

## 疏水相互作用和反相层析技术 原理和方法



# GE Healthcare 生命科学产品使用手册



## 抗体纯化手册

18-1037-46

## 重组蛋白手册

## 蛋白扩增与简单纯化

18-1142-75

## 蛋白纯化手册

18-1132-29

## 离子交换色谱及色谱聚焦

## 原理与方法

11-0004-21

## 亲和色谱层析

## 原理与方法

18-1022-29

## 疏水相互作用

## 原理与方法

18-1020-90

## 凝胶排阻层析

## 原理与方法

18-1022-18

## 扩张床吸附技术

## 原理与方法

18-1124-26

## 微载体细胞培养

## 原理与方法

18-1140-62

## Percoll 方法学与应用

18-1115-69

## Ficoll-Paque Plus

## 淋巴细胞的体外分离

18-1152-69

## GST基因融合系统手册1

8-1157-58

## 二维电泳（固定的pH梯度）

## 原理与方法

80-6429-60



# 目 录

简介	9
第一章 疏水相互作用层析的原理	12
理论情况下的疏水相互作用层析	12
水的作用	12
蛋白结构	13
可逆的相互作用	14
疏水相互作用分离的步骤	14
分辨率	17
柱效	18
选择性	19
第二章 疏水相互作用的实践	25
简介	25
纯化策略 (CIPP) 中的疏水相互作用层析	25
疏水相互作用分离的实际考虑	27
筛选选择性	30
自动的疏水相互作用填料筛选, 方法开发和优化	30
手动介质筛选, 方法开发和优化	31
样品性质和配基的选择	33
盐的选择和缓冲液制备	33
柱子和填料准备	38
样品制备	38
样品上样	39
样品上样量	39
样品体积	40
温度	40
洗脱	41
线性梯度洗脱	41
逐步洗脱	42
流速	35
流速控制	44
洗涤和再平衡	45
分析结果和下一步	45
规模化放大	46
仪器选择	46

疏水相互作用层析介质的保养 .....	47
问题解决 .....	47
理想的疏水相互作用分离：目的蛋白可以用梯度洗脱很好的分离 .....	47
目的蛋白在梯度里很早洗脱，分辨率差 .....	47
目的蛋白在梯度的末端洗脱，分辨率差 .....	48
目的蛋白在梯度的中间洗脱，分辨率差 .....	48
BioPress填料-专为生产设计的填料 .....	52
客户定制的填料 .....	52
客户定制产品 .....	52
第3章 疏水相互作用层析的介质 .....	53
简介 .....	53
SOURCE: 用高分辨率纯化和简单放大 .....	53
纯化选项 .....	54
纯化案例 .....	56
进行一次分离 .....	58
第一次使用或长期储存后使用 .....	59
用梯度洗脱分离 .....	59
用逐步洗脱分离 .....	59
清洗 .....	60
填料性质 .....	60
化学稳定性 .....	61
保存 .....	61
Sepharose High Performance: 高分辨纯化 .....	61
纯化选择 .....	62
纯化案例 .....	64
进行一次分离 .....	65
第一次使用或长期储存后使用 .....	66
用梯度洗脱分离 .....	67
用逐步洗脱分离 .....	67
清洗 .....	67
填料性质 .....	68
化学稳定性 .....	69
保存 .....	69
Sepharose Fast Flow: 用高分辨纯化，简单放大 .....	69
纯化选择 .....	70
纯化案例 .....	72

进行一次分离	75
第一次使用或长期储存后使用	76
用梯度洗脱分离	77
用逐步洗脱分离	77
清洗	77
填料性质	78
化学稳定性	78
保存	79
第四章 纯化策略中的疏水相互作用层析	79
应用CIPP	80
纯化技术的选择和组合	80
疏水相互作用层析作为捕获步骤	82
纯化重组人表皮生长因子 (h-EGF)	83
用于中度纯化的疏水相互作用层析	84
纯化Fab片段	85
疏水相互作用层析作为精细纯化	86
纯化重组的Pseudomonas aeruginosa exotoxin A, PE553D	86
用作精细纯化的其它技术	88
第五章 反相层析: 原理和方法	89
简介	89
术语	92
反相层析理论	90
反相层析分离的步骤	91
分辨率	93
选择性	95
反相层析的实践	103
填料和柱子选择	103
洗脱液选择和准备	104
柱子和填料准备	107
样品制备	107
样品上样量	108
样品体积	108
温度	108
洗涤和再平衡	110
问题解决	110
鬼峰	110

基线漂移：平衡洗脱液.....	110
纯化选项C C2/C18:对复杂样品的高分辨分离.....	113
使用μRPC .....	113
分离案例 .....	114
进行分离 .....	115
第一次使用或长期储存后使用 .....	115
用梯度洗脱分离 .....	115
清洁 .....	116
填料性质 .....	117
化学稳定性 .....	117
储存 .....	117
SOURCE: 快速高分辨分离, 简单规模化放大 .....	117
纯化选项 .....	118
纯化案例 .....	118
进行分离 .....	121
第一次使用或长期储存后使用 .....	121
用梯度洗脱分离 .....	122
清洗 .....	122
填料性质 .....	123
化学稳定性 .....	124
储存 .....	124
反相层析和CIP .....	124
反相层析作为捕获步骤 .....	125
反相层析作为中度纯化 .....	125
反相层析作为精细纯化 .....	125
附录1 样品制备 .....	126
样品的稳定性 .....	126
样品净化 .....	127
特定的样品制备步骤 .....	128
蛋白沉淀的重新溶解 .....	131
更换缓冲液和脱盐 .....	132
除去脂蛋白 .....	135
除去酚红 .....	135
除去小分子量杂质 .....	135
附录2 填充和制备柱子 .....	136
选择柱子 .....	137

柱子填充和柱效	137
附录3 选择纯化设备	139
直线流速 (cm/h) 和体积流速 (ml/min) 之间的相互转换	140
从直线速度 (cm/h) 到体积流速 (ml/min)	140
从体积流速 (ml/min) 到直线速度 (cm/h)	140
从ml/min到使用注射器	141
附录4 换算数据：蛋白、柱压	141
柱压	141
附录5 氨基酸表	142
附录6 纯化过程中的分析检测	144
附录7 生物样品的保存	146

# 简 介

如图1所示，根据生物分子的不同特性，可以用层析技术分离开。疏水相互作用层析（HIC）在相对温和的条件下根据生物分子疏水性的不同而分离它们。

性质	方法
疏水性	疏水相互作用层析 (HIC)
	反相层析 (RPC)
电荷	离子交换层析 (IEX)
大小	凝胶过滤 (GF)，也称排阻层析
生物识别（配基特异性）	亲和层析 (AC)

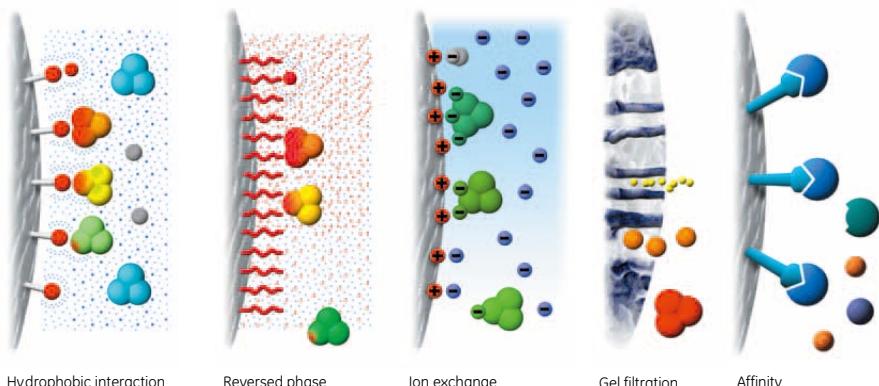


图1 层析纯化的分离原理。

疏水相互作用层析作为对其它根据蛋白电荷、大小、生物特异性识别等来进行分离的方法的有效补充，广泛的用于蛋白纯化。这种技术是样品进行硫酸铵沉淀后理想的下游纯化步骤（硫酸铵沉淀经常用于起始步骤样品的浓缩和清洁）或者是在离子交换层析后的进行下游纯化。在这两种情况下，样品都包含高浓度的盐，可以不经过或经过很少的处理，直接上样到疏水层析柱上。高浓度的盐增强了样品中疏水组分和层析介质的相互作用。在分离过程中，样品被纯化，并被分别以小体积洗脱下来，因此，浓缩了样品以便直接上样到凝胶过滤层析，或者在缓冲液交换后进行离子交换层析。在纯化方案中，疏水相互作用层析可以用于捕获、中度纯化、精细纯化。GE医疗集团的介质可以用于实验室小规模分离，乃至公斤级产品的生产。

