安全问题，例如检测和去除病原体、热原、免疫原等污染物和致癌的危害物质。用分析技术锁定特殊的污染物质为了证明它们已经被降低到可以接受的水平是必须的。

定义靶蛋白的特性和关键的杂质

目标: 为靶蛋白确定一个“稳定性窗口”为了更容易的选择纯化技术和优化组合, 并且避免在纯化过程中蛋白质失活。


 检查蛋白稳定性窗口至少包含溶液的pH值和离子强度。所有涉及到靶蛋白和污染物特性的信息都将有助于指导选择蛋白纯化的分离技术和试验条件。对于靶蛋白或者相关蛋白的基础数据, 包括蛋白的大小、等电点 (pI) 和疏水性或者可溶性数据。非变性一维和二维聚丙烯酰胺凝胶电泳能够表明样品的复杂性和靶蛋白及主要污染物的特性。特别重要的是对蛋白质稳定性窗口的了解, 可以避免使蛋白质发生不可逆失活的条件。检查靶蛋白对溶液pH值和离子强度的稳定性窗口是明智的。表1显示的是不同蛋白质的特性是如何能够影响一个纯化策略的。

表 1. 蛋白质特性和它们对选择纯化策略的影响

样品和靶蛋白质特性	对选择纯化策略的影响
对温度的稳定性	需要在更低的温度下快速操作
pH 稳定性	提取或者纯化缓冲液的选择。离子交换条件的选择, 亲和或者反相色谱的选择。
对有机溶剂的稳定性	选择用反相色谱条件
去污剂需要量	考虑色谱步骤的影响和去除去污剂的需要。考虑去污剂的选择。
盐 (离子强度)	针对沉淀技术、离子交换技术和疏水性相互作用色谱, 选择需要的条件。
辅助因子对于蛋白稳定性或者	添加剂、pH值、盐和缓冲液的选择
对活性蛋白酶的敏感性	需要快速去除蛋白酶或者加入蛋白酶抑制剂
对于金属离子的敏感性	需要在缓冲液中加入EDTA 或者 EGTA
对氧化还原剂的敏感性	需要加入还原剂
分子量	选择凝胶过滤介质
蛋白质电荷	选择离子交换条件
生物专一性的亲和力	选择配基作为亲和介质
翻译后修饰	选择簇特异性亲和介质
疏水性相互作用	针对疏水色谱选择介质

建立分析测定法

目标：随着纯化技术的进展，评价纯化效果（产量，生物活性，回收率）和帮助优化纯化方法。



选择快速和可以信赖的分析方法

为了在纯化方法的研究中取得有效的进展，应该评价每一步纯化的效果。实验室应该使用下列分析方法：

- 针对靶蛋白的快速和可以信赖的分析方法。
- 确定纯度。
- 确定总蛋白量。
- 针对那些必须被去除的杂质的分析。

针对靶蛋白的可以信赖的分析方法的重要性无论怎么强调都不过分。检测色谱收集馏分应该能够确保所使用的分离缓冲液不会干扰分析结果。靶蛋白质的纯度经常用SDS-PAGE、毛细管电泳法、反相色谱法或者质谱法进行评价。Lowry或者Bradford分析方法经常用于总蛋白质含量的测定。Bradford分析方法非常适用于那些脂类含量高的样品的分析，而脂类杂质可能会干扰Lowry分析方法的结果。对于大规模蛋白的纯化，针对靶蛋白质和关键杂质进行分析经常是基本的要求。在实践中，当为了某种研究目的而纯化某种蛋白质，鉴定和建立那些有害污染物的特殊的分析方法太消耗时间以至于不去鉴定和建立那些有害污染物的分析方法。一个实用的方法是将蛋白纯化到某种水平，然后在存放一段时间后用SDS-PAGE分析蛋白质，检查蛋白酶的切割作用。对实验进行适当的质控，包括对蛋白质生物活性的分析，将会指示杂质是否会干扰研究结果。

样品提取和澄清

样品处理最小化

添加剂的使用最小化

尽早去除对目标蛋白有损伤作用的污染物

定义：从原材料中将靶蛋白进行初级分离

目标：为了进一步的纯化，准备澄清样品。去除微小的颗粒物物质或者其它与色谱分析不相溶的污染物。

样品制备是否优先于第一个色谱纯化步骤取决于样品的类型。在一些情况下可以将样品直接用于第一步步骤，即样品捕获。例如，细胞培养上清可以直接用适宜的色谱基质例如Sephacrose™ Fast Flow进行纯化，可能仅仅需要一个小的pH值的调整或者离子强度调整。然而，对于一些样品，提取和澄清步骤是最基本的。如果样品需要进行提取，那么所选择的技术必须是稳定的和适用于将来可能用到的所有规模的纯化。我们必须注意到，某种技术例如硫酸铵沉淀法，经常用于小规模纯化，可能不适用于非常大规模的样品制备。如果一个纯化方法将要用于扩大规模生产，缓冲液和添加剂的选择必须要仔细考虑。在这些例子中，便宜的缓冲液，例如在实验室常用的醋酸缓冲液或者柠檬酸缓冲液，较适用于更复杂的组分。同样我们也应该注意到透析和其它用来调整样品状态的通用方法不适用于非常大量的或者非常小量的样品准备。




-  对于重复性纯化，使用一种稳定的和能够处理样品差异的提取和澄清技术。这样可以确保在下一轮的纯化步骤中得到同一个重复性的产物，不管是否与开始物质具有差异性。
-  只有在必要的时候才使用添加剂来保证样品的稳定性或者提高样品的提取效果。选择那些容易被去除的添加剂。添加剂可能需要通过额外的步骤去除。
-  使用 Sephadex™ G-25凝胶过滤介质预装柱，应用于实验室规模的快速的样品净化，如表2所示：

表 2. 针对样品净化的预装柱

预装柱	每次运行的样品体积	每次运行回收的 样品体积	代码
HiPrep™ 脱盐26/10	2.5 -15 ml	7.5 - 20 ml	17-5087-01
HiTrap™ 脱盐	0.25 - 1.5 ml	1.0 - 2.0 ml	17-1408-01
Fast 脱盐 PC 3.2/10	0.05 - 0.2 ml	0.2 - 0.3 ml	17-0774-01
PD-10 脱盐	1.5 - 2.5 ml	2.5 - 3.5 ml	17-0851-01

Sephacel G-25 凝胶过滤介质，在实验室和规模化生产中，被用于制备和净化蛋白质大于5000的样品。样品体积高达30%，或者在一些情况下可以上样量达到40%的总柱体积。在单一的步骤中，样品被脱盐，转换到一个新的缓冲液中，低分子量的物质被去除。具有较高的体积容量，并且对样品浓度相对不敏感，这一步的速度可以满足大体积的样品被快速和高效的处理。使用高样品体积装载，可以产生使样品分离并且对样品的稀释最小化（大约1: 1.4）的结果。在第8章包含更进一步的对样品储存、提取和净化步骤的详细说明。

Sephadex G-25 也被用于改变样品的条件。例如，在两步纯化之间快速调节pH, 缓冲液交换和脱盐。



需要考虑的介质

Sephadex G 25凝胶过滤

应用于高分子量和低分子量的快速组分分离。

典型的流动速度是60 cm/h (Sephadex G-25 Superfine, Sephadex G-25 Fine), 150 cm/h (Sephadex G-25 Medium).



在单一步骤中样品的净化和捕获的组合

如果需要处理大量体积的样品或者将来这个方法需要扩大纯化规模，考虑使用STREAMLINE™ 扩张床吸附技术。这项技术适用于大规模的重组蛋白的纯化和单克隆抗体的纯化。含有颗粒的原始样品不需要过滤和离心就能够应用于扩张床。STREAMLINE 吸附是针对使用STREAMLINE柱而经过特殊设计的。在液态化床的工业应用上，它们可以达到在高流速下的高产率。这个技术不需要对样品进行纯化，因此将样品的准备和捕获结合于单一步骤中。粗制样品被应用到STREAMLINE 介质的扩张床中。在靶蛋白被捕获的同时细胞碎片、细胞、颗粒物、全部细胞和污染物被除去。流动是可以反相的，靶蛋白在洗脱缓冲液中被解吸附。



需要考虑的介质：**STREAMLINE (离子交换, 亲和, 疏水性相互作用)**

直接从粗制品中完成样品的净化和捕获

按照类型和应用进行设计的STREAMLINE 吸附剂可以直接用于处理从发酵匀浆和细胞培养/发酵的粗制的原料，以200 - 500 cm/h 的流速进样。

注释：cm/h：流速(线流率)=流量率/柱的横断面积。

第三章

三步纯化策略

原理

随着样品的背景信息、分析方法和样品的制备和提取步骤的进展，可以应用三步纯化策略对样品进行纯化。(图3). 这个策略被用来帮助发展制药工业中治疗性蛋白的纯化过程，同时在帮助研究性实验室研制纯化方案时也是同样有效。

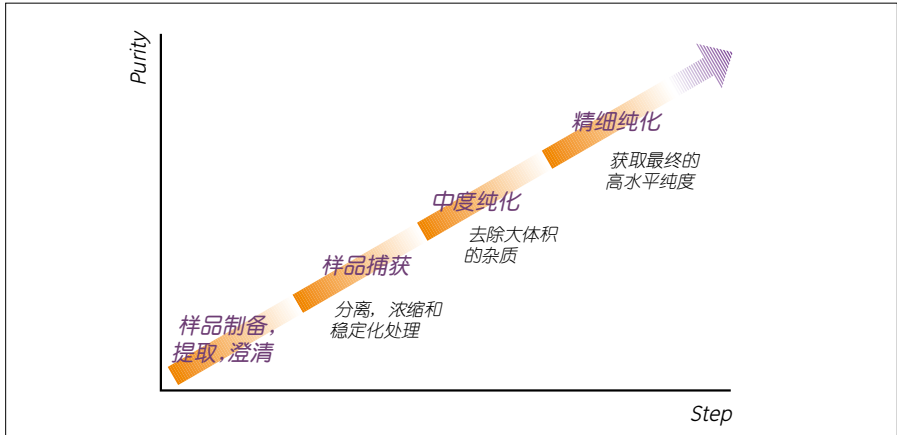



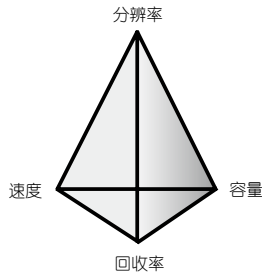
图. 3. 样品制备和三步纯化策略

 在纯化过程中分配一个特定目标物到每一步中。

在三步纯化策略中，一个特定目标物被分配到每一步中。纯化问题与特定的步骤相关联，在很大程度上取决于起始物质的特性。因此，一个纯化步骤的目标物将依据它在纯化过程的位置而不同，即在开始阶段，将产物从粗制样品中分离时，在中间纯化阶段，为了进一步纯化已经部分纯化的样品时，或者在最后阶段将纯化好的样品进行净化处理。三步纯化策略保证更快的纯化方法进展和用更短的时间和更经济的方式纯化产品。在捕获阶段，将目标物进行分离、浓缩并且对目标物进行稳定化处理。目标物被浓缩和转移到另外一个环境中，可以保存它的活性或效价。最终，其它关键污染物被大量的去除。在中度纯化阶段，制品中的大量杂质已被去除，例如其它的一些蛋白质和核酸、内毒素和病毒。在样品精细纯化阶段，由于大量的杂质已经被去除，仅剩下一些痕量的杂质或者是与目标物非常接近的相关物质。制品完成了最终的纯化。应该注意的是三步纯化策略并不意味着所有的纯化策略都必须经过三个纯化步骤。例如，对靶蛋白的捕获和中度纯化可能在一个纯化步骤中就完成了，或许中度纯化和最后的精致可能在一个纯化步骤中就完成了。类似的，如果对纯度的要求很低时，一个快速的捕获步骤就足够获得

想要得到的结果，或者制品开始的纯度就很高，只要经过精细纯化阶段就可以达到需要的纯度的产品。对于治疗性蛋白的纯化，或许需要四阶段纯化或者五阶段纯化步骤才能够完全达到对纯度和安全性的最高要求。对于一个有效的纯化过程，捕获、中度纯化和精细纯化阶段的优化组合是非常关键的。

纯化技术的选择和组合



每一种技术都在分辨率、容量、速度和回收率之间达到一种平衡

样品处理最小化

纯化步骤最少化

在每一步骤中使用不同的技术

目标：对于一个设定纯度的产品通过快速途径进行纯化

对于色谱分离技术而言，考虑到回收率、分辨率、速度和容量等因素，每种不同的色谱技术将会得到不同的绩效表现。一种色谱技术可能对于上述参数的其中之一是最优的，例如分辨率或者在两种参数间获得最佳的平衡，例如速度和容量。对于按照这些参数其中之一进行优化的分离纯化方法所产生的结果，与那些使用同样的技术但是聚焦于一个可选择参数所产生的结果有显著不同。如同第49页所显示的结果那样，离子交换技术既可以用于捕获阶段也可以用于样品的精细纯化阶段。



选择一种技术满足纯化步骤所要求达到的目标

捕获, 用简单的模式表示，参考在纯化过程中加载靶蛋白的总量。在一些情况下，加载样品的总量或许会受到上样体积的限制（如在凝胶过滤色谱中）或者受到大量存在于样品中的污染物的限制，而不是靶蛋白的总量的限制。

速度，在开始纯化阶段速度是一个最重要的环节，需要尽可能快的将样品中的污染物如蛋白酶等必须去除的物质除去。

回收率 在整个纯化的进程中，回收率的重要性会逐渐增加，因为被纯化产品的价值在逐渐增加。回收率受到对样品破坏过程的影响和不适宜色谱柱条件的影响。

分辨率 高分辨率的获得是通过对色谱技术的选择和色谱介质的效率来形成一个很窄的色谱峰。一般情况下，在样品纯化的最后阶段获得好的分辨率是非常困难的，因为这时样品中的杂质和靶蛋白质的特性非常相似。每一种技术在分辨率、速度、容量和回收率等参数中都达到了一种平衡，在样品纯化中，我们可以选择这些技术来满足对每一个纯化步骤的要求。一般来说，如果使上述4个参数中的一个参数最优化，那么将会以损失其它3个纯化参数为代价并且纯化步骤也会受到影响。每一个纯化参数的重要性是变化的，这主要取决于一个纯化步骤是否用于捕获、中度纯化或者精细纯化阶段。这将指导关键参数的最优化，同样也指导在每一步纯化中选择最适宜的介质。应用色谱技术对蛋白质进行纯化，这些色谱技术的分离作用是根据样品与杂质在某些特性方面的不同而进行分离的。

表 3. 用在纯化过程中的蛋白的特性

蛋白特性	技术
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), 反相作用 (RPC)
生物识别 (特异性配基)	亲和性 (AC)
电荷, 特异性配基或者疏水性	扩张床吸附 (EBA), 依据离子交换、亲和性或者疏水性



-  依据每种纯化技术的主要优势和样品在开始纯化或者每一步骤结束时的条件来选择并且合理的组合纯化技术。
-  通过对纯化技术的合理组合使在两个纯化步骤间的样品处理量最小化，避免对样品使用条件的限制。


表4所示的是在三步纯化策略中对于每阶段每种纯化技术的适用性的一个指导。

纯化技术	主要特征	捕获	中度纯化	精细纯化	样品起始条件	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 改变 浓缩
疏水性相互作用	好的分辨率 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
亲和色谱	高分辨率 高容量 高速度	★★★	★★★	★★	特殊的结合条件 样品体积没有限制	特殊的洗脱条件 浓缩
凝胶过滤	高分辨率 使用 Superdex™		★	★★★	限制样品体积 (<5% 总柱体积) 和流速范围	交换缓冲液 (如果需要的话) 稀释
反相色谱	高分辨率		★	★★★	需要有机溶剂	在有机溶液中存在丢失生物活性的危险 浓缩

表 4. 在三步纯化策略中纯化技术的适用性

避免额外的样品处理步骤

产物从第一个色谱柱上被洗脱下来的条件应该适合于下一个色谱柱开始的条件。各种技术开始的条件和结束的条件在表4中已经列出来了。例如，如果样品是低离子强度，可以使用离子交换柱。从离子交换柱将样品洗脱后，样品通常会在高的离子强度的缓冲液中，能够使用疏水层析柱（如果需要的话可以调整溶液的pH值和加入更多的盐）。相反，如果样品从疏水层析柱上被洗脱下来，样品可能处于很高的盐离子强度的环境，需要对样品进行稀释或者进行缓冲液的交换步骤，为了进一步降低盐离子强度，使溶液的离子强度满足可以进行离子交换的需要。这样，样品先经离子交换再用疏水层析比先用疏水层析再用离子交换要更加直接。

 硫酸铵沉淀法是在实验室规模应用的一个通用的样品净化和浓缩步骤。在这种情况下，在捕获阶段使用疏水层析（需要高的盐离子浓度将样品结合到介质上）是一个理想方法。在从疏水层析柱上将样品洗脱后，样品中盐离子浓度和总样品体积将会被显著减少。将部分样品稀释或者用Sephadex G-25脱盐柱进行快速缓冲液交换为下一步的离子交换或者亲和层析步骤准备样品。

凝胶色谱技术能够很好的适用于那些经过浓缩技术（离子交换、疏水层析、亲和层析）处理过的样品，因为目标蛋白经过洗脱后体积缩小，来自洗脱缓冲液中的复合组分不会对凝胶过滤分离产生影响。（凝胶过滤是一个限定体积容量和不受缓冲液条件影响的非结合技术）。最终纯化策略的选择总是取决于样品的特殊特性和需要达到的纯化程度。图4所示的是各种纯化技术的合理组合。

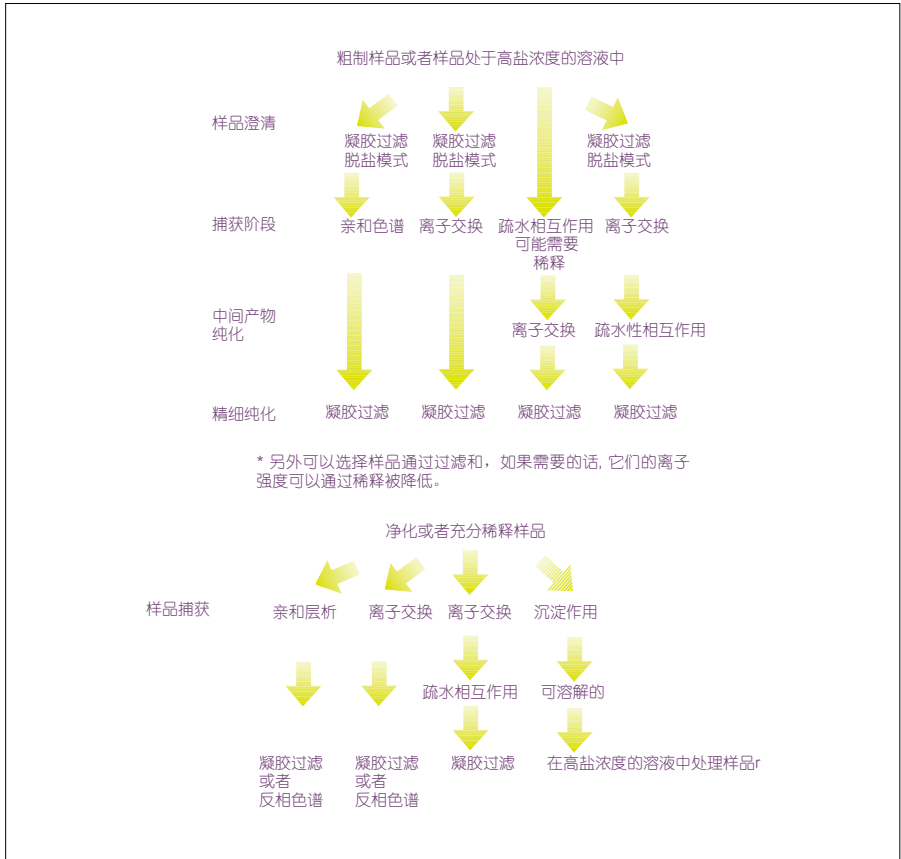


图. 4. 色谱步骤的逻辑组合.

