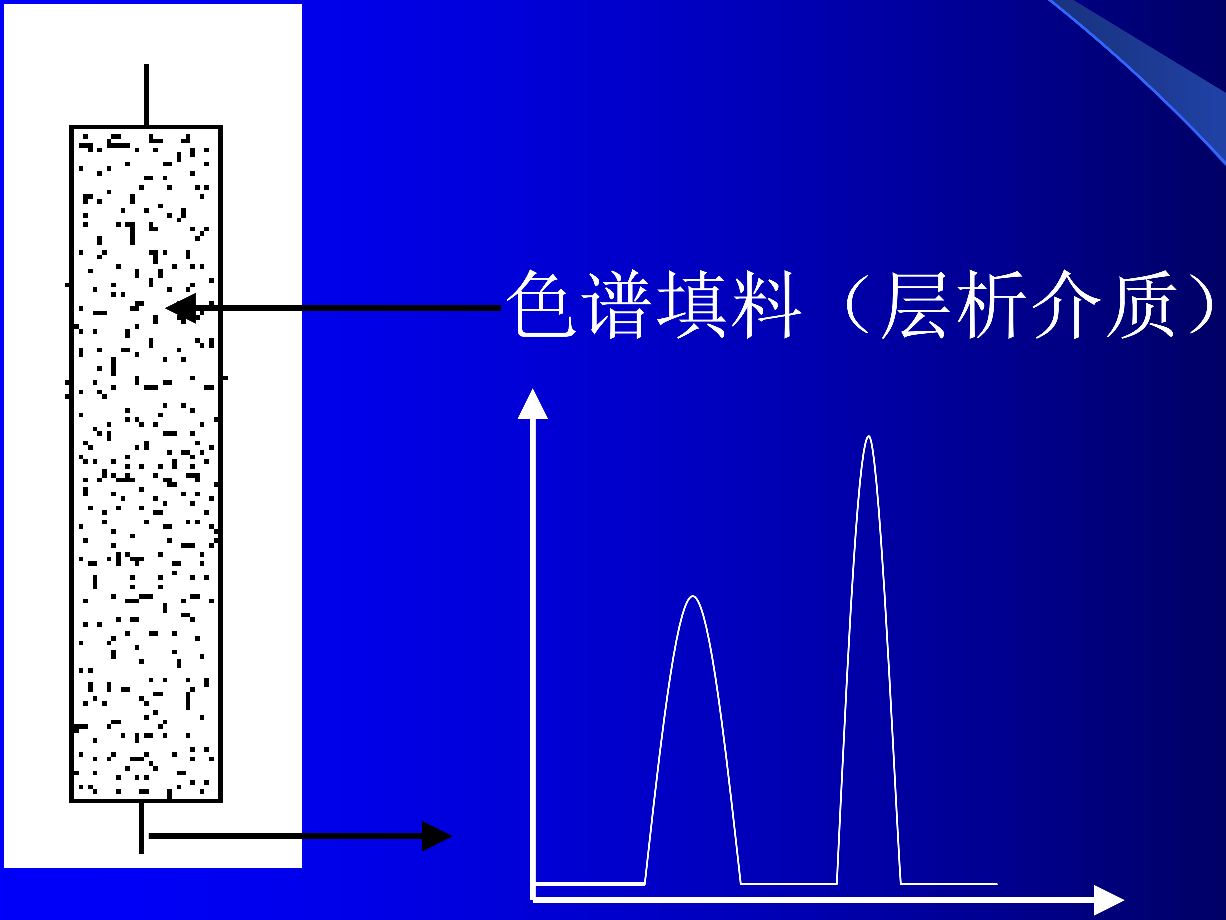
生物大分子分离纯化的策略

韦 新 桂

北京韦氏博慧色谱科技有限公司

色谱填料的定义



一、色谱分离的原理

1、生物分子的大小及形状

2、生物分子的荷电性质

3、生物分子的极性

4、生物分子的特异性

二、色 谱 种 类

1、凝胶过滤色谱（分子筛）
2、离子交换色谱
3、疏水色谱
4、亲和色谱

(1) 凝胶过滤色谱

1、原理

凝胶过滤色谱(Gel Filtration Chromatography GFC)又称为分子排阻色谱(Size Exclusion Chromatography SEC）原理见图解。

凝胶过滤色谱

2、凝胶过滤色谱的优点

1. 分离条件温和，蛋白质收率高，重现性好。
2. 分离的分子量范围广。
3. 易于操作。

3、凝胶过滤色谱的缺点

处理量小，时间长，分离效果不很理想。

琼葡糖凝胶G10-200 FF

本产品将葡聚糖凝胶和琼脂糖凝胶混合造粒，再经过高度交联制备出流速快、重复性好、分离效果更好的新型凝胶过滤填料。

它和普通的葡聚糖凝胶填料相比流速快，刚性好，颗粒均匀，没有非特异吸附，装填后体积不收缩，因此可以在高流速下保持很好的分离效果，其特性和进口的superdex系列一样，但是型号更全，完全可以代替葡聚糖凝胶系列填料，规格也全，既有平均粒径为90μm的制备级填料，也有平均粒径为34μm高效填料。满足用户不同需求。它们稳定性好，使用寿命长，分辨率高，不需要溶胀，使用方便，是理想的凝胶过滤填料。

本公司的凝胶过滤色谱填料

型号	分离范围	平均粒径(μm)
琼葡糖凝胶 G10 FF	＜700	34和 90
琼葡糖凝胶 G15 FF	100-1500	34和 90
琼葡糖凝胶 G25 FF	1000-5000	34和90
琼葡糖凝胶 G50 FF	1000-30000	34和90
琼葡糖凝胶 G75 FF	3000-80000	34和90
琼葡糖凝胶 G100 FF	4000-120000	34和90
琼葡糖凝胶 G150 FF	5000-300000	34和90
琼葡糖凝胶 G200 FF	5000-600000	34和90