这本手册描述了该技术的理论及实践，可以采用的介质，如何选择这些介质以及应用案例和最经常进行步骤的详细指导。使用经验以及从多于40年的层析纯化中总结的许多小窍门能够指导新手和专家来用最新的层析介质获得最好可能的结果。

第五章讲述反相层析（RPC），一种既能提供最高分辨率分离也能适用于分析工作的技术，比如和质谱连用，进行鉴定和性质鉴别或进行产品纯度的检测。反相层析也可以在纯化步骤中用于最终精细纯化，但是必须注意确保有机溶剂的存在不会影响生物活力的恢复或三级结构。

GE医疗集团提供广泛的预装柱和可立即使用的层析填料，也提供一系列手册。这些手册涵盖了不同的技术，来确保纯化在任何实验室、任何规模下都是一个简单而有效的过程。

## 图例：



表明用来改进步骤的大体建议或在特殊情况下建议采取的措施。



表明必须采纳的建议，或当需要特别注意时给予警告。



高亮显示解决问题的建议，用来帮助分析和解决难题。



高亮显示化合物，缓冲液和仪器。



提供实验方案的大纲。

通用缩略语：

层析中：

A280nm, A214nm: 在指定波长的紫外吸收。

AC: 亲和层析。

CF: 层析聚焦。

CIPP: 捕获、中度纯化、精细纯化

CV: 柱体积

GF: 凝胶过滤层析, 有时也称为SEC (分子大小排阻层析)

HIC: 疏水相互作用层析

IEX: 离子交换层析, 文献中也被记为 IEC

MPa: 兆帕斯卡

Mr: 相对分子量

N/m: 用每米的理论塔板数目来表示的柱效

pI: 等电点, 蛋白具有零表面电荷时的pH值

psi: 压强单位, 磅每平方英寸

RPC: 反相层析

Rs: 分辨率, 峰之间的分离度

SDS: 十二烷磺酸钠

产品名称中的缩略语：

CIP: 在位清洗

FF: Fast Flow, 快流速

HMW: 高分子量

HP: High Performance高效

i.d.:内径

LMW: 低分子量

PE: PEEK

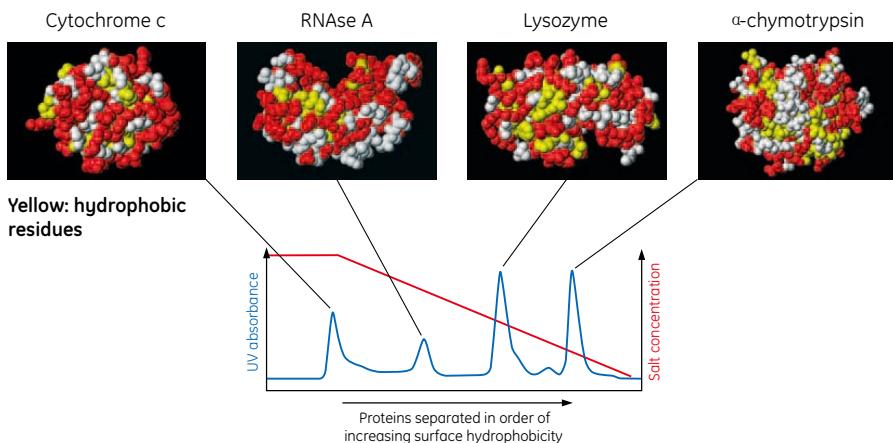
ST: 用不锈钢制作的柱子

# 第一章 疏水相互作用层析的原理

本章提供一个对疏水相互作用层析（HIC）的简单介绍，主要讲述进行分离的基本原理。进行分离的实际操作方面将在第二章涉及。

疏水相互作用层析根据蛋白表面疏水性的不同，利用蛋白和疏水层析介质疏水表面可逆的相互作用来分离蛋白。虽然可以在科学文献中找到一些建议，但是到目前为止，还没有被广泛接受的关于疏水相互作用层析机制的理论。

图2显示分子表面带有不同程度的疏水性的标准蛋白是如何被分离的。运行所用缓冲液中的某种盐的存在会显著影响疏水蛋白和疏水层析介质的相互作用。高浓度的盐会增强相互作用，而低浓度的盐减弱相互作用。在本例中，所有单个蛋白都和疏水相互作用层析介质的疏水表面相互作用，但是，随着缓冲液中离子强度的降低，相互作用逆转了，具有最低程度疏水性的蛋白最先被洗脱。具有最强相互作用的蛋白最后被洗脱，这需要盐浓度降得更低来逆转相互作用。



Column: Phenyl Sepharose High Performance packed in Tricorn 10/100 column  
Sample: Cytochrome c, RNase A, lysozyme,  $\alpha$ -chymotrypsin  
Start buffer: 1.7 M ammonium sulfate, 0.02 M Tris-HCl, pH 7.5  
Elution buffer: 0.02 M Tris-HCl, pH 7.5  
Gradient: 0-100% elution buffer in 10 CV  
Flow: 1 ml/min, 76 cm/h

图2 蛋白根据其表面疏水性（黄色表示疏水性氨基酸，红色表示亲水性氨基酸）的不同被分离，其中标准蛋白用Phenyl Sepharose High Performance分离。

## 理论情况下的疏水相互作用层析

### 水的作用

对于极性物质来说，水是一个好的溶剂。但是对于非极性的物质来说，是一个不好的溶剂。在

液态水中，大部分水分子由于它们之间形成的氢键而成簇存在（图3）。虽然水簇的半衰期非常短，其净效应是分子间非常强的黏附，这些可以从水的高沸点可以反映出来。

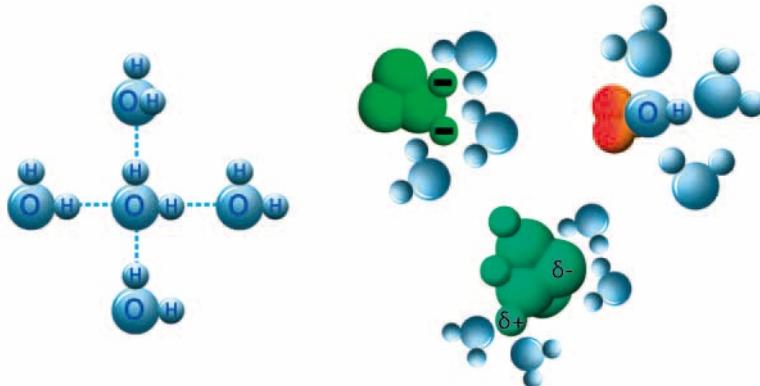


图3 水的溶解性取决于它能够与偶极子作用并能形成氢键。

在空气-水的界面上，水分子自身排列成一个高度有序的壳层。这里，形成氢键的可能性不再平衡，却主要由界面的液体方面来主导。这导致一个高度有序的结构，体现在强的表面张力上。任何影响水壳层稳定性的物质也都会影响表面张力。