在捕获步骤中，要求所选择的技术应该具有对目标蛋白质很强的结合作用和尽可能少的结合各种污染物，即这个技术具有很高的选择性和/或对感兴趣的蛋白具有很高的容量。

使用一个组合的纯化技术和选择其中之一纯化技术对样品进行纯化。对于样品而言，在一个离子交换—疏水层析—凝胶过滤层析三步纯化策略中，捕获阶段的选择根据电荷的差异（在离子交换中）、中度纯化阶段根据疏水性的差异和最后的精细纯化阶段根据蛋白质大小的差异进行纯化的。图5所示的是一个标准的三步纯化策略。

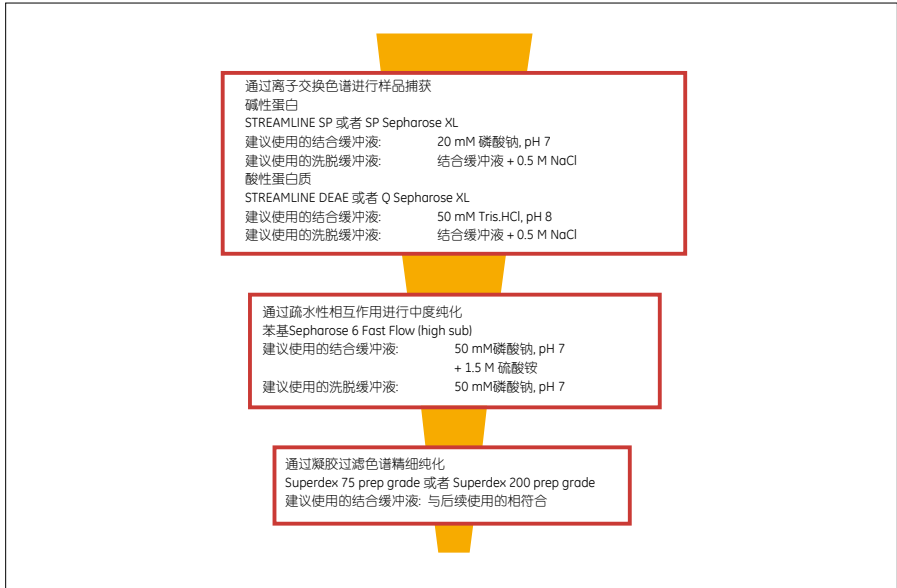


图. 5. 一个标准的纯化步骤。



如果对于目标蛋白一无所知，使用离子交换—疏水层析—凝胶过滤层析。这种技术组合被认为是一个标准的纯化步骤。



在相同的样品纯化策略中，考虑使用阴离子和阳离子两种交换色谱给予不同的选择性。

离子交换是一个使用阴离子交换剂或者阳离子交换剂的具有不同选择性的技术。分离的pH值能够被修饰来改变样品组分带电荷特性。因此在一个纯化策略中，在目标蛋白捕获阶段、中度纯化阶段或者样品精细纯化阶段可以多次使用离子交换色谱。离子交换色谱可以在同样的纯化设计中，应用于样品的捕获阶段，在低分辨率模式下进行快速的分离，和在高分辨率模式下进行产物的精细纯化。图6所示的例子是对纤维素酶进行纯化，其优点是采用了不同的选择性的阴离子和阳离子交换来研制一个简单的两步纯化过程。

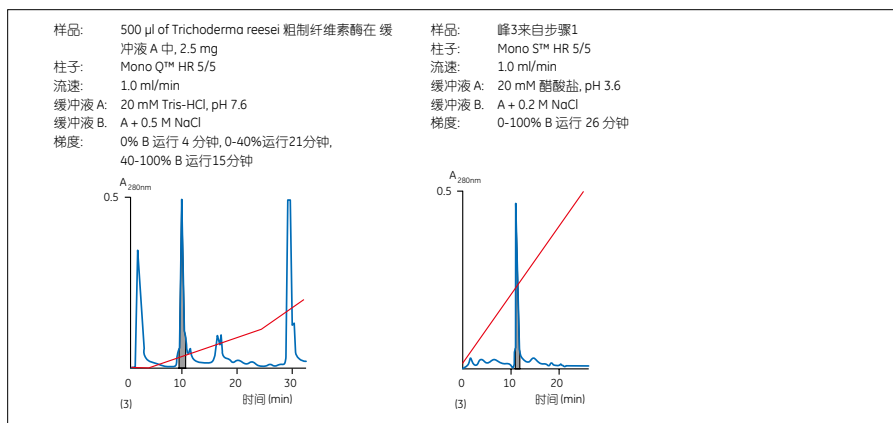







图. 6. 对纤维素酶的两步纯化。

 假设目标蛋白可以耐受反相色谱的操作条件，那么可以考虑应用反相色谱来对目标蛋白进行精细纯化。

反相色谱技术对蛋白和多肽的分离是以样品的疏水性为理论依据的。反相色谱是一种高选择性（高分辨率）技术，需要使用有机溶剂。当蛋白的活性恢复和三级结构不是必需的时候，反相色谱分析技术广泛的被应用于纯度检验分析。由于许多蛋白在有机溶剂中变性，因此这项技术并没有被广泛的推荐用于蛋白质的纯化，因为所纯化的蛋白很难复性和恢复到原先的正确的三级结构。然而，在样品的精细纯化阶段，当主要的蛋白杂质已经被去除后，使用反相色谱进行精细纯化是非常有效的，特别是针对少量的在有机溶剂中不变性的目标蛋白。

 如果纯化的目的不是要扩大规模（即仅仅需要毫克级的产品数量），可以在所有步骤中都使用高效、预装的介质如Sepharose High Performance (离子交换, 疏水性相互作用), SOURCE™ (离子交换, 疏水性相互作用), MonoBeads™ (离子交换), 或Superdex (凝胶过滤)。

 标准纯化步骤推荐的介质

纯化步骤	Media	Quantity	Code No.
捕获	STREAMLINE SP 	300 ml	17-0993-01
捕获	STREAMLINE DEAE 	300 ml	17-0994-01
捕获	HiPrep™ 16/10 SP XL	1 柱子	17-5093-01
捕获	HiPrep 16/10 Q XL	1 柱子	17-5092-01
中度纯化	HiPrep 16/10 Phenyl FF (high sub)	1 柱子	17-5095-01
精细纯化	HiLoad™ 16/60 Superdex 75 prep grade	1 柱子	17-1068-01
精细纯化	HiLoad 16/60 Superdex 200 prep grade	1 柱子	17-1069-01
样品澄清/条件	预装 PD-10 柱子	30 柱子	17-0851-01
样品澄清/条件	HiTrap 脱盐柱	5 柱子	17-1408-01
样品澄清/条件	HiPrep 26/10 脱盐柱	1 柱子	17-5087-01

样品条件的改变

尽管我们要尽量避免在两步纯化之间对样品进行额外的处理，但是对一个已经洗脱样品的缓冲液进行调节（pH、离子强度和/或缓冲离子对）或许是必要的，这样可以保证样品液与随后所使用的纯化技术具有兼容性。Sephadex G-25是一个用于在两步纯化之间通过缓冲液交换进行快速脱盐和调节pH值的理想介质。加载的样品体积可以高达总柱体积的30%，或者在一些情况下达到总柱体积的40%。在一个单一的纯化步骤中，样品被脱盐，交换到一个新的缓冲液中，并且低分子量的物质被去除。图7所示的是一个典型的脱盐/缓冲液交换分离。高体积容量和速度使得这一步能够快速和有效的处理非常大的样品体积。加载高样品体积可以使在分离过程中对样品的稀释最小化。Sephadex G-25在实验室规模的制备中也被用于快速样品净化。

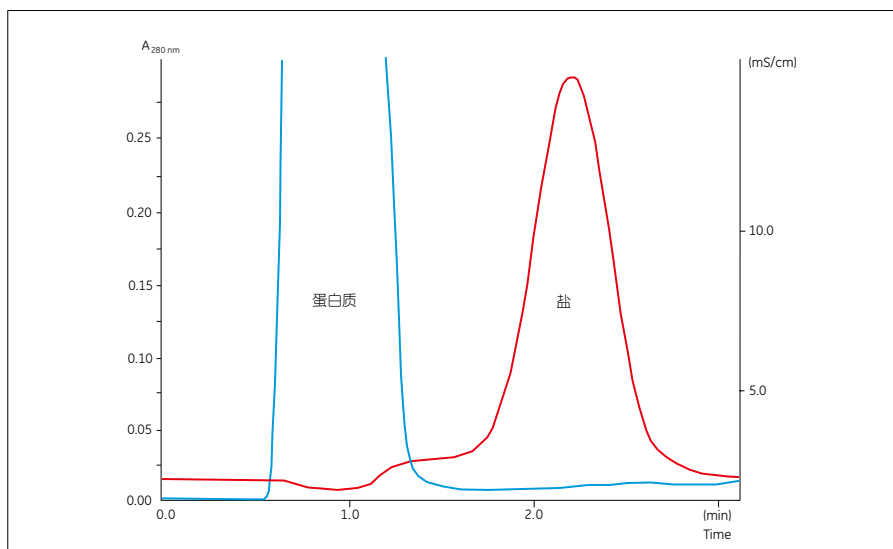


图 7. 小鼠血浆在HiPrep 26/10 脱盐柱上进行缓冲液交换。

 在实验室规模的制备中使用Sephadex G-25预制柱来快速改变样品条件，如表5所示。

表 5. 用预制柱进行快速脱盐和交换缓冲液。

预装柱	每次运行加载的 样品体积	每次运行回收的 样品体积	产品编号.
HiPrep 脱盐 26/10	2.5 - 15 ml	7.5 - 20 ml	17-5087-01
HiTrap 脱盐	0.25 - 1.5 ml	1.0 - 2.0 ml	17-1408-01
快速脱盐 PC 3.2/10	0.05 - 0.2 ml	0.2 - 0.3 ml	17-0774-01
PD-10 脱盐	1.5 - 2.5 ml	2.5 - 3.5 ml	17-0851-01



在使用离子交换柱前，可以用稀释法作为一个可选择性的方法来进行脱盐。



对介质的考虑:

Sephadex G-25 凝胶过滤法

在分子量和低分子量物质之间进行快速的组分分离

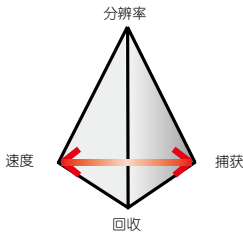
典型的流速为60 cm/h (Sephadex G-25 Superfine, Sephadex G-25 Fine),
150 cm/h (Sephadex G-25 介质).

在下面的捕获章节、中度纯化章节和精细纯化章节中会进行更加详细的讨论。

注释: cm/h : 流速(线性流速) = 流过的体积/柱子的横断面积

第四章

捕获



尽可能早的去除有害的污染物

定义：在原始溶液或者被澄清的原液中，对目标靶分子进行初步纯化。

目标：快速分离、稳定和浓缩目标物。

- 使用高容量的浓缩技术减少样品体积，使样品能够更快速的纯化和能够应用更小体积的柱子进行样品纯化。
- 在第一步纯化中应该使用稳定的和简单的纯化技术。当处理原始样品时，不要试图在一个纯化步骤中解决所有问题。

在样品捕获阶段，通过将速度和容量进行优化组合，使样品中的目标产物被有效的分离、浓缩和稳定化处理。初步纯化的产物被浓缩和转移到有利于保护产物活性的环境中。捕获一般使用离子交换或者亲和色谱等方法一步洗脱，进行成组物质间的分离。在理想状态下，可以完成关键污染物的去除。如果选择具有高选择性的亲和介质，使用亲和色谱纯化，在一些情况下可以达到很高水平的纯化度。在杂质存在的条件下，介质对蛋白质的结合容量对于优化和减少工作规模将会是一个非常关键的参数。例如，当在样品的捕获步骤中使用离子交换色谱时，其目的是从原始样品中快速吸附目标蛋白，将目标蛋白与关键污染物分离，例如蛋白酶和糖苷酶。在选择条件时，要尽量避免其它杂质吸附到色谱柱上，这样可以使色谱柱对目标蛋白的容积达到最大。在纯化过程中或许需要较高的速度，以便减少样品敷加时间，特别是如果存在蛋白水解作用或者存在其它威胁目标蛋白完整性的破坏效应。

- 在方法的研制过程中，使用梯度洗脱来增加捕获步骤的速度和容量。

在捕获步骤中最常用的方法是离子交换色谱法 (IEX)，该方法具有很高的结合容量。离子交换色谱法 (IEX) 的介质能够耐受很苛刻的净化条件，这种苛刻的纯化条件或许在对粗制样品进行纯化后，在进行后期的纯化过程中是需要的。典型的方式是蛋白从离子交换色谱柱上用盐离子强度梯度被洗脱下来。然而，在方法的进展过程中，转换成梯度洗脱，将会产生一个简单的、稳定的分离，用更短的运行时间和消耗更少的缓冲液。由于在捕获阶段，分辨率并不是主要考虑的因素，所以可以增大上样量（高上样量可以降低分辨率）。高的速度、高的容积和低的缓冲液消耗对于大规模的纯化特别有利。如图8所示

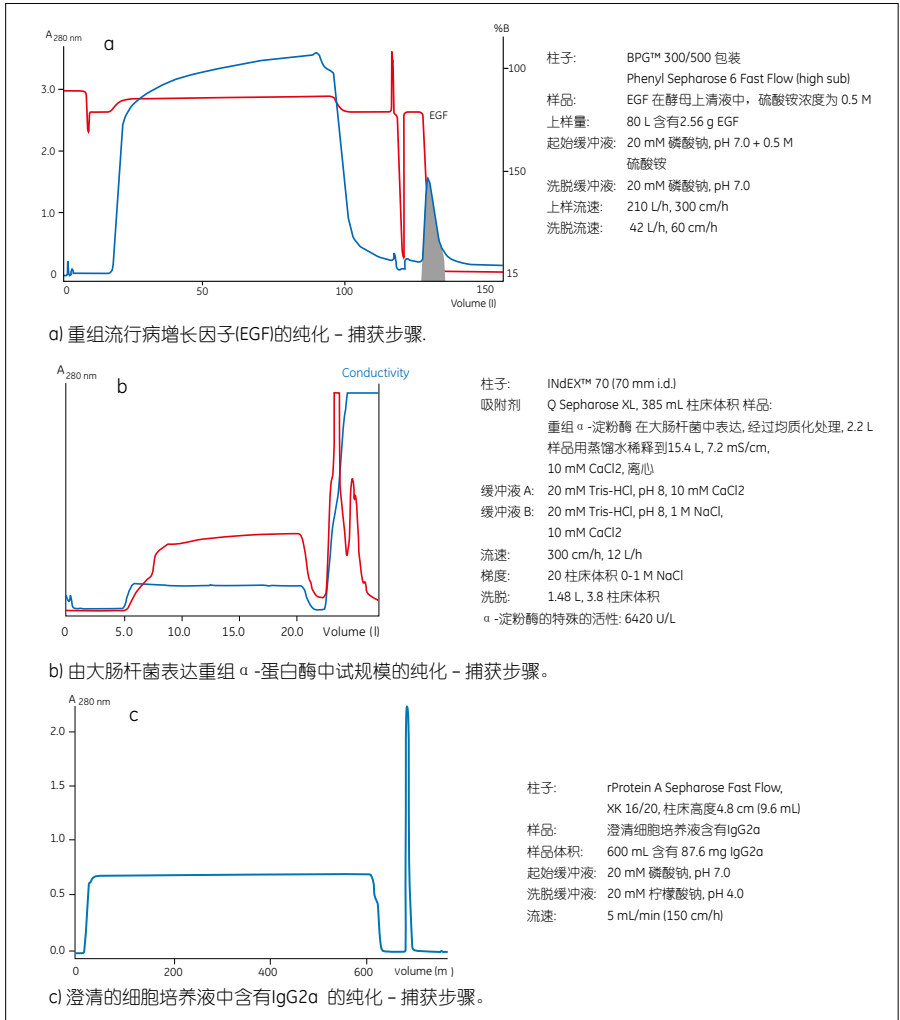


图 8. 捕获步骤的例子。



对于大规模的捕获阶段，在方法进展过程中，样品处理量将是经常被关注的。对纯化过程进行全面地考虑是非常重要的：样品提取和净化，样品的载荷容量，在平衡过程中的流速，结合、洗涤、洗脱和净化，和净化处理步骤的需要。原则上，在捕获步骤设计中需要对样品的处理达到最大容量和/或速度，以损失一些分辨率为代价。然而，对于那些在物理化学性质等方面与目标蛋白质有显著不同的分子而言，纯化经常会达到很高的分辨率和纯度。在任何样品制备阶段，回收率都会被考虑，特别是对于那些具有很高价值的产品，在对捕获步骤进行优化时，分析样品的回收率是非常重要的。在第27页有关于捕获步骤的例子。



捕获阶段所选用的介质需要能够提供很高的速度和很高的容量。

Sepharose XL (离子交换色谱)

用于实验室规模和生产规模的捕获阶段处理原始样品的混合物。在高流速的状态下，快速去除杂质、对目标蛋白的高容量结合和好的分辨率是样品捕获阶段的主要特征。推荐的流速是100-500 cm/h。介质大小为90 μm，在预装柱和大批量的介质中是可以使用的。

Sepharose Big Beads (离子交换色谱)

用于捕获阶段处理粘稠样品或者非常大体积的样品。在样品捕获阶段，使用Sepharose Big Beads对具有高粘稠度的样品进行预先清除，并且使用更小颗粒直径的离子交换介质。推荐的流速应该达到300 cm/h。当需要快速吸附并且分辨率不是很重要时，应该选择这种介质。Big Beads介质的流速特性在处理非常大体积的样品时，需要非常高的流速时，也是有用的。在这些情况下，流速可以超过1000 cm/h，颗粒直径为200 μm。可以用作大容积介质。

STREAMLINE (离子交换色谱, 亲和色谱, 疏水性相互作用色谱)

直接从原始样品中进行样品的净化和捕获：

STREAMLINE 吸附剂被用来处理那些直接来自发酵液匀浆和来自细胞培养液/发酵液等起始原料的样品，根据它的类型和应用，流速范围为200 - 500 cm/h，颗粒直接为200μm。可以用作大容积介质。

其它可以考虑的介质：

Sepharose Fast Flow (离子交换色谱, 疏水性相互作用色谱)

针对原始样品各种规模的纯化，这些介质提供了一个非常宽范围的选择性和非常好的可选性。它们能够对原始样品进行快速的分离、结合并且具有好的分辨率。推荐的流速是100-300 cm/h。颗粒大小为90 μm。可以用作预装柱和大容积介质。

注意: cm/h : 体积流速 (线性流速) = 体积流速/柱子的横断面积。



如果一个纯化过程不是用作扩大规模生产 (即仅需要毫克级别的量), 可以使用高效介质例如 Sepharose High Performance (离子交换色谱, 疏水性相互作用色谱) 或者 MonoBeads (离子交换色谱), 或者 SOURCE (离子交换色谱, 疏水性相互作用色谱)。所有这些介质都有预装柱。



对于小规模纯化可以使用 MonoBeads 或者 MiniBeads™ (离子交换色谱), 苯基 Superose™ (疏水性相互作用) 或者 NHS-活化的 Superose (亲和色谱) 柱子。



对于一次纯化或者即时可用的样品, 在第一步纯化的过程中, 通过选取色谱峰中很窄的一段, 以损失产量来换取样品的高纯度。



在离子交换色谱中, 使用 HiTrap 离子交换和 HiTrap 疏水性相互作用试剂盒 进行介质的筛选和简单纯化方法的优化。



如果开始纯化的物质是比较干净的, 用具有很高分辨率的 MonoBeads (离子交换色谱) 进行一个单一步骤的纯化可能就足以满足实验室规模所需要的纯度。



如果能够有一个生物专一性的配基, 可以考虑在捕获步骤中使用亲和色谱进行分离纯化。如果介质是常规使用的, 应该确保来自原始样品中的任何污染物能够在柱子的再生步骤中被去除, 同时再生步骤应该不损害配基的亲水性。亲和色谱能够使纯化在捕获步骤中具有很高的选择性, 提高针对污染物的分辨率, 但是纯化速度将会被降低, 来维持一个较高的对目标蛋白的结合能力。



如果开始纯化的样品比较干净, 用一个预装的 HiTrap 柱子进行一步纯化, 就可以满足取得毫克级别制品的纯度的需要, 如图9所示。HiTrap 亲和柱可以应用在宽的选择性范围内 (见表6, 第31页)。



如果开始纯化的物质是经过浓缩的, 体积小并且不是以扩大规模生产为目的, Superdex 凝胶过滤介质是一个比较温和的首选步骤, 需要很少的优化或者不需要优化。相反的, 凝胶过滤不适用于具有大的样品体积或者需要大规模生产的典型样品的捕获步骤。

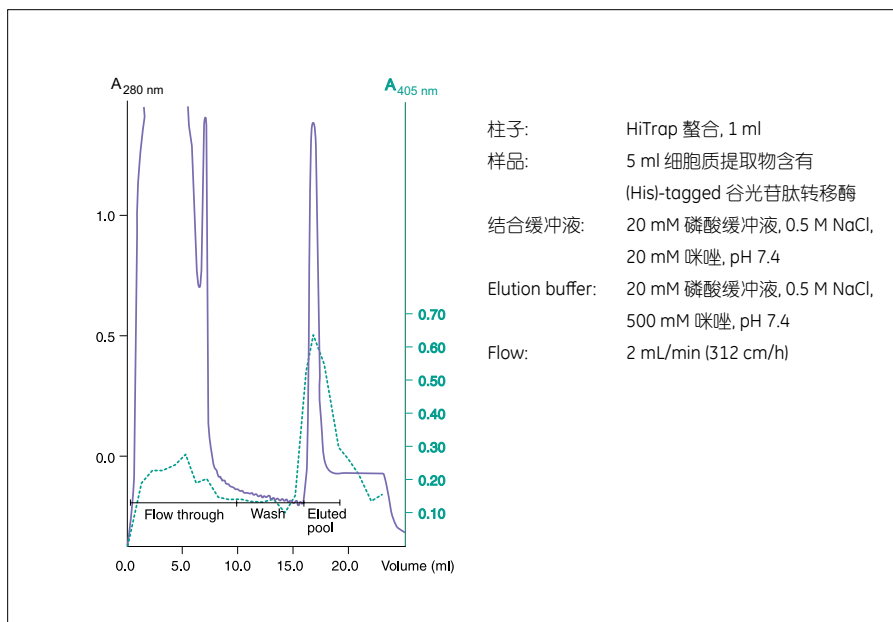


图. 9. HiTrap 螯合柱子，用于纯化来自细胞质提取物中的组氨酸标记的谷胱甘肽-S-转移酶。

表 6. 重组的HiTrap亲和柱用于实验室规模的分离.