(2) 离子交换色谱

1、原理

离子交换色谱（Ion Exchange Chromatography IEC）原理是带电的生物大分子和离子交换色谱填料上的离子基团进行交换而被分离纯化。

2、离子交换色谱优点

1. 处理量大，操作简单。

2. 应用广泛。

3、离子交换色谱缺点

样品要除盐，分离效果不如亲和和疏水色谱。

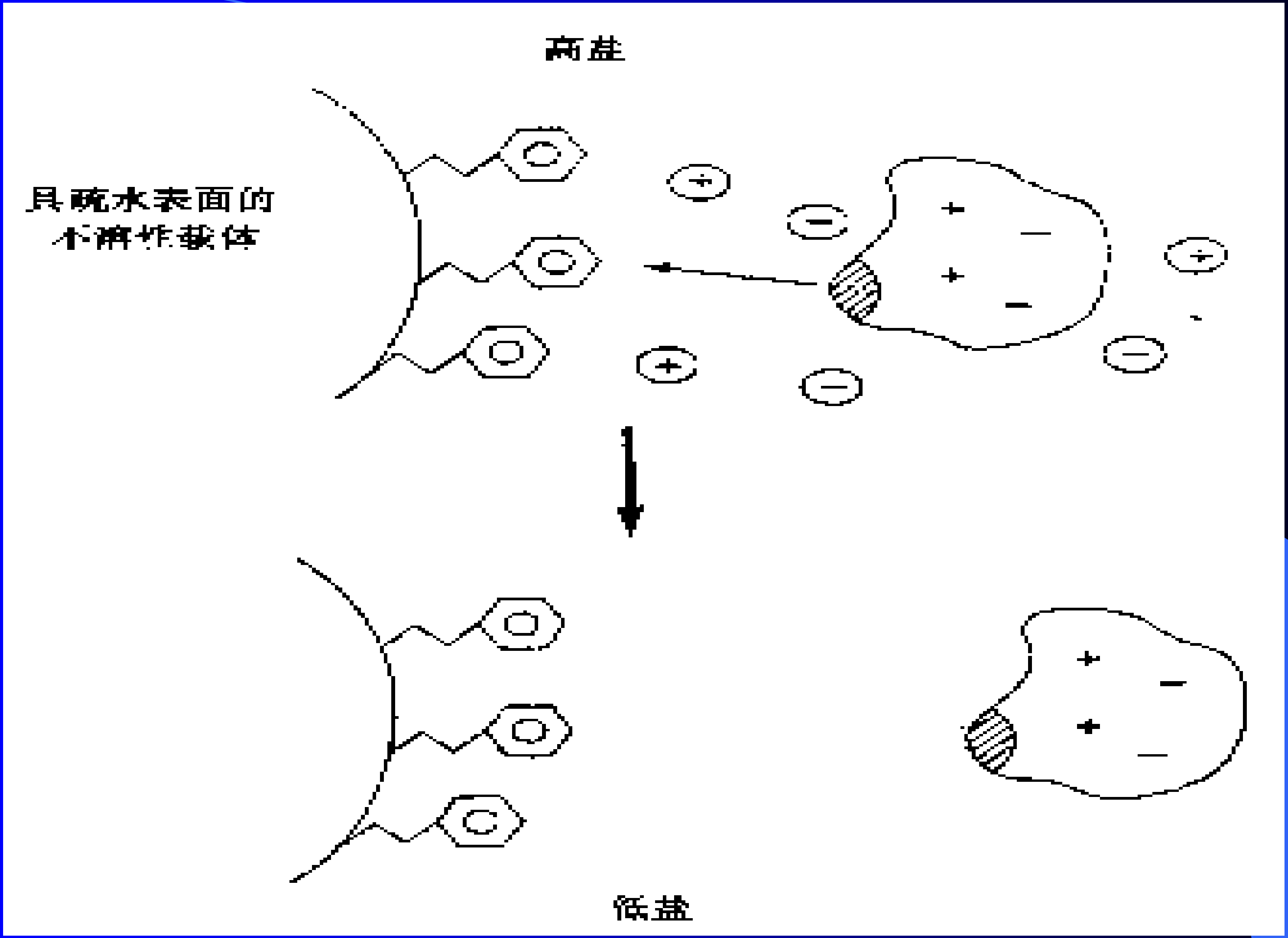
4、本公司的离子交换色谱填料

介 质 名 称	功能基团
DEAE琼脂糖凝胶 FF	二乙基氨基乙基 $-OCH_2CH_2N(C_2H_5)_2$
Q 琼脂糖凝胶 FF	二乙基(2-羟丙基)季胺 $-OCH_2CH_2N^+(C_2H_5)_2CH_2CH(OH)CH_3$
CM 琼脂糖凝胶 FF	羧甲基 –OCH2COOH
SP 琼脂糖凝胶 FF	磺酸丙基 $-C_3H_6SO_3H$
球形羟基磷灰石 FF	钙离子及磷酸根

(3) 疏水色谱

1、原理

疏水相互作用色谱（Hydrophobic Interaction Chromatography HIC）原理是在高浓度的盐溶液中，蛋白质会被吸附到疏水色谱填料的疏水基团上，当逐渐降低盐浓度时，它们会按疏水性的强弱先后被洗脱。



疏水相互作用色谱的原理

2、 疏水色谱的影响因素

1） 色谱填料的影响

1. 色谱填料只有疏水相互作用力。
2. 疏水基团的密度必须适中。
3. 疏水基团碳链不应该太长。

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。

3、疏水色谱的特点

1. 分离效果好，成本低。

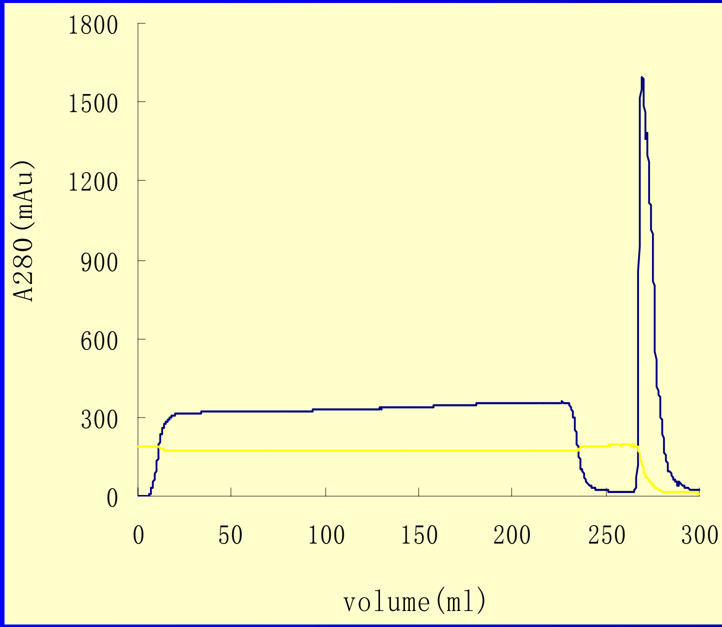
2. 洗脱条件温和，处理样品量大，分辨率高。

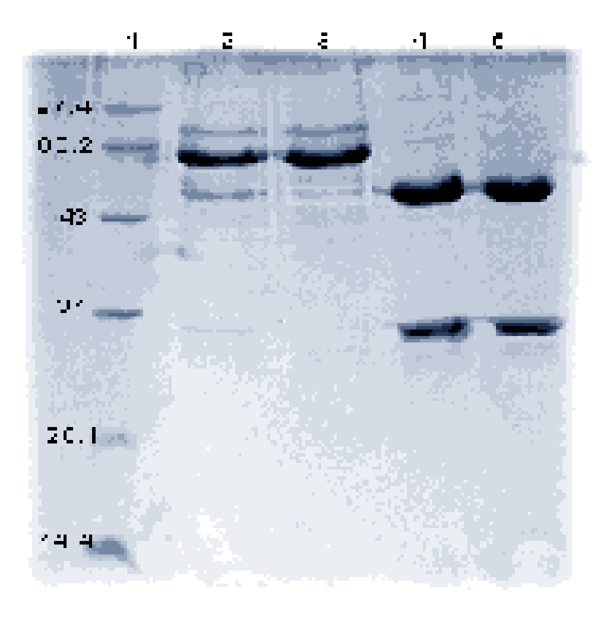
3. 配合其他色谱使用更能发挥它的分离效果。

4、疏水色谱应用

苯基琼脂糖凝胶纯化培养液中的抗体。

5.疏水色谱纯化细胞培养样品中的抗体





苯基琼脂糖凝胶分离抗体

填料：苯基琼脂糖凝胶 FF 5ml
Buffer A:50mM PBS，0.6M 硫酸铵，pH7.0
Buffer B: 50mM PBS，pH7.0
结果：洗脱蛋白量4.5mg/ml×20ml=90mg