当一个疏水物质，比如蛋白质或者疏水配基浸没在水中，类似于表面张力的现象就会发生。水分子不能湿润疏水物质的表面。取而代之的是：由于水分子们不能在所有的方向形成氢键，它们在物质的周围形成了一个高度有序的壳层。

使这个壳层最小化导致有序水数目的减少，那就是出现了一个热力学上更加有利的情况：熵增加了。为了获得熵，疏水物质被强迫的融合在一起，来使这样的壳层总面积最小化。这样，疏水相互作用依赖于水分子的性质而不是疏水分子的直接相互吸引（图3）。

## 蛋白结构

蛋白质三维结构是蛋白质分子内相互作用以及蛋白质和周围溶剂相互作用的共同结果。对于可溶蛋白，溶剂是水，疏水侧链因此被包埋在蛋白质内部。最终的结构是最适合周围溶液的热力学折衷的结果。因此，虽然疏水氨基酸大多被包埋在球形蛋白内部，有些则暴露在外，在蛋白表面形成疏水区域。

由于蛋白质表面既有疏水区域也有亲水区域，在某种高浓度的盐的存在下，它们可能由于增强的疏水相互作用而沉淀下来。离子强度的改变，有机溶剂的存在，温度和pH（尤其在等电点，没有表面净电荷时）都能影响蛋白质结构和溶解度，最终影响和其它疏水表面的相互作用，例如和疏水相互作用层析填料的作用。

## 可逆的相互作用

疏水相互作用层析填料上疏水配基和蛋白质疏水表面相互作用。在纯水中，任何疏水效应都太弱而不能导致配基和蛋白之间或蛋白自身的相互作用。然而，某些盐能增强疏水相互作用，加入这些盐导致到疏水相互作用的结合（吸附）。对于选择性洗脱，盐浓度逐步的降低，样品组分根据疏水性的依次洗脱（图4B）。

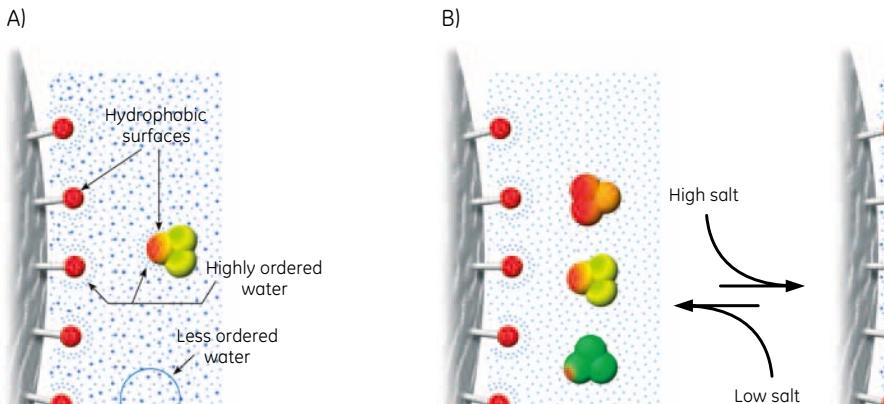


图4 A) 高度规则的水壳层包围在配基和蛋白的疏水表面周围。疏水物质被迫融合以减少这种壳的总面积（熵最大）。盐能够增强疏水作用。B) 疏水作用的平衡主要由盐浓度控制。

因此，疏水相互作用层析最终分离结果是如下几个因素交互作用的结果：暴露在表面的疏水氨基酸残基的多少和分布；填料的疏水性；样品的性质和组成；缓冲液中盐的浓度和种类。

## 疏水相互作用分离的步骤

疏水相互作用介质是将含有烷基或芳香基团配基偶联到惰性的球形颗粒基质上。为了提供大的内部表面，基质是多孔的。配基则在填料最终的疏水性上起着至关重要的作用。填料被装进柱子，形成装好的柱床。有关填装柱子的更详细信息请参见附录2。柱床用缓冲液平衡，以填充基质的小孔及颗粒间的缝隙。图5展示了随后的分离过程。

蛋白和填料的相互作用由适度的高浓度盐所促进。通常使用1-2M 硫酸铵或3M 氯化钠。起始缓冲液中盐的种类和浓度是经过选择的，用来确保目的蛋白结合到填料上，其它疏水性弱的蛋白和杂质直接流过柱子。

结合条件是任何疏水相互作用层析分离的关键因素。在这个阶段，目的蛋白的最终的选择性，分辨率，结合能力都会显著的受到影响。样品应该在和起始缓冲液在同样的盐条件下，但是，很少需要进行缓冲液交换，因为缓冲离子和pH 的作用弱一些。如果需要，可以直接调节pH。

在优化结合条件前，需要检查目的蛋白在不同盐浓度下的“稳定窗口”，因为许多蛋白在提高

盐浓度的时候会沉淀。目的蛋白的沉淀导致分离不可能进行，至少会显著的降低产量。检测稳定窗口的最简单的办法就是观察在不同盐浓度下的试管中的样品，并且检测上清中剩余的蛋白活力。

当样品上样结束后，柱子被冲洗，用来使所有的未结合的蛋白流过（比如紫外信号回到基线）。此后，改变条件开始洗脱。蛋白用降低在洗脱缓冲液中的盐浓度的方式来洗脱。当盐的水平降低时，疏水性最低的蛋白开始从柱子上洗脱。通过用梯度控制盐浓度的改变，蛋白被以纯的、浓的形式分离开。具有最强疏水性的蛋白结合最强，最后被洗脱。

用没有盐的缓冲液洗涤会在洗脱结束后除去大多数紧结合的蛋白。如果正确的判断了填料的疏水性和样品中的蛋白，所有的蛋白都将在该阶段被洗脱。在下一次运行上样前，柱子需用起始缓冲液重新平衡。

偶尔，疏水相互作用会很强，以至于需要用更剧烈的方法洗掉所有结合的物质，比如0.5-1.0M氢氧化钠，70%的乙醇，或30% 异丙醇。这些清洗步骤必须在水或者无盐缓冲液后，在用高盐的起始缓冲液再次平衡柱子前进行。参见附录8，柱子清洗。

