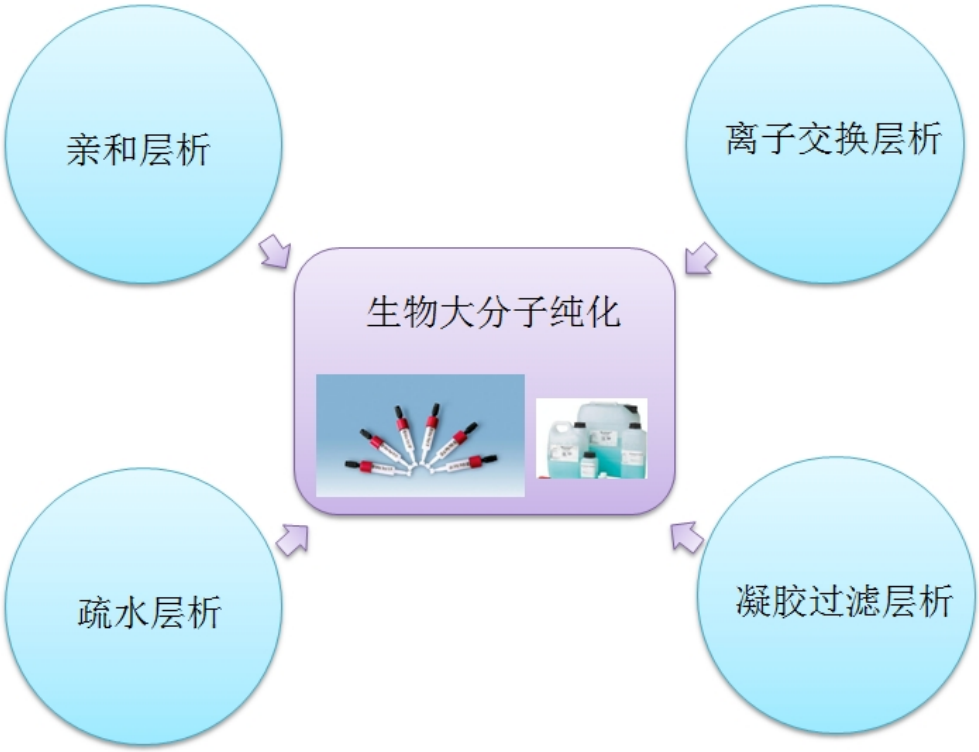
层析填料选择指南
金克隆

金克隆（北京）生物技术有限公司层析填料选择指南及产品目录 2018



总则

生物分子下游纯化的对象一般包括蛋白、酶、重组蛋白、单抗、抗体及抗原、肽类、病毒、生化分子等。纯化前首先需要测定生物分子的各物理和化学特性，然后通过实验选择出最有效的纯化流程。

《测定——分子量、PI》

■当目标蛋白的物理特性如分子量、PI 等都不清楚时，可用PAGE电泳方法或层析方法加以测定。分离范围广的填料很适合测定未知蛋白的分子量。用少量离子交换介质在多个含不同pH缓冲液的试管中，可简易地测出PI，并选择纯化用缓冲液的最佳pH。

《选择——层析方法》

■若对目标蛋白的特性或样品成分不太了解，可尝试几种不同的纯化方法：

（一）使用最通用的凝胶过滤方法，选择分离范围广阔的介质依据分子量将样品分成不同组份。

（二）用含专一配体或抗体的亲和层析介质结合目标蛋白。亦可用各种活化偶联介质偶联目标蛋白的底物、受体等自制亲和介质，再用以结合目标蛋白。一步即可得到高纯度样品。

（三）体积大的样品，往往使用离子交换层析加以浓缩及粗纯化。高盐洗脱的样品，可再用疏水层析纯化。疏水层析利用高盐吸附、低盐洗脱的原理，洗脱样品又可直接上离子交换等吸附性层析。两种方法常被交替使用于纯化流程中。

《纯化——大量粗品》

■处理大量原液时，为避免堵塞柱子，一般使用Sepharose Big Beads、SepharoseXL、SepharoseFast Flow 等大颗粒离子交换介质。将离心、超滤、初纯化结合为一。提高回收率，缩短纯化周期。

《纯化——硫酸氨样品》

■硫酸氨沉淀方法常被用来初步净化样品，经处理过的样本处于高盐状态下，很适合直接上疏水层析。若作离子交换，需先用SephadexG-25脱盐。疏水层析是较新的技术，随着介质种类不断增多，渐被融入各生产工艺中。低盐洗脱的样品可稍加稀释或直接上其它吸附性层析。

《纯化——糖类分子》

■固化外源凝集素如刀豆球蛋白、花生、大麦等凝集素，可结合碳水化合物的糖类残基，很适合用作分离糖化细胞膜组份、细胞、甚至亚细胞细胞器，纯化糖蛋白等。

■一般多糖纯化大多使用分子筛如Sephadex，Sephacryl。若分子量在600KD 以下，并需更高分辨率，可选择新一代的琼葡糖凝胶Superdex。一般植物可能含水溶性、酸溶性、碱溶性多种多糖。综合利用分子筛及离子交换层析有助进一步获各组份纯品。另外，多糖药物需去除可引起过敏反应的蛋白质，传统Sevag方法用丁醇脱蛋白需反复数十次。阴阳离子交换法可以一、两步快速去除多糖中残存的蛋白质。

《纯化——糖蛋白》

■偶联凝集素的琼脂糖凝胶FF可以分离各种糖蛋白，例如Con A 琼脂糖凝胶 FF可以纯化糖基化的蛋白，或者膜组分，甚至细胞等物质。此外硼酸琼脂糖凝胶FF也用来分离各种多糖和糖蛋白，其原理是苯硼酸类似于凝集素可以和各种糖基上的邻二羟基发生亲和作用，通过降低pH或者竞争洗脱的方法就可以纯化各种糖和糖蛋白。

《纯化——膜蛋白》

■膜蛋白相对有比较强的疏水性，可以用苯基或丁基填料做疏水色谱分离，如果是有糖基结构或者受体等，也可以用亲和色谱的方法。没有现成的亲和填料可以用活化好的填料去合成，还可以结合离子交换和凝胶过滤等色谱手段进一步纯化。

■膜蛋白分离常使用去污剂以保持其活性。离子性去污剂应选用与目标蛋白相反电荷者，避免在作离子交换时和目标蛋白竞争交换介质，以此除去去污剂。非离子性去污剂可以疏水层析除去。

《纯化——单抗、抗原》

■单抗多为IgG。来源主要是腹水和融合瘤培养上清液。腹水有大量白蛋白、转铁蛋白和宿主抗体等。Protein G和Protein A对IgG的Fc区有专一性亲和作用，能一步纯化各种不同来源的IgG（见附录）。重组Protein A对IgG有较高的载量和专一性，基团脱落更少。脱落的rProtein A 用离子交换Q Sepharose HP凝胶即可很容易去除。

■血清互补剂如小牛血清可先用Protein G预处理，在培养前除去IgG。

■疏水层析苯基-琼脂糖凝胶HP亦很适合纯化IgG。可有效去除抗体中的聚集体。

■纯化IgG 抗原最有效的方法是用活化偶联介质如CNBr、NHS activated 琼脂糖凝胶偶联IgG,再进一步获取IgG 抗原。

■ IgM Capture Bestarose 是用来纯化融合瘤细胞培养的单抗IgM的。IgY Capture Bestarose是专门用来纯化IgY的。

《纯化——重组蛋白》

■重组蛋白在设计和构建的时候应该已经考虑到了纯化的问题。在此，我们提供三个快速表达、一步纯化的融合系统。

一、HIS标签重组蛋白可以很方便用镍琼脂糖凝胶FF或镍NTA琼脂糖凝胶FF分离，填料已经螯合好了镍离子，使用非常方便，有更高的吸附载量，特异性更强，可以选择多种洗脱方式，是纯化这类融合蛋白的最佳工具，也可以选择HP级别高分辨率的填料。此外还可选择经济型Ni-Resin HP填料，特别适合离心操作。

二、GST融合蛋白在表达时同时表达了谷胱甘肽s转酶，很方便用GST琼脂糖凝胶FF分离，然后再用肠激酶或凝血酶等酶解就得到表达的产物。凝血酶可以用肝素琼脂糖凝胶FF或苯甲脒琼脂糖凝胶FF分离。此外还可选择经济型GST-Resin HP填料，特别适合离心操作。

三、Protein A融合载体使要表达的蛋白和Protein A 的IgG结合部位融合在一起表达，以IgG Sepharose 6FF 纯化，同时结合凝胶过滤层析，去除高聚体和杂蛋白。

《纯化——血浆蛋白》

■阴离子交换在血浆蛋白的纯化中应用非常广泛，结合低温乙醇法在丙种球蛋白纯化后期用DEAE-琼脂糖凝胶FF吸附二聚体等杂质从而达到提高产品纯度的目的，同样也可以在白蛋白纯化过程中使用阴离子交换吸附PKA、微量的IgG以及聚体，在凝血VIII因子纯化过程中使用大孔径的Q琼脂糖凝胶可以增加载量和回收率。使用传统的DEAE sephardex A-50纯化凝血酶原复合物(PCC)也是非常经典的方法。

《纯化——包涵体蛋白》

■包涵体蛋白往往需溶于6M盐酸胍或8M尿素中。高化学稳定性的Sepharose 6FF凝胶过滤介质很适合在变性条件下做纯化。变性纯化后的蛋白需要复性至蛋白的天然构象。Q Sepharose FF 和Phenyl Sepharose FF 分别被发现有助包涵体蛋白的复性。一般包涵体蛋白样品的纯度越高，复性效果越好。

《包涵体蛋白固相复性》

■近年许多文献报导将包涵体蛋白在变性条件下固定(吸附)在层析介质上，一般用各种Sepharose FF离子交换层析介质。去除变性剂后，蛋白在介质上成功复性，再将复性好的蛋白洗脱下来。固相复性避免了一般复性过程中蛋白质聚体的形成，所以复性得率更高，而且无需大量稀释样品，并将复性和初纯化合二为一，大大节省时间及提高回收率。