应用	HiTrap柱子	产品编号.	数量/ 组件	每毫升胶大约 的结合容量
免疫球蛋白的分离	HiTrap rProtein A	17-5079-01	5 × 1 ml	人
		17-5080-01	1 × 5 ml	IgG 50 mg/ml
IgG 类别, 片段和亚类	HiTrap Protein A	17-5029-02	2 × 1 ml	
IgG 类别, 片段和亚类		17-0402-01	5 × 1 ml	人
		17-0402-03	2 × 1 ml	IgG 20 mg/ml
IgG 类别, 片段和亚类	HiTrap Protein G	17-0403-01	1 × 5 ml	
		17-0404-01	5 × 1 ml	人
		17-0404-03	2 × 1 ml	IgG 25 mg/ml
含有人IgG ₃ 对于鼠源性单克隆抗体 IgG ₁ 和大鼠IgG 有很强的亲和力 来自腹水、血清和细胞 培养上清的单克隆抗体 和多克隆抗体	MABTrap™ GII	17-1128-01	HiTrap Protein G 柱子 (1 ml), 附件, 预制的缓冲液 可用于10次纯化	同上
鼠源性重组单链抗体 可变区片段, 由大肠 杆菌重组表达生产 来自蛋黄的IgY抗体	RPAS 纯化 模式	17-1362-01	HiTrap 抗-E 柱子, 附件, 预制的缓冲液 可用于20次纯化	0.17 mg ScFv/5 ml
	HiTrap IgY 纯化	17-5111-01	1 × 5 ml	IgY 20 mg/ml
IgM	HiTrap IgM 纯化	17-5110-01	5 × 1 ml	IgM 5 mg/ml

应用	HiTrap 柱子	产品编号	数量/ 组件	每毫升胶大约的 结合容量
不同的特异性介质组 需要核苷酸的酶, 凝血因子, DNA结合蛋白质, α_2 -巨球蛋白	HiTrap Blue	17-0412-01	5 × 1 ml	人血清白蛋白 20 mg/ml
		17-0413-01	1 × 5 ml	
暴露氨基酸的蛋白质和多肽: 组氨酸 (半胱氨酸, 色氨酸) 例如: 2-巨球蛋白和干扰素	HiTrap 整合	17-0408-01	5 × 1 ml	(His) ₆ -标记的蛋白 (27.6 kD) 12 mg /ml
		17-0409-01	1 × 5 ml	
组氨酸标记的融合蛋白质	HisTrap™	17-1880-01	HiTrap 整合柱子 (1 ml), 配件, 预制缓冲液	同上
生物素和生物素酰化的物质	HiTrap 抗生物素蛋白链菌素	17-5112-01	5 × 1 ml	生物素化的 BSA 6 mg/ml
凝血因子, 脂蛋白脂肪酶, 类固醇受体, 激素, DNA结合蛋白质, 干扰素, 蛋白质合成因子	HiTrap 肝素	17-0406-01	5 × 1 ml	ATIII (牛的) 3 mg/ml
		17-0407-01	1 × 5 ml	
亲和介质的基质的准备 伯胺的偶联	HiTrap NHS-活化的	17-0716-01	5 × 1 ml	特异性配基
		17-0717-01	1 × 5 ml	

重组蛋白的分离条件

所有的 HiTrap 柱子都提供详细的操作步骤保证最佳的结果

最大的流速: HiTrap 1 ml 柱子: 可以达到 4 ml/min

HiTrap 5 ml 柱子: 可以达到 20 ml/min



对于原始的具有较大体积的并且含有颗粒的样品，考虑使用STREAMLINE 扩张床吸附技术。

STREAMLINE 扩张床吸附技术特别适用于大规模的重组蛋白和单克隆抗体的纯化。STREAMLINE 吸附剂经过特别设计，适用于STREAMLINE 柱子。这个技术不需要对样品进行净化处理，将样品的准备和捕获结合在一步中完成。如图10所示，原始样品被用于STREAMLINE 介质的扩张床，在目标蛋白被捕获的同时，细胞碎片，颗粒物质，整个细胞和污染物被去除。流动是反向的，目标蛋白在洗脱缓冲液中被解吸附。

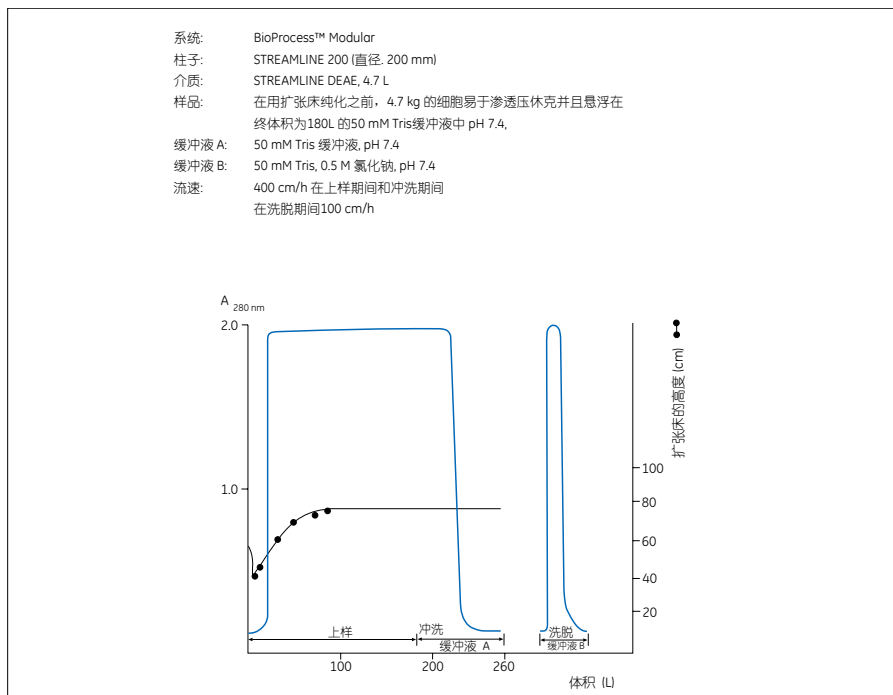
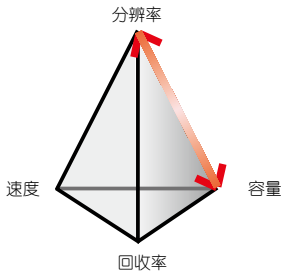


图. 10. 重组蛋白质绿脓假单胞菌外毒素A的纯化 -捕获步骤

见第3章第17页，对于捕获阶段、中度纯化阶段和精细纯化阶段，建议的各种技术的逻辑组合。

第五章

中度纯化



在每一步中使用不同的技术，使纯化步骤数最少


定义：大量污染物的进一步去除

目标：样品的纯化和浓缩

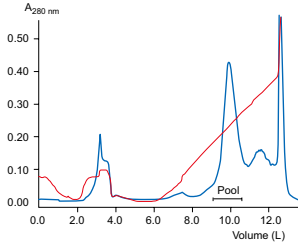
在中度纯化阶段，我们将注意力集中于将目标蛋白和大多数大体积的杂质分开，例如其它蛋白质、核酸、内毒素和病毒与目标蛋白质分开。区分相似组分的能力逐渐重要起来。对于分辨能力的要求取决于捕获阶段所获得的样品状态和对最终制品纯度的要求。容量对于维持样品的产量仍然是非常重要的。在中度纯化阶段，速度不是非常重要的因素，因为在样品捕获阶段，导致蛋白水解或者其它的破坏因素已经被去除，样品体积应该被缩减。必须在每次应用中确定在样品的捕获能力和分辨率之间的最佳的平衡。然后确定在方法的进展过程中如何优化分离条件。

 所使用的技术必须具有较高的分辨率。一般需要连续梯度洗脱。

在捕获步骤中，对样品吸附过程的选择性将会非常重要的，不仅要获得高的目标蛋白结合容量，而且通过对样品加载过程进一步的分离，更加有利于样品的纯化。然而，与样品的捕获阶段相反，样品从色谱柱上解吸附的过程中，选择性也是非常重要的，经常使用一个更具有选择性的解吸附原理完成样品纯化，例如使用连续的梯度洗脱或者使用多步骤的洗脱过程，如图11所示。中度纯化步骤中，样品纯化的例子在第35页有示。

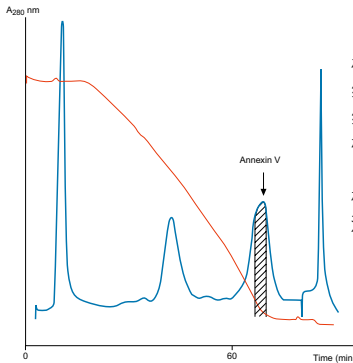
 使用一个补充的具有选择性的技术，用于样品的捕获阶段。

d) 重组蛋白质绿脓假单胞菌外毒素A的纯化 - 中度纯化步骤.



柱子: FineLINE™ 100 (直径 100 mm)
介质: SOURCE 30Q, 375 mL (50 mm 柱床高度)
样品: 来自以前的样品池, 用蒸馏水稀释3倍, 1.5 L/循环
缓冲液 A: 20 mM 磷酸盐缓冲液, pH 7.4
缓冲液 B: 缓冲液 A + 1.0 M 氯化钠
梯度: 0 到50% B, 20 柱体积
流速: 600 cm/h

b) 重组锚定蛋白V的纯化 - 中度纯化步骤.



柱子: XK 16/20 丁基 Sepharose 4 Fast Flow
缓冲液 A: 20 mM 磷酸钠, pH 7.0, 1 M (NH₄)₂SO₄
缓冲液 B: 20 mM 磷酸钠, pH 7.0,
样品: 部分纯化的锚定蛋白V, 在大肠杆菌中表达, 5 ml
梯度: 0 到50% B, 20柱体积
流速: 100 cm/h

图. 11. 中度纯化步骤.



对于中度纯化所使用的介质应该具有高的容量和高的分辨率, 具有一个补充的选择性范围。

SOURCE (离子交换色谱)

使中度纯化具有快的速度、高的分辨率和高的容量。

SOURCE介质应该具有高的通量、高的捕获能力和高的分辨率。经常性的, 如果使用经过过滤的样品, 中度纯化步骤可以与捕获步骤结合起来。流速可以高达2000 cm/h。SOURCE 30 在大规模的中度纯化中也是一个很好的选择。

颗粒大小15 μm。在预装柱和大容量介质中可以使用。

颗粒大小30 μm。在大容量介质中可以使用。

Sepharose High Performance (离子交换, 疏水性相互作用, 亲和色谱)

对高分辨率和高容量的中间产物进行纯化:

这些介质可以进行大规模的中度纯化, 并且在纯化过程中需要优先考虑分辨率和容量时, 它们是理想的介质。推荐的流速可以高达150 cm/h。

颗粒大小: 34 μm 。可以在预装柱和大容量介质中应用。

Sepharose Fast Flow (离子交换, 疏水性相互作用, 亲和色谱)

大规模药物制剂制备, 对中间产物进行纯化

对于实验室和大规模制备的一般应用, 这些介质是可以被接受的。对于纯化技术适用范围的广泛性和选择性以及能够耐受苛刻的净化条件都是有效的。它们可以提供一个快速的分离, 同时具有好的分辨率。推荐的流速为100-300 cm/h。

颗粒大小90 μm 。可应用于预装柱和大容积介质。

注意: cm/h :流速 (线性流速) = 体积流速/柱子的横断面积。



使用 HiTrap 离子交换, HiTrap 疏水性相互作用和 RESOURCE 疏水性相互作用试剂盒对介质筛选和简单的纯化方法优化。见下面的表格

Kit	Code No.
HiTrap 离子交换试剂盒	17-6001-01
HiTrap 疏水性相互作用试剂盒	17-1349-01
RESOURCE疏水性相互作用试剂盒	17-1187-01



如果纯化并不是以扩大规模生产为目的 (对产品的需求仅仅是毫克级别的), 使用高效介质如 Sepharose High Performance (离子交换,疏水性相互作用) MonoBeads (离子交换) 或者 SOURCE 15 (离子交换,疏水性相互作用)。

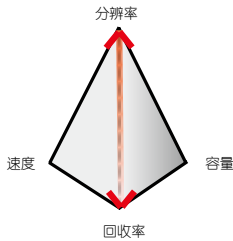


对于小规模纯化使用MonoBeads, MiniBeads (离子交换) 或者苯基Superose PC (疏水性相互作用) 柱子。

见第3章第17页, 对于捕获阶段、中度纯化阶段和精细纯化阶段, 建议将各种纯化技术进行逻辑组合。

第六章

精细纯化



每一步骤采用不同的纯化技术。

定义：最终去除微量的污染物；调整PH值、盐及添加剂浓度以便于储存。

目标：得到所需的高纯度产物。

在精细纯化阶段，关注的重点就是如何达到高分辨率，从而完成最终的纯化。在此之前的步骤已去除大部分的污染物和杂质，除了一些微量的杂质，如可过滤物、内毒素、核苷酸、病毒，以及与产物密切相关的物质，如小的异构体、中间反应物和聚合物。为达到要求的分辨率，可能需要损失样品载荷或回收率（在峰值点剪切）。

最终产物的回收率是优先要考虑的，并且必须选择一种能确保达到有可能的最高的回收率的技术。在这个阶段，产物的损失比之前的步骤会更多。理想状态下，产物应该在缓冲液中回收，以方便下一过程操作。



所选取的技术，必须能够区分目标蛋白质和其它剩余的污染物。

为达到分离目的所要求的高分辨率并不仅仅是使用一种高选择性的技术就可以完成，而是通常需要选择一种高效率、体积小、大小均匀的球状介质。

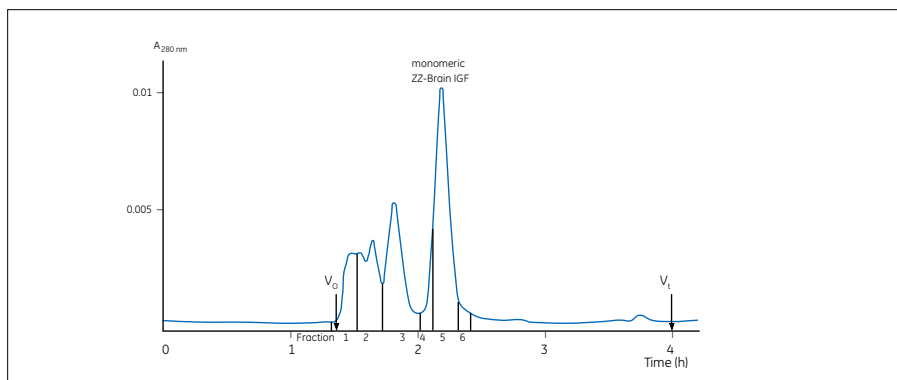


图 12. 二聚体和多聚体的分离 - 精细纯化步骤。

通常情况下，前面的步骤已经使用了样品的带电性、疏水性或亲和性的分离方法，因而高分辨率的凝胶过滤是精细纯化阶段最理想的方法。在其中的一个步骤中，产物被纯化并转移到所需要的缓冲液中，而二聚体或聚合物往往可以被去除，如图12所示。

为去除类似大小的污染物，通常需要采用另一种浅梯度洗脱的高分辨率技术，如图13所示。

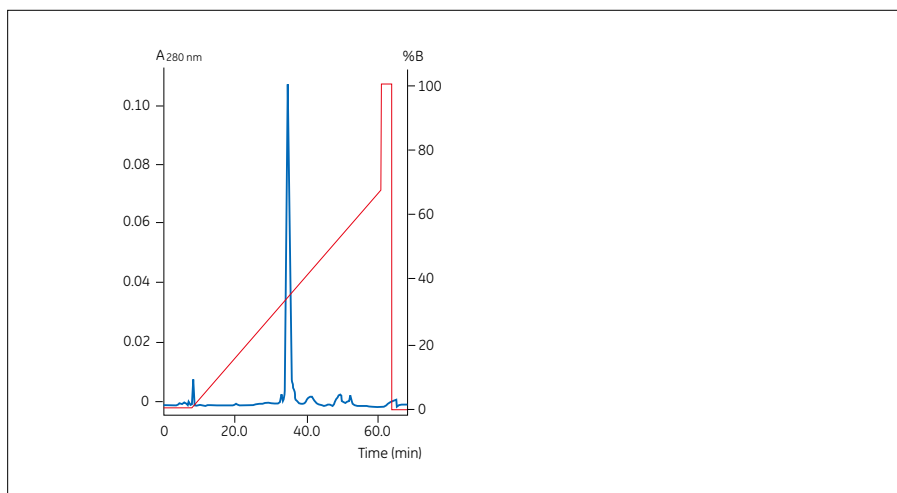


图 13. 重组表皮生长因子最终的精细纯化步骤，使用反相色谱。该方法是在预装的RESOURCE™ RPC 上研制的，并且用SOURCE 15RPC进行规模化生产。

凝胶过滤也是所有色谱技术中最慢的，层析柱规格决定所能容纳的样本量。因此，使用凝胶过滤技术最合理的时间是在样品体积减小的时候，以便小体积的柱子也可以使用。



当净化规模需要扩大时，重要的是要确保在实验室条件下的精细纯化过程所达到的高分辨率，在大量样品存在时，使用大规模的柱子同样也能够达到相同的高分辨率。



精细纯化过程使用的介质应当能确保尽可能高的分辨率。

Superdex（凝胶过滤）

精细纯化过程所用的高产率凝胶过滤介质。

Superdex介质是高分辨率的凝胶过滤介质，不仅运行时间短而且回收率高。Superdex是实验室条件下的首选，而Superdex prep grade则是为了大规模生产应用。一般流速可达75 cm/h。

Superdex粒径：13微米。存于预填充柱。

uperdex prep grade粒径：34微米。用于预填充柱或者作为批量使用的介质。

MonoBeads（离子交换）

在需要达到高分辨率的前提下，适合于实验室规模的精细纯化过程所用介质。在实验室条件下，这些介质可以对样品进行高容量和高分辨率的分离。一般的流速是150-600 cm/h。

粒径：10微米。预填充柱。

SOURCE 15（离子交换，疏水性相互作用，反相层析）

精细纯化过程所用的快速高分辨率介质。

SOURCE 15是实验室和大规模应用均可使用的快速、大容量、高分辨率分离介质。其多孔状结构决定即使在高载荷、高流量条件下也能保持高分辨率。推荐流速是150-1800厘米/小时