苯基琼脂糖纯化**SDS-PAGE**图

1.marker 2. 培养液上清 3.苯基柱 穿透
4.和5 .苯基柱洗脱

6、本公司的疏水色谱填料

介 质 名 称	功能基团
苯基琼脂糖凝胶 FF	苯基 $-OCH_2CH(OH)\ CH_2OC_6H_5$
丁基琼脂糖凝胶 FF	丁基 $-OCH_2CH\ (OH)\ CH_2OC_4H_9$
辛基琼脂糖凝胶 FF	辛基 $–OCH_2CH\ (OH)\ CH_2OC_8H_{17}$

(4) 亲和色谱

1、原理

亲和色谱(Affinity Chromatography AC)又叫功能色谱(Function Chromatography)，它的原理是填料上的配基与生物大分子特异结合，用特殊的洗脱条件把被吸附的生物分子洗脱下来。一种亲和色谱填料只能用于一种或有限的一类生物分子。

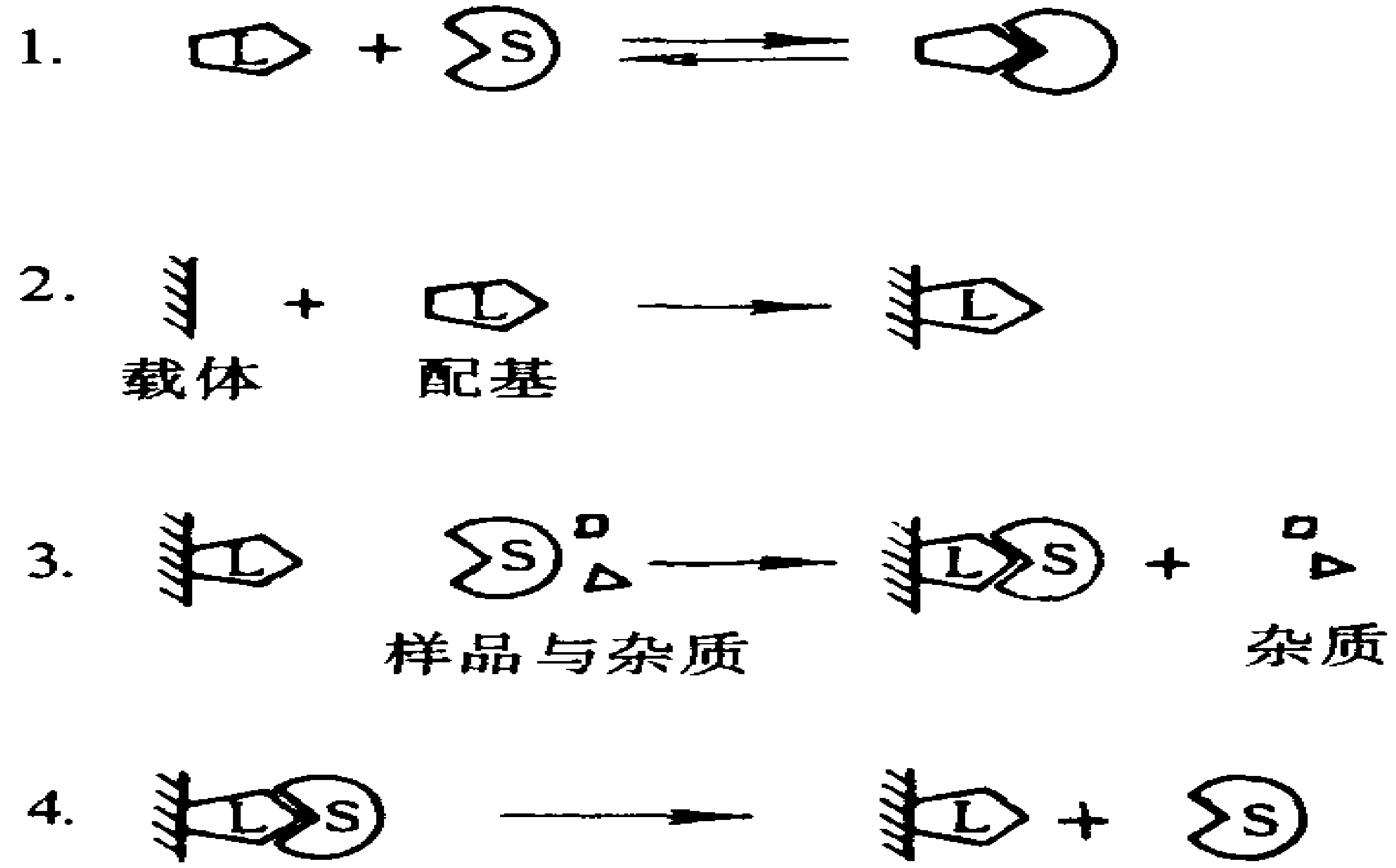


图 7-1　亲和层析法基本过程

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

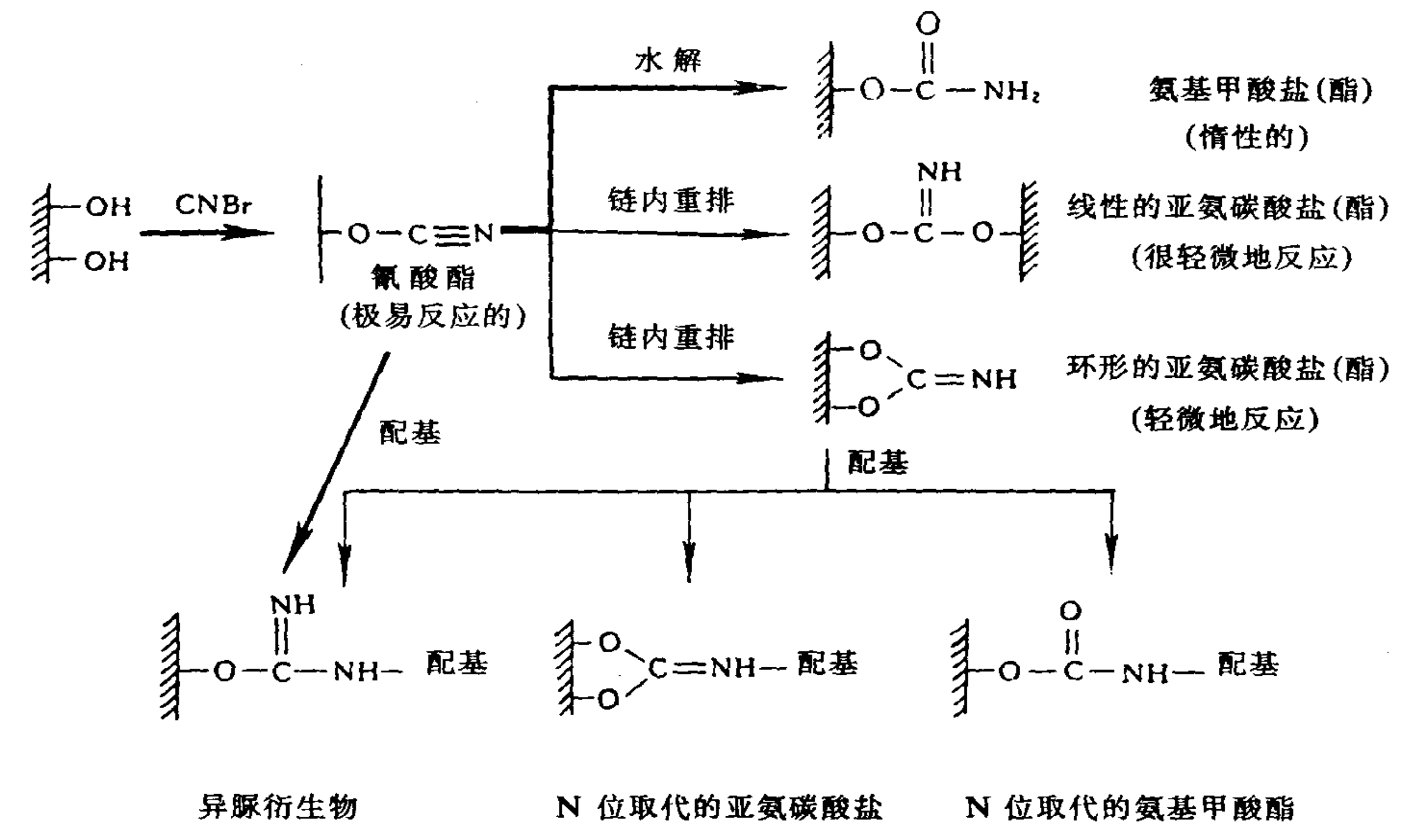
2、活化方法

1. 溴化氰活化法

溴化氰活化及配基偶联的反应如下图所示。对新活化的琼脂糖凝胶偶联分析表明，80%配基是由氰酸酯偶联的，20%由亚氨碳酸盐偶联的。

缺点：

对填料没有交联作用，因此填料刚性不好，流速不快。偶联后形成的酰胺键不稳定，容易降解而使配基脱落。



溴化氰活化及配基偶联的原理

2.缩水甘油醚活化法

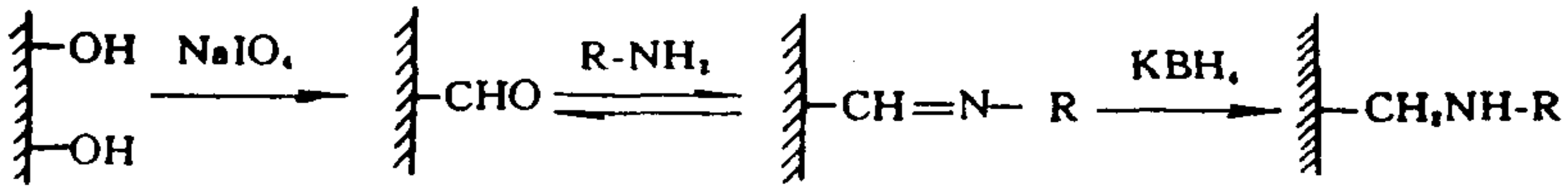
这种活化的填料其偶联配基密度虽然只有溴化氰活化75%，但它有合适的亲和手臂，所以有更好的分离效果，而化学性质更加稳定。配基很少脱落。

此外它对琼脂糖凝胶还有交联作用，所以填料的刚性更好，流速更快。

- 3. 环氧氯丙烷活化法

这种活化的方法时间短，而且价格便宜，也很常用。

4.高碘酸盐活化法



3、金属螯合亲和色谱