■固相复性方法也被用于以镍琼脂糖凝胶直接复性及纯化包涵体形式表达的组氨酸融合蛋白；以肝素琼脂糖凝胶直接复性及纯化包涵体形式表达的含多个赖氨酸的融合蛋白。

《纯化——肽类》

■肽类的来源有天然萃取，合成肽和重组肽三种。肽容易被酶降解，但可从有机溶剂或促溶剂中复性，所以多以高选择性的反相层析或离子交换树脂作纯化。

《纯化——核酸、病毒》

■核酸的纯化用于去除影响测序或PCR污染物等研究。核酸可大致上分为质粒DNA、噬菌体DNA和PCR产物等。病毒也可视作核酸大分子，和质粒DNA一样，可用分离大分子的Sephacry S-1000 SF或 Sepharose 4FF 凝胶过滤介质去除杂蛋白，再配合离子交换 Q琼脂糖凝胶分离核酸。也可以用DEAE或Q琼脂糖凝胶FF富集和分离后再上琼脂糖凝胶6B FF得到纯的病毒

《疫苗纯化--病毒类疫苗纯化》

■凝胶过滤介质 Sepharose 4 Fast Flow 或Sepharose 6 Fast Flow是经典的病毒类疫苗纯化方法，可以去除培养基中的杂蛋白、处理量大、快速的特点。柱高一般40-70cm，上样量一般为10-15%。目前使用此方法生产的疫苗品种有： 乙肝、狂犬、出血热、流感等，分子量较小的疫苗也可以 Sephacryl S-500 HR，如甲肝疫苗。

《纯化——中草药有效成分》

■中药的化学成分极其复杂。传统中药多是煎熬后服用，有效成分多较为亲水，包括生物碱、黄酮、蒽醌、皂甙、有机酸、多糖、肽和蛋白质。灵活及综合性地利用多种层析方法。如离子交换、分子筛、反相层析，更容易分离到单一活性成分。葡聚糖凝胶LH-20同时具备吸附性层析和分子筛功能，例如：用甲醇分离黄酮甙，三糖甙先被洗下来，二糖甙其次，单糖甙随后，最后是甙元。葡聚糖凝胶LH-20可使用水、醇、丙酮、氯仿等各种试剂，广泛用于各种天然产物的分离，包括生物碱、甙、黄酮、醌类、内脂、萜类、甾类等。

■生物碱在酸性缓冲液中带正电，成为盐，SP 阳离子交换层析柱可以分离许多结构非常近似的生物碱。相反，黄酮、蒽醌、皂甙、有机酸等可溶于偏碱的缓冲液中，在Q 阴离子交换柱上分离效果良好。

《抗生素聚合物分析》

■中国药典从2000年版起要求抗生素头孢曲松钠需要找出聚合物占产品的白分比，规定使用葡聚糖凝胶G10过滤法测定。

《去除——蛋白中的核酸》

■大量核酸增加样本黏度，令区带扩张，反压增加，降低分辨率和流速。药审和食检对核酸含量也有严格限制。胞内表达蛋白的核酸问题尤其严重。核酸带阴电荷，在初步纯化时利用阳离子交换介质如 SP 或 CM Sepharose FF 结合目标蛋白，可除去大量核酸。核酸在高盐下会和蛋白解离，疏水层析介质很适合用来结合目标蛋白，在纯化蛋白的同时去除核酸。利用核酸酶将核酸切成小片断，用凝胶过滤做精细纯化时便很容易去除了。

《去除——病毒和微生物》

■病毒和微生物可成为病原，应尽量减除。结合不同层析技术，使用注射用水，用 NaOH 定期进行仪器和凝胶的在位消毒和在位清洗，皆可避免污染物增加。

■病毒大都有脂外壳。可用与目标蛋白电荷相反的 S/D (solvent/detergent)处理，使病毒失活，如 Triton 和 Tween。再用适当的离子交换介质如 CM Sepharose FF 结合目标蛋白，去除 S/D。

■其它污染物可以改变 pH 和离子强度使其从目标分子中解离或失活，凝胶过滤介质 Superdex 及多种吸附性介质，SOURCE 都是很好的精细纯化介质，可去除多种微量污染物。

《去除——血清白蛋白》

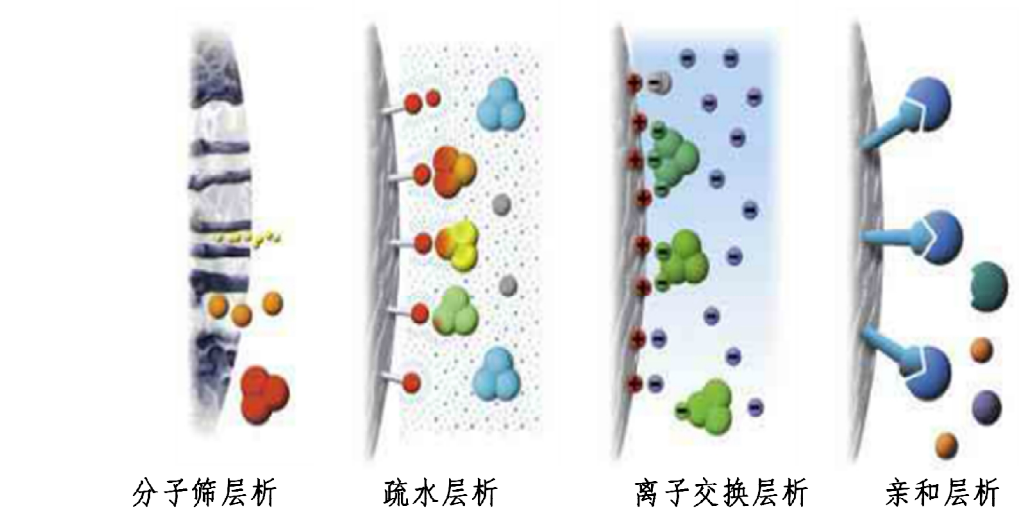
■蓝色琼脂糖凝胶FF可以用于分离各种激酶或依赖核苷酸为辅酶的酶，它很特异和白蛋白结合，所以用它去除样品中的血清蛋白的干扰，使样品更好纯化。PH4.5左右lml填料可以去除0.3ml血浆中的白蛋白，载量为16-20mg/ml。用镍琼脂糖凝胶FF也可以和白蛋白结合，载量为16mg/ml。

《脱盐、小分子去除》

■使用凝胶过滤介质Sephadex G10,G15,G25,等去除小分子，效率高，处理量可达床体积30%。只需在进样后收集首1/3-1/2柱体积的洗脱液，就可以去除该填料分离范围上限以下的小分子，简单直接。由于只是去除小分子，柱高10cm以上即可。整个过程一般可于数分种至半小时完成。Sephadex G25 系列介质专为蛋白质脱盐而设计。

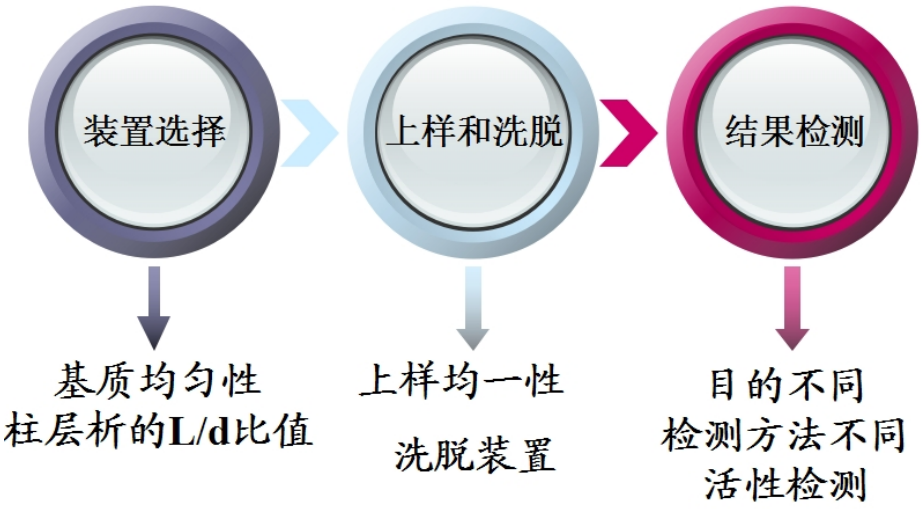
■病毒、DNA疫苗或质粒可以用琼脂糖凝胶6BFF除盐或交换缓冲液，蛋白、抗体等可以用琼葡糖凝胶G15FF或葡聚糖凝胶G25快速去盐和交换缓冲液，前者适合分子量大于3000以上物质的，应用范围比普通的sephadex G25更广。

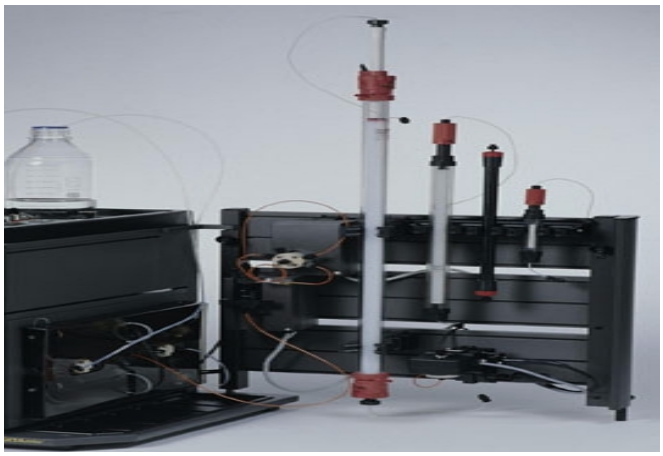
产品名常用缩写解释	
英文缩写	中文注释
XL	高载量
Pg	制备级
HR	高分辨率
LS	低取代，配基密度低
HS	高取代，配基密度高
HP	高性能，填料平均颗粒大小约 **34um**，颗粒细能带来高分辨率的分离纯化
FF	快流速，填料平均颗粒大小约 **90um**,较 **HP** 颗粒粗，具有良好的分辨率及轻松实现规模扩大的分离纯化