粒径：15 μm。存于预填充柱或者作为批量使用介质。



其它推荐的介质：

SOURCE 30（离子交换）

SOURCE 30介质适用于高通量、大容量和高分辨率的纯化。然而，这种介质可以作精细纯化的另一个选择，其最高流速可达2000 cm/h。

颗粒大小：30微米。可批量使用。

注意：cm/h：流速（线性流速）=体积流量/柱横截面积。



微量的净化可使用Superdex PC (凝胶过滤)、MiniBeads (离子交换) 或者苯基 Superose PC (疏水性相互作用)柱。

见第3章，第17页，有关于在样品的捕获阶段，中度纯化阶段及样品的精细纯化阶段进行合理的技术组合的建议。

第七章

蛋白质纯化策略的实例

三步分离纯化策略已成功地应用于从简单的实验室规模的分离纯化到大型工业化规模的生产在内的许多纯化方案中。本章所举例子就是一个标准的实验室纯化步骤的应用实例，即样本提取和澄清、捕获、中间产物的分离纯化及精细纯化。也有一些例子，其纯化策略需要更少的步骤，根据本手册给出的蛋白质纯化的一般准则，并选择最适当的技术和介质以满足净化要求达到的目标。大多数的这些例子是利用ÄKTA设计色谱系统进行设计的。

例一：重组酶的三步纯化

这个例子展示一个最常见的净化策略：

用离子交换色谱对样品进行捕获，疏水性相互作用色谱进行中间产物的分离纯化及应用凝胶过滤进行样品的精细纯化。纯化的目标是获得高纯度的蛋白质用于结晶和结构测定。有关这项工作的更详细的说明可以在应用指南18-1128-91找到。

靶分子：脱乙酰氧基噻孢霉素C聚合酶（DAOCS），氧敏感酶。

源材料：以可溶性形式在大肠杆菌的细胞质上表达的重组蛋白。

样本提取和澄清

细胞在裂解液悬浮 (50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 2 mM DTT, 0.2 M 苯甲脒-HCl, 0.2 mM PMSF, pH 7.5), 并用超声溶解。添加链霉素硫酸盐 (1%) 和聚乙烯亚胺 (0.1%) 沉淀DNA。离心澄清提取液。

裂解液中的EDTA, DTT, 苯甲脒-HCl和PMSF用来抑制蛋白酶和尽量减少对氧敏感酶的损害。将样品置于冰上同样减少蛋白酶活性。

捕获

捕获步骤的重点是从相对不稳定的靶蛋白迅速消除最有害的污染物。这一点, 再加上计算好的DAOCS等电点($pI = 4.8$), 决定了选择阴离子交换介质进行样品纯化。在使用较大柱进行优化的捕获过程之前, 筛选阴离子交换柱, 包括那些来自HiTrap 离子交换试剂盒, 以选择最佳的介质 (结果未显示)。最后选定Q Sepharose XL, 一种高容量的介质, 非常适合捕捉。

如图14所示, 优化的捕获步骤允许使用高速的阶梯式洗脱从而加快纯化速度。这对于处理潜在的不稳定的样品特别有利。

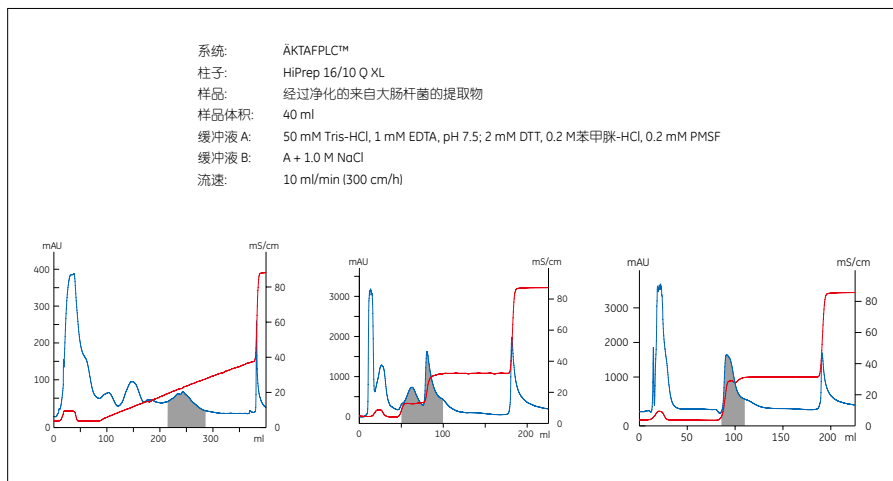


图. 14. 用离子交换色谱进行捕获和进行纯化条件的优化。图中阴影部分为洗脱下来的DAOCS。

中度纯化

疏水性相互作用色谱(HIC)之所以入选，是因为其分离的原则与离子交换相辅相成，而且所需样品的数量最少，此条件是必要的。疏水性很难进行预测，而且我们推荐筛选不同的介质。

中度纯化步骤是由筛选预包装的疏水性相互作用介质(RESOURCE 疏水相互作用试剂盒)，以选择最佳的介质用于分离（结果未显示）。SOURCE 15ISO被选中是因为它能达到较高的分辨率。中度纯化步骤，如图15所示，为了达到更高的分辨率，和显著减少残存的杂质，需要牺牲最大可能达到的分离速度为代价。

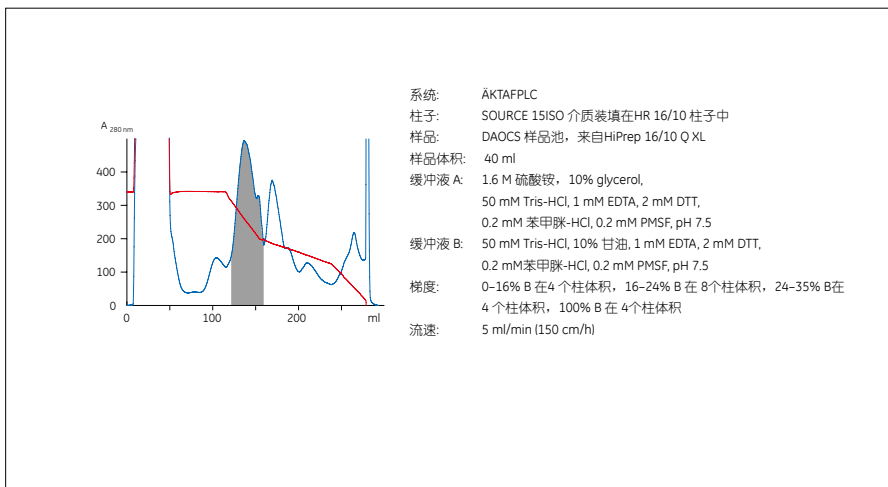


图. 15. 用疏水性相互作用进行中度纯化.

精细纯化

精细纯化的主要目的是消除聚合物和微量污染物，并将纯化的样品转移到缓冲液中，用于进一步的结构研究。选择Superdex 75 预制梯度（一种凝胶过滤介质在相对较短的时间提供高分辨率分离）是因为DAOCS的分子量（34500）处于这一介质的最佳分离范围。图16显示了最后的纯化步骤。

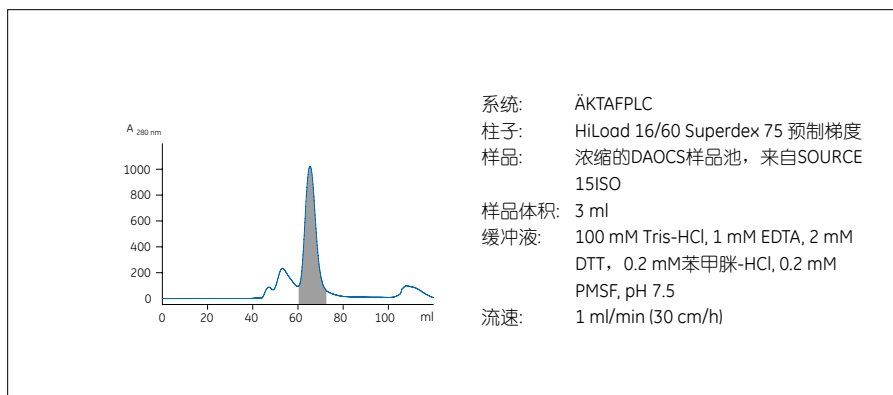


图. 16. 使用凝胶过滤色谱精细纯化样品。

分析测定

图17显示的分析结果，收集到的分离组分经使用Multiphor™ II进行SDS-PAGE分离和银染，按照指导说明提供的操作步骤进行分离和染色。

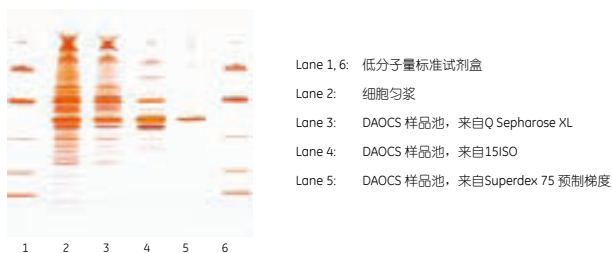


图. 17. 使用ExcelGel™ SDS 梯度胶8-18进行纯化步骤的分析。

终产品用X-ray 衍射进行分析研究，图18。

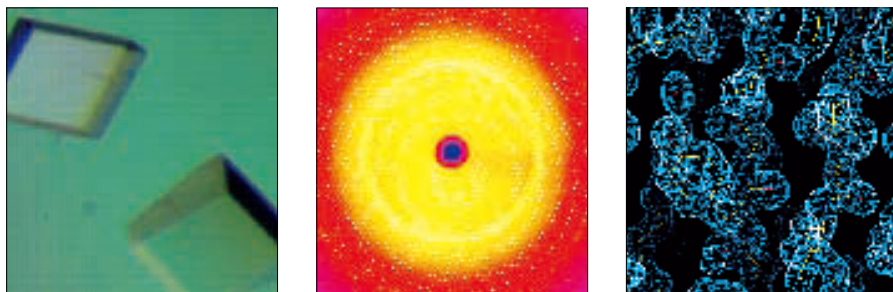


图. 18. 结晶物，衍射模式和纯化后的DAOCS高分辨率电子密度图谱。图18由I. Andersson 教授和A. Terwisscha van Scheltinga博士提供，瑞典大学农业科学院，和K. Vålegård博士，Uppsala 大学，Uppsala，瑞典。

例二

重组抗原结合片段的三步纯化

这个例子显示了一个三步纯化策略，其在捕获和精细纯化过程应用同一纯化原则的两个不同的模式：用离子交换捕获，疏水性相互作用于中间产物的分离纯化及用离子交换色谱于精细纯化过程。这是用作扩大纯化规模的常规程序。

在应用指南编号为18-1111-23可以看到一份更详细的说明。

靶分子

HIV gp-120的重组抗原结合片段(Fab)。

源材料

抗-gp 120 Fab在大肠杆菌BM170 MCT61菌株的周质表达。大肠杆菌颗粒在收获并清洗一次后冷冻储存。

样本提取、澄清和捕获

溶解解冻的细胞，然后在捕获步骤之前用NDA酶（加入2mM MgCl₂，pH 7.5）处理。用膨胀床吸附方法从非澄清混合液中捕获Fab片段，介质为STREAMLINE SP(阳离子交换剂)。

选择膨胀床吸附是因为可以用一个单一的步骤就可以直接从蛋白质粗样中捕获靶蛋白，不需要离心或其他前处理步骤。这项技术非常适合用于大规模纯化。

捕获步骤的结果如图19所示。一步洗脱后，Fab片段被集中并迅速转移到一个稳定的环境。

柱子: STREAMLINE 200 (直径: 200 mm)
 吸附剂: STREAMLINE SP, 4.6 L
 样品: 60 L 高压均质处理的大肠杆菌悬液
 缓冲液 A: 50 mM 醋酸钠, pH 5.0
 缓冲液 B: 50 mM 醋酸钠, pH 5.0, 1 M NaCl
 流速: 在上样期间和冲洗期间 300 cm/h, 在洗脱期间 100 cm/h

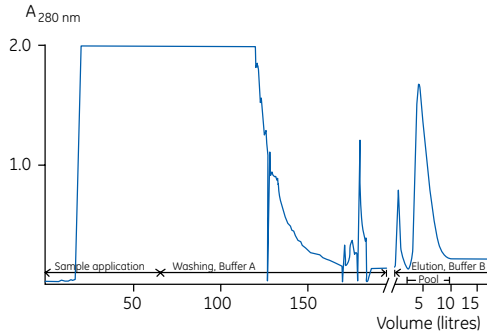


图. 19. 在样品捕获步骤中使用扩张床吸附技术。

中度纯化

之所以选择疏水性相互作用色谱(HIC)，是因为其分离的原则与离子交换是相辅相成的，而且所需样本处理步骤最少，因为样品从STREAMLINE SP洗脱后已经在高盐缓冲液中了。

样品的疏水性是难以预测的，因而建议在纯化前筛选不同的介质。HiTrap 疏水相互作用检测试剂盒（含五个适用于生产规模的1ml的预填柱，其内装介质不同）可以用来筛选最合适的介质。缓冲液pH值保持在 5.0，以进一步减少捕获后需要的样品处理步骤数。筛选介质的结果如图20所示。

系统: ÄKTAexplorer
 样品: Fab 片段, 来自STREAMLINE SP, 2 ml
 柱子: HiTrap疏水相互作用试剂盒(1 ml columns), 苯基Sepharose High Performance,
 苯基 Sepharose 6 Fast Flow (low sub), 苯基 Sepharose 6 Fast Flow (high sub), 丁基Sepharose 4 Fast Flow, 辛基 Sepharose 4 Fast Flow
 缓冲液 A: 1 ml (NH₄)₂SO₄, 50 mM NaAc, pH 5.0
 缓冲液 B: 50 mM NaAc, pH 5.0
 梯度: 20 柱体积
 流速: 2 ml/min (300 cm/hr)

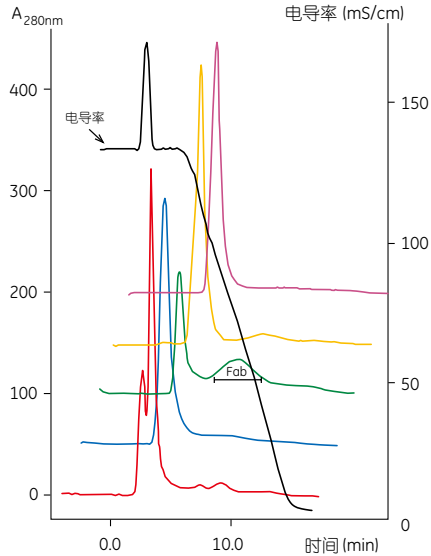


图. 20. 疏水性相互作用介质的监测, 使用HiTrap 疏水性相互作用试剂盒。

选择苯基 Sepharose 6 Fast Flow (high sub), 因为此介质对于靶蛋白表现出良好的选择性从而去除了大量污染物。优化洗脱条件达到一步洗脱, 最大限度地提高处理量以及疏水性相互作用纯化技术的集中效应。图21显示了优化后的洗脱及随后的中度纯化步骤的扩大规模纯化。

系统: ÄKTaexplorer
 样品: Fab 片段, 来自STREAMLINE SP, 80 ml
 柱子: 苯基 Sepharose 6 Fast Flow (high sub) in XK 16/20 (110 cm 柱床高度)
 缓冲液 A: 1 M (NH₄)₂SO₄, 50 mM NaAc, pH 5.0
 缓冲液 B: 50 mM NaAc, pH 5.0
 梯度: 不连续梯度至50% B
 流速: 5 ml/min

系统: ÄKTaexplorer
 样品: Fab片段, 来自STREAMLINE SP, 800 ml
 柱子: 苯基Sepharose 6 Fast Flow (high sub)in XK 50/20
 缓冲液 A: 1 M (NH₄)₂SO₄, 50 mM NaAc, pH 5.0
 缓冲液 B: 50 mM NaAc, pH 5.0
 梯度: 不连续梯度至50% B
 流速: 平衡流速: 100 ml/min
 上样和洗脱流速: 50 ml/min

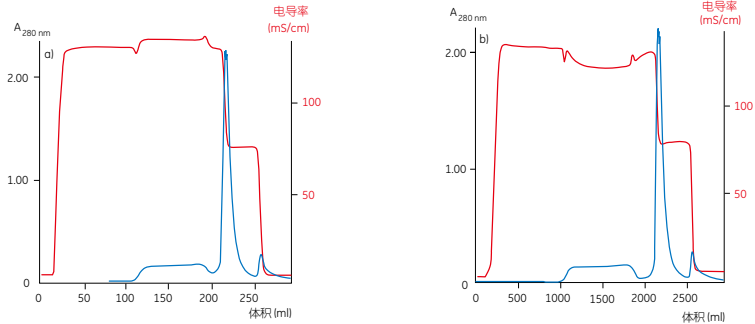


图. 21. 中度纯化, 使用疏水性相互作用色谱: 条件优化和扩大化生产。

精细纯化

凝胶过滤是最后精细纯化步骤的首选, 其能去除微量污染物并将样品转移到合适的储存环境。然而, 在这个例子中, 凝胶过滤不能解决从Fab片段(M_r 50 000)去除污染物(M_r 52 000)的问题 (结果未显示)。

作为一种替代性选择, 使用另一种阳离子交换介质SOURCE 15S。与捕获步骤的阳离子交换相反, 精细纯化步骤的阳离子交换在小且统一大小的介质(SOURCE 15S)上采用浅梯度洗脱, 从而提供了高分辨率的洗脱结果, 如图22所示。

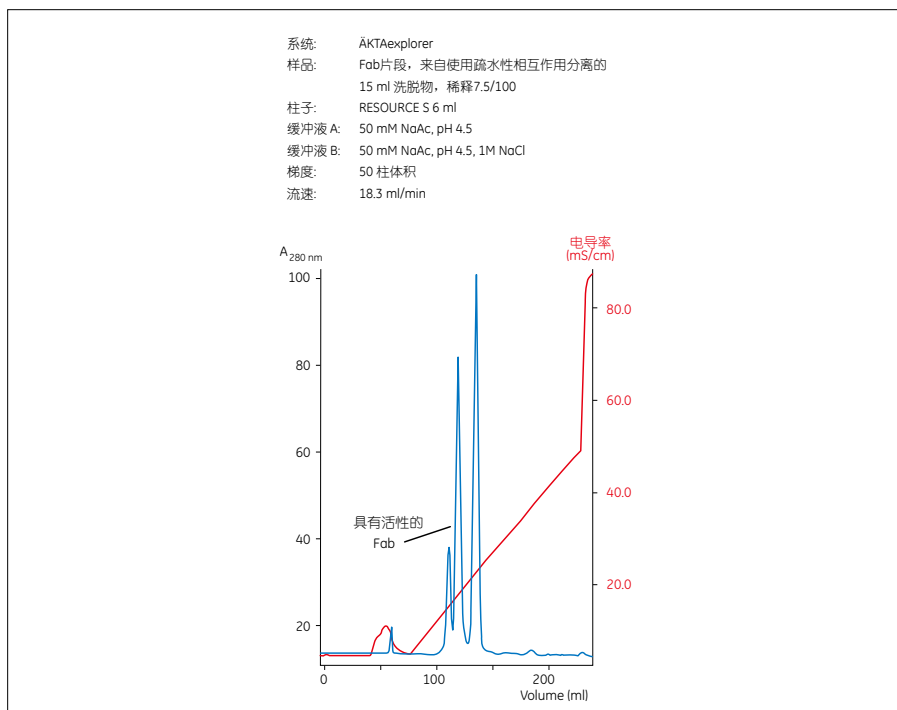


图. 22. 优化Fab 精细纯化步骤.