或者，可以选择这样一个条件使疏水的杂质大多结合在柱子上而让目的蛋白流过柱子以除去杂质。

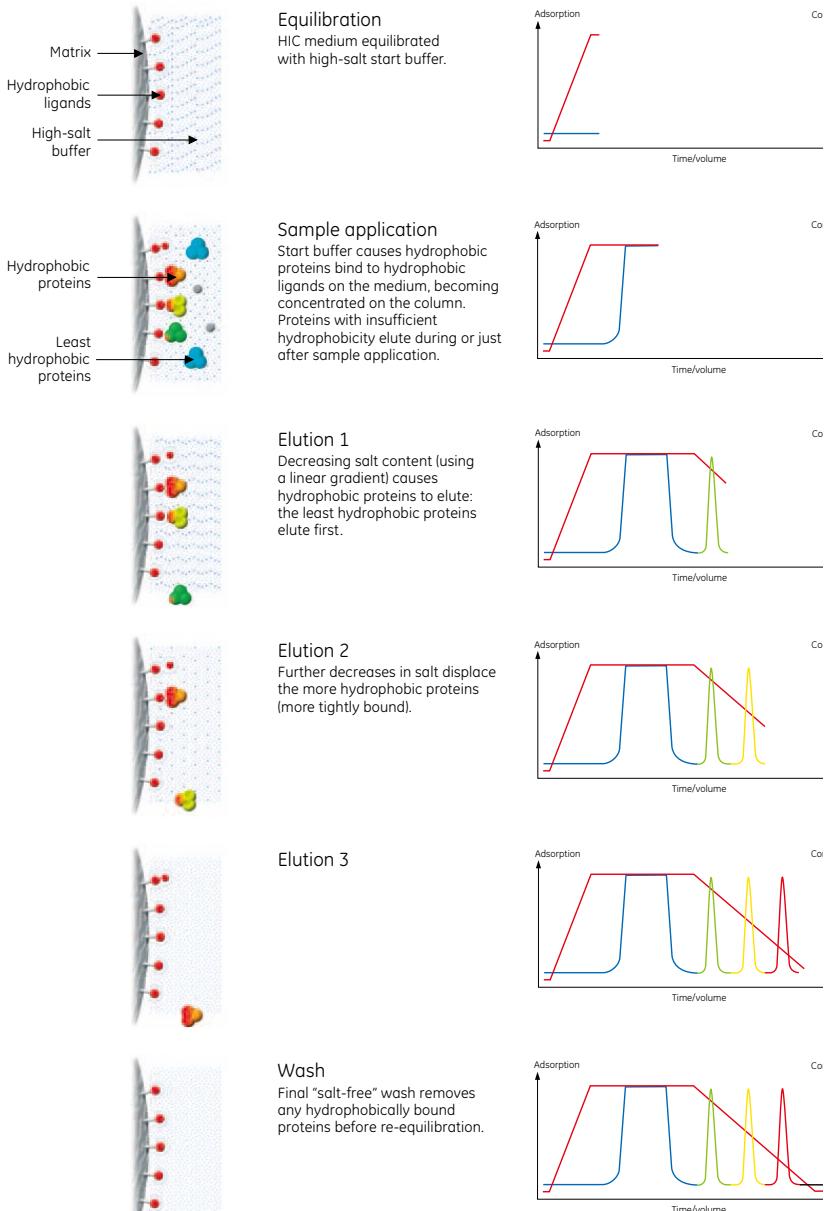


图5 疏水相互作用层析分离的步骤。

## 分辨率

疏水相互作用层析分离的分辨率是如下一些指标的组合：从柱子上洗脱的峰之间的分离度（选择性）；柱子产生窄的、对称的峰（效率）；当然还有样品上样量。这些因素由实际情况，比如填料性质、结合和洗脱条件、柱子填装和流速所影响。所有这些将在第二章，疏水相互作用的实践里详细讲述。

分辨率 ( $R_s$ ) 定义为峰尖的距离与两个峰宽平均值的之比。如图6所示， $R_s$ 可以从层析图中确定。

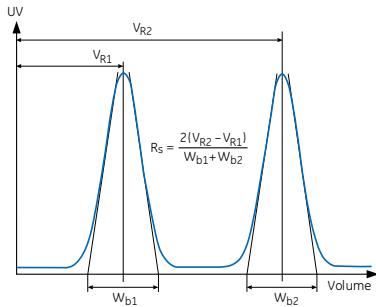


图6 两个峰之间的分辨率 ( $R_s$ ) 的确定。

洗脱体积和峰宽用同样的单位来测量，以给出一个无量纲的分辨率值。 $R_s$ 表征两个峰的相对分离度。如果需要进一步优化层析过程，可以参考该值。

如果  $R_s=1.0$  (图7) 则如果收集98%的峰，会达到98%的纯度 (假设峰是对称的，而且大小相似)。基线分辨率需要  $R_s>1.5$ 。在这个值下，峰纯度为100%。

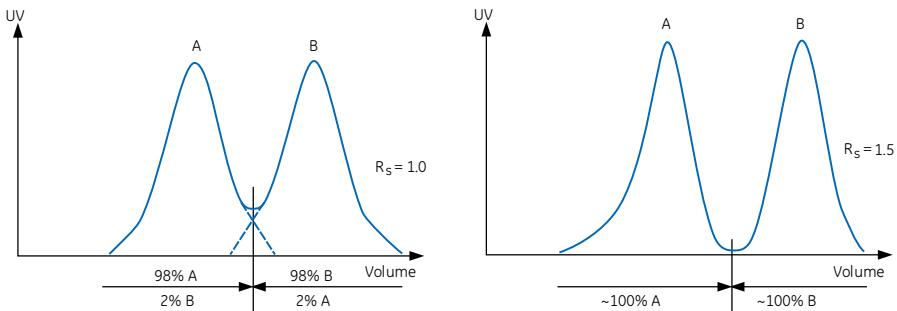


图7 不同分辨率的分离结果。

一个单一的，良好分离的峰并不一定意味着纯的物质，也可能代表着一系列能够在所选择的洗脱条件下不能分离的组分。可能需要用其它的层析介质进行进一步纯化。纯化策略的建议请参见第4章。

## 柱效

柱效（从填装好的柱床上洗脱出窄的、对称峰的能力）和在柱子上发生的峰变宽有关，而且常常用理论塔板的数目来表示（测定柱效请参见附录2）。峰变宽的主要原因是溶质分子（蛋白质）的纵向扩散。如果可供扩散的距离达到最小化，那么可以将峰变宽最小化。在所有条件下，一个填装好的柱子对分辨率贡献最大。柱子的不均匀填装、填装过紧或过松或含有气泡都会导致通道效应（缓冲液流过不均匀），峰变宽，结果是分辨率的丢失。图8描述了产生好柱效的因素。很明显，颗粒大小是影响分辨率的一个显著因素。总的来说，最小的颗粒会在一个填装完好的柱床上，正确的洗脱条件下产生最窄的峰。

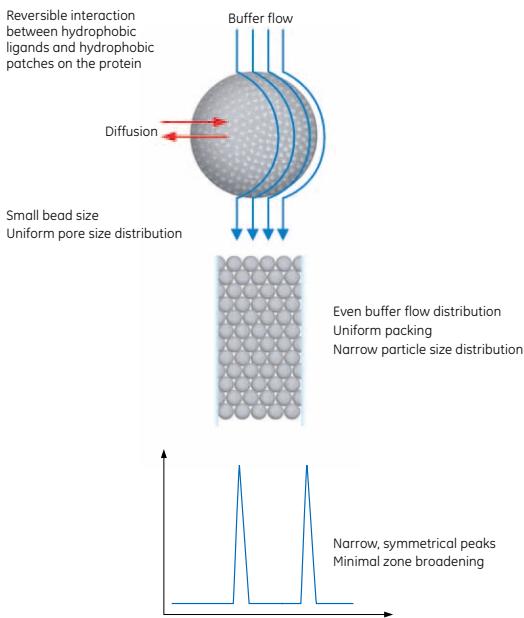


图8 影响柱效的因素。

虽然用柱效描述的分辨率可以通过减小基质的颗粒大小来提高，使用小的颗粒通常导致压力的增加，以至需要降低流速，延长了洗脱时间。因此，需要将介质和纯化要求（速度、分辨率、纯度等）相匹配。大体积高浓度的样品的黏度会降低用小颗粒填装的柱子的分辨率。样品需要被稀释或使用大些的颗粒。

## 选择性

好的选择性（峰之间的分离度）在决定分辨率方面比高柱效更重要（图9）。

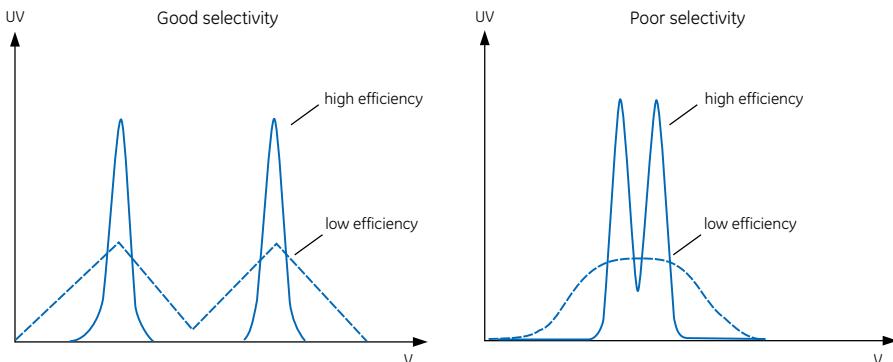


图9 选择性和柱效对分辨率的影响。

对于疏水相互作用层析，选择性很大程度上依赖于配基的性质以及基质上的取代程度，基质的性质，目的蛋白的性质，用于结合的盐的类型和浓度。在这些性质之间寻找到一个平衡会导致一个分离很好的、高选择性的疏水相互作用层析分离。