层析纯化分类

层析基本操作过程图如下：



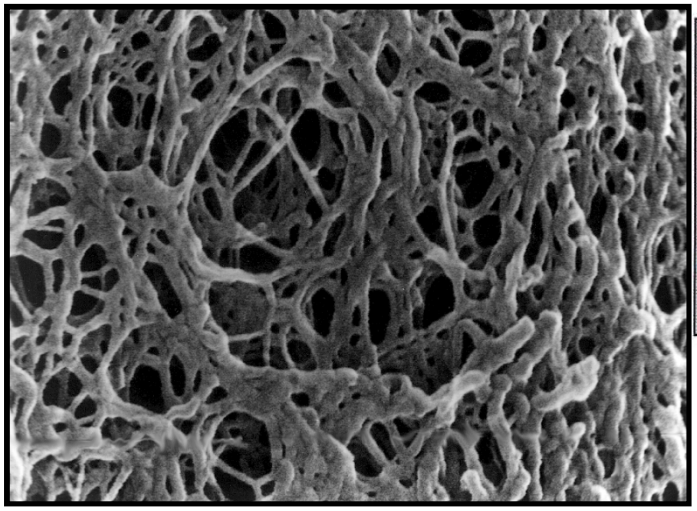


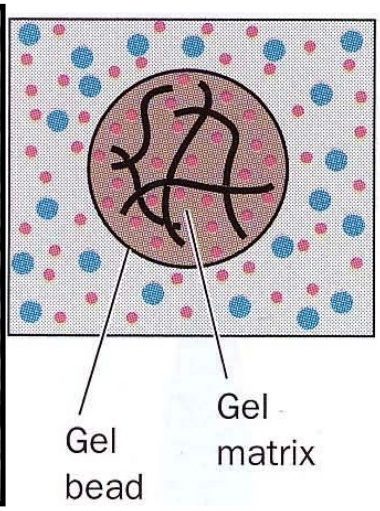
层析填料选择

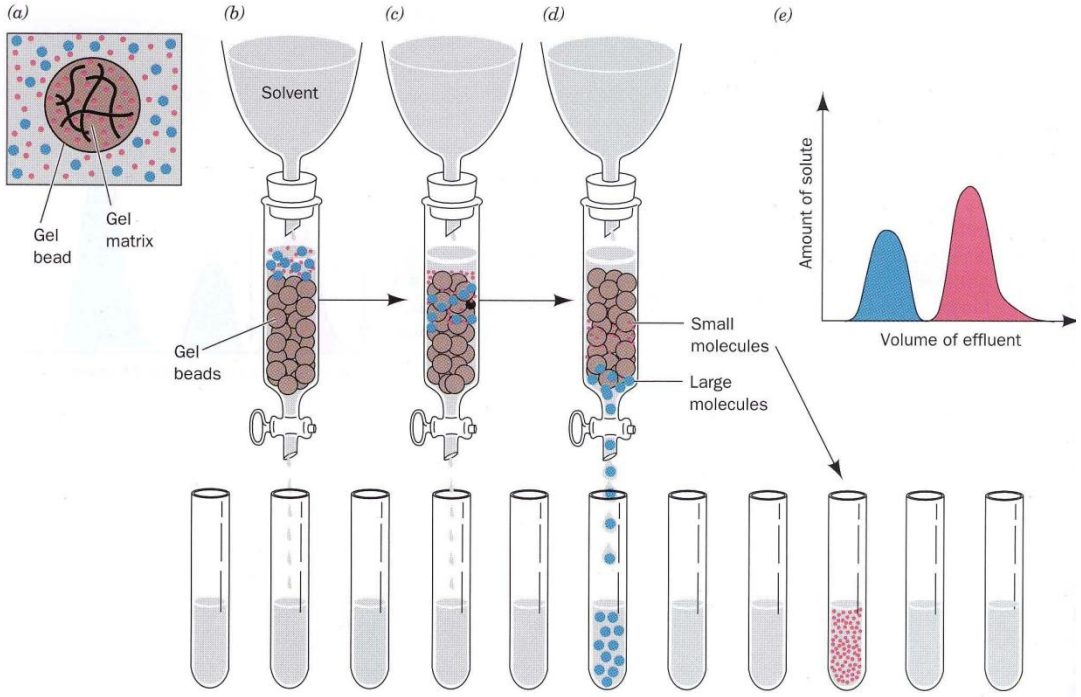
一、凝胶过滤填料选择

凝胶层析又称分子筛过滤、排阻层析等，依据是多孔的载体对不同体积和不同形状分子的排阻能力的不同，从而对混合物进行分离。

原理：凝胶是一种不带电的具有三维空间的多孔网状结构的物质，每个颗粒的细微结构及筛孔的直径均匀一致，小分子可以进入凝胶网孔，而大分子则排阻于颗粒之外。凝胶分离包括两种：一是分级分离；二是分组分离。分级分离一般选择长柱，柱高：直径=20:1-100:1，上样 5%柱床体积。分组分离一般选择短柱，柱高在 50cm 以下，柱高：直径=5:1-10:1，上样 20%柱床体积。由于凝胶过滤技术的分离极限限制，一般需要分离的两种物质的分子量差异在一倍以上时选用凝胶过滤才得到较好的分离效果。







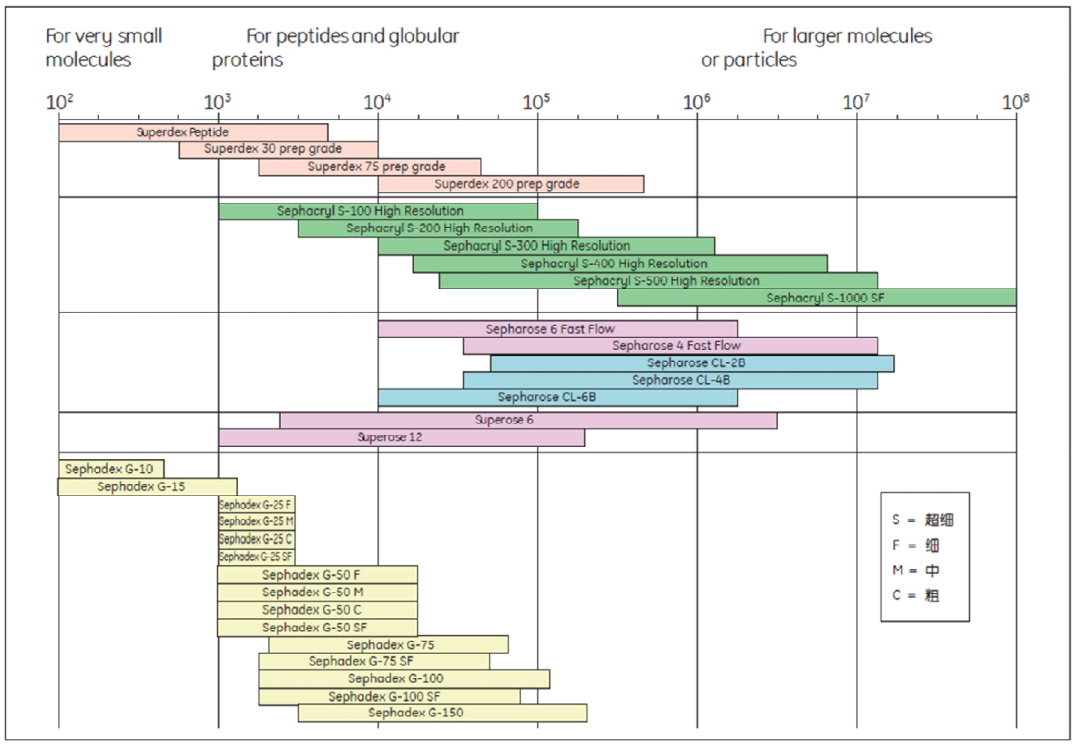
大分子物质沿凝胶颗粒间隙随洗脱液移动，流程短，移动速率快，先被洗出层析柱。小分子物质可通过凝胶网孔进入颗粒内部，然后再扩散出来，故流程长，移动速度慢，最后被洗出层析柱。

优点：凝胶属于惰性载体，不带电荷，吸附力弱，操作条件比较温和，温度范围广，不需要有机溶剂，分离效果好。
缺点：样品被不断稀释，上样量不能太大，否则分辨率变差。

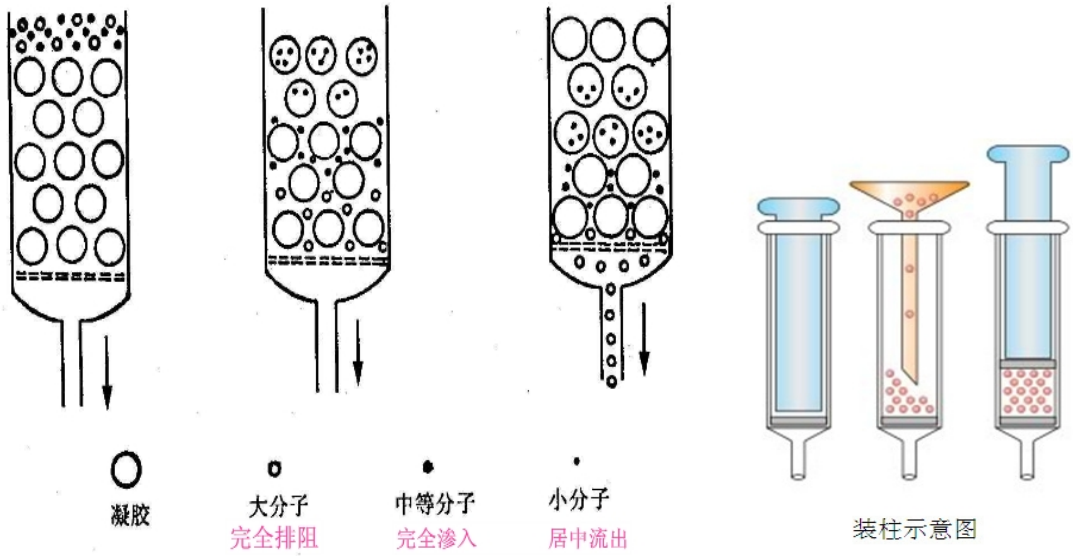
凝胶过滤层析的介质分类	
葡聚糖凝胶	Sephadex（Sephadex G 中的 G 值越小，交联度越大，吸水性越小）适合脱盐、buffer 交换
琼脂糖凝胶	Sepharose（宽广的分离范围）
琼葡糖凝胶	Superdex 琼脂糖及葡萄糖组成的复合凝胶，高分辨率、高回收率、运行时间短
聚丙烯酰胺葡聚糖凝胶	Sephacryl

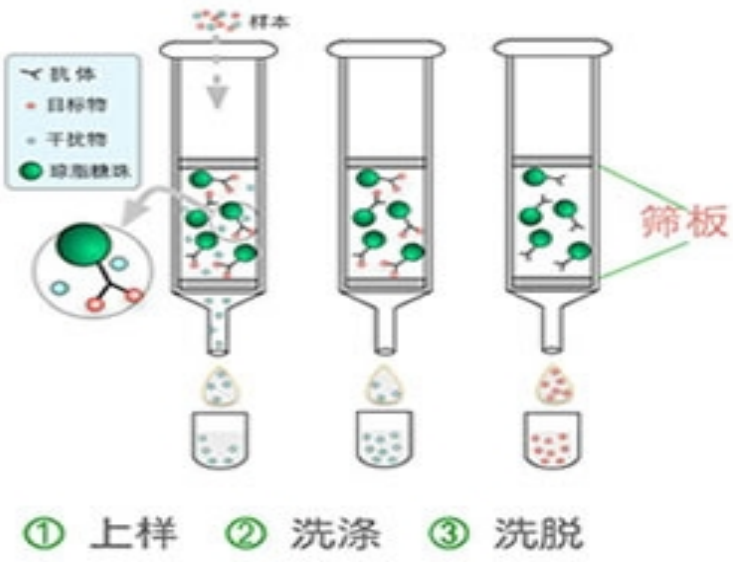
: :