分析检验

收集组分, 参照仪器使用说明, 用SDS-PAGE分离, 用PhastSystem 经考马斯亮兰染色。

用羊抗人IgG Fab ELISA (一种抗-gp120 ELISA) 检测Fab, 并采用体外试验检测HIV-1感染的T细胞的抑制作用。

通过检测 A_{260}/A_{280} 来监测核酸。 A_{260}/A_{280} 比值高(>1) 则存在DNA, 这可通过将选定的样品用琼脂糖凝胶电泳和溴化乙锭染色来验证。内毒素测定采用动力学显色鲎试验(Coamatic™, Chromogenix AB, Mölndal, Sweden)。

例三

单抗的两步纯化

这个例子表明在捕获步骤中使用高选择性亲和层析技术具有高效性，因为为了达到所需的纯度，只有凝胶过滤精细纯化步骤是必要的。

这项工作的目标是建立一种高效的单抗纯化的常规步骤。

这项工作的更详细说明可以在应用指南18-1128-93找到。

靶分子

小鼠IgG₁单抗。

源材料

细胞培养上清。

样本提取和澄清

在捕获步骤中，调整结合缓冲液的盐浓度和pH值。在亲和层析色谱步骤前，样品经0.45 μm的滤器过滤。

捕获

亲和或离子交换层析尤其适合如细胞培养上清液之类的样本，因为象它们这样的结合技术，能浓缩靶蛋白，并大大降低了样本量。单抗纯化步骤中，捕获靶蛋白可以通过使用一个高度选择性的亲和层析介质实现。在这个例子中使用的是HiTrap rProtein A柱。

虽然预填柱的包装内提供了使用标准，但是对于特定的靶分子还应进一步优化结合和洗脱条件。

大多数小鼠单克隆抗体的IgG₁亚型需要在高盐浓度环境下结合到固定蛋白A上，因此，需要选择适合的盐浓度从而达到最大的洗脱峰面积以及没有抗体流失。选择最佳的结合条件的结果如图23所示。最佳洗脱pH值也有助于提高抗体回收率。

优化的结合和洗脱条件使包括IgG₁在内的峰形良好，如图24所示。

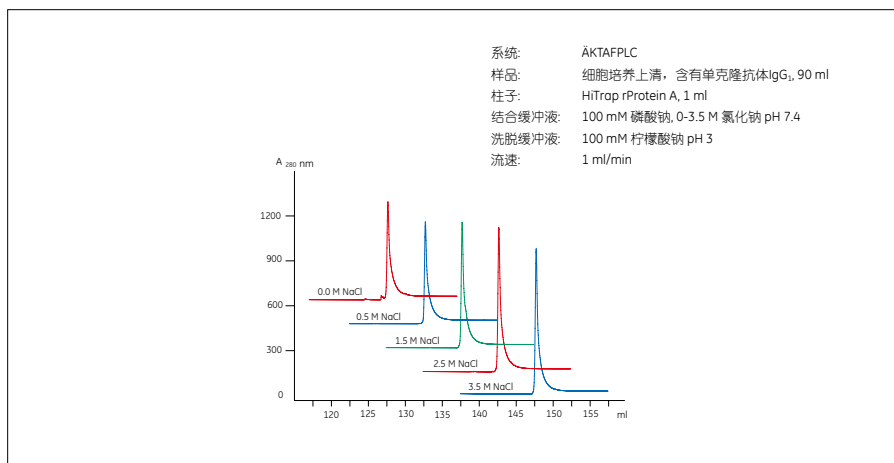


图. 23. 自动筛选最佳的结合条件。

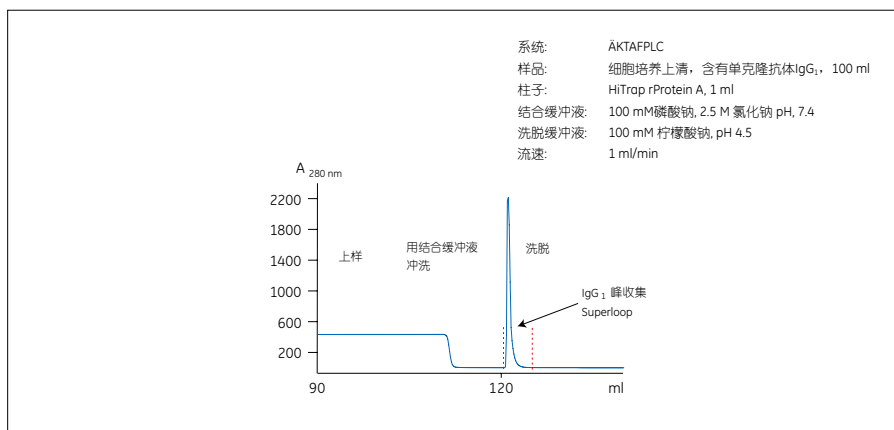


图. 24. 最佳的捕获步骤, 用HiTrap rProtein A。

中度纯化

不需要中度纯化，因为高选择性的捕获步骤也去除了杂质蛋白质和低分子量物质，从而实现了高效的纯化。

精细纯化

在大多数抗体制备过程中，有可能存在IgG聚合物和/或二聚体。因此，有必要进行凝胶过滤精细纯化步骤，尽管在捕获步骤已达到较高的纯度。精细纯化步骤可以去除少量或微量级别的污染物。选择Superdex 200 prep grade凝胶过滤介质，因为它的分子量范围最适合分离IgG抗体。图25显示了最后的纯化步骤。

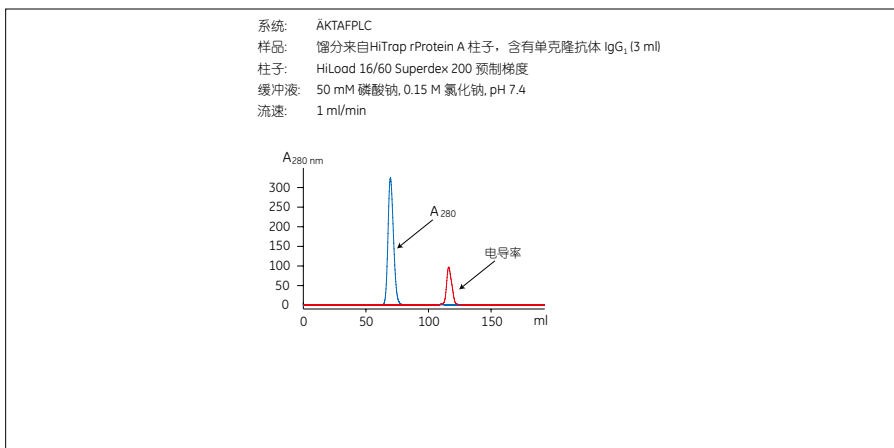


图. 25. 凝胶过滤，使用HiLoad 16/60 Superdex 200 预制梯度。

分析方法

根据仪器提供的说明，收集的组分用SDS - PAGE进行分离，使用PhastSystem银染。



使用SDS PAGE对纯化步骤进行分析。

例4

膜蛋白的一步纯化

这个例子表明，使用适当标记的重组蛋白，选择适当的去污剂和色谱介质，能够在一个纯化步骤中成功地对目标蛋白质进行纯化。其目的是纯化重组氨基酸标记的膜蛋白，在非变性条件保持膜蛋白的特性。关于这项工作的一份更详细的说明，包括大小和电荷同质性的结果，可以在应用指南18-1128-92找到。

靶蛋白

组氨酸标记的细胞色素氧化酶bo 3 泛醇氧化酶，来自大肠杆菌。

源材料

组氨酸标记的细胞色素氧化酶bo 3 泛醇氧化酶在大肠杆菌的膜内积累。

样本提取和澄清

膜制备

膜蛋白需要使用去污剂提取。每次均需测试去污剂的浓度和种类。

离心获取细胞并在-80℃冷冻。冷冻细胞与200mM Tris-HCl (pH8.8)、20mM Na₂-EDTA、500mM蔗糖混合，室温轻轻搅拌。

添加10 mg/ml溶菌酶（在缓冲液中），搅拌30分钟。离心去上清。沉淀物重悬于5 mM Na₂-EDTA（pH 8.0，加入了PMSF），搅拌10分钟。加入氯化镁（终浓度为10 mM）和少量DNase I酶结晶，搅拌5分钟。液体超声3 × 1分钟。离心去除完整细胞，高速离心分离膜物质，重悬于50 mM Tris-HCl (pH8.0) 和 250 mM NaCl中，再次高速离心得到沉淀。膜颗粒冷冻储存。

膜蛋白的增溶作用

膜蛋白沉淀用冰冷的1%的十二烷基-β-D-麦芽苷（非离子型去污剂）在20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 300 mM氯化钠溶液中，并加入5 mM咪唑溶液融解。溶液在冰浴上搅拌30分钟。通过离心将不能溶解的物质去除。非离子型去污剂的存在避免了变性条件和干扰了纯化步骤，同时维持了膜蛋白的可溶性。

捕获

由于膜蛋白的不稳定性和有相互铰链的趋势，在较低的温度下使用快速的纯化步骤经常是非常关键的。对于带有组氨酸标记的膜蛋白，使用HiTrap螯合物柱可以使捕获步骤具有高的亲和性和选择性，如图26所示。这个技术也能够去除污染的蛋白质、DNA、类脂和低分子量的物质和在使用去污剂溶液中可以使去污剂-蛋白质结合物平衡。这个技术不受非离子去污剂存在的影响。缓冲液和分离步骤要按照HiTrap 螯合色谱柱推荐使用的缓冲液和分离操作进行。

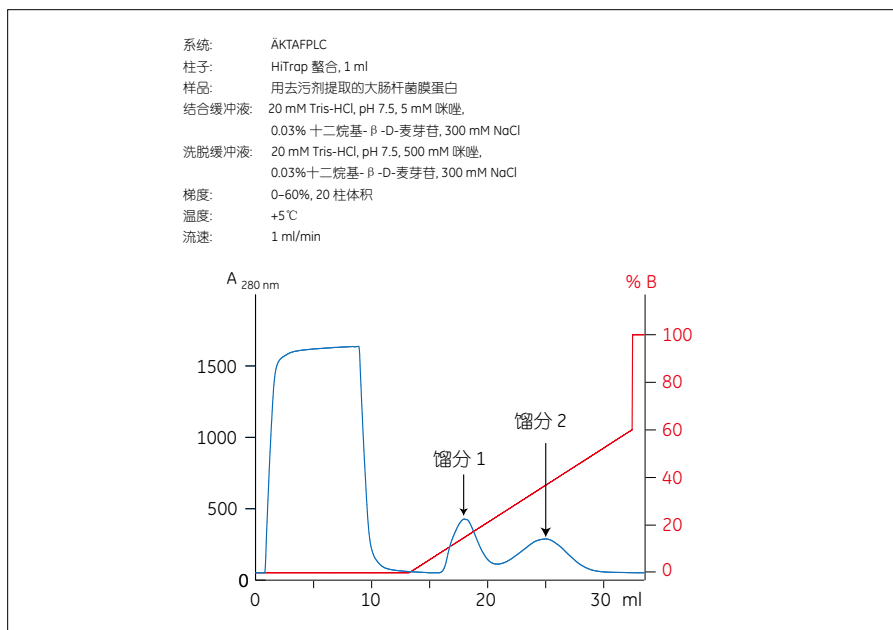


图. 26. 利用HiTrap 螯合柱子进行一步法的纯化

中度纯化和精细纯化

由于在样品的捕获阶段选用具有高选择性的纯化技术对膜蛋白进行纯化，使纯化的膜蛋白达到足够的纯度，可以进行更进一步的特性研究，所以不是所有的蛋白都需要对中间产物进行纯化或者最后阶段的精细纯化，如果一步纯化就可以达到如图所示的纯度（电泳分析所示）。

结果分析

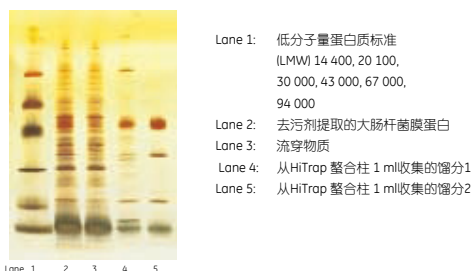



图. 27. SDS 电泳，使用PhastGel 8~25%，银染。

为了确定最后的纯度，收集的片段用SDS-PAGE进行分离，PhastSystem™进行银染，随后的分离和染色步骤按照提供的操作指导进行。图27所示，图中所示2个片段的细胞色素b3的四个亚基。片段2是基本上纯的，然而片段1中有污染物。

第8章

样品存放条件

推荐应用于生物样本


 使生物样本在一个封闭的容器中并维持冷藏的环境，使细菌的生长和蛋白酶活性降到最低。避免存放条件接近于样品稳定性临界线（如极端pH，pH值接近于目标蛋白的等电点或者盐浓度，还原剂或者螯合剂）。对于样品的存放时间超过24小时，需要在样品中添加抑菌剂，但是需要选择适宜的抑菌剂确保样品在随后的步骤中具有兼容性。长期存放需要将蛋白进行冷冻或者分装成小管进行冻干（避免那些可能降低蛋白活性的重复冻融或者冻干/再溶解的操作）。那些将要被冻干的样品应该溶于易挥发的缓冲液中，如表7所示。

应该注意到在冷冻和溶解过程中能够形成浓度梯度，这样可能会形成在极端条件下导致蛋白质降解。如果需要的话，可以加入稳定剂。经常需要对纯化蛋白进行存放。

表 7. 挥发性缓冲液系统.

挥发性缓冲液系统，使用离子交换色谱			
pH 范围	缓冲液系统	平衡离子	pK-缓冲离子的值
2.0	甲酸	H ⁺	3.75
2.3-3.5	吡啶/甲酸	HCOO ⁻	3.75; 5.25
3.0-5.0	三甲胺/甲酸	HCOO ⁻	3.75; 9.25
3.0-6.0	吡啶/乙酸	CH ₃ COO ⁻	4.76; 5.25
4.0-6.0	三甲胺/乙酸	CH ₃ COO ⁻	4.76; 9.25
6.8-8.8	三甲胺/HCl	Cl ⁻	9.25
7.0-8.5	氨水/甲酸	HCOO ⁻	3.75; 9.25
8.5-10.0	氨水/乙酸	CH ₃ COO ⁻	4.76; 9.25
7.0-12.0	三甲胺/碳酸盐	CO ₃ ²⁻	6.50; 9.25
7.9	碳酸氢铵	HCO ₃ ⁻	6.50; 9.25
8.0-9.5	碳酸铵/铵盐	CO ₃ ²⁻	6.50; 9.25
8.5-10.5	氨基乙醇/HCl	Cl ⁻	10.0
8.5	碳酸铵	CO ₃ ²⁻	6.50; 9.25

对于已纯化蛋白的推荐存放方法

 存放在高浓度的硫酸铵溶液中（如4 M）。冻存在50%的甘油中，特别适用于酶。加入稳定性试剂，如甘油(5-20%)，血清白蛋白（10 mg/ml）配基（浓度的选择依据活性蛋白的浓度）。无菌过滤器防止细菌生长。

样品提取和澄清步骤

样品提取

样品的提取步骤应该按照蛋白质的来源进行选择，例如细菌、植物或者哺乳动物，细胞内或者细胞外的蛋白质。使用最温和的操作，因为细胞或者组织的破碎会释放出蛋白水解酶和对溶液产生普遍的酸化作用。提取技术的选择在很大程度上依赖于可以使用的设备和操作的规模以及样品的类型。表8所示的是普通提取过程的例子。提取过程应该在低温环境中，在维持适宜的pH值和离子强度的缓冲液中快速进行，并且能够维持样品的稳定性。在开始进行色谱分离前，样品应该是干净的并且没有颗粒杂质。

表 8. 通常的样品提取步骤。

提取步骤	典型的条件	蛋白质来源	注释
一般	2个柱体积的水加到	红细胞, 大肠杆菌	较低的产量, 但是
细胞裂解(渗透压休克)	1个柱体积的预冲洗细胞	周质; 细胞内蛋白质	较少的蛋白酶被释放
酶消化	溶菌酶 0.2 mg/ml, 37 ° C, 15 mins.	细菌; 细胞内 蛋白质	仅仅用于实验室规模, 经常与机械破碎相结合
手动均质化	按照仪器的指导 说明进行	肝组织	
绞碎 (研磨)	"	肌肉	
适中的 刀片均质化	按照仪器的指导 说明进行	肌肉组织, 大多数 动物组织, 植物组织	
用研磨基进行研磨 例如 沙子	"	细菌, 植物组织	
强力的超声处理或者 砂磨剂	按照仪器的指导 说明进行	细胞悬液; 细胞内 蛋白质, 在细胞 浆中、细胞周质 中, 包涵体	小规模, 核酸的释放 可能会导致黏度的 问题, 包涵体必须 是可溶的
Manton-Gaulin 均质化 处理机	按照仪器的指导 说明进行	细胞悬液	仅仅适用于大规模 纯化
弗氏细胞压碎器	按照仪器的指导 说明进行	细菌, 植物细胞	
分级沉淀	见片段沉淀章节	细胞外的: 分泌的重组 蛋白质, 单克隆抗体 细胞裂解物	沉淀物必须是可 溶解的

细节来自于蛋白纯化，原理和实践, R.K. Scopes 和其它领域。

缓冲液和添加剂

随着对目标蛋白稳定性和其它特性的了解，添加剂可以维持到最低程度。这样有助于避免添加剂在分析或者其它操作步骤中所产生的干扰，并且可以避免在后期的纯化阶段使用额外的纯化步骤来去除添加剂。表9所示的是缓冲液和添加剂一起使用的例子。

表 9. 在样品沉淀中常用的试剂

	使用的典型条件	目的
缓冲液组成 Tris	20 mM, pH 7.4	维持pH, 使由于溶酶体破裂导致的酸性最小
NaCl	100 mM	维持介质中的离子强度
EDTA	10 mM	降低氧化损伤, 螯合金属离子
蔗糖或者葡萄糖	25 mM	使溶酶体膜稳定化, 减少酶蛋白的释放
离子型去污剂或者 非离子型去污剂	See 表 10	膜内在蛋白质的提取和纯化使不好溶解的蛋白质增溶
DNA酶和RNA酶	1 µg/ml	降解核苷酸, 减少样品溶液的粘滞性
蛋白酶抑制剂* PMSF	0.5 - 1 mM	抑制丝氨酸蛋白酶
APMSF	0.4 - 4 mM	丝氨酸蛋白酶
苯甲脒-HCl	0.2 mM	丝氨酸蛋白酶
胃酶抑素	1 µM	天冬氨酸蛋白酶
亮肽素糜蛋白	10 - 100 µM	半胱氨酸和丝氨酸蛋白酶
酶抑制素	10 - 100 µM	胰凝乳蛋白酶, 木瓜蛋白酶, 半胱氨酸蛋白酶
抗痛素-HCl	1 - 100 µM	木瓜蛋白酶, 半胱氨酸蛋白酶和丝氨酸蛋白酶
EDTA	2 - 10 mM	依赖于金属的蛋白酶, 锌和铁
EGTA	2 - 10 mM	依赖于金属的蛋白酶, 例如钙
还原剂 1,4二硫苏糖醇, DTT	1 - 10 mM	保持被还原的半胱氨酸残基
1,4二硫赤藓糖醇, DTE	1 - 10 mM	"
巯基乙醇	0.05%	"
其它 甘油	5 - 10%	使样品在溶液中稳定, 如果需要的话, 可以使用 50%的甘油

PMSF - 苯甲磺酰氟

APMSF - 4-氨基苯-甲磺酰氟

PMSF 是一种危险的化学品. 在水中的半衰期为35 分钟. PMSF 经常以10 mM 或者 100 mM 的浓度溶液储存(1.74 或者17.4 mg/ml 在异丙醇中) 在 - 20° C存放.

* 蛋白酶抑制剂可以用于来自几个提供者的预制混合液中.

详细的信息摘自蛋白质纯化,原理和实践 R.K. Scopes. 1994, Springer., 蛋白质纯化原理,高分辨率方法和应用, J-C. Janson 和 L. Rydén, 1998, 2nd ed. Wiley VCH 和其它来源.

去污剂

经常使用非离子型去污剂对完整膜蛋白进行提取和纯化。最适宜的去污剂的选则经常是要经过反复试验的。所使用去污剂的浓度经常要在接近或者高于临界的胶束浓度。即去污剂单体开始相互铰链的浓度。这个浓度依赖于去污剂的类型和试验条件。表10所示的是离子型和非离子型去污剂。要调整去污剂浓度达到最佳的结果，经常需要考虑所纯化蛋白质的活性和产量的平衡。在纯化进行过程中，降低样品提取中所使用的去污剂的浓度是可以的。然而，一定水平的去污剂的浓度在整个样品纯化步骤中是维持样品可溶性所必需的。去污剂可以通过吸附色谱技术进行交换。(参考: 苯基Sephacrose 为介质的去污剂交换色谱法: 它的应用及交换去污剂结合的膜蛋白. 生物化学 23, 1984, 6121-6126, Robinson N.C., Wiginton D., Talbert L.)