金属螯合亲和色谱(Metal Chelate Affinity Chromatography)，又称固定金属离子亲和色谱，其原理是利用蛋白表面的一些氨基酸，例如组氨酸等能与多种过渡金属离子如Cu^{2+}，Zn^{2+}，Ni^{2+}，Co^{2+}，Fe^{3+}发生特殊的相互作用，利用这个原理对蛋白进行分离。因此螯合了金属离子的琼脂糖凝胶就能够选择性的吸附那些含有组氨酸的蛋白和对金属离子有吸附作用的多肽、蛋白和核苷酸。半胱氨酸和色氨酸也能与固定金属离子产生吸附作用，但这种吸附力要远小于组氨酸残基与金属离子的吸附作用。

1.螯合金属离子的影响

常用的有Ni2+、Cu2+、Zn2+、Co2+和Ca2+。其中Cu2+、Ni2+对蛋白吸附力强， Co2+ ，Zn2+比较弱。

2.缓冲液的影响

缓冲液中最好没有EDTA，EGTA和氨盐，在缓冲液中加入适量的表面活性剂或者减少盐浓度可以降低非特异的疏水吸附。

3.样品的影响

1.样品通常溶解在pH5.5-8.5的缓冲液中，pH高，载量也高。

2.缓冲液的pH不能小于5.5，否则金属离子会脱落。

3.样品不能含EDTA，EGTA和氨盐等

- 镍琼脂糖 **FF**

本产品是我公司自主设计合成的金属螯合琼脂糖凝胶，这种金属螯合色谱填料具有更高的载量，物理和化学稳定性好，批次重复性好，使用寿命长，且已经完成了金属离子的螯合，使用更方便。

- 应用实例：
- 镍琼脂糖凝胶 FF分离带His标签的重组蛋白

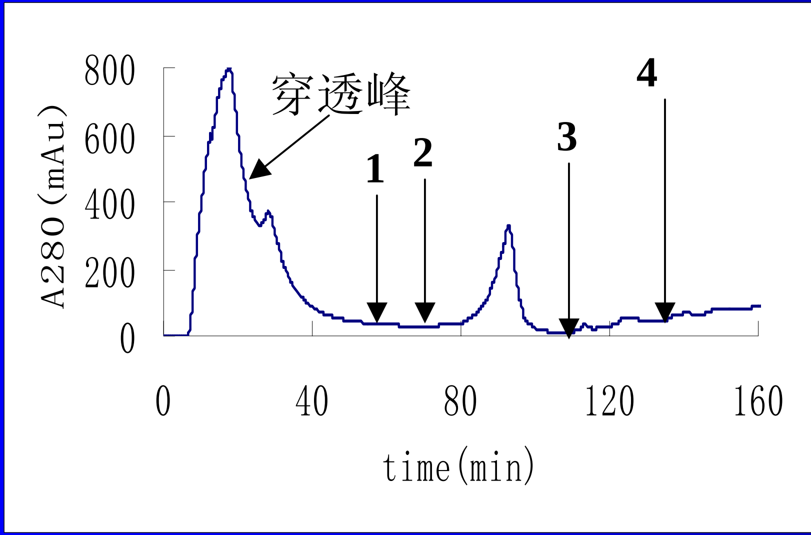


图1镍柱色谱图

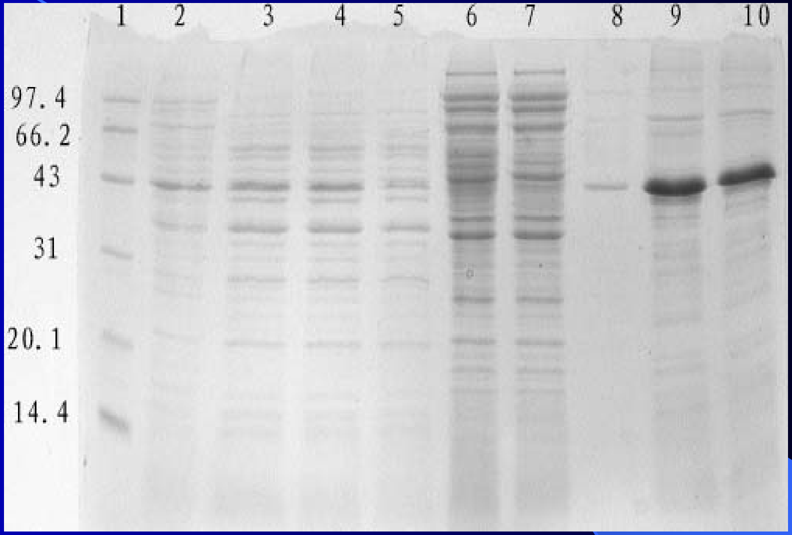


图2 镍柱SDS-PAGE

柱子： 镍琼脂糖凝胶 FF 1.6x20 10 ml

样品：13.5ml细胞破碎液

平衡缓冲液：20mM PBS pH 7.4 0.5M NaCl

洗脱缓冲液:平衡缓冲液中加不同浓度的咪唑

1： Marker 2: 细胞破碎液，3,4： 穿透峰，5: 10mM咪唑洗脱峰，6,7：20mM咪唑洗脱峰，8：100mM咪唑洗脱峰，9、10：200mM咪唑洗脱峰