凝胶过滤填料的选择原则
1、凝胶的交联度越高，孔径越小。
2、对大分子物质的分离，多采用琼脂糖。
3、对小分子物质的分离，多采用葡聚糖。
4、凝胶颗粒的粗细影响分离效果。


For very small molecules
For peptides and globular proteins
For larger molecules or particles
10²
10³
10⁴
10⁵
10⁶
10⁷
10⁸
Superdex Peptide
Superdex 30 prep grade
Superdex 75 prep grade
Superdex 200 prep grade
Sephacryl S-100 High Resolution
Sephacryl S-200 High Resolution
Sephacryl S-300 High Resolution
Sephacryl S-400 High Resolution
Sephacryl S-500 High Resolution
Sephacryl S-1000 SF
Sepharose 6 Fast Flow
Sepharose 4 Fast Flow
Sepharose CL-2B
Sepharose CL-4B
Sepharose CL-6B
Superose 6
Superose 12
Sephadex G-10
Sephadex G-15
Sephadex G-25 F
Sephadex G-25 M
Sephadex G-25 C
Sephadex G-25 SF
Sephadex G-50 F
Sephadex G-50 M
Sephadex G-50 C
Sephadex G-50 SF
Sephadex G-75
Sephadex G-75 SF
Sephadex G-100
Sephadex G-100 SF
Sephadex G-150
S = 超细
F = 细
M = 中
C = 粗

凝胶过滤分离范围总览


凝胶
大分子
完全排阻
中等分子
完全渗入
小分子
居中流出
装柱示意图



葡聚糖凝胶系列产品

葡聚糖凝胶 Sephadex 是用环氧氯丙烷为交联剂，在碱性条件下交联而成商品化凝胶。亲水性强，在水中吸水迅速膨胀。在碱、弱酸中稳定，可高压灭菌。葡聚糖凝胶 G 系列产品，交联度越大，网状结构越紧密，孔径越小，吸水膨胀就愈小，故只能分离相对分子质量较小的物质

Sephadex 根据颗粒大小可以分为四种：粗（C:Coarse）、中（M:Medium）、细（F:Fine）、超细（SF:Superfine)。一般粗颗粒流速快，但分辨率较差；细颗粒反压大， 流速慢，但分辨率高。要根据分离要求来选择颗粒大小。Sephadex 的机械稳定性相对较差，它不耐压，分辨率高的细颗粒要求流速较慢，所以不能实现快速而高效的分离。

LH 构型葡聚糖凝胶：Sephadex G-25 和 G-50 中分别加入羟丙基(羧基)基团，形成 LH 型烷基化葡聚糖凝胶，主要型号为 Sephadex LH-20 和 LH-60，适用于以有机溶剂为流动相，分离脂溶性物质，例如胆固醇、脂肪酸激素等。

金克隆-凝胶过滤层析葡聚糖凝胶产品简介					
货号	中文名称	粒径/μm	分离范围 球蛋白/分子量	pH	应用
TLG010	葡聚糖凝胶 G-10 Sephadex G-10	40-120	＜700	2-13	脱盐、交换缓冲液、分离小分子
TLG015	葡聚糖凝胶 G-15 Sephadex G-15	40-120	＜1500	2-13	脱盐、交换缓冲液、分离小分子
TLG025	葡聚糖凝胶 G-25 Sephadex G-25 Coarse	100-300（粗） 50-150（中） 20-80（细） 20-50（超细）	1000-5000	2-13	脱盐及交换缓冲液用
TLG050	葡聚糖凝胶 G-50 粗 Sephadex G-50 Coarse	100-300（粗） 50-150（中） 20-80（细） 20-50（超细）	1500-30000	2-10	小分子蛋白质分离
TLG075	葡聚糖凝胶 G-75 Sephadex G-75	40-120	3000-80000	2-10	中等蛋白质分离
TLG100	葡聚糖凝胶 G-100 Sephadex G-100	40-120	4000-150000	2-10	中等蛋白质分离
TLG150	葡聚糖凝胶 G-150 Sephadex G-150	40-120	5000-300000	2-10	稍大蛋白质分离
TLG200	葡聚糖凝胶 G-200 Sephadex G-200	40-120	5000-600000	2-10	较大蛋白质分离
TLLH20	葡聚糖凝胶 LH-20 Sephadex LH-20	100-200 目	100-4000	2-11	分离嗜脂性分子
TLLH60	葡聚糖凝胶 LH-60 Sephadex LH-60	100-200 目	400-20000	2-11	分离嗜脂性分子

琼脂糖系列产品：

琼脂糖是由 D-半乳糖和 3，6 位脱水的 L-半乳糖连接构成的多糖链，在温度 100℃时呈液态，当下降至 45℃以下时，通过分子间氢键，自发凝集成束，形成珠状凝胶。稳定性差。它们之间相互连接成线性双链单环的琼脂糖；再凝聚即呈琼脂糖凝胶。

琼脂糖凝胶在干燥状态下保存易破裂，故一般均存放在含防腐剂的溶液中。40 度以上易老化。不能高压和冰冻。

常用的为 Sepharose 2B、4B、6B，因为 Sepharose 4B 的结构比 Sepharose 6B 疏松，而吸附容量比 Sepharose 2B 大，所以 Sepharose 4B 应用最广。

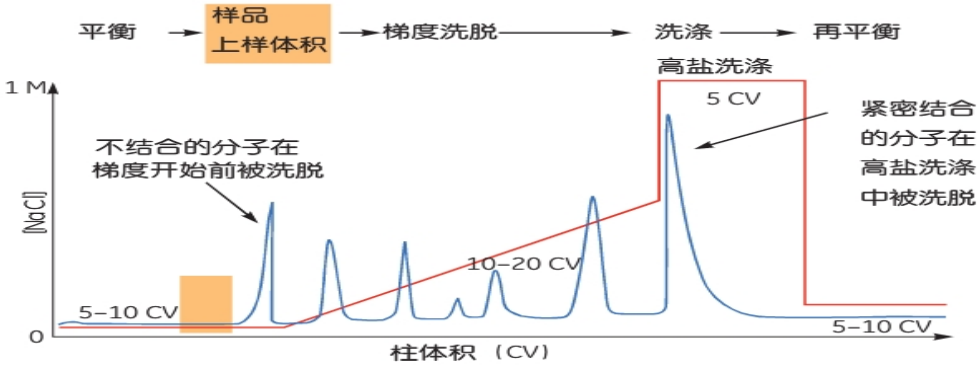
Sepharose CL：与 1，3-二溴异丙醇在强碱条件下反应，即生成 CL 型交联琼脂糖，其热稳定性和化学稳定性均有所提高。特别适合含有机溶剂的分离，能承受较强的在位清洗。

FF 系列可以耐受较高的流速，轻松实现规模扩大的分离纯化，在短时间内得到较好的分辨率。

金克隆-凝胶过滤层析琼脂糖凝胶产品简介					
货号	中文名称	粒径/μm	分离范围 球蛋白/Mr	pH	应用
TL662B	琼脂糖凝胶 2B Sepharose 2B	60-200	7×10^4-4×10^7	4-9	蛋白、大分子复合物、病毒、核酸、多糖的分离、分子量测定等
TL664B	琼脂糖凝胶 4B Sepharose 4B	60-140	6×10^4-2×10^7	4-9	
TL666B	琼脂糖凝胶 6B Sepharose 6B	45-165	1×10^4-4×10^6	4-9	
TL662C	琼脂糖凝胶 CL-2B Sepharose CL-2B	60-200	70,000-40 $\times10^6$	3-13	蛋白、大分子复合物、病毒、核酸、多糖的分离、分子量测定等
TL664C	琼脂糖凝胶 CL-4B Sepharose CL-4B	45-165	10,000-4 $\times10^6$	3-13	
TL666C	琼脂糖凝胶 CL-6B Sepharose CL-6B	45-165	10,000-4 $\times10^6$	3-13	
TL664F	琼脂糖凝胶 4FF Sepharose 4FF	45-165	70,000-20 $\times10^6$	3-13	巨大分子，病毒，疫苗的分离纯化等
TL666F	琼脂糖凝胶 6FF Sepharose 6FF	45-165	10,000-4 $\times10^6$	3-13	

离子交换填料 (Ion Exchange Chromatography 简称为 IEC)

离子交换层析可以分类里电荷只有轻微差别的分子，以保证分离是基于带电分子与带相反电荷的层析填料之间的可逆相互作用。通常情况下，选择适宜的条件使被感兴趣的分子在上样的过程中结合到柱子的填料上，然后用洗脱剂改变条件以便使被结合的物质被洗脱下来。通常提高盐浓度或改变 pH 进行洗脱。最常用盐（NaCl）梯度洗脱，经常通过连续梯度或逐步增加离子强度进行洗脱，最常用的是氯化钠。



使用梯度洗脱的典型分离图

阴离子交换：离子交换基团为正电荷，能与带负电的离子发生交换作用。
阳离子交换：离子交换基团为负电荷，能与带正电的离子发生交换作用。

Type of exchanger	名称	结构	强弱	pH
阴离子交换基团	Diethylaminoethyl（DEAE）	$-OCH_2CH_2N^+H(CH_2CH_3)_2$	弱	2-9
	Quaternary aminoethyl（QAE）	$-OCH_2CH_2N^+(C_2H_5)_2CH_2CHO$ HCH_3	强	2-10
	Quaternary ammonium（Q）	$-CH_2N^+(CH_3)_3$	强	
阳离子交换基团	Carboxymethyl（CM）	$-OCH_2COO^-$	弱	6-10
	Sulphopropyl（SP）	$-CH_2CH_2CH_2SO_3^-$	强	2-10
	Methylsulphonate（S）	$-CH_2SO_3^-$	强	

可以先尝试强交换剂（Q、SP、S），其能够在广泛的 ph 范围内进行分离，如果感兴趣蛋白的等电点低于 pH 7.0 或未知，则可以使用强阴交换剂（Q）结合蛋白。如果说强的离子交换剂不理想，则可以考虑使用弱的交换剂（DEAE、CM），要注意的一点是，弱的离子交换剂的离子交换能力随着 PH 而变化。