表 10. 离子型去污剂和非离子型去污剂的例子。

十二烷基硫酸钠	0.1 - 0.5%	变性蛋白质, 用于SDS-PAGE 使用非离子型去污剂避免变性
Triton™ X-100	0.1 %	使用非离子型去污剂用于膜蛋白的 membrane 增溶作用 注释: 在280 nm处可能有很强的吸收!
NP-40	0.05 - 2%	"
十二烷基 β D-麦芽苷	1%	"
辛基 β D-葡萄糖苷	1 - 1.5%	"

关于去污剂的更为详细的信息:蛋白质纯化, 原理, 高分辨率方法和应用

J-C. Janson 和 L. Rydén, 1998, 2nd ed. Wiley VCH.

样品澄清


离心




在第一次使用色谱步骤前使用离心方式澄清样品。去除脂类和颗粒状物质。

对于小量的样品体积和那些经过过滤的非特异性吸附的物质: 10000g离心15分钟; 对于细胞匀浆, 离心40000~50000g30分钟。

超滤

 在进行第一步色谱分离前使用。去除盐类和浓缩样品。

针对不同的分子量，从1000到300000，可以使用不同临界限的超滤膜。这个过程比凝胶过滤要慢，因为膜产生的阻塞作用。


 在一个实验运行过程中检查目标蛋白的回收率。一些蛋白可以产生非特异性吸附到膜表面。

过滤


 在第一次色谱分离前使用。去除颗粒物质。适用于小样品体积。

在色谱分离前对样品制备，按照色谱介质中分离颗粒的大小选择过滤器。

过滤器大小	色谱介质中颗粒的大小
1 μm	90 μm 和更大的珠子
0.45 μm	3, 10, 15, 34 μm
0.22 μm	除菌过滤或者额外净化样品

 在完成一个试验运行过程中检查目标蛋白的回收率。一些蛋白可以非特异性的吸附到膜表面。

凝胶过滤 (对于澄清或者条件限制性样品)

 在色谱纯化步骤前或者两步色谱纯化步骤之间使用。针对小样品体积或者大样品体积的快速处理。从样品 $M_r > 5000$ 中去除盐类。

Sephadex G-25 被用于实验室制备和大规模的制备和澄清样品。一般情况下，加载的样品体积可以达到总柱体积的30%。在一个单一步骤中，样品被脱盐，经过缓冲液交换进入到一个新的缓冲体积中，并且低分子量的物质被去除。在这一步骤中，大的体积容量和快的速度可以使大体积的样品被快速的有效的处理。加载大的样品体积可以导致在分离中样品被最低限度的稀释。典型的洗脱过程如图28所示。

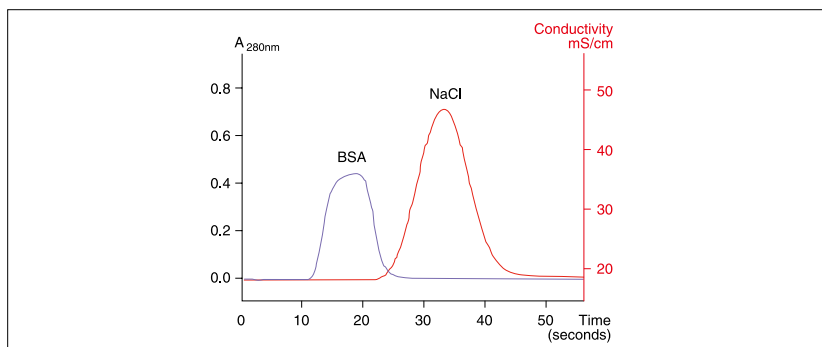


图28 典型的样品脱盐和缓冲液交换的图形

方法学

从下表中选择预装脱盐柱

预装柱	加载的样品体积	回收的样品体积	编号
Hi Prep 脱盐柱 26/10	2.5~15ml	7.5~20ml	17-5087-01
Hi Prep 脱盐柱	0.25~1.5ml	1.0~2.0ml	17-1408-01
快速脱盐 PC 3.2/10	0.05~0.2ml	0.2~0.3ml	17-0774-01
PD 10 脱盐	1.5~2.5ml	2.5~3.5ml	17-0581-01

柱子填装

下列指导原则可以适用于任何规模的操作

柱子直径=典型的10~20厘米的柱床高度

硅胶的量=5倍的样品体积

对于装填Sephadex G-25，可以将任何颗粒直径大小的介质装填到柱子中（超级精细纯化，精细纯化，中等和粗糙）。如果改变颗粒直径的大小将会改变流速和上样的体积（见图29）。对于实验室规模的分离纯化，使用Sephadex G-25精细纯化的颗粒介质，并且平均柱床高度为15厘米。

关于装填Sephadex G-25，单个产品的装填说明含有更为详细的信息。

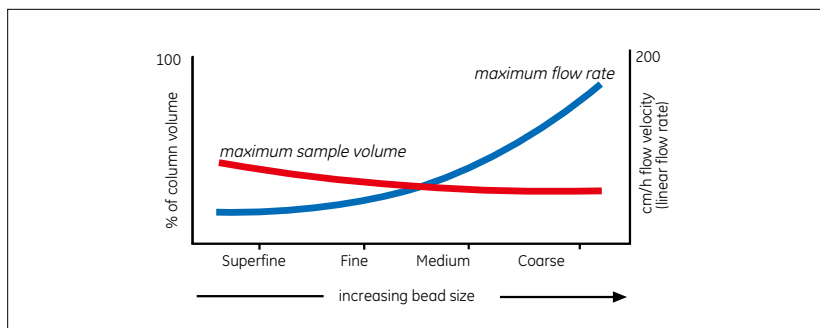


图 29 Sephadex G-25：样品体积和流速随介质颗粒大小的不同而变化

分段沉淀



在实验室规模下提取和澄清样品。用于部分纯化样品，具有浓缩样品的效果。在进行第一步色谱步骤之前使用。



大多沉淀技术不适合大规模的准备工作。

沉淀技术受温度、PH值和样品浓度的影响。调整参数以确保结果可重复。沉淀可以以三种不同方式进行，如图30所示。

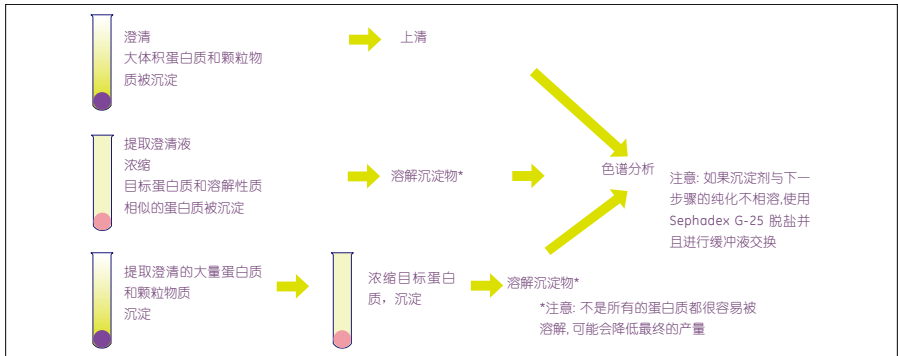


图. 30. 三种方法使用沉淀

表11是对沉淀技术的综述，对于两个常用的方法下面有详细的说明。

表 11. 沉淀技术示例

沉淀剂	典型的使用条件	样品类型	注释
硫酸铵	见后面的描述	>1mg/ml 蛋白质，特别是免疫球蛋白	稳定蛋白质，没有变性，可以直接利用疏水性相互作用纯化上清
硫酸葡聚糖	见后面的描述	样品中含有较多的脂蛋白，例如，腹水	沉淀脂类蛋白质
聚乙烯吡咯烷	加入3% (w/v), 搅拌4小时，离心，丢弃沉淀物	"	另外可以选择硫酸葡聚糖
聚乙二醇 (PEG, M.W. >4000)	20% 重量/体积	血浆蛋白质	非变性，可以直接利用离子交换色谱或者亲和色谱直接纯化上清。
丙酮	80% 体积/体积 在0 °C	用于多肽的沉淀或者样品的浓缩，为电泳做准备	完全去除沉淀剂可能会很困难，可能会引起蛋白质的不可逆变性
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%		"
硫酸链霉素	1%		沉淀核酸

细节摘自于蛋白质纯化,原理和实践, R.K. Scopes. 1994, Springer., 蛋白质纯化,原理,高分辨率方法和应用, J-C. Janson 和 L. Rydén, 1998, 2nd ed. Wiley VCH 和其它来源

硫酸铵沉淀法

材料:

饱和硫酸铵溶液: 100克硫酸铵加入100毫升的蒸馏水, 搅拌溶解;

1 M Tris-HCl pH 8.0

第一步色谱纯化所用缓冲液

步骤:

1. 样本过滤(0.45µm) 或者离心(冷却, 10000 g);
2. 以1: 10 (Tris-HCl: 样品) 的比例加入1 M Tris-HCl pH 8.0以维持pH值;
3. 轻轻搅拌, 一滴一滴地添加硫酸铵溶液 (在约20%饱和度时溶液变成乳状)。继续添加直至饱和度为50%*。搅拌1小时;
4. 10000g离心20分钟;
5. 舍弃上清液。以重悬于同等体积的相同浓度硫酸铵溶液中的方式, 将片状沉淀物洗两次 (此溶液即不会重新溶解沉淀的蛋白质, 也不会引起进一步的沉淀)。再次离心;
6. 用少量色谱用缓冲液溶解沉淀物;
7. 在用Sephadex G-25进行澄清液/缓冲液交换过程或疏水相互作用分离过程去除硫酸铵。

*可以调整百分比饱和度以沉淀靶分子或沉淀污染物。

根据不同的温度调整达到指定饱和度所需的硫酸铵量。表12显示20 °C所需硫酸铵量。

表 12. 需要加入的硫酸铵的数量达到给定的饱和度at 20 °C

根据蛋白质纯化进行价值计算, R. K. Scopes (Springer-Verlag, New York),Third Edition, p. 346, 1993.

起始的饱和百分比	最终的饱和溶液百分比																
	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
	每升溶液中加入的总的硫酸铵 (克) 20 °C																
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	114
90																0	37
95																	0
																	38

更进一步的关于温度的变化与饱和百分比浓度的变化的细节和关于沉淀技术的综述参看蛋白质纯化指导,在酶学中的方法, Vol. 182, p. 291 Academic Press 1990.

硫酸葡聚糖沉淀法

材料:

10%右旋糖酐硫酸

1 M氯化钙 第一步色谱纯化所用缓冲液

步骤:

1. 每1毫升的样本加入0.04 ml右旋糖酐硫酸溶液和1 ml氯化钙溶液。搅拌15分钟;

2. 离心(10000 g, 10 分钟), 去沉淀。

用Sephadex G-25交换澄清液/缓冲液, 去除右旋糖酐硫酸。

蛋白质沉淀的重溶

许多蛋白质很容易溶于少量下一色谱步骤所用的缓冲液中。表13所示的试剂可用于某些可溶性差的蛋白质。具体情况取决于特定的蛋白质。这些试剂一般会被去除, 以使蛋白质重新折叠, 并最大限度地恢复其数量和活性。色谱步骤往往会移除纯化过程所用的变性剂。

表 13. 变性剂示例.

变性剂	典型的使用条件	去除/注释
尿素	2 - 8 M	使用Sephadex G-25去除尿素
盐酸胍	3 - 8 M	使用Sephadex G-25 或者离子交换色谱去除变性剂
Triton X-100	2%	"
十二烷基肌氨酸钠	1.5%	"
N-辛基葡萄糖苷	2%	"
十二烷基硫酸钠	0.1 - 0.5%	在第一色谱步骤过程中交换非离子型去污剂, 避免阴离子交换色谱
碱性 pH	> pH 9, NaOH	在色谱过程中可能需要调节pH值维持可溶性

细节摘自蛋白质纯化,原理和实践, R.K. Scopes. 1994, Springer.,

蛋白质纯化, 原理, 高分辨率方法和应用, J-C. Janson 和 L. Rydén, 1998, 2nd ed. Wiley VCH 和其它来源

膨胀床吸附 (层析)



适用于大规模的重组蛋白和单克隆抗体纯化。该技术无需样品净化并可一步实现纯化、浓缩和捕获。

EBA可以被看作是样品制备和捕获结合在一个单一步骤的技术。添加粗制样品到层析介质的膨胀床, 捕获靶蛋白, 并且同时去除细胞碎片、细胞、颗粒物、完整细胞。液体逆流, 靶蛋白在缓冲液中解吸附。

第9章

纯化技术的原则和标准条件

离子交换（ IEX ）色谱

离子交换色谱根据负载电荷的不同分离蛋白质，分辨率高且对样品的容纳能力强。分离原理是基于带电蛋白质和带相反电荷的色谱介质之间的可逆相互作用。蛋白质结合到柱子上，然后改变条件，使结合物逐步被洗脱。

这种洗脱通常是通过增加盐的浓度或pH值的变化来进行，采用逐步调整或连续梯度进行洗脱。最常见的，使用盐（氯化钠）溶液进行梯度洗脱（图31）。通过结合过程浓缩靶蛋白，并且以纯化、浓缩的形式收集。

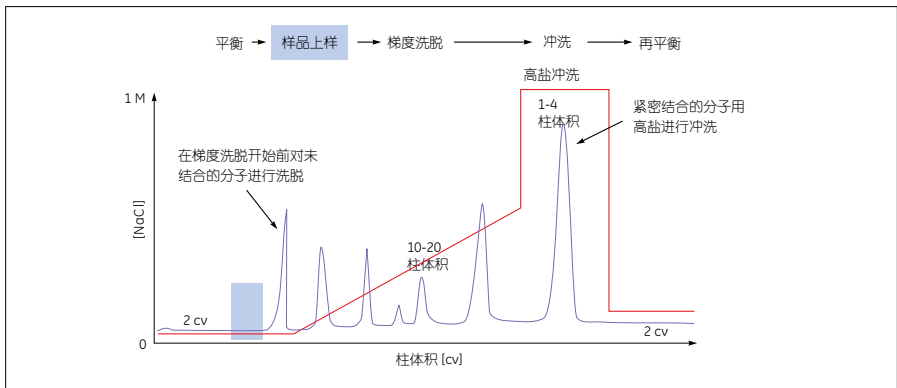


图. 31. 典型的离子交换梯度洗脱.

根据周围环境的pH值，蛋白质带不同的净表面电荷。当高于其等电点（PI）时，蛋白质结合到阴离子交换剂；低于其等电点时，蛋白质结合到阳离子交换剂。通常离子交换色谱是用来结合靶分子，但如果需要的话它也可以用来结合杂质。

离子交换色谱可以在不同的pH值重复进行，从而分离带有明显不同负载电荷特性的蛋白质，如图32所示。这在多步纯化步骤中很有优势，如第24页的范例中所示。

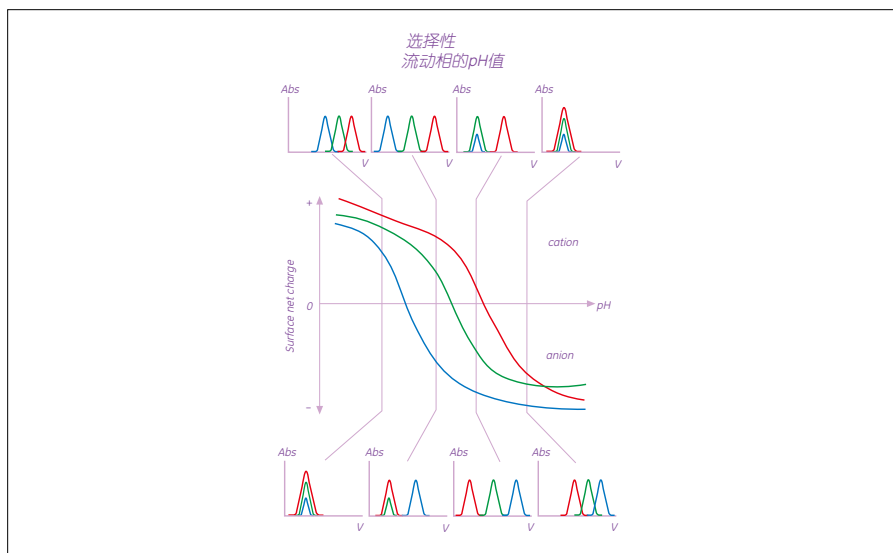


图 32. pH对蛋白质洗脱模式的影响.

选择离子交换剂

对于大多数的纯化步骤，建议首先使用强交换剂，确保在方法建立过程中，在一个较大的PH值范围内可使用该交换剂。如果等电点pH值低于7.0或不清楚，使用强阴离子交换剂(Q)结合靶分子。

强离子交换剂

Q（阴离子交换）、S和SP（阳离子交换）是在一较大pH值范围(pH 2 - 12)完全负载电荷。

弱离子交换剂

DEAE（阴离子交换）和CM（阳离子交换）在较窄的pH值范围内(分别为pH 2 - 9和pH 6 - 10) 完全负载电荷，但可作为分离的替代选择。

取样量和容量

离子交换层析技术是一项结合技术，不依赖于所提供的样品体积和较低的样品的离子强度，同时靶分子有较高的负载电荷。加载和结合到柱子上的蛋白质总量不应超过柱子本身的总结合能力。梯度洗脱的最佳条件是使用柱子约五分之一的总结合能力。

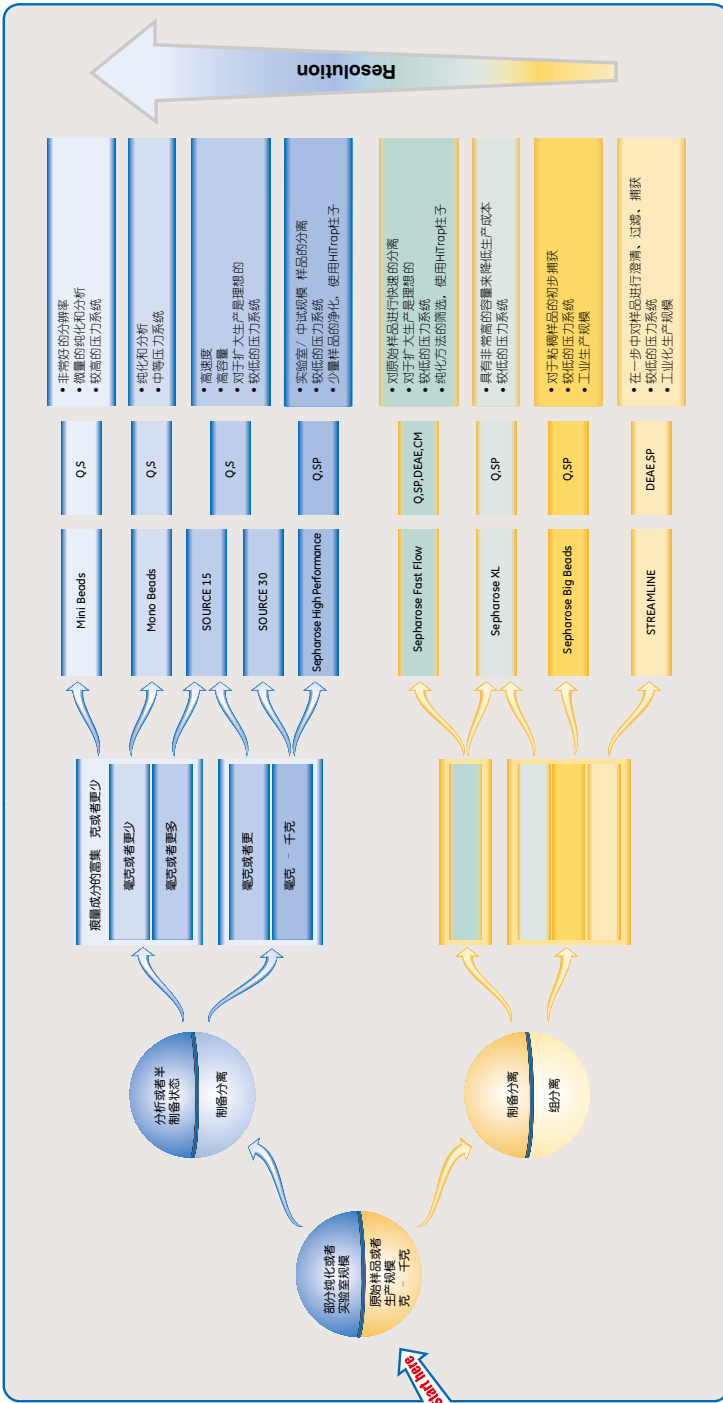


图. 33. 离子交换介质的选择指导. (Code no. 18-1127-31)