用Cu2+分离带His标签的重组蛋白

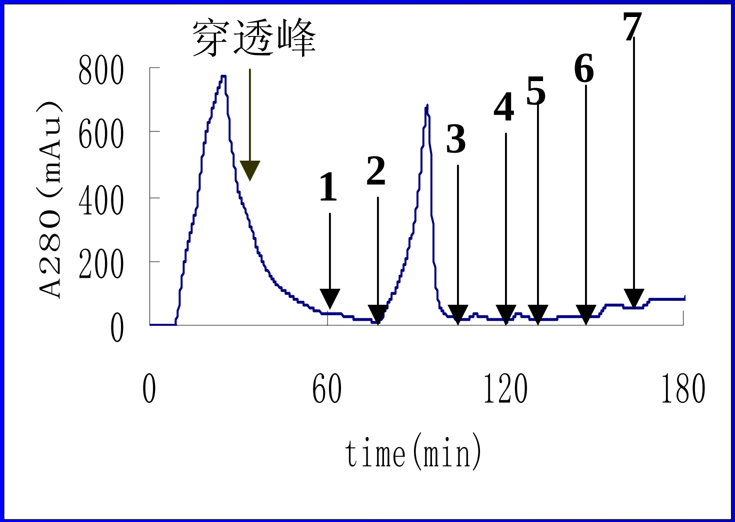


图3 Cu2+螯合色谱图

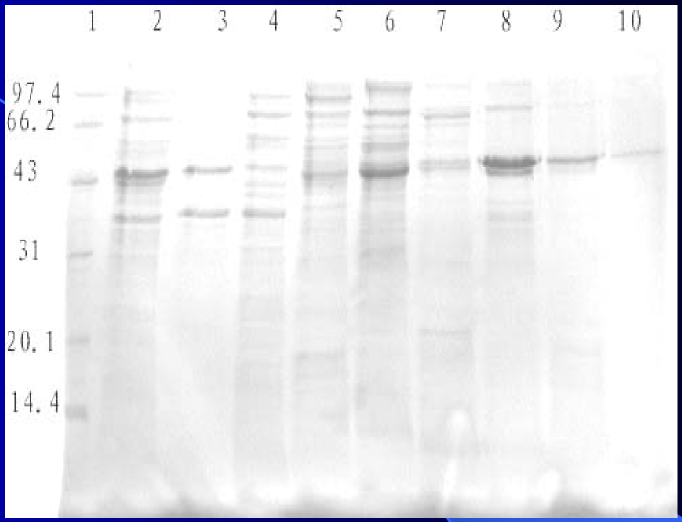


图4 Cu2+柱SDS-PAGE

柱子： Cu2+琼脂糖凝胶 FF 1.6x20 10 ml

样品：20ml细胞破碎液

平衡缓冲液：20mM PBS pH 7.45 0.5M NaCl

洗脱缓冲液:平衡缓冲液中加不同浓度的咪唑

1: marker，2: 细胞破碎液，3:穿透峰，4: 10mM咪唑洗脱峰，5: 20mM咪唑洗脱峰，6: 50mM咪唑洗脱峰，7: 100mM咪唑洗脱峰，8:200mM咪唑洗脱峰，9: 300mM咪唑洗脱峰，10: 400mM咪唑洗脱峰