多峰配体（MMC, adhere）提供离子相互作用、氢键和疏水相互作用。MMC

表现的如同弱的阳离子交换剂，但可以在高电导率下结合。Adhere 表现为强阴离子交换剂。

层析柱填料选择的影响因素：

根据纯化步骤的目标和起始材料的条件选择离子交换填料。此外，还需要考虑样品的稳定性、规模、速度、结合能力和设备。

1. 样品的制备：样品必须澄清，无颗粒物质。可以过滤或者离心除去。
2. 层析柱：使用任何的 IEX 填料前都要清洗掉保存溶液和防腐剂，所需填充的柱床体积是由待纯化样品的量和填料的结合容量决定的。
3. 缓冲液：所有缓冲液都需要过滤，对于颗粒大于 90μm 的可以使用 1μm 滤膜，对于 34μm 的可以使用 0.45μm 滤膜，对于小于 15μm 的可以使用 0.22μm 滤膜。

为了避免气泡产品，确保层析柱和缓冲液在相同温度下使用。

离子交换层析介质分类	
葡聚糖凝胶系列	QAE、SP、DEAE、CM
琼脂糖凝胶系列	QAE、SP、DEAE、CM
纤维素系列	DE-32、DE-52、CM-52
注释	QAE 代表强阴离子交换剂 DEAE 代表弱阴离子交换剂 SP 代表强阳离子交换剂 CM 代表弱阳离子交换剂

金克隆-离子交换层析琼脂糖凝胶填料产品简介					
货号	中文名称	粒径/μm	离子载量（/mL 填料）	pH	应用
TL60FF	Q 琼脂糖凝胶 FF Q Sepharose FF	45-165	0.18-0.25 mmol Cl-	2-12	利用离子交换作用，应用于蛋白等生物分子的快流速高产量纯化等
TL60HP	Q 琼脂糖凝胶 HP Q Sepharose HP	24-44	0.18 -0.25 mmol Cl-	2-12	利用离子交换作用，应用于蛋白等生物分子的精细纯化等
TL68FF	SP 琼脂糖凝胶 FF SP Sepharose FF	45-165	0.18-0.25 mmol H+	4-13	利用离子交换作用，应用于蛋白等生物分子的快流速高产量纯化等。
TL68HP	SP 琼脂糖凝胶 HP SP Sepharose HP	24-44	0.18-0.25 mmol H+	3-14	利用离子交换作用，应用于蛋白等生物分子的精细纯化等
TL44FF-B	DEAE-琼脂糖凝胶 FF DEAE Sepharose FF	45-165	0.11-0.16 mmol Cl-	2-9	利用离子交换作用，应用于蛋白等生物分子的快流速高产量纯化等
TL426C	DEAE-琼脂糖凝胶 CL-6B DEAE-Sepharose CL-6B	45-165	0.13-0.17mmol/g 凝胶	3-9	利用离子交换作用，应用于蛋白等生物分子的快流速高产量纯化等
TL38FF	CM 琼脂糖凝胶 FF CM Sepharose FF	45-165	0.09-0.13 mmol H+	6-10	利用离子交换作用，应用于蛋白等生物分子的快流速高产量纯化等
TL386C	羧甲基-琼脂糖凝胶 CL-6B CM-Sepharose CL-6B	45-165	0.10-0.14mmol/g 凝胶	/	利用离子交换作用，应用于蛋白等生物分子的高载量纯化等

金克隆-离子交换层析葡聚糖凝胶填料产品简介					
货号	中文名称	粒径/μm	离子载量（/mL 填料）	pH	应用
TLDA25	DEAE 葡聚糖凝胶 A-25 DEAE Sephadex A-25	40-120	3-4mmol/g 干胶	2-9	利用离子交换作用，纯化低分子质量蛋白、多肽、核苷酸及巨大分子等
TLDA50	DEAE 葡聚糖凝胶 A-50 DEAE Sephadex A-50	40-120	3-4mmol/g 干胶	2-9	
TLA025	QAE 葡聚糖凝胶 A-25 QAE Sephadex A-25	40-120	2.6-3.4mmol/g 干胶	2-12	利用离子交换作用，纯化低分子质量蛋白、多肽、核苷酸及巨大分子等
TLA050	QAE 葡聚糖凝胶 A-50 QAE Sephadex A-50	40-120	2.6-3.4mmol/g 干胶	2-12	
TLCC25	CM 葡聚糖凝胶 C-25 CM Sephadex C-25	40-120	4-5mmol/g 干胶	6-10	利用离子交换作用，纯化低分子质量蛋白、多肽、核苷酸及巨大分子等
TLCC50	CM 葡聚糖凝胶 C-50 CM Sephadex C-50	40-120	4-5mmol/g 干胶	6-10	
TL8C25	SP 葡聚糖凝胶 C-25 SP Sephadex C-25	40-120	2-2.6mmol/g 干胶	4-13	利用离子交换作用，纯化低分子质量蛋白、多肽、核苷酸及巨大分子等
TL8C50	SP 葡聚糖凝胶 C-50 SP Sephadex C-50	40-120	2-2.6mmol/g 干胶	4-13	

金克隆-离子交换层析纤维素填料产品简介					
货号	中文名称	粒径/μm	离子载量(/mL填料)	pH	应用
TLDE32	DEAE 纤维素 DE-32 Cellulose DE-32	50	180mg HSA/ml	/	DEAE-纤维素，它采用平均粒径为 50μm 的颗粒型亲水高分子聚合物，表面又用大分子糖链接枝，使它有更高的比表面积和更好的生物兼容性，它在高流水下保持更高载量，同时又具有更好的分辨率，用于分离生物高分子。
TLDE52	DEAE 纤维素 DE-52 Cellulose DE-52	50	180mg HSA/ml	/	DEAE-纤维素，它采用平均粒径为 50μm 的颗粒型亲水高分子聚合物，表面又用大分子糖链接枝，使它有更高的比表面积和更好的生物兼容性，它在高流水下保持更高载量，同时又具有更好的分辨率，用于分离生物高分子。
TLCM52	羧甲基纤维素 CM-52 CM Cellulose CM-52	50	70mg 核酸酶/ml	/	CM-纤维素，它采用平均粒径为 50μm 的颗粒型亲水高分子聚合物，表面又用大分子糖链接枝，使它有更高的比表面积和更好的生物兼容性，它在高流水下保持更高载量，同时又具有更好的分辨率，用于分离生物高分子。

疏水层析系列----（HIC）

疏水层析（HIC）是根据不同的蛋白与疏水表面产生的相互作用的差异，进行蛋白分离的一种方法。生物分子表面大都含或强或弱的疏水区域，在不同环境下，与各种疏水介质产生不同强弱和结合高离子强度可加强疏水性。和离子交换刚刚相反，高盐吸附，低盐洗脱。因此，可以用于分离离子交换层析很难或不能分离的物质。经洗脱样品又可直接或稍加稀释后上其它层析柱，做为连接下游和层析步骤的桥梁。并可完全取代传统的盐析沉淀技术，更符合工业生产要求。

疏水层析的分离效果受不同配体、缓冲液、盐浓度、温度等多种因素影响。哪种介质最适合很难预测，必须经过试验，逐渐摸索找到合适的层析介质。

疏水层析填料类型

1、亲水性填料

基质主要是：交联琼脂糖

配体：苯基、辛基或丁基化合物，基质 与配体通过耦合方法构成稳定的苯基、辛基或丁基。

2、非亲水性填料

基质：硅胶、树脂（苯乙烯、二乙烯聚合物）等。

配体：苯基、辛基、烷基等，二者通过共价结合构成费亲水性吸附剂。

金克隆公司销售的疏水性填料有三种 Butyl, Phenyl 和 Octyl。分别为在琼脂糖凝胶基质上共价结合丁基、苯基或者辛基的层析填料。

苯基系列 — 属于芳香族疏水作用的介质，疏水性最强

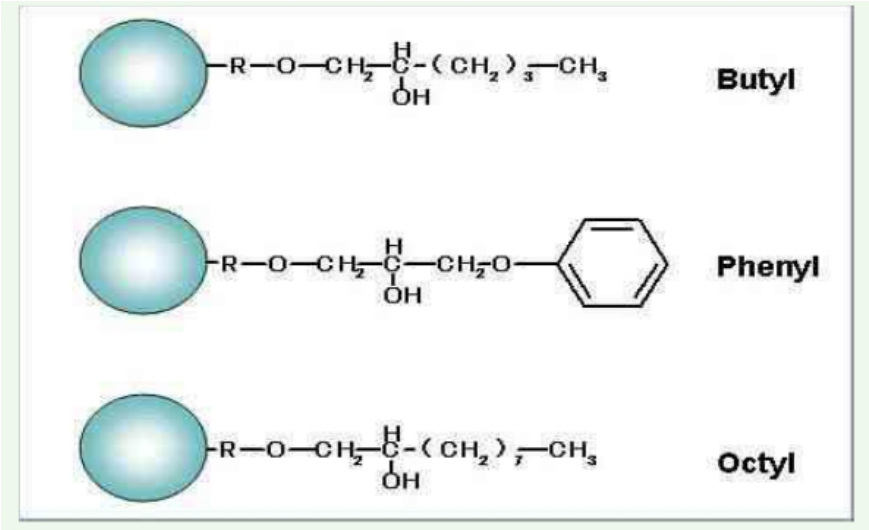
辛基系列 — 属于脂肪族疏水介质，配基为辛基

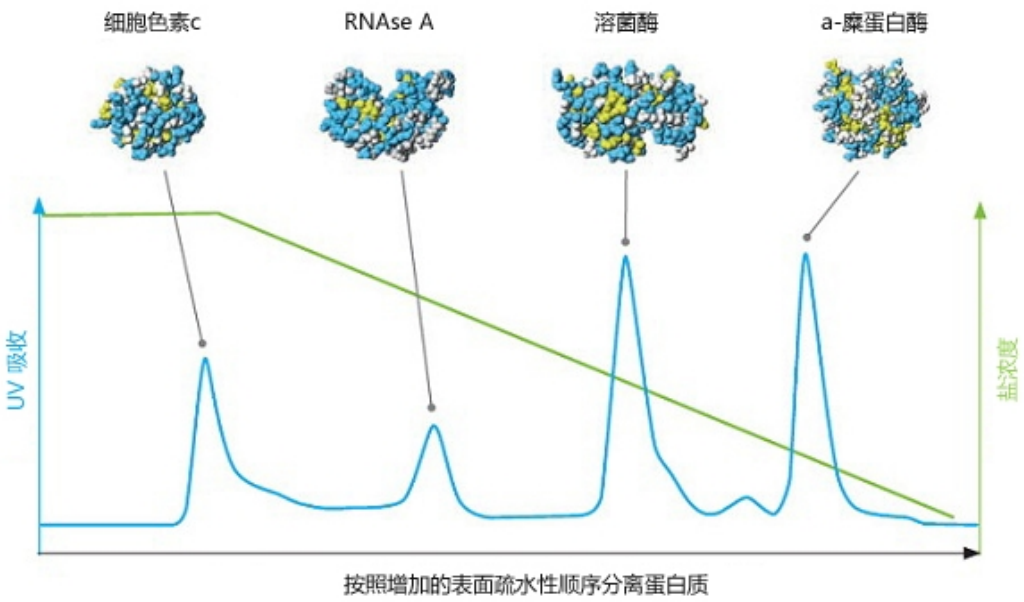
丁基系列 — 疏水性最弱的介质，适合在较低盐浓度条件下纯化疏水性分子，可去除脂类、脂蛋白、色素，在酵母重组表达乙肝疫苗纯化过程中发挥重要作用。