### 选择性和结合能力

虽然疏水相互作用层析介质根据配基的类型、有时配基的密度来描述，但是在确定的实验条件下，能结合到疏水相互作用层析柱上的蛋白实际量则更多的是和实践相关的。这被称为某种填料对某种蛋白的可及载量。如果确定的条件包含操作填料时的流速，结合的蛋白量就会被称为该填料的动态载量。疏水相互作用层析介质的动态载量依赖于填料的性质，被纯化的蛋白和实验条件，比如盐浓度、流速、温度，有时也与pH有关。

配基的性质、目的蛋白、盐和盐浓度对决定疏水相互作用层析介质最终的选择性、结合能力起到如此重要的作用，以至于这些参数必须根据实验来进行确定和优化。这和诸如离子交换层析或亲和层析等其它技术不同，在这些技术中，“标准蛋白”可以用作预测选择性和载量的指引。

### 选择性和盐的选择

当使用疏水相互作用层析介质时，某种盐促进疏水相互作用的能力依赖于存在的离子种类和它们的浓度。

蛋白质沉淀和疏水蛋白与疏水填料相互作用有着相同的驱动力，因此，通过增加周围溶液的离子强度（浓度）能够促进这种驱动力。

一种离子的洗脱/沉淀能力用Hofmeister序列来描述（图10）。在有蛋白质的溶液里，小的，高电荷离子是强沉淀剂（反离序性），而有机酸碱有更强的稳定作用（离序性）。离序性这个名词指的是离子在水结构中产生有序或混沌的能力。钙和镁盐并不是从Hofmeister序列上所期待的那种强沉淀剂，因为这些离子可能结合到蛋白表面的特殊位置。

← Increasing precipitation ("salting-out") effect

Anions:  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{CH}_3\text{COO}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{ClO}_4^-$ ,  $\text{I}^-$ ,  $\text{SCN}^-$

Cations:  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Rb}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cs}^+$ ,  $\text{Li}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$

Increasing chaotropic ("salting-in") effect →

图10 Hofmeister 序列：显示了一些阴阳离子对蛋白沉淀的作用。



钠，钾或铵的硫酸盐具有相对高的沉淀作用。正是这些盐有效的促进了疏水相互作用，并且对蛋白质结构有一种稳定作用。在实践中，钠，钾或铵的硫酸盐有效的促进了疏水相互作用层析中配基和蛋白的相互作用，并且对蛋白质结构具有稳定作用。因此，最通常使用的盐是硫酸铵，硫酸钠，氯化钠，氯化钾和醋酸铵。

$\text{Na}_2\text{SO}_4 > \text{K}_2\text{SO}_4 > (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 > \text{Na}_2\text{HPO}_4 > \text{NaCl} > \text{LiCl} \dots > \text{KSCN}$

图11 一些盐对蛋白沉淀的相对作用。



结合到疏水相互作用层析介质上的蛋白量几乎和盐的浓度在某个浓度下呈线性正相关，在更高的浓度下，几乎呈指数增长。如果蛋白不稳定或者稳定性未知，最好在线性区间进行蛋白和填料的结合。

### 疏水相互作用层析介质的选择性和性质

当配基对介质的疏水性贡献显著时，基质也会影响最终的选择性。疏水相互作用层析介质由多孔的基质制成，它们在物理上是稳定的，在化学上对强力的清洗是稳定的，并且非特异结合水平低。

#### 基质

- 多孔径和颗粒大小的一个最优平衡提供了一个大的，由配基覆盖的表面，用来保证高结合能力。在分离大的生物高分子时，高度多孔性并且开放的孔结构是一个优势。
- 惰性基质将与样品组分的非特异相互作用最小化。
- 高度物理稳定性确保填装好的介质尽管在盐浓度或pH的极端变化下仍能保持稳定，并以此来提高重复性和避免再次填装柱子的必要。
- 高度的物理稳定性和颗粒大小的均一性有助于高流速，尤其是在清洗或再次平衡的步骤中，用来提高通量和产量。
- 高度的化学稳定性保证了在需要的情况下基质能够用强力的清洗溶液。
- 现代的疏水相互作用填料用聚合物或琼脂糖基的基质来满足化学和物理稳定性，高结合能力和不同的颗粒大小（表1）。

表1 用于疏水相互作用层析填料的基质。

基质	形式	平均颗粒尺寸
SOURCE15	聚苯乙烯/联乙烯苯	15μm
Sepharose High Performance	6%琼脂糖	34μm
Sepharose 6 Fast Flow	6%琼脂糖	90μm
Sepharose 4 Fast Flow	4%琼脂糖	90μm

SOURCE™填料是由聚苯乙烯和联乙烯苯制成的具有高度球型（均一），小（15微米），多孔（15微米）的颗粒，有助于在高流速下高分辨率分离。



图12 SOURCE的电子显微镜照片，显示了球形、均一的颗粒。

Sepharose™基质是基于琼脂糖的亲水链，它们排列成束，并且具有不同程度的链间交联（图13），用以提供一系列刚性的，大孔的基质，具有好的载量和低非特异性结合。最合适的填料可以根据分辨率、结合能力和流速要求来选择。比如在Sepharose High Performance（34微米）上进行梯度洗脱可以给出高分辨率的分离，然而更大些的Sepharose Fast Flow（90微米）最适合在高流速下进行高载量逐步洗脱。

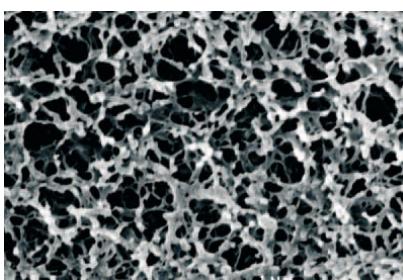


图13 交联的琼脂糖基质的结构（Sepharose）。

疏水相互作用填料的不同基质已经使用好多年了，这些基质的参考文献仍然可以在科学文献中找到。比如说用苯基或辛基配基取代的Sepharose CL-4B。然而，最近开发的基质提供了更好的物理和化学稳定性。为了能够从显著的快速分离和改善的性能中获益，值得在新的填料上进行检测并重新优化旧的实验方案。

### 配基和取代的程度

在基质上配基和配基取代的程度也会对填料最终的疏水性有所贡献，因此会影响选择性。图14显示一个蛋白质混合物在同一种Sepharose Fast Flow基质但是被不同的配基取代的填料上进行分离的例子，这四种不同的配基条件是：苯基（高取代），苯基（低取代），丁基和辛基。