用Co2+分离带His标签的重组蛋白

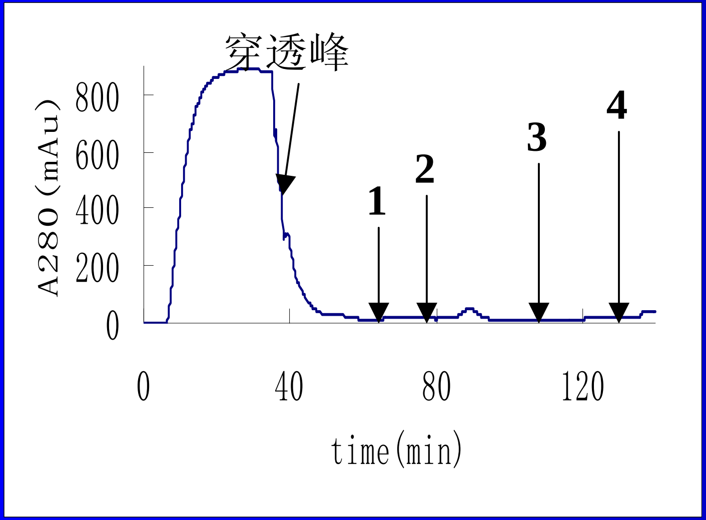


图5 Co2+螯合色谱图

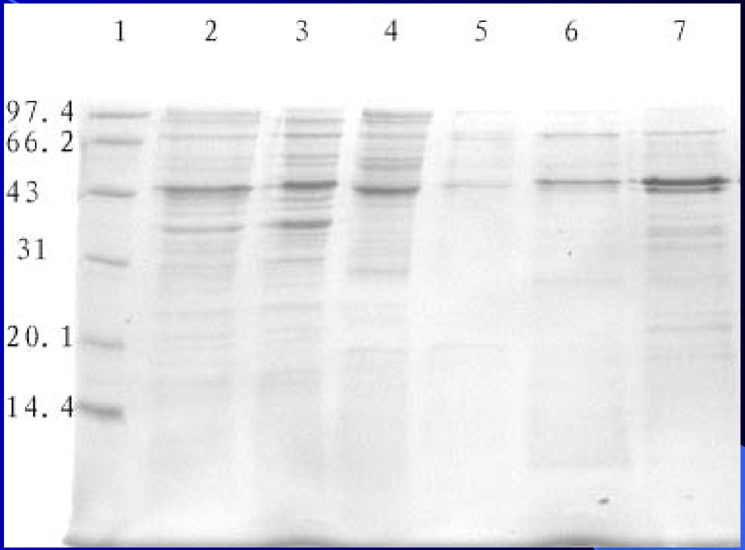


图6 Co2+柱SDS-PAGE

1: marker，2: 细胞破碎液，3: 穿透峰，4: 20mM咪唑洗脱峰，5: 50mM咪唑洗脱峰，

6: 100mM咪唑洗脱峰，7: 200mM咪唑洗脱峰

柱子： **Co2+琼脂糖凝胶 FF 1.6x20 10 ml**

样品：20ml细胞破碎液

平衡缓冲液：20mM PBS pH 7.45 0.5M NaCl

洗脱缓冲液:平衡缓冲液中加不同浓度的咪唑

Ni2+螯合色谱分离带His标签重组蛋白条件优化

洗脱的条件相似，但是在缓冲液中加了1%的吐温20

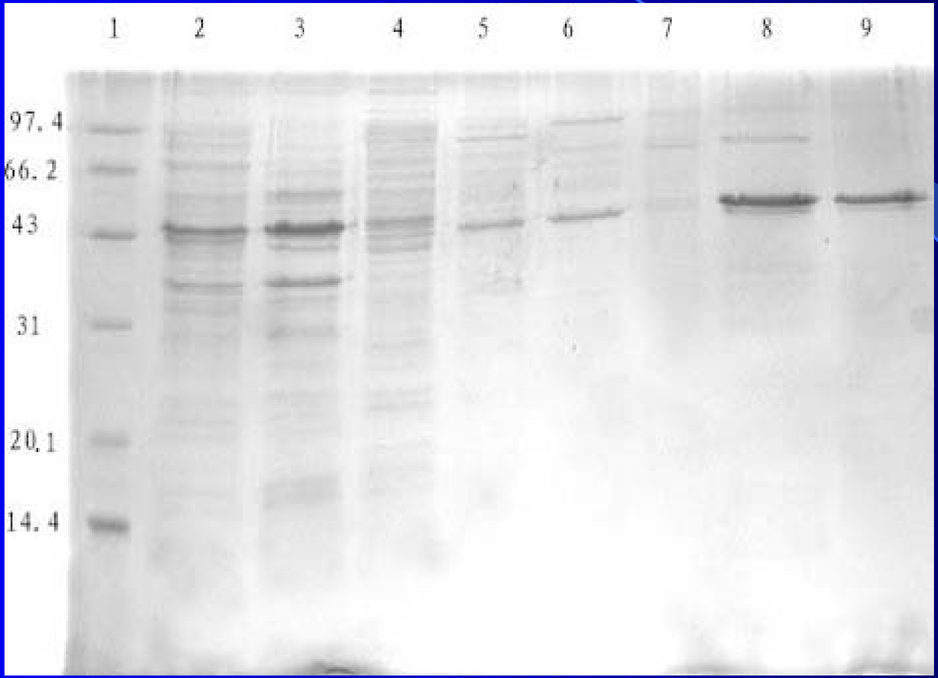


图7. Ni^{2+}柱的SDS-PAGE

1: marker，2: 细胞破碎液，3: 穿透，4: 15mM咪唑洗脱峰，5: 20mM咪唑洗脱峰，6: 50mM咪唑洗脱峰，7: 100mM咪唑洗脱峰，8: 200mM咪唑洗脱峰，9: 500mM咪唑洗脱峰

把穿透的样品再上镍柱

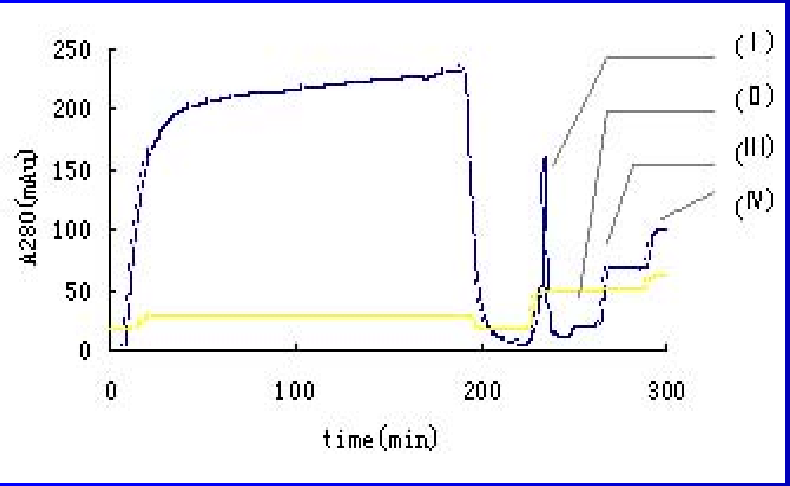


图8镍柱色谱图

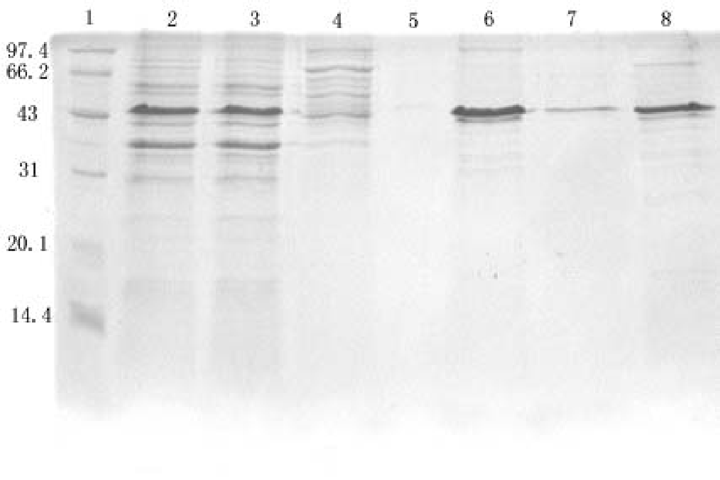


图9. 镍柱的SDS-PAGE

柱子： 镍琼脂糖凝胶 FF 1.6x20 10 ml

样品：前三次不同柱的穿透峰160ml,加水80ml

平衡缓冲液：20mM PBS pH 7.4 0.5M NaCl

洗脱缓冲液:平衡缓冲液中加不同浓度的咪唑，而且洗脱液中有1%吐温20

1：marker；2：穿透样品；3：穿透峰；4：50mM咪唑洗脱峰；5：100mM咪唑洗脱峰；6：300mM咪唑洗脱峰；7：500mM咪唑洗脱峰；8 ：合并前一次的0.2M.0.5M咪唑洗脱。

不同分离方法比较

金属离子	洗脱方式	上样量	回收率	纯度
Ni2+柱	咪唑	15.1 mg	64.5%	85%
Cu2+柱	咪唑	26.2 mg	41.5%	87%
Co2+柱	咪唑，吐温20	26.2 mg	31.5%	72%
Ni2+柱	咪唑，吐温20	16.2 mg	66.5%	92%
Ni2+柱	咪唑，吐温20	16.3mg	104%	92%

表中回收率是按每100mg总蛋白中含20mg的重组蛋白计算得到的。

结果表明，Ni2+金属螯合琼脂糖凝胶色谱有更好的蛋白回收率和纯度。

- 镍NTA琼脂糖凝胶FF

镍琼脂糖凝胶FF的配基是最经典的IDA，镍离子有六个螯合价位，Ni-IDA螯合了三价，剩余三价，而Ni-NTA是四价的，剩余是两价，因此Ni-IDA琼脂糖凝胶作用力要比Ni-NTA琼脂糖凝胶的强，也正因为这个原因， IDA的载量要比NTA高，而在同样条件下Ni-IDA洗杂质和目标蛋白的要比Ni-NTA的咪唑浓度高 。但是NTA的填料更稳定，耐受更强的还原剂，更不容易脱落。本公司是这两种都有，用户按自己的需要选择。