疏水性的顺序为： Butyl 丁基 < Octyl 辛基 < Phenyl 苯基

HIC介质的疏水性示意图。

结构见下图：





疏水层析影响因素：

1、 色谱填料的影响：

1) 色谱填料只有疏水相互作用力。
2) 疏水集团的密度必须适中。
3) 疏水集团的碳链不应该太长。

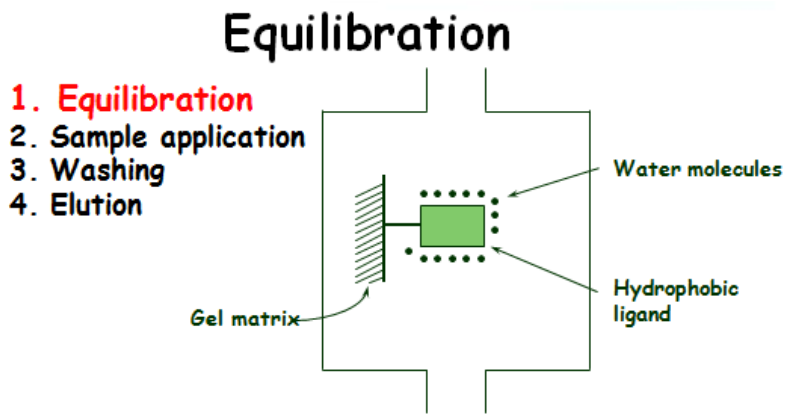
2、 缓冲液的影响

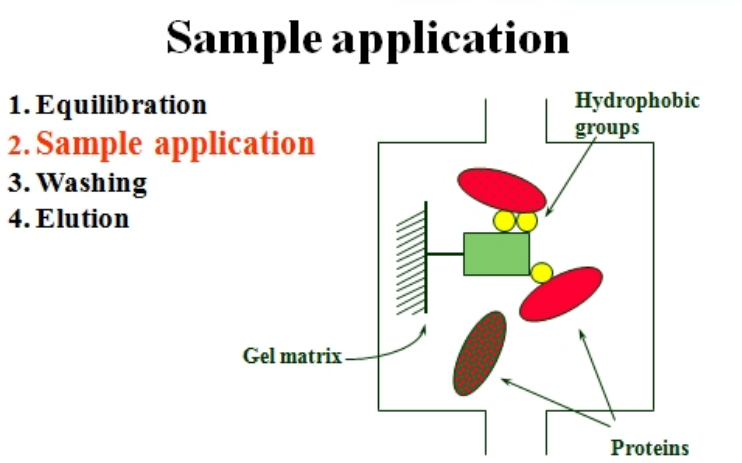
1) 缓冲液的盐浓度
2) 在洗脱缓冲液中有机溶剂的影响
3) 起始缓冲液的盐浓度对分辨率有决定作用

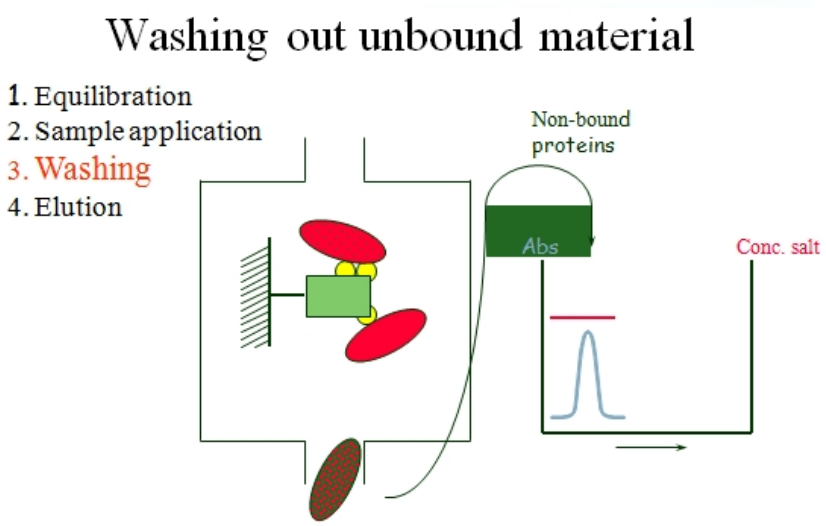
3、 PH 值的影响

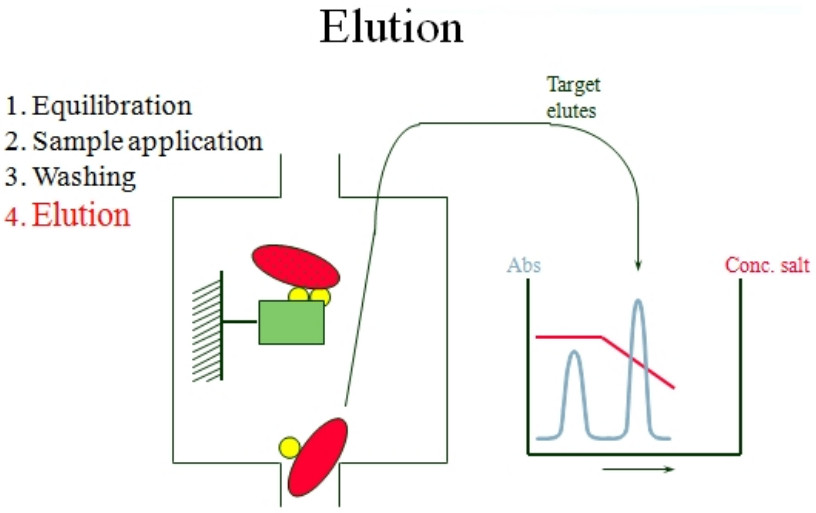
中性 ph 可以保持蛋白质的活性，当 ph 偏碱性时有利于洗脱。

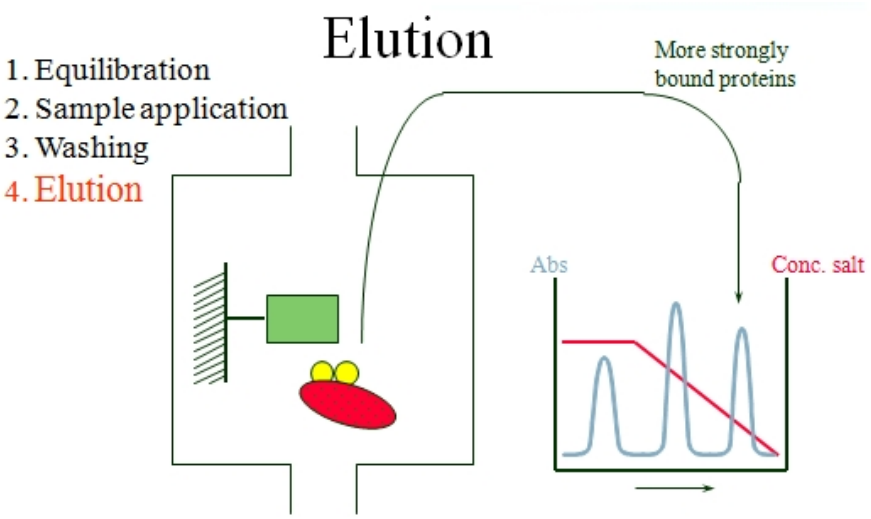
流程图：


Equilibration
1. Equilibration
2. Sample application
3. Washing
4. Elution
Water molecules
Hydrophobic ligand
Gel matrix


Sample application
1. Equilibration
2. Sample application
3. Washing
4. Elution
Hydrophobic groups
Gel matrix
Proteins


Washing out unbound material
1. Equilibration
2. Sample application
3. Washing
4. Elution
Non-bound proteins
Abs
Conc. salt


Elution
1. Equilibration
2. Sample application
3. Washing
4. Elution
Target elutes
Abs
Conc. salt

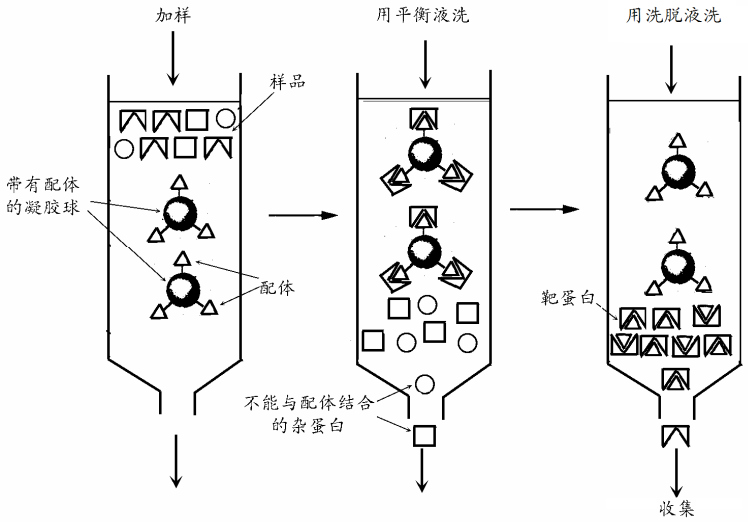

Elution
1. Equilibration
2. Sample application
3. Washing
4. Elution
More strongly bound proteins
Abs
Conc. salt