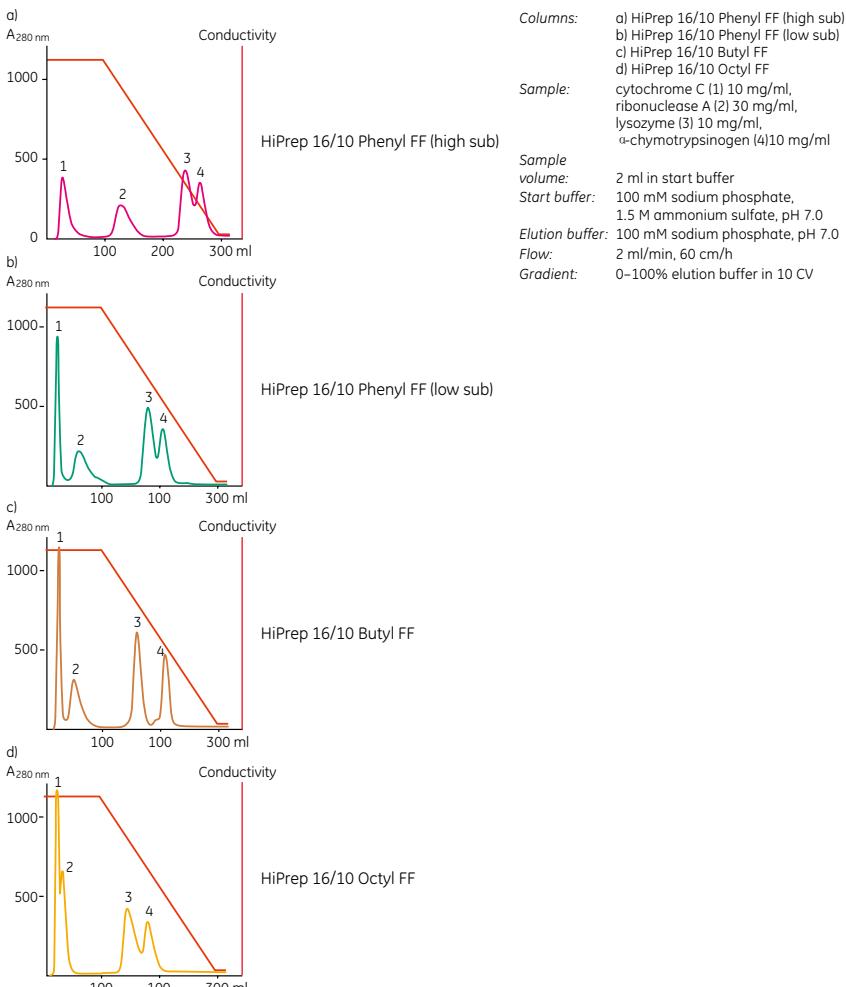


图14 配基和配基密度的不同对疏水相互作用层析基质选择性的影响。

疏水相互作用层析填料的结合能力随着增加的配基浓度而增加到一定程度。同时，相互作用的强度也增加了，这可能导致结合组分的洗脱困难。选择一种由同一种配基取代，但是低一些配基浓度的填料比如Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (低取代) 而非Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (高取代)或许能解决这个问题。图14a和14b显示两种填料上配基的不同浓度是如何影响选择性的。

最通常使用的疏水配基如表2所示。总的来说，疏水相互作用填料可以根据它们和样品组分的相互作用分为两类。直链烷基（丁基，辛基，醚基，异丙基）显示一个纯的疏水性质，而芳香基配基（苯基）显示混合型性质，包括芳香性和疏水性相互作用，并且缺少电荷，都在最终的层析性质中起到作用。

表2 疏水相互作用层析基质上取代的配基。

Phenyl	$-\text{O}-\text{C}_6\text{H}_5$
Butyl-S	$-\text{S}-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}_3$
Butyl	$-\text{O}-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}_3$
Octyl	$-\text{O}-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}_3$
Ether	$-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CHOH}-\text{CH}_2-\text{OH}$
Isopropyl	$-\text{O}-\text{CH}-(\text{CH}_3)_2$

 如果目的蛋白在高盐条件下不结合，用一种更加疏水的填料。如果目的蛋白结合的如此紧以至于需要非极性添加剂才能洗脱，降低起始缓冲液的盐浓度或者使用疏水性弱些的填料。

### 选择性和洗脱

图15和16描述了最通常使用的疏水相互作用层析分离的形式，即蛋白通过梯度或分步的形式降低缓冲液中的盐含量从而被洗脱下来。紫外吸光值和电导分别显示在洗脱过程中蛋白洗脱峰和盐浓度的变化。

在上样、洗脱、洗涤、再平衡的过程中缓冲液的体积用柱体积 (CV) 来表示，比如对于1毫升柱床体积的柱子来说， $5\text{CV}=5\text{毫升}$ 。

用柱体积来描述分离图样有助于方法开发和在放大过程中将方法转移至其它尺寸的柱子上。

梯度洗脱（图15）通常在不知道样品组成的情况下进行，用来尽可能多的将组分结合在柱子上然后分别的洗脱下来，来看总的蛋白洗脱图样。或者用于高分辨分离或分析。

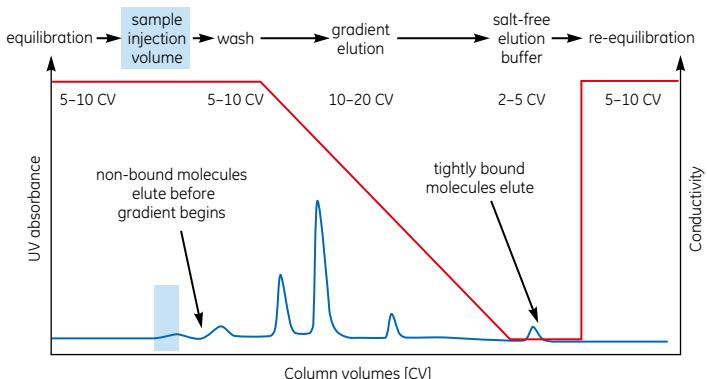


图15典型的使用线性梯度洗脱的高分辨疏水相互作用层析分离。

逐步洗脱（图16）可以分为几种不同的形式。当一个疏水相互作用层析分离用梯度洗脱优化好后，转换至逐步洗脱加快分离时间，减少缓冲液消耗而保持需要的纯度水平。

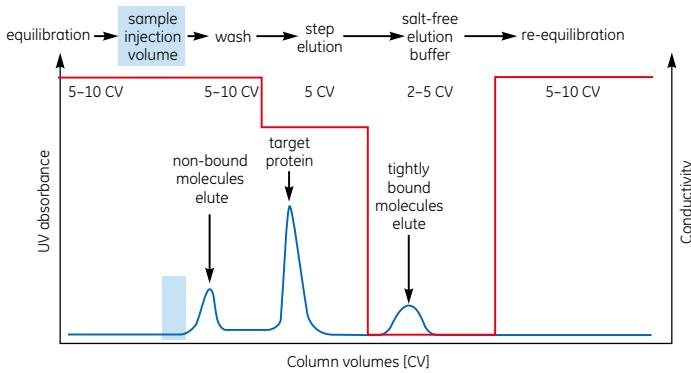


图16 使用逐步洗脱的典型疏水相互作用层析分离。

相同的逐步洗脱液可以用于成组分离，用来浓缩目的蛋白，迅速的将它们从不需要的物质中移除。目的蛋白以富集的、浓缩的形式洗脱下来。

偶尔的，梯度洗脱通过选择能够使杂质结合最多而让目的蛋白流过柱子的条件，来除去污染物。必需小心的保证柱子的载量足够结合所有的杂质。

## 第二章 疏水相互作用的实践

### 简介

该章包括如何通过控制条件进行一次成功的分离的实践建议和为每个应用选择最合适的填料或预装柱。额外的应用案例和产品相关信息在第3章。

#### 填料选择

现代疏水相互作用层析填料的起源和不同已经在第一章解释了。一个疏水相互作用层析填料总体的性能（选择性、分辨率和结合能力）由很多参数所影响：蛋白性质、配基类型、配基取代度、在样品上样过程中的盐浓度和种类，去垢剂的存在，一些次要因素包括：温度、pH、基质类型。理解每个参数的作用和重要性确保每个分离都能在需要的分辨率下进行。有如此之多的参数需要考虑，建议按如下步骤安排分离开发阶段：

1. 筛选具有正确选择性的填料\*。
2. 选择在结合时所用的盐的类型和浓度。
3. 优化梯度洗脱来提供最大分辨率和回收率。
4. 如果分辨率或回收率并非理想，尝试添加剂和/或调节pH。

\*如果不只一种填料看起来合适，由于选择性是选择疏水相互作用层析柱最重要的参数，根据最终需要的纯化规模和分离目的（捕获、中度纯化、精细纯化，见下文）重新选择填料。基质的选择通常依赖于具有正确选择性的填料的可及性。