GST琼脂糖凝胶FF纯化GST融合蛋白

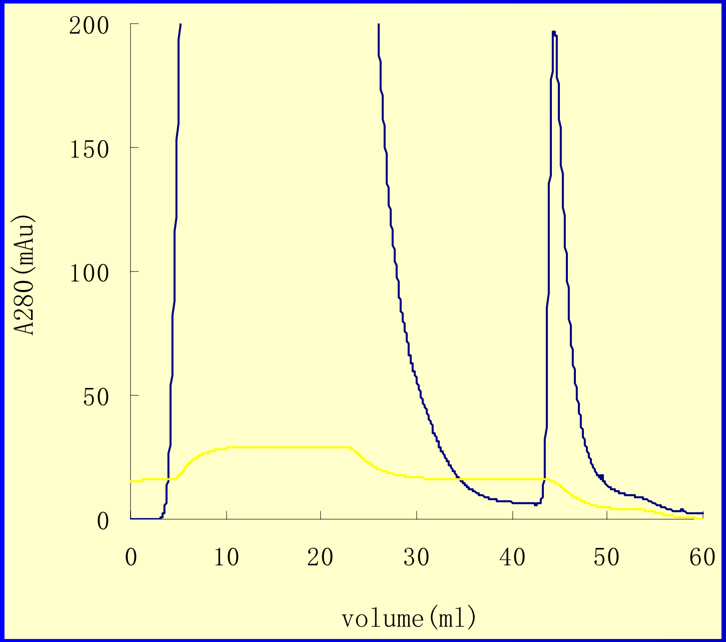


图10 亲和色谱分离GST融合蛋白

1ml预装柱子，5ml细胞破碎液缓冲液A 稀释到20 ml，平衡缓冲液A: 20 mM磷酸盐缓冲液 pH7.4，洗脱缓冲液B: 50mM Tris-Cl,10mM GSH，pH8.0 。

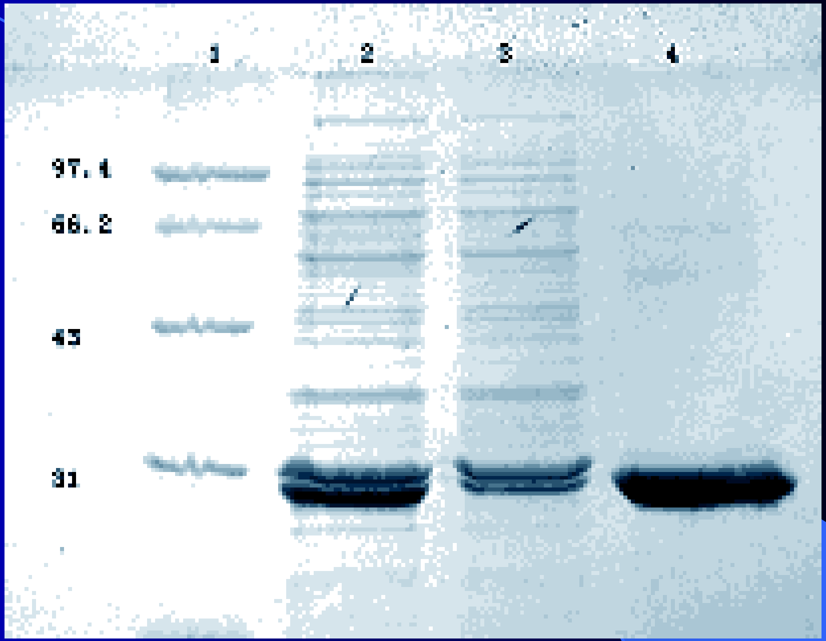


图11 SDS-PAGE电泳

1:mark 2:细胞破碎液 3:穿透 4:洗脱

去内毒素琼脂糖凝胶的应用

去内毒素琼脂糖凝胶FF(A)　高效去内毒素琼脂糖凝胶FF(B)

载量 3000-5000EU/ml　载量 10000-30000EU/ml

	A处理前	A处理后	B处理前	B处理后
浓度mg/ml	1.10	1.09	2.9	2.9
内毒素量EU/mg	3000-5000	<10	1000-5000	<10

使用过程配基不脱落，非常安全，已应用于病毒、疫苗、核酸、多糖、蛋白、抗体等样品中内毒素去除，都取得很好的效果。样品回收率高，操作方便，可重复使用。

重组蛋白A琼脂糖凝胶 FF

本产品将进口的重组蛋白A偶联到环氧活化的琼脂糖凝胶6B上，成为用于抗体分离纯化的亲和色谱填料。

产品稳定性好，基团脱落少，使用寿命长，使用方便，可从腹水或培养液中直接分离纯化抗体。

由于采用了环氧活化的方法，与溴化氰活化方法相比，可获得长短更适合的结合臂，使抗体纯化获得更好的效果。并且这种方法活化的琼脂糖凝胶没有离子交换的作用，因而其死吸附少 。

应用：

重组蛋白A琼脂糖凝胶分离腹水中的单抗

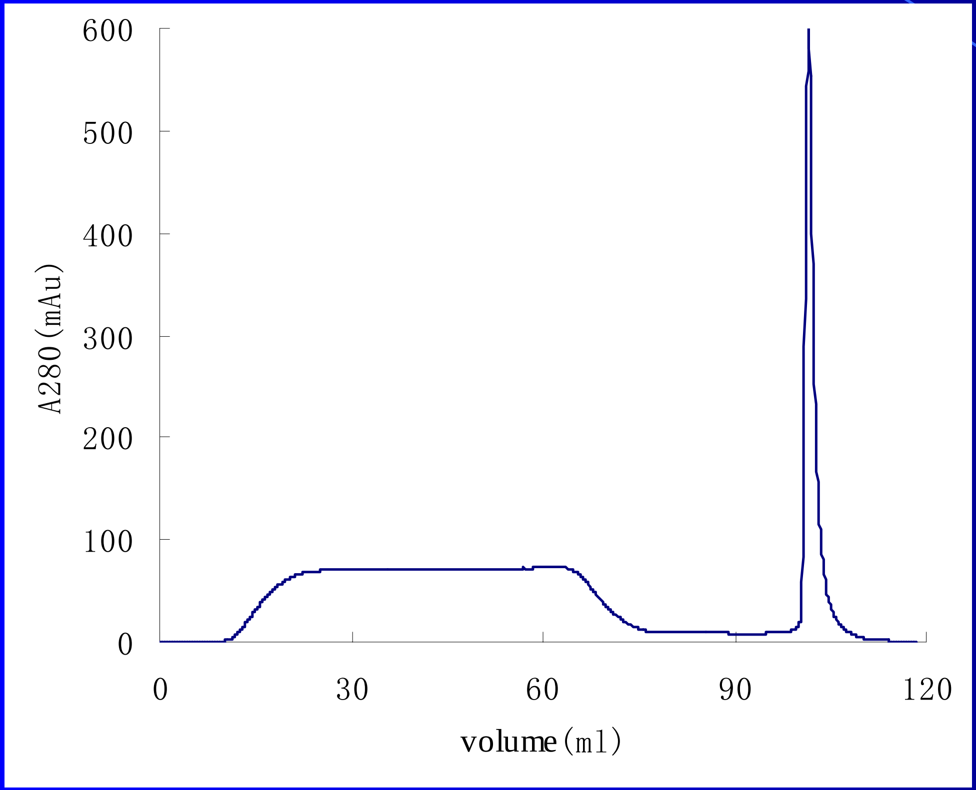


图12 亲和色谱分离腹水中的IgG

1.6x20cm柱子10ml，4ml腹水用缓冲液A 稀释到80 ml，平衡缓冲液A: 20 mM磷酸盐缓冲液 pH7.4，洗脱缓冲液B: 100mM柠檬酸缓冲液 pH4.0 。