金克隆-疏水层析填料产品简介					
货号	中文名称	粒径/μm	离子载量(/mL 填料)	pH	应用
TL576F	苯基-琼脂糖凝胶 6FF Phenyl-Sepharose 6 FF	45-165	40μmol phenyl/ml 凝胶	3-13	快流速，适合生物大分子和疫苗的分离纯化等
TL59HP	苯基-琼脂糖凝胶 H.P Phenyl-Sepharose H.P.	22-44	25μmol phenyl/ml 凝胶	3-13	高分辨率，适合生物大分子和疫苗的分离纯化等
TL594C	苯基-琼脂糖凝胶 CL-4B Phenyl-Sepharose CL-4B	45-165	40μmol phenyl/ml 凝胶	3-12	适合含芳香族配体蛋白纯化，特别适合单抗的纯化等
TL374F	丁基-琼脂糖凝胶 4FF Butyl -Sepharose 4FF	45-165	40μmol Butyl/ml 凝胶	3-13	快流速，适合生物大分子和疫苗的分离纯化等
TL37HP	丁基-琼脂糖凝胶 H.P. Butyl -Sepharose H.P.	24-44	50μmol Butyl/ml 凝胶	3-13	高分辨率，适合生物大分子和疫苗的分离纯化等
TL374B	丁基-琼脂糖凝胶 4B Butyl–Sepharose 4B	45-165	10-14μmol Butyl/ml 凝胶	4-8	适合生物大分子和疫苗的分离纯化等
TL574F	辛基-琼脂糖凝胶 4FF Octyl-Sepharose 4FF	45-165	5μmol Butyl/ml 凝胶	3-13	快流速，适合生物大分子和疫苗的分离纯化等
TL57HP	辛基-琼脂糖凝胶 H.P. Octyl-Sepharose H.P.	24-44	25μmol Butyl/ml 凝胶	3-13	高分辨率，适合生物大分子和疫苗的分离纯化等
TL574C	辛基-琼脂糖凝胶 CL-4B Octyl-Sepharose CL-4B	45-165	40μmol Butyl/ml 凝胶	3-12	适合生物大分子和疫苗的分离纯化等

亲和层析填料（Affinity Chromatography　AC）

将具有特殊结构的亲和分子制成固相吸附剂放置在层析柱中，当要被分离的蛋白混合液通过层析柱时，与吸附剂具有亲和能力的蛋白质就会被吸附而滞留在层析柱中。那些没有亲和力的蛋白质由于不被吸附，直接流出，从而与被分离的蛋白质分开，然后选用适当的洗脱液，　改变结合条件将被结合的蛋白质洗脱下来，这种分离纯化蛋白质的方法称为亲和层析。利用共价连接有特异配体的层析介质分离蛋白质混合物中能特异结合配体的目的蛋白或其它分子的层析技术。一种亲和色谱填料只能用于一种或有限的一类生物分子。

原理图：



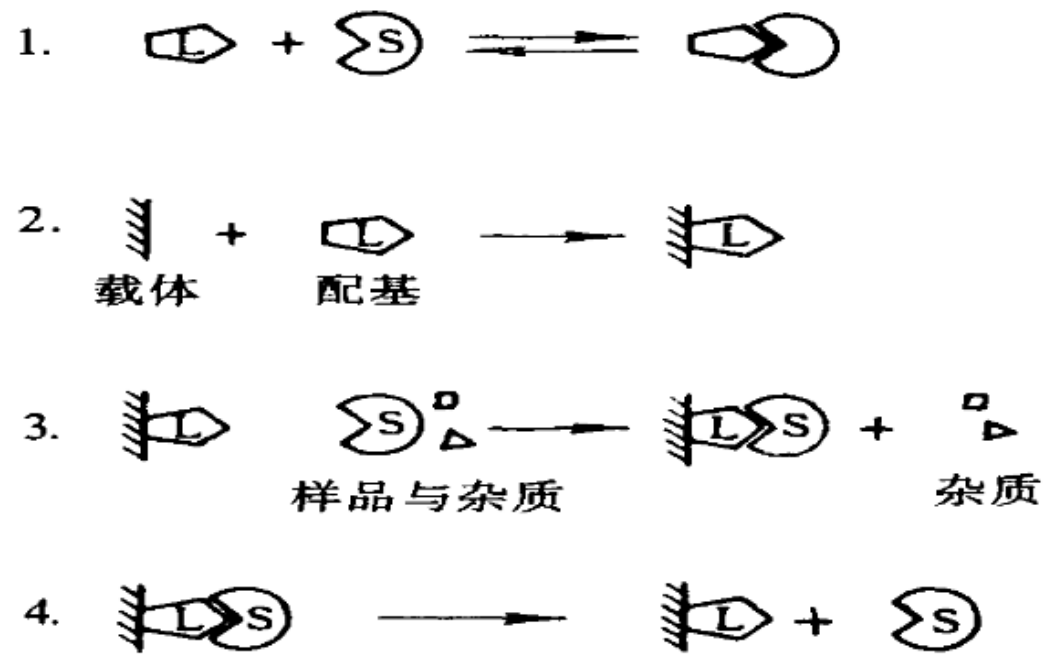


图 7-1　亲和层析法基本过程

1. 一对可逆结合的生物分子　2. 载体与配基偶联
3. 亲和吸附层析　4. 洗脱样品

亲和层析如何选择填料？

一、基质的选择

理想的基质应符合下面的要求：

1、极低的非特异性吸附。

2、高度的亲水性。

3、较好的理化稳定性。

4、大量的化学基团能被有效地活化，而且容易和配体结合。

5、适当的多孔性。(即孔径大小和筛孔多少)。 具体要求须根据分离物的性质而定：

（1） 当分离物与配体亲和力弱时，选用多孔性好的基质可提高结合容量；

（2） 当分离物呈颗粒状或碎片状时，则选用多孔性差的基质对改善分离效果有利。

一般亲和吸附剂采用的基质有纤维素、聚丙烯酰胺凝胶、交联葡聚糖、琼脂糖、交联琼脂糖、多孔玻璃珠等。相比之下，目前应用较多的基质是：聚丙烯酰胺凝胶、多孔性玻璃珠、琼脂糖珠(Sepharose 4B)。三种基质中，目前应用最多的是： 琼脂糖凝胶 4B。

纤维素：基质较软，容易压缩，具有非特异性吸附，且本身结构不均一，但价格低廉。

聚丙烯酰胺凝胶：丙烯酰胺与双功能交联剂 N， N’－亚甲基双丙烯酰胺在一定条件下共聚产生的凝胶。 通过调节单体浓度和交联剂的比例，可得到不同孔径的凝胶。聚丙烯酰胺凝胶的非特异性吸附较强，一般应在较高离子强度（0.02M 以上）下操作，以消除非特异的离子交换吸附。其优点是功能基团多；同时与配体结合后，多孔性会大大降低，且聚丙烯酰胺具有大量的酰胺键，不易在载体与配体之间引入间隔物。

交联葡聚糖凝胶（又称 Sephadex）本身孔径较小，经过活化功能后，会进一步降低其多孔性，使其亲和活化效率降低。

玻璃珠（CPG）：具有优良的机械性能，不受洗脱液、压力、流速、PH 和离子强度的影响，可获得快速、高效的分离；而且可抗微生物腐蚀，容易进行消毒。缺点：如表面对某些蛋白质有非特异性吸附作用，而且难于功能化等。亲和层析中所使用的可控孔径多孔玻璃是粒径较大的玻璃珠(40－80 目或 80－120 目），因为对于亲和层析而言，孔径的选择是一个关键，它决定了功能化基团的数量和亲和介质的吸附容量。如孔径为 2500A 的玻璃珠，其吸附容量显著小于孔径为 1750 A 和 750A 的玻璃珠。 为利用无机基质的优点 （如 机械强度高） ，而避免其缺点（如不易于功能化） ，目前很多基质采用涂层，即将容易功能化 的介质如多糖包裹在多孔无机基质上，从而易于接上多种亲和配基。

琼脂糖凝胶：是亲和层析的理想介质之一，具有优良的多孔性，而且经过交联后，可大大改善其物理化学稳定性和机械性能。它基本上能符合理想基质的五点要求；同时 Sepharose 极易用溴化氰活化，并易于引入不同的基团；在温和的条件下，可以连接较多的配体，容易吸附大分子物质，且吸附容量也较大；此外，Sepharose 4B 的结构比 Sepharose 6B 疏松，机械强度比 Sepharose 2B 好。因此，Sepharose 4B 成了亲和层析中广泛使用的一种基质。

二、配体的选择

理想的配体应具有以下一些性质：

1、**配体与待分离的物质有适当的亲和力**。亲和力太弱待分离物质不易与配体结合造成亲和层析吸附效率很低。而且吸附洗脱过程中易受非特异性吸附的影响引起分辨率下降。但如果亲和力太强，待分离物质很难与配体分离，这又会造成洗脱的困难。总之，配体和待分离物质的亲和力过弱或过强都不利于亲和层析的分离。应根据实验要求尽量选择与待分离物质具有适当的亲和力的配体。

2、**配体与待分离的物质之间的亲和力要有较强的特异性**。也就是说配体与待分离物质有适当的亲和力，而与样品中其它组分没有明显的亲和力，对其它组分没有非特异性吸附作用。这是保证亲和层析具有高分辨率的重要因素。

3、**配体要能够与基质稳定的共价结合，在实验过程中不易脱落**。并且配体与基质偶联后，对其结构没有明显改变，尤其是偶联过程不涉及配体中与待分离物质有亲和力的部分，对二者的结合没有明显影响。

4、**配体自身应具有较好的稳定性**。在实验中能够耐受偶联以及洗脱时可能的的较剧烈的条件，可以多次重复使用。

根据配体对待分离物质的亲和性的不同，可以将其分为两类：**特异性配体**和**通用性配体**。

特异性配体：一般是指只与单一或很少种类的蛋白质等生物大分子结合的配体。如生物素和亲和素、抗原和抗体、酶和它的抑制剂、激素、受体等。它们结合都具有很高的特异性，用这些物质作为配体都属于特异性配体。配体的特异性是保证亲和层析高分辨率的重要因素。要找到合适的特异性配体通常需要大量的实验。

通用性配体：一般是指特异性不是很强，能和某一类的蛋白质等生物大分子结合的配体，如各种凝集素（lectine）可以结合各种糖蛋白，核酸可以结合 RNA、结合 RNA 的蛋白质等。通用性配体对生物大分子的专一性虽然不如特异性配体但通过选择合适的洗脱条件也可以得到很高的分辨率。而且这些配体还具有结构稳定、偶联率高、吸附容量高、易于洗脱、价格便宜等优点，所以在实验中得到了广泛的应用。