选择介质

根据如下参数，如纯化的规模、要求的分辨率、分离的速度、样品的稳定性和介质的结合能力来考虑选择色谱介质。第75页的图33显示了如何选择离子交换介质。

样品制备

正确的样品制备，确保良好的分辨率，且延长柱子的使用寿命。确保上样时能高效率的结合，样本应该在开始时与缓冲液的pH值和离子强度相同。样品必须去除颗粒物，尤其是在使用粒径为34 μm或更小的介质时（见65页的样品纯化步骤详细情况）。

准备柱子

预填柱

为了提高方法建立过程中的速度和效率，利用小预填柱来筛选介质和优化纯化方法。HiTrap 离子交换试剂盒非常适合这种类型的工作，如图34所示。

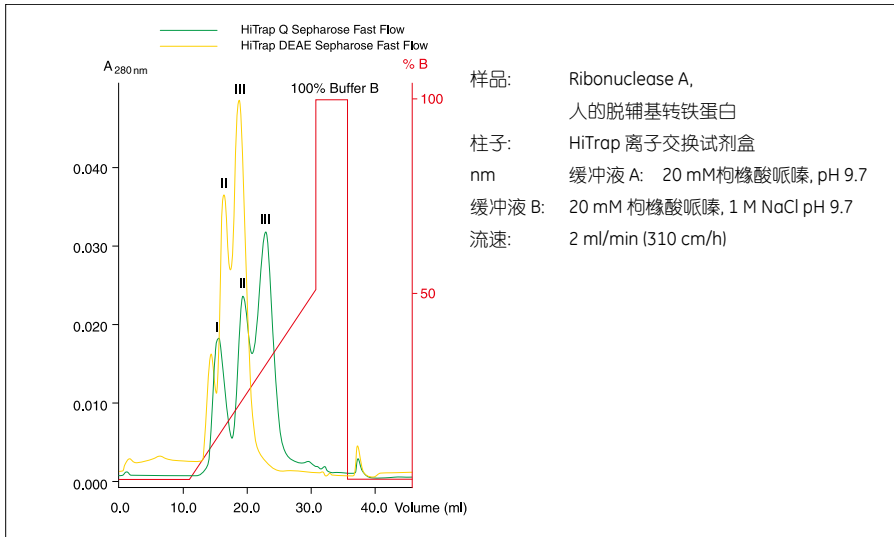


图. 34. 用HiTrap 离子交换试剂盒的2个柱子进行介质选择。使用任何规模的预填柱均能保证结果的可重复和高性能。

填充柱子


下列准则适用于各种规模:

柱尺寸=一般5-15厘米床高度。

凝胶量=估计结合样品所需的凝胶量，使用这一数额的五倍的凝胶量填充柱子。关于特殊介质的更为详细的信息请参看单个产品的装填指导说明

缓冲液的制备

缓冲液离子应该与选定的介质具有相同的电荷，其 pKa值与工作pH值相差应该在0.6pH单位内。缓冲液浓度应足以维持缓冲能力和稳定的pH值，在加载样品或增加盐浓度的情况下。

 当样品的带电特性不明时，首次尝试这些条件：

阴离子交换

梯度：0-100%洗脱缓冲液B，10-20个柱容积

开始缓冲液A：20毫米的Tris - HCl，pH值8.0

洗脱缓冲液B：20 mM Tris-HCl + 1 M NaCl, pH 8.0

阳离子交换

梯度：0-100%洗脱缓冲液B，10-20个柱容积

开始缓冲液A：20 mM Na₂HPO₄·2H₂O, pH 6.8

洗脱缓冲液B：20 mM Na₂HPO₄·2H₂O + 1 M NaCl, pH 6.8

方法建立（优先顺序）

1. 选择最佳的离子交换剂，使用小柱，如预先填充的HiTrap柱，从而节省时间、节约样品。
2. 探索最适pH值。如已知靶蛋白等电点，从离等电点0.5-1pH处开始（见图32显示的洗脱方式与pH值相应变化）。
3. 选择最陡梯度，从而使选定的pH值达到可接受的分辨率。
4. 在维持分辨率和最小分离时间的前提下选择最高流速。对于特定的介质查阅建议流量。
5. 对于大规模的纯化，为减少分离时间和缓冲液的消耗，在方法优化后转为一步式洗脱，如图35所示。使用一步式洗脱时可能增加样品加载量。

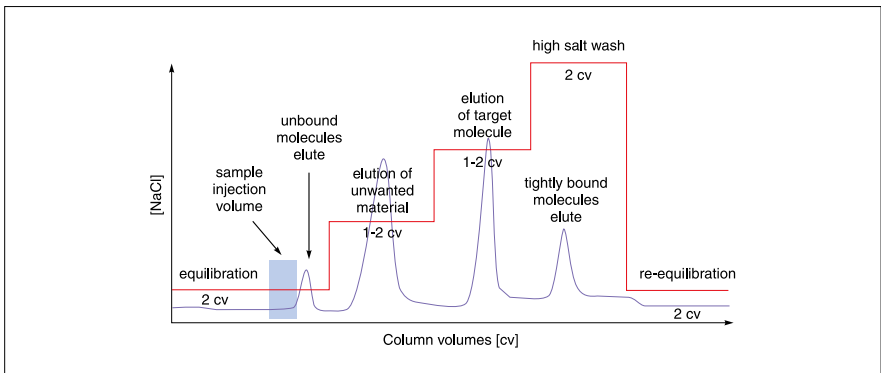


图. 35. 不连续洗脱。

净化、清洗和灭菌

根据不同类型的样品和介质进行。

介质和预填柱包装内附有指南。

介质和柱子的存储

介质和预填柱包装内附有推荐条件。

其它资料

离子交换层析：原理与方法编号：18-1114-21。

疏水性相互作用色谱（HIC）

疏水性相互作用色谱根据蛋白质疏水性的差异分离蛋白质。这项技术非常适合捕获步骤或中度纯化步骤。分离的依据是蛋白质与层析介质的疏水表面之间可逆的相互作用。这种作用在高离子强度缓冲液中增强，从而疏水性相互作用层析成为硫酸铵沉淀或离子交换层析过程高盐溶液洗脱后理想的“下一步”。样品在高离子强度溶液（如1.5 M硫酸铵）中结合到柱子上。然后改变条件，使结合的物质逐渐洗脱下来。洗脱通常是通过降低盐的浓度（图36）。盐浓度要逐步调整或有一个持续减少的梯度。最常见的是通过硫酸铵盐浓度递减的梯度来洗脱样品。在结合过程中靶蛋白被集中，并以纯化和浓缩的形式被收集。其他洗脱程序包括降低洗脱液极性（乙二醇达到50%），使用促溶剂（尿素、盐酸胍）或使用去污剂，改变pH值或温度。

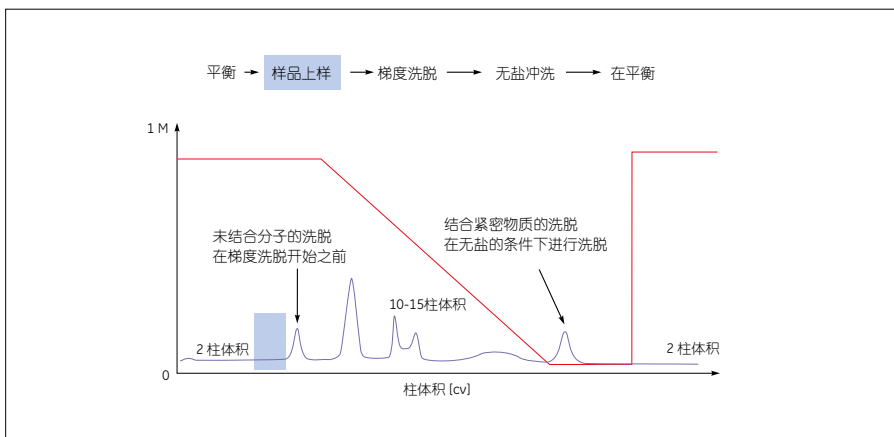


图. 36. 典型的疏水性相互作用的梯度洗脱

疏水性配体的选择

疏水性非常强的蛋白与强疏水性配体紧密结合，且对于靶蛋白或者污染物，可能需要极端的洗脱条件，如促溶剂或去污剂。为了避免这个问题，建议使用HiTrap 疏水性相互作用试剂盒或者RESOURCE疏水性相互作用试剂盒筛选几个疏水介质。如果样品有强疏水性基团，则首先选用低疏水性介质。选择在合理的低盐浓度水平下，达到最佳分辨率和承载能力的介质。通常情况下，蛋白质与配体结合能力递增顺序为：醚、异丙酯、丁酯、辛酯、苯基。然而，结合特性（无论是敏感度还是结合强度）都千差万别，需要个别检测。

取样体积和容量

疏水性相互作用是一种结合技术，因而不固定取样量，使选定的条件能使蛋白质紧密结合到柱子上。加载和结合到柱子上的蛋白质总量不应超过柱子本身的总结合能力。梯度洗脱的最佳条件是使用柱子约五分之一的总结合能力。

选择介质

在疏水性相互作用中，色谱基质以及疏水配体的特点均影响介质的选择。这些与下列参数，如样品的溶解度、所需分辨率、纯化规模以及在预期的规模下可用的介质，要一起综合考虑。图37是选择疏水性相互作用介质的指南。

样品制备

正确的样品制备，确保良好的分辨率，且延长柱子的使用寿命。确保点样时能高效率的结合，样本开始时应该与缓冲液的pH值和离子强度相同并处于高离子强度的溶液中（如1.5M 硫酸铵或4M NaCl）。样品必须去除颗粒物，尤其是在使用粒径34 μm或更小的介质时（见65页的样品纯化步骤详细情况）。

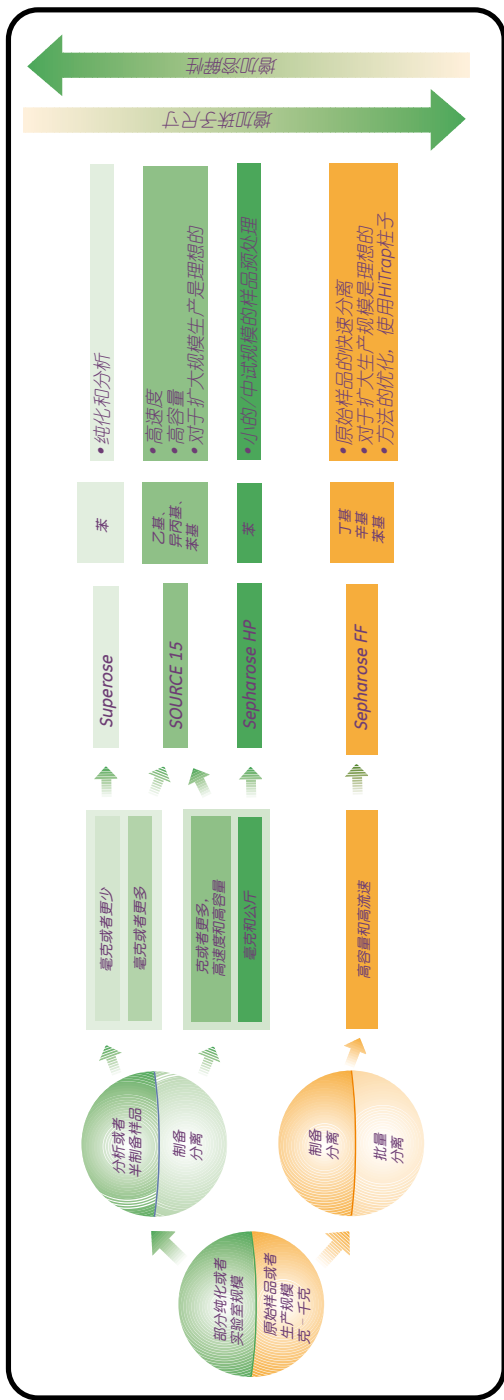


图. 37. 疏水性相互作用介质选择指导.

准备柱子

预填柱

为了提高方法建立过程中的速度和效率，利用小的预填柱来筛选介质和优化方法。HiTrap 疏水性相互作用试剂盒和RESOURCE疏水性相互作用试剂盒非常适合这种类型的工作。在任何规模的样品纯化中使用预装柱，可以确保结果的可重复性和高效性。图38显示用HiTrap 疏水性相互作用试剂盒筛选介质的结果。

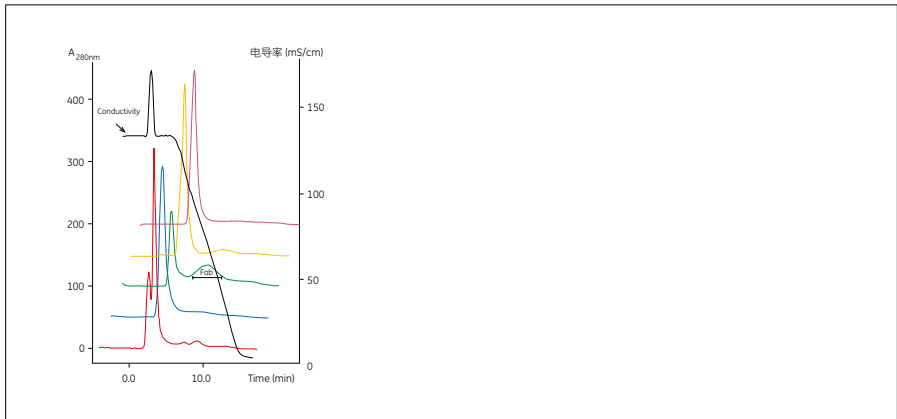


图. 38. 用HiTrap 疏水性相互作用试剂盒筛选介质.

填充柱子

下列准则适用于各种操作规模：

柱尺寸=一般5-15厘米床高度。

凝胶量=估计结合样品所需的凝胶量，使用这一数额的五倍的凝胶量来填充柱子。

关于特殊介质的更为详细的信息请参看单个产品的填充指导说明

缓冲液的制备

缓冲离子的选择对于疏水相互作用并不关键。选择适合蛋白质稳定性和活性的PH值。缓冲液浓度应足以缓冲加载样品时引起的pH值变化及改变盐的浓度后引起的pH值的变化。



当样品的疏水特性不明时，首次尝试这些条件：

梯度： 0-100%洗脱缓冲液B， 10-20个柱容积；

开始缓冲液A： 50 mM磷酸钠（pH值7.0） + 1 - 1.5 M硫酸铵；

洗脱缓冲液B： 50 mM磷酸钠（pH值7.0）。

方法建立（优先顺序）

1. 蛋白质的疏水特性是难以预料的，需仔细研究其结合条件。使用HiTrap 疏水性相互作用试剂盒或者RESOURCE疏水性相互作用试剂盒筛选介质，从而得到在所需的盐浓度范围内达到最佳的结合和洗脱效果。当样品的疏水特性不明时，从0-100%B开始(0%B=1 M 硫酸铵)。
2. 选择能达到可接受的分辨率的梯度洗脱。
3. 在维持分辨率和最小分离时间的前提下选择最高流速。对于特定的介质查阅建议的流量。
4. 对于大规模的纯化，为减少分离时间和缓冲液的消耗，在方法优化后转为阶梯洗脱，如图39所示。使用阶梯洗脱时可能增加样品加载量，这是大规模纯化的一个额外的好处。

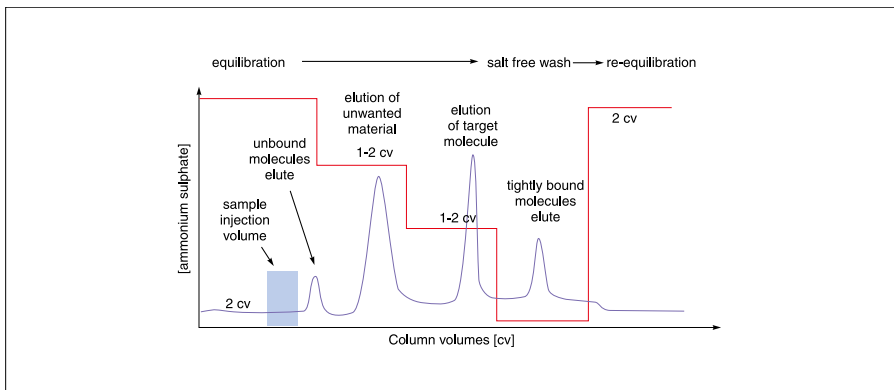


图. 39. 阶梯式洗脱。

5. 如果样品强烈吸附在凝胶上，可能会使引起蛋白质构象变化的条件发生改变，如pH值、温度、离子或有机溶剂。每种蛋白质由于这些因素导致的构象变化各不相同。使用筛选程序观察这些因素的效应。另外，可换用疏水性稍弱的介质。

净化、清洗和灭菌

根据不同类型的样品和介质进行。

介质和预填柱包装内附有指南。

介质和柱子的存储

介质和预填柱包装内附有推荐条件。

其它资料

疏水性相互作用色谱：原理与方法编号：18-1020-90。

亲和色谱(AC)

亲和色谱分离蛋白的原理是根据一种蛋白（或一组蛋白质）和色谱基质上一种特定的配体间可逆的相互作用。这项技术是捕获或中度纯化步骤理想的选择，只要靶蛋白有合适的配体就可以使用该技术。亲和色谱具有高选择性、高分辨率，对于靶蛋白通常还有高容纳能力。

靶蛋白与一种可与之发生互补结合的物质（配体）特异性的可逆的结合在一起。在有利于靶蛋白与配体间产生特异性结合的条件下加样。未结合的物质被洗去，然后选择最佳的洗脱条件使结合的靶蛋白复原。洗脱可以利用特异性的竞争性配体，或非特异性的洗脱条件，如通过改变pH值、离子强度或极性来进行洗脱。在结合过程中靶蛋白被集中，并以纯化和浓缩的形式被收集。分离的关键阶段如图40所示。亲和色谱法也可用于去除特定的污染物，例如 苯甲脒 Sepharose 6B可用于去除丝氨酸蛋白酶。

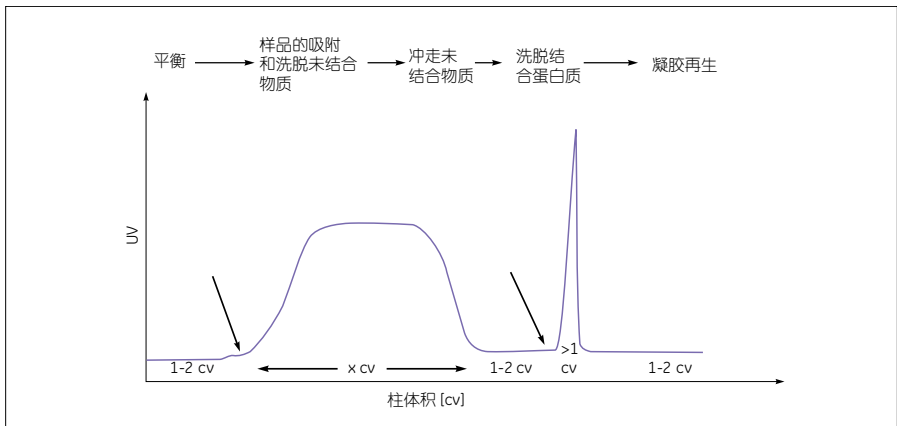


图. 40. 典型的亲和色谱分离.