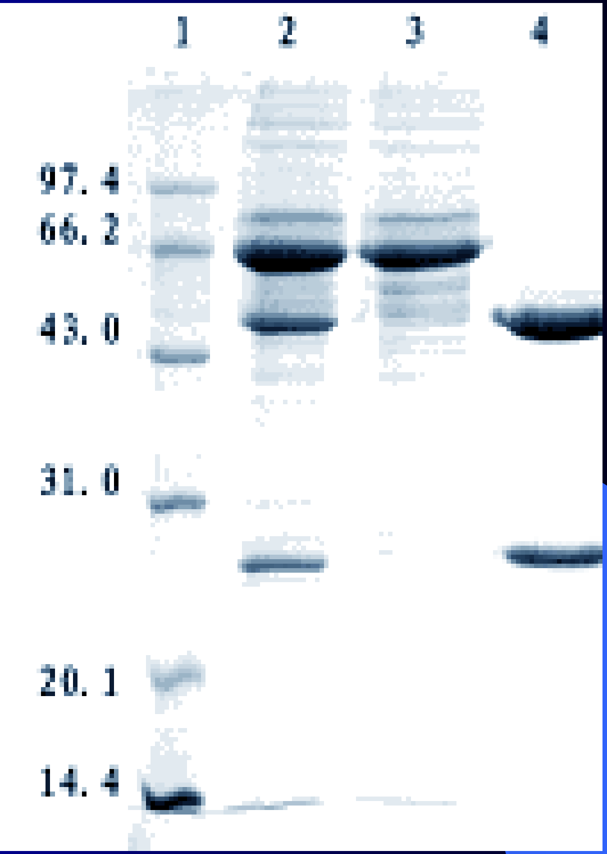


图13 SDS-PAGE电泳

1:mark 2:腹水 3:穿透 4:洗脱

染料亲和层析

蓝色琼脂糖凝胶FF去除牛血清白蛋白

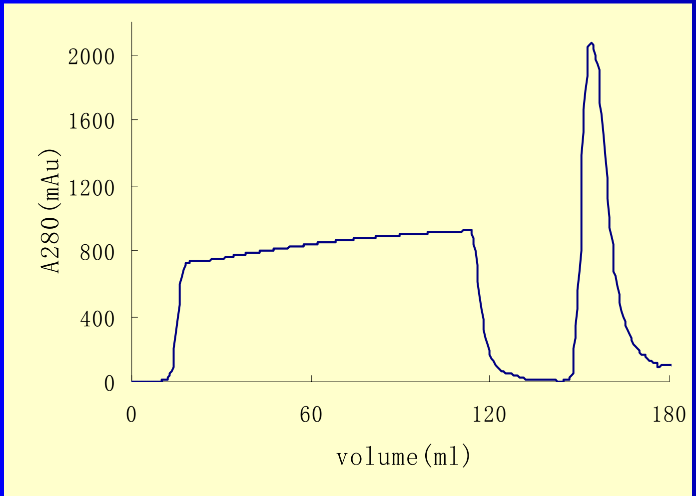


图14 染料亲和色谱去除BSA

1.6x20cm柱子15ml，80 ml样品，平衡缓冲液A: 50 mM磷酸盐缓冲液 pH7，洗脱缓冲液B: 50 mM磷酸盐缓冲液 pH7 含1M KCl。

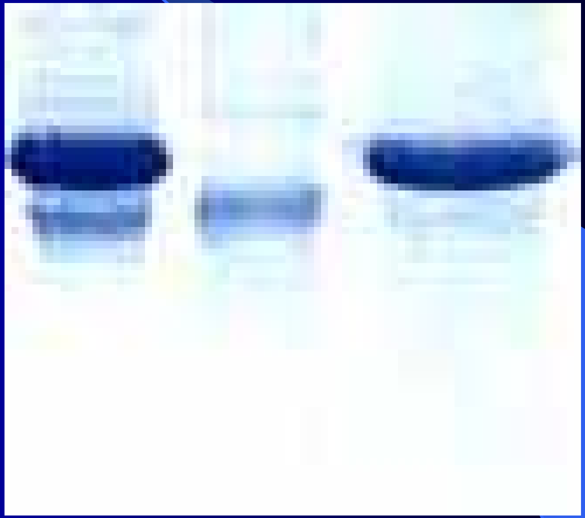


图15 SDS-PAGE电泳

1:样品 2:穿透 3:洗脱

亲和纯化超螺旋DNA

用DNA琼脂糖凝胶FF纯化超螺旋DNA
配合去内毒素填料开发出可用于临床级别的DNA疫苗生产工艺。

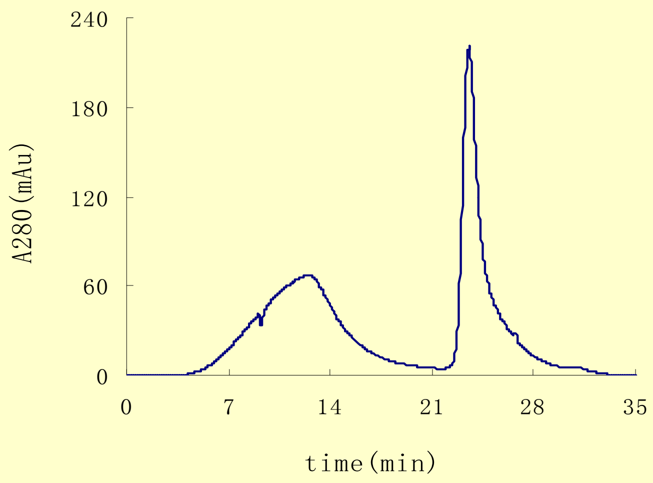


图16 亲和色谱纯化超螺旋DNA

0.75x2.5cm预装柱1ml，10 ml样品，平衡缓冲液A: 100 mM Tris-HCl缓冲液 10mMEDTA 2.5M硫酸铵 pH8，洗脱缓冲液B: 100 mM Tris-HCl缓冲液 10mMEDTA pH8 。

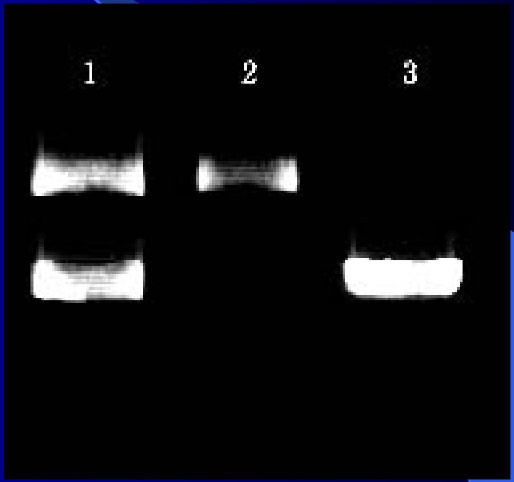


图17 1%琼脂糖凝胶电泳

1:样品 2:穿透 3:洗脱

4、亲和色谱填料再生

1. 亲和色谱柱使用几次后，吸附容量下降，亲色谱填料结块，颜色改变，这说明亲和色谱填料吸附了杂质，所以色谱柱要经过再生处理。

2. 通常把污染了的亲和色谱填料与非专一性的蛋白酶一起保存过夜。这种方法几乎可以完全恢复柱的吸附容量。不同的亲和填料配基性质不同，最好参照产品的使用说明，免得使填料损坏。

本公司的系列色谱填料有严格的质量标准，批次稳定，性能良好，价格便宜。服务周到快捷，技术全面，让用户没有后顾之忧。

北京韦氏博慧色谱科技有限公司

电话：010-67804548 13911415318：联系人:韦新桂 E-mail: weixingui@263.net http://www.wsac.cn 传真：010-67804548。

谢　谢！