亲和吸附介质的配基

1、酶的抑制剂
2、抗体
3、protein A：protein A 为分子量约为 42KD 的蛋白质，存在于黄色葡萄球菌的细胞壁中，占该细胞壁构成成分约 5%。
4、凝集素（lectin）：是与糖特异性结合的蛋白质（酶和抗体除外）的总称，大部分凝集素为多聚体，含有两个以上的糖结合部位，不同的凝集素与糖结合的特异性不同。
5、辅酶和磷酸酰苷
6、过渡金属离子
7、组氨酸
8、肝素

基体配体吸附剂的制备：

偶联方法
- 物理方法等　包埋法和吸附法
- 化学方法
  - 交联法：即用戊二醛、碳二亚胺等双功能试剂交联基质与配体
  - 偶联法：利用**CNBr**、环氧氯丙烷、双环氧乙烯、丁二烯砜、亚胺二烯酸等化学试剂使配体与活化的基质偶联或形成螯合物

www.g-clone.com

CNBr是最常用的偶联剂，偶联过程分为基质的活化、偶联、去除未结合配体、配体结合量的测定等步骤

ProteinA 和 ProteinG 对不同抗体的结合能力：

种属	亚型	Protein A	Protein G
Human	**IgA**	varible	—
	IgD	—	—
	IgE	—	—
	IgG1	++++	++++
	IgG2	++++	++++
	IgG3	—	++++
	IgG4	++++	++++
	IgM	varible	—
Avianeggyolk	**IgY**	—	—
Cow		++	++++
Dog		++	+
Goat		—	++
Guineapig	**IgG1**	++++	++
	IgG2	++++	++
Hamster		+	++
Horse	**Total IgG**	++	++++
Koala		—	+
Liama		—	+
Monkey(rhesus)		++++	++++
Mouse	**IgG1**	+	++++
	IgG2a	++++	++++
	IgG2b	+++	+++
	IgG3	++	+++
	IgM	variable	—
Pig		+++	+++
Rabbit	**Total IgG**	++++	+++

Rat	**IgG1**	—	+
	IgG2a	—	++++
	IgG2b	—	++
	IgG3	+	++
Sheep	**Total IgG**	+/-	++

++++=结合能力强；++=结合能力中等；—=结合能力弱或没有结合

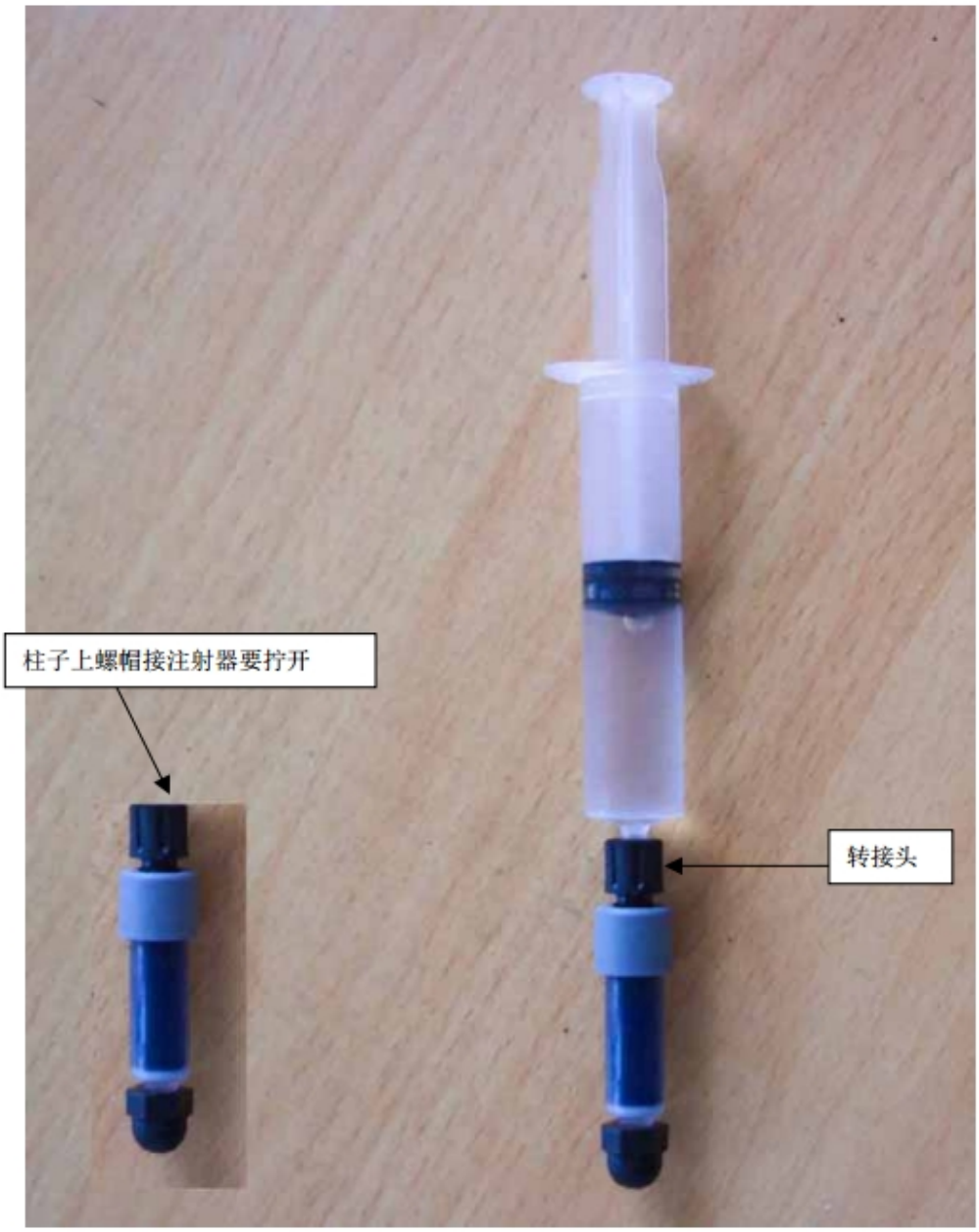
金克隆-亲和层析填料产品简介				
货号	名称	粒径 /μm	pH	应用
TL356F	Blue-Sepharose 6FF 蓝色-琼脂糖凝胶 6FF	45-165	4-12	高效亲和能力，快速度适合干扰素、α_2-巨球蛋白、凝血因子、需要核苷酸辅助的酶。
TL504B	Glutathione Sepharose 4B 谷胱甘肽-琼脂糖凝胶 4B	45-165	4-10	羧端含谷胱甘肽 S-转移酶重组融合蛋白或依赖 S-转移酶或谷胱甘肽的蛋白
TL516F	Heparin Sepharose 6FF 肝素-琼脂糖凝胶 6FF	45-165	5-10	用于纯化抗凝血酶 III，凝血因子，脂蛋白，脂酶，蛋白合成因子，激素，干扰素
TL336F	Benzamidine Sepharose 6B 苯甲脒-琼脂糖凝胶 6B	45-165	2-13	纯化尿激酶，胰蛋白酶
TL694B	Trypsin Sepharose 4B 胰蛋白酶-琼脂糖凝胶 4B	45-165	2-13	纯化胰蛋白酶抑制剂，抑肽酶
TL534B	Lysine-Sepharose 4B 赖氨酸-琼脂糖凝胶 4B	45-165	2-11	适用于纤维蛋白酶原、血纤维蛋白溶酶原激活剂、双链 DNA 的纯化
TL556F	Ni Sepharose 6FF 镍-琼脂糖凝胶 6FF	10-45	3-12	带 His 标签的重组蛋白及能被金属离子吸附的高分子
TL484F	Gelatin Sepharose 4FF 明胶-琼脂糖凝胶 4FF	45-165	3-10	与纤维连接蛋白特异结合，用于纯化或者去除纤维连接蛋白
TL314B	Arginine Sepharose 4B 精氨酸-琼脂糖凝胶 4B	45-165		适用于丝氨酸蛋白酶，凝血因子，血纤维蛋白溶酶原，血纤维蛋白溶酶原激活剂等的亲和纯化
TL626F	Red Sepharose 6FF 红色-琼脂糖凝胶 6FF	45-165		适用于各种依赖 NAD+和 NADP+的脱氢酶、激酶、羧肽酶、转化酶及别的结合染料蛋白的分离纯化
TL404B	ConA Sepharose 4B ConA-琼脂糖凝胶 4B	45-165		适用于亲和层析介质，纯化糖蛋白、膜蛋白、糖脂、多糖、带甘露糖苷或葡萄糖苷残基的膜囊泡，激素，脂蛋白等

为了适应不同的亲和层析要求，金克隆公司还有多种活化偶联介质（中间体）。客户可根据自身需求，选用合适的活化偶联介质，通过简单的化学反应即可在此中间体上偶联特异性配基（如 IgG、ProteinA、抗原、抗体、多肽），来制备各种亲和层析介质。

金克隆-活化色谱填料产品简介		
货号	名称	特性及应用
TL306B	环氧树脂活化琼脂糖凝胶 FF Epoxy-Activated Sepharose FF	粒径90μm， 20-40umol/ml 偶联带OH、NH2、SH的配基制备成亲和色谱填料，非特异吸附少、化学稳定性好。
TL464B	HOOC-琼脂糖凝胶 FF	20-40umol/ml 偶联带氨基的配基。
TL7000	活化巯基琼脂糖凝胶 FF	粒径90μm，配基：巯基吡啶，配基密度：15-30μmol /ml 或 20-40μmol /ml。偶联带巯基的配基制备成亲和色谱填料，偶联效率高，10个碳原子手臂，可用于共价色谱纯化带巯基物质。

问题及解决方案

	原因分析	推荐解决方案
柱子反压过高	筛板被堵塞	清洗或更换筛板
	填料被堵塞	按照填料清洗部分进行树脂清洗
		裂解液中含有微小的固体颗粒，建议上柱前使用滤膜(0.22or0.45μm)过滤，或者离心去除。
样品纯化过程中曲线不稳	样品或 buffer 中有气泡	去除样品或柱子中的气泡
		样品和 buffer 进行脱气
洗脱组分中没有目的蛋白	样品中抗体浓度太低	使用其抗原做配体的介质
	抗体被降解	适当的提高洗脱 pH
回收率逐渐减低	上样量太多	减少上样量
	柱子太脏，载量降低	按照填料清洗部分进行树脂清洗



柱子　　装完的样子

注射器应该连上转接头，插紧，拧开柱子的上头，先用注射器推一点液体到柱子的上孔排空转换头和柱子间的空气，然后再把注射器和转接头拧到柱头上再拧紧，打开柱子下面的螺帽，就可以缓慢推液体，力量要均匀，每次换溶液都要象上面操作那样除气泡，避免有气泡进入柱子影响效果。