取样体积和容量

亲和色谱技术是一种结合技术，因而不依赖于取样量，如果所选定的条件能紧密结合蛋白质。

选择介质

选择介质时应考虑纯化的规模和可用的商品化亲和介质等因素。为了节省时间，并确保可重复性，使用预填柱来建立方法或进行小规模纯化。HiTrap亲和柱非常适合这项工作。34页的表6显示的是预填亲和柱的例子。特异性的亲和介质是根据推荐的偶联步骤，将配体偶联到选定的凝胶基质而制成的。

样品制备

正确的样品制备能确保有效的结合，且延长柱子的使用寿命。关键是去除可能存在的非特异性结合到柱子上的污染物，如脂类。苛刻的冲洗过程可能会破坏亲和介质的配体，从而影响柱子的结合能力。样品必须去除颗粒物（见第8章的样品纯化步骤详细情况）

准备柱子

预填柱

预填柱能确保高效能和结果重复性。

填充柱子

下列准则适用于各种规模：

柱尺寸=短且宽。

凝胶量=根据介质已知的结合能力计算（2-5倍的容纳能力）。

缓冲液的制备

每种亲和介质都有特定的结合、洗脱和复原缓冲液。根据介质或柱子所提供的说明使用。

1. 选择能够特异性结合靶蛋白的配基。依照制造商的说明选定结合和洗脱条件，查看对于特定介质的推荐流速。
2. 选择最佳流速，以实现高效率的结合。
3. 选择洗脱的最佳流速，以达到最高的回收率。
4. 选择柱子再生的最大流速，以尽量减少运行时间。

净化、清洗和灭菌

根据不同类型的样品和介质进行。

介质和预填柱包装内附有指南。

介质和柱子的存储

遵照制造商的说明。

其它资料

亲和层析法：原理与方法编号：18-1022-29

凝胶过滤（GF）

凝胶过滤层析是根据分子大小的差别分离蛋白。这项技术是纯化过程最终的精细纯化步骤所采用的理想技术，此时样品量已被减少（在凝胶过滤中，样本量明显影响速度和分辨率）。样品在同等条件下洗脱（单一缓冲液，没有梯度，如图41所示）。改变缓冲液条件，以适应不同类型的样品或进一步纯化、分析或储存的要求，这是因为缓冲液组成并不直接影响分辨率。在选定的缓冲液中，蛋白以纯化的形式收集。

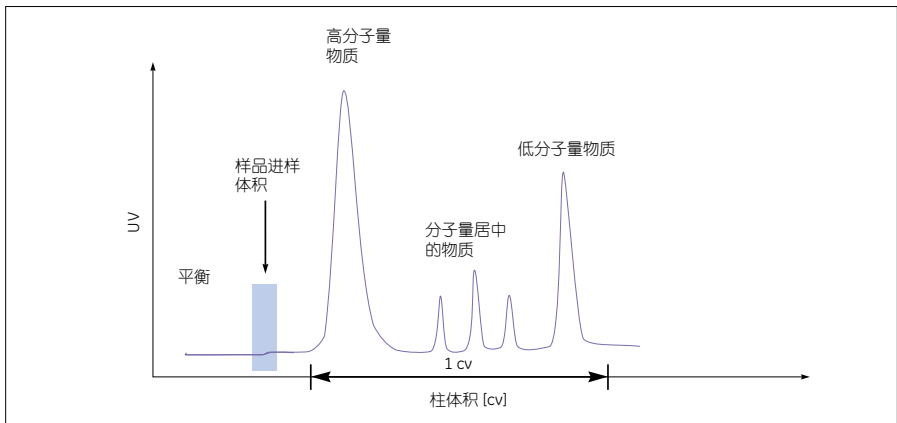


图. 41. 典型的凝胶洗脱。

取样量和容量

为了达到最高分辨率，样本量不得超过柱子总容量的5%。凝胶过滤不限定样品浓度，但如果蛋白高于50毫克/毫升，粘度的影响可能会造成'指纹效应'。非常粘稠的样品应稀释。

片段范围 (球状蛋白质)

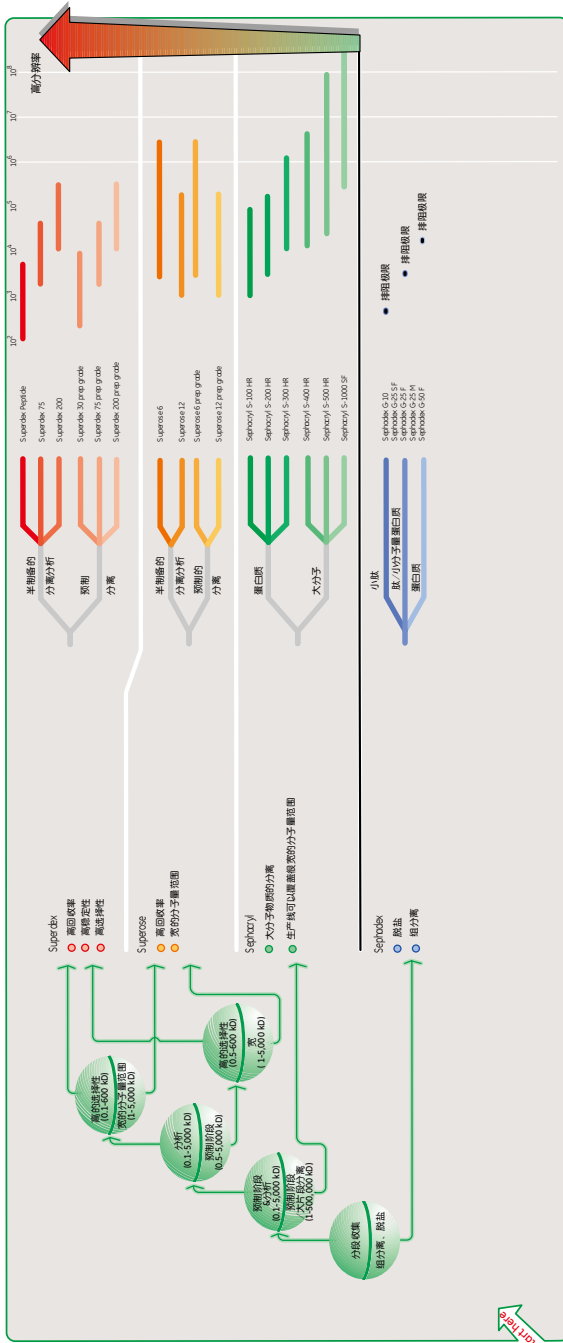


图 42. 凝胶过滤介质筛选指导原则代码: 18-1124-19.

选择介质

选择凝胶过滤介质时应考虑下列参数，如靶蛋白和污染物的分子量、要求的分辨率、纯化规模。79页的图42显示了选择凝胶过滤介质的指南。

样品制备

正确的样品制备能确保高分辨率，且延长柱子的使用寿命。样品缓冲液并不直接影响分辨率。在分离过程中，样品缓冲液与柱子里的缓冲液交换。粘稠的样品可能会导致增加柱子的反压和影响柱包装，因此应稀释使用。样品必须去除颗粒物，尤其是使用粒径 $34\ \mu\text{m}$ 或更小的介质时（见60页的样品纯化步骤详细情况）。

准备柱子

预填柱

使用预填柱能保证结果的可重复性和高性能。

填充柱子

在凝胶过滤中，良好的柱子填充是至关重要的。两条分离色带的分辨率与柱长的平方根成正比。适用下列准则：

柱尺寸：=最低50厘米床高度（Sephacryl）/最低30厘米床高度（Superdex， Superose）

床体积=取决于每次的取样量（最多5%的床体积）

缓冲液的制备

缓冲液离子并不直接影响分辨率。选择收集纯化产物所需的缓冲液并能维持蛋白质稳定性和活性。缓冲液浓度应足以维持缓冲能力及稳定pH值。缓冲液中离子强度可达到150 mM NaCl，以避免与基质间非特异性的离子作用（显示为洗脱峰值的延迟）。



当使用一个新的样本，尝试这些条件：

缓冲液：50mM磷酸钠，pH7.0 + 0.15 M氯化钠；

或选择样品下一步洗脱所用缓冲液。

方法建立（优先顺序）

1. 选择介质，使靶蛋白和污染物能够产生最好的分离效果。
2. 在维持分辨率和最小分离时间的前提下选择最高流速。对于特定的介质查阅建议的流量。低流速有利于提高高分子量组分的分辨率，而高流速有利于提高低分子量组分的分辨率。
3. 在不降低分辨率的前提下，确定最大样本量（样本量应在0.5-5%的总柱子容量）。
4. 为了进一步提高分辨率，以串联两根柱子的方式增加柱长。

净化、清洗和灭菌

根据不同类型的样品和介质进行。

介质和预填柱包装内附有指南。

介质和柱子的存储

介质和预填柱包装内附有推荐条件。

其它资料

凝胶过滤层析：原理与方法 编号：18-1022-18

反相色谱 (RPC)

反相色谱技术分离蛋白和多肽的原理是根据它们与色谱介质的疏水表面间可逆的相互作用。加样后，蛋白质结合到柱子上，然后改变条件，使结合物逐步洗脱。因为根据反相色谱的性质，蛋白质结合的很紧密，需要使用有机溶剂和其他添加剂（离子配对试剂）来洗脱。洗脱通常是通过增加有机溶剂的浓度，最常见的是乙腈。样本在结合和分离过程中浓缩，并以纯化和浓缩的形式收集。分离的关键阶段如图43所示。

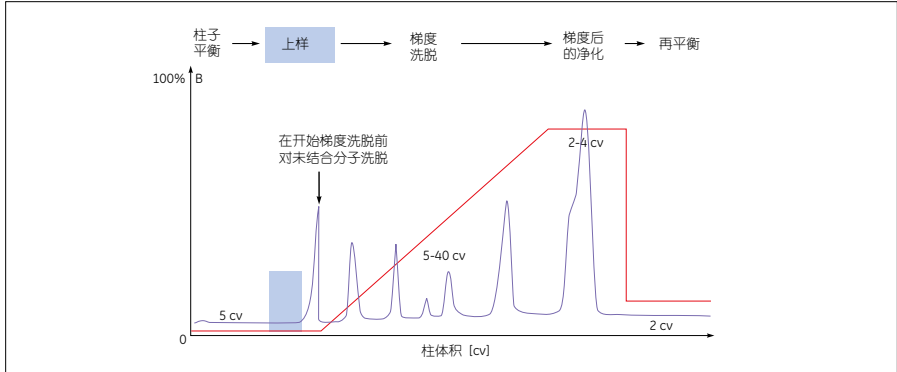


图. 43. 典型的反相色谱梯度洗脱。

反相色谱技术通常用于寡核苷酸和多肽的最后精细纯化阶段，是用于分析分离效果（如多肽图谱）可选用的理想技术。

如果蛋白质纯化后要求活性不变且重新形成正确的三级结构，则不推荐使用反相色谱技术，因为大部分的蛋白质在有机溶剂中会变性。

疏水性配体的选择

根据疏水性的需要选择疏水性配体。高疏水性分子与高度疏水性配体紧密结合，例如C18。

筛选几种反相色谱介质，如果样品有强疏水性成分（通常是大分子，如蛋白质），则首先从低疏水性介质开始。选择能达到最佳分辨率和最大承载能力的介质。某些介质的聚合物（SOURCE反相色谱）比硅介质有明显的优势，因为它可以在pH值范围1-14内使用。这样不仅可以作为硅介质的一种替代选择，而且可以用于方法优化，在一个广泛的pH范围内应用。

取样量和容量

反相色谱是一种结合技术，不限定样本量。总容量取决于实验条件以及凝胶和样品的性质。在最佳条件下进行梯度洗脱，筛选不使分辨率降低的加样方法。

选择介质

反相色谱中色谱介质同疏水配体一样，它的影响是有选择性的。推荐筛选不同的反相色谱介质。

样品制备

样品应去除颗粒物质，而且有可能时，溶解在起始缓冲液中。

准备柱子

在长期储存或改变缓冲系统后，反相柱在第一次使用时应进行条件限制。

缓冲液的制备

当样品性质未知时，尝试以下条件：

梯度：2-80 %洗脱液（20个柱体积）。

起始缓冲液A：0.065 %TFA（三氟乙酸）溶于水。

洗脱缓冲液B：0.05 %TFA溶于乙腈

方法建立（优先顺序）

1. 从筛选的结果选择介质。
2. 选择给出可接受的分辨率的梯度。对未知样品，从0-100%B开始。
3. 在维持分辨率和最小分离时间的前提下选择最高流速。
4. 对于大规模的纯化，转为阶梯洗脱。
5. 强烈吸附于凝胶的样本更容易从低疏水性介质上洗脱。

净化、清洗和灭菌

根据不同类型的样品和介质进行操作。

介质和预填柱包装内附有使用指南。

介质和柱子的存储

介质和预填柱包装内附有推荐的使用条件。

更多信息

www.apbiotech.com

膨胀床吸附技术（EBA）

膨胀床吸附技术是单一途径的操作，目标蛋白质从粗制品中被纯化，不需要分离净化、浓缩和初步净化去除颗粒物。原始样品在加载到经过特殊设计的含有STREAMLINE吸附颗粒的膨胀床的柱子中。目标蛋白质被捕获到吸附介质上。细胞碎片、颗粒物、整个细胞和杂质则流过柱子被去除。然后目标蛋白质被洗脱。

图44a 所示的步骤涉及到利用膨胀床吸附技术纯化和图44b 所示的是一个典型的膨胀床洗脱模式。

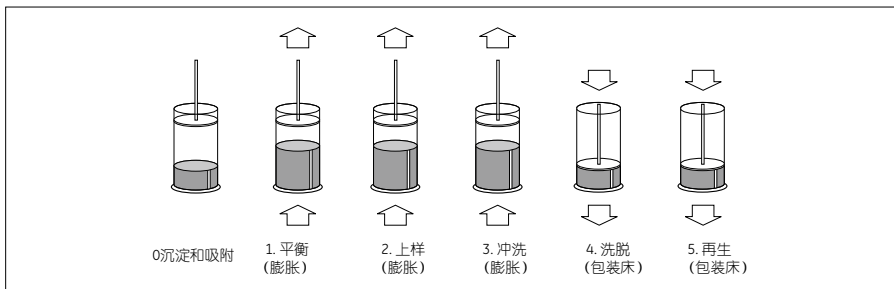


图. 44a. 膨胀床纯化过程的步骤。

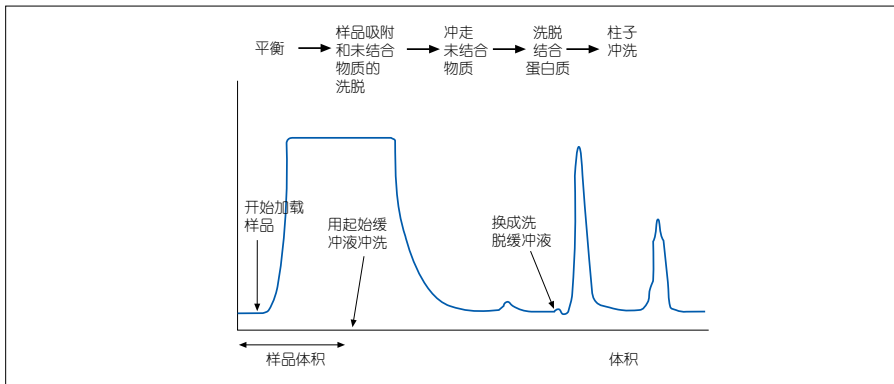


图. 44b. 典型的膨胀床洗脱。

STREAMLINE 吸附剂的选择

吸附剂的选择原则与色谱使用的介质的选择原则一样。选择那些与目标蛋白质能够产生最强结合的吸附剂并且与杂质的结合尽可能的弱，例如具有高选择性的介质和/或对感兴趣的蛋白质具有高的容量。

样品体积和容量

所有STREAMLINE 介质都是结合技术,不依赖于样品体积. 加载的总蛋白量不能超过柱子的总结合容量。

样品制备

STREAMLINE 能够处理粗制的, 含有颗粒的原料, 可以显著减少样品的制备步骤。根据使用的分离原理的不同（离子交换色谱、亲和色谱、疏水性相互作用色谱），或许需要调整样品液的pH或者离子强度。

柱子制备

在XK 16 或者 XK 26 色谱柱中填充柱床模式做预试验筛选STREAMLINE 介质。当使用膨胀床模式时，介质必须被填充到经过特殊设计的 STREAMLINE 柱子中,按照操作指导手册进行操作。

缓冲液准备

缓冲液的准备根据所选择的分离原理的不同而不同。

方法研制

1. 选择合适的配基结合目标蛋白质。
2. 使用净化的物质在已经填充的柱子上筛选最佳的结合条件和洗脱条件(0.02 - 0.15 升介质的柱床体积). 在筛选过程中或许使用梯度洗脱，但是最终目标是研制一步洗脱的方法。
3. 用未经澄清的样品在小规模的膨胀模式的条件下，筛选最佳的结合、洗脱、冲洗和净化条件。(0.02 - 0.15升介质的柱床体积)
4. 在中试试验中开始规模化操作(0.2 - 0.9升介质的柱床体积)
5. 大批量生产(达到几百升介质的柱床体积)

净化、清洁和灭菌

每种STREAMLINE 吸附剂均提供指导说明。

STREAMLINE 吸附剂和柱子的存放

每种STREAMLINE 吸附剂和柱子都提供推荐的存放条件。

更多信息

膨胀床吸附: 原理和方法 编号 18-1124-26

生物工艺介质

应用于大规模生产



从样品的捕获到样品的精细纯化，每一阶段所使用的色谱技术需要的特殊的生物工艺介质都已经被设计出来。大容量的产品与清晰的纯化顺序和传递过程相结合，保证了对生物工艺介质的使用是在适当的数量、适当的地方和适当的时间下进行使用的。Amersham Pharmacia Biotech 可以保证将来生物工艺介质的供应，可以使他们安全投资用于长期的生产。介质是按照证明有效可行的方法，并且是在严格控制的条件下进行生产和检验的，可以完全满足高的性能规范。每批订单上的分析证书都是有效和可用的。

常规的支持文件含有关于操作、稳定性、可提取的复合物和分析方法等详细的说明。在这些文件中最基本的信息是给出了非常重要的工序验证的起点，同时也提供了专家的支持。在每一阶段使用生物工艺介质可以导致一个很容易验证的生产过程。高流速、高容量和高的回收率有助于整个产业化生产过程的经济有效。所有的生物生产介质都具有化学的稳定性，可以允许有效的净化和卫生学过程。填充方法建立在适合宽范围的生产规模和兼容大规模柱子和可用的设备。

其它参考文献和资料

Antibody Purification	Code No. 18-1037-46
Recombinant Protein Handbook	Code No. 18-1142-75
Gel Filtration Principles and Methods	Code No. 18-1022-18
Ion Exchange Chromatography Principles and Methods	Code No. 18-1114-21
Hydrophobic Interaction Chromatography Principles and Methods	Code No. 18-1020-90
Affinity Chromatography Principles and Methods	Code No. 18-1022-29
Expanded Bed Adsorption Principles and Methods	Code No. 18-1124-26
Gel Filtration Columns and Media Selection Guide	Code No. 18-1124-19
Ion Exchange Columns and Media Selection Guide	Code No. 18-1127-31
HIC Columns and Media Product Profile	Code No. 18-1100-98
Affinity Chromatography Columns and Media Product Profile	Code No. 18-1121-86
Sample Clean-up, Proteins and Peptides	Code No. 18-1128-62
Convenient Protein Purification - HiTrap™ Column Guide	Code No. 18-1129-81
Protein and Peptide Purification Technique Selection	Code No. 18-1128-63
Protein Purification - major techniques poster	Code No. 18-1123-93
Protein Purification - strategies poster	Code No. 18-1129-75
Protein Purification, Principles, High Resolution Methods and Applications, J-C. Janson and L. Rydén, 1998, 2nd ed. Wiley VCH	Code No. 18-1128-68
Handbook of Process Chromatography, G.Sofer and L.Hagel, 1997, Academic Press	Code No. 18-1121-56
Protein Purification, Principles and Practice, R.K. Scopes. 1994, Springer Advanced Texts in Chemistry Ed. Springer Verlag New York Inc.	

HiTrap, Sepharose, STREAMLINE, Sephadex, MonoBeads, Mono Q, Mono S, MiniBeads, RESOURCE, SOURCE, Superdex, Superose, HisTrap, HiLoad, HiPrep, INdEX, BPG, BioProcess, FineLINE, MabTrap, MAbAssistant, Multiphor, FPLC, PhastSystem and ÄKTA are trademarks of Amersham Pharmacia Biotech Limited.

Amersham is a trademark of Amersham plc.

Pharmacia and Drop Design are trademarks of Pharmacia Corporation. Coamatic is a trademark of Chromogenix AB.

Coomassie is a trademark of ICI plc.

Triton is a trademark of Union Carbide Chemicals and Plastics Co. Tween is a trademark of ICI Americas Inc.

All goods and services are sold subject to the terms and conditions of sale of the company within the Amersham Pharmacia Biotech group that supplies them.

A copy of these terms and conditions is available on request.

© Amersham Pharmacia Biotech AB 2001 - All rights reserved.

Amersham Pharmacia Biotech AB Björkgatan 30, SE-751 84 Uppsala, Sweden

Amersham Pharmacia Biotech UK Limited Amersham Place, Little Chalfont, Buckinghamshire HP7 9NA, England Amersham Pharmacia Biotech Inc 800

Centennial Avenue, PO Box 1327, Piscataway, NJ 08855 USA Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH Munzinger Strasse 9, D-79111 Freiburg, Germany

Amersham Pharmacia Biotech KK, Sanken Bldg. 3-25-1, Hyakunincho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan

www.chromatography.amershambiosciences.com