在所有分离步骤中保持温度恒定。

#### 纯化策略 (CIPP) 中的疏水相互作用层析

为了确保有效的、可重复的、能够给出要求的纯度的蛋白质分离，最好开发多步程序，即应用捕获、中度纯化、精细纯化的策略 (CIPP)，如图17显示，并将在第4章详细描述。

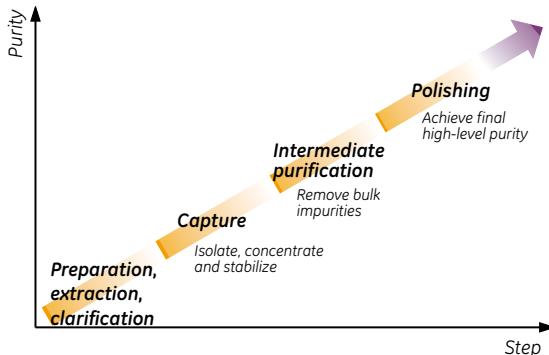


图17 蛋白纯化策略。

CIPP应用于制药工业和研究实验室，用作更快的方法开发，以更短的时间来获得产品和好的经济效益。

疏水相互作用层析可以用于捕获、中度纯化或精细纯化阶段。由于样品应该在高些的盐浓度下来促进疏水相互作用，疏水相互作用层析很好的适用于在硫酸铵沉淀样品沉淀后的捕获步骤或在离子交换层析后直接进行中度纯化步骤。在两种情况下，样品已经在一个高盐溶液中，并且除了需要再增加更多的盐以外，不需要额外的准备。由于疏水相互作用层析会浓缩目的蛋白到减少的体积，组分可以直接转移至凝胶过滤层析。疏水相互作用层析也可以用逐步洗脱，用于快速的捕获步骤或用梯度洗脱来在精细纯化阶段中获得最高的分辨率。

任何纯化的最重要的第一步是样品制备，这点在附录1和第二章有更详细的描述。

关于在纯化策略中应用捕获、中度纯化、精细纯化方案的详细信息参见第4章。

### 捕获

起始捕获步骤的目的是分离、浓缩、稳定目的蛋白，该步骤适用的填料需要提供高流速和高载量。如下选择：

- Sepharose Fast Flow (90微米颗粒大小) -捕获或中度纯化步骤，需要好的分辨率（流速最高300cm/h）
- 当选择性可以达到满意，需要高分辨率，而低流速(为了补偿高压力)可以忍受时，使用Sepharose High Performance (34微米颗粒大小) 疏水相互作用填料用作捕获或放大。
- 如果使用大颗粒填料不能达到所需要的选择性时使用SOURCE (15微米可以大小) 填料。

### 中度纯化

中度纯化的目的是除去大部分的杂质，应该提供高载量高分辨率。填料选择如下：

- 使用Sepharose High Performance (34微米颗粒大小) 疏水相互作用填料用作需要高分辨率的中度纯化步骤（流速可至150cm/h）。
- Sepharose Fast Flow (90微米颗粒大小) 用于需要高分辨的中度纯化步骤（流速可至300cm/h），或者用High Performance基质不能达到所需选择性时。
- 如果使用大颗粒填料不能达到所需要的选择性时使用SOURCE (15微米可以大小) 填料。

### 精细纯化

精细纯化的目的是通过除去痕量的杂质或很相似的物质达到最终的纯度，应该提供最高可能的分辨率，填料选择如下：

- SOURCE15 (15微米颗粒大小) -在实验室或大规模纯化过程中用作精细纯化，这些步骤需要高分辨率和高通量（在重新平衡或再生过程中流速可达1800cm/h）。
- 如果SOURCE填料不能提供需要的选择性，尝试Sepharose High Performance填料。
- 如果使用小颗粒填料不能提供需要的选择性，尝试使用Sepharose Fast Flow填料。

图18给出了可用于疏水相互作用层析的介质和预装柱的选择指南。大规模工业分离可使用自定义介质。

## 疏水相互作用分离的实际考虑

这个章节涵盖了疏水相互作用层析每步的细节，还有实际操作的提示和小窍门来提高分辨率和总体的性能。实践中，分离的步骤可以总结如下：

1. 用5-10个柱体积的起始缓冲液平衡柱子，或直到紫外吸光回到基线电导平稳。
  2. 调节样品到选择的盐浓度（如果需要的话调节pH）。过滤，上样到柱子上。
  3. 用5-10个柱体积的起始缓冲液冲洗或直到紫外吸光基线电导平稳，此时，所有未结合的蛋白被从柱子上洗脱掉了。
  4. 用10-20个柱体积开始洗脱，增加洗脱缓冲液的比例，直到盐浓度达到最低值，就是无盐缓冲液（100% 洗脱缓冲液）。
- 或者，如果没有能够产生梯度的仪器，用最多5倍柱体积的洗脱缓冲液（盐浓度比起始缓冲液的低）洗脱结合的蛋白。重复，在每步降低盐浓度，直到目的蛋白被洗脱下来。
5. 用2-5个柱体积的无盐洗脱缓冲液洗脱任何疏水结合在柱子上的物质。
  6. 用5-10倍柱体积的起始缓冲液平衡柱子，或直到电导达到需要的值。

这些步骤将和更详细的提示和建议高亮显示，贯穿本节

缓冲液体积用柱体积来表达，比如对于1毫升柱床体积来说，3个柱体积=3毫升。用柱体积来描述分离图样有助于方法开发和将方法应用于其它尺寸的柱子上。在分离每个阶段柱体积的数目通常可以通过优化来减少。比如，如果保持分辨率，可以减少梯度体积，并且，如果分离纯度合理的样品，就需要更少的缓冲液。

 在整个分离过程中保持样品、起始、洗脱缓冲液、柱子和层析设备在相同的、稳定的温度来保证一致的，可重复的结果。

## Selection Guide – Hydrophobic Interaction Chromatography Media

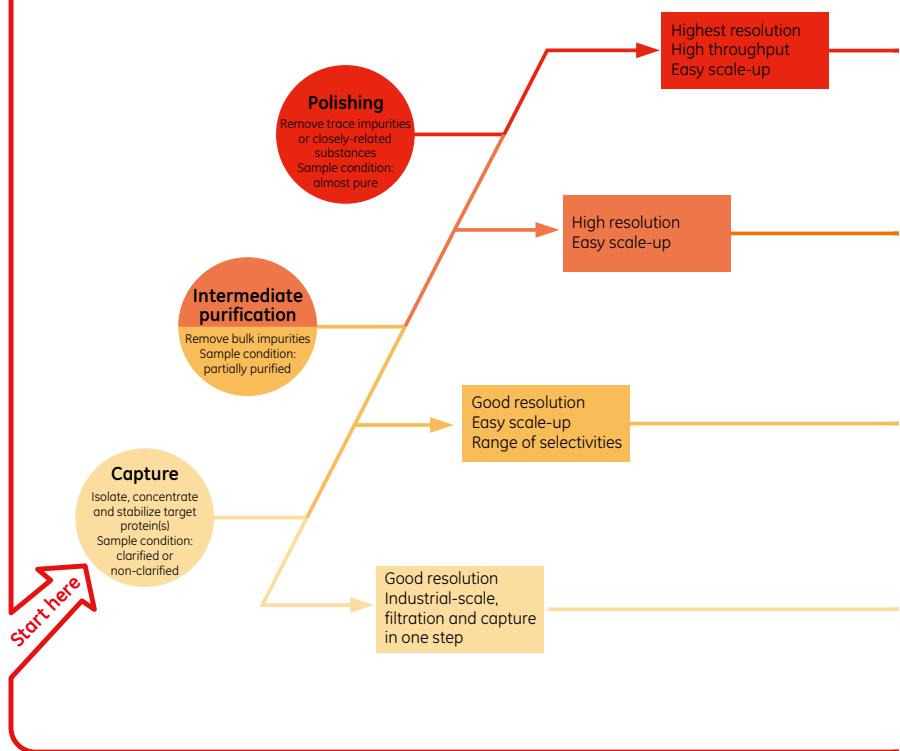
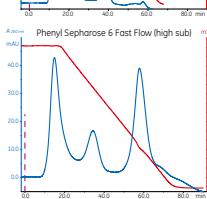
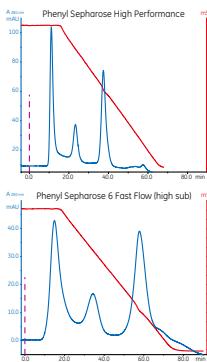
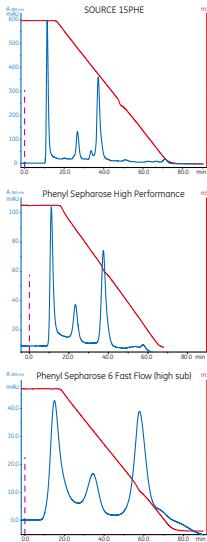


图18 一个典型的纯化策略包括三个阶段：捕获、中度纯化和精细纯化（CIPP）。每个阶段都有特定的目标，主要取决于起始的材料。根据纯化步骤的目标和起始材料的情况选择合适的疏水相互作用层析介质。

注意：STREAMLINETM 产品，基于扩展柱床吸附技术，可以让蛋白从粗的颗粒状的给料中无需净化、浓缩或起始纯化中纯化出来。STREAMLINE 产品是为在工业规模处理中使用，并且用来生产克级产品。STREAMLINE Phenyl只以客户设计产品的方式提供。更多信息请参见[www.gehealthcare.com/protein-purification](http://www.gehealthcare.com/protein-purification) 下载《扩展柱床吸附手册》（书号18-1124-26）

- SOURCE 15**  
(phenyl, isopropyl, ether)
- Use RESOURCE HIC Test Kit to find suitable selectivity and optimize separation.
- Sepharose High Performance**  
(phenyl, butyl\*)  
*\*available as a CDM product*
- Use Sepharose High Performance for polishing if SOURCE media do not offer required selectivity.
  - Use HiTrap HIC Selection Kit to find suitable selectivity and optimize separation.
- Sepharose Fast Flow**  
(phenyl high sub,  
phenyl low sub, butyl,  
octyl, butyl-S)
- Use Sepharose Fast Flow for polishing if media with smaller particle size do not offer required selectivity.
- STREAMLINE**  
(Phenyl)  
*\*available as a CDM product*
- Use STREAMLINE for direct capture from unclarified feedstock.



## 筛选选择性



图19 Hiprep HIC Selection Kit和RESOURCE HIC Test Kit。

在开发的起始阶段，使用1毫升预装柱，比如HiTrap™ HIC selection Kit和RESOURCETM HIC TEST Kit能够节省时间和样品。这样可以快速有效的筛选适合所需要的选择性的填料。这个方法是有帮助的，因为即使目的蛋白的性质是知道的，最终的选择性，结合能力和回收率都很大程度上依赖于填料和目的蛋白的相互作用。

HiTrap 柱子是用Sepharose High Performance和 Sepharose Fast Flow介质预装的。Resource 疏水相互作用柱是基于SOURCE介质的。所有的柱子都可用于小规模纯化，同时也提供了详细的使用方法。这些试验试剂盒中的填料都有大包装，所以优化好的方法可以简单的转移至操作需要的规模。



在进行任何疏水相互作用层析前，需确定样品的“盐稳定窗口”。比如，加入逐步增加的盐至粗提物中，用来确定蛋白沉淀发生的浓度。确认样品在上样到柱子时低于该盐浓度，以避免沉淀。用硫酸铵沉淀的方法进行样品清洁的指南请参照附录1。如果可能的话，检测目的蛋白的生物学活性，来确定活力能够保持的盐浓度范围。记住，样品可能在活力检测前需要脱盐。

## 自动的疏水相互作用填料筛选，方法开发和优化

使用ÄKTAdesignTM层析系统能够选择合适的方法模版来控制系统自动的用一系列柱子和一系列缓冲液条件进行分离。

1. 样品制备：已经建立盐溶解性窗口，从最高的能够保持生物学活力而不发生沉淀问题的盐浓度开始。调节样品到起始缓冲液的盐浓度来促进疏水相互作用。使用高浓度的储液调节盐浓度，以避免由于加入固体盐时局部盐浓度过高而造成沉淀。直接调节样品的pH。由于疏水相互作用对pH不是非常敏感，不需要完全的缓冲液交换。
2. 准备起始和洗脱缓冲液：50mM 磷酸盐，pH7.0 加入硫酸铵（根据盐稳定性窗口，浓度最高至2M），至起始缓冲液中。
3. 在用高盐的起使缓冲液平衡前，用无盐的洗脱缓冲液洗涤柱子。如果柱子保存在20%乙醇中，这可以避免盐析出。

- 寻找最优的选择性，在一系列盐浓度下将样品上样到每根柱子上，在运行整个过程收集穿透。选择一种目的蛋白能够在梯度中洗脱下来的填料。
- 寻找在起始缓冲液中能够使目的蛋白结合最多的最低盐浓度，保持或改进分辨率，使和结合的其它杂蛋白一起洗脱的风险最小。
- 优化最陡的梯度来获得可接受的分辨率。
- 优化最高流速，使能够保持分辨率并且使分离时间最短。对于特定的介质，检查建议流速。
- 在保持令人满意的分辨率的条件下，优化最大样品上样量。总的来说，上样到柱子总结合能力的20%-30%能够在梯度洗脱条件下给出良好的分辨率。

当优化好的分离条件已经建立，可以通过转移至逐步洗脱来减少分离时间和缓冲液消耗。用逐步洗脱通常可以增加样品上样量。

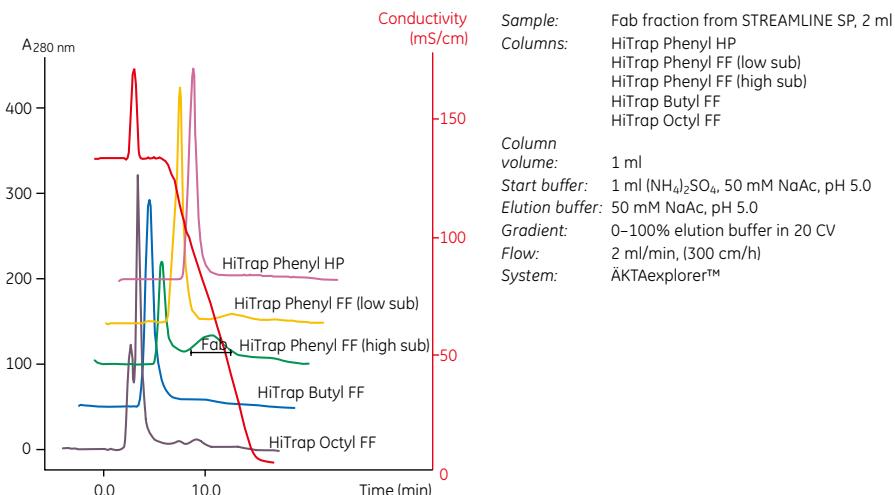


图20 用不同的疏水相互作用层析介质填充的HiTrap 1毫升柱子筛选介质。

图20显示用不同的疏水相互作用层析介质填装的HiTrap 1毫升柱子进行填料筛选的实例。缓冲液pH保持5.0用来避免在捕获后进行样品条件更改。由于对目的蛋白的优秀选择性，Phenyl Sepharose 6 Fast Flow（高取代）被选中了。蛋白在梯度范围内被洗脱下来，并且和主要的杂质分离开来。在规模化前可以使条件进行优化，用逐步洗脱来使通量和目的蛋白的浓度最大化。图74显示优化的洗脱流程和随后的规模化。

## 手动介质筛选，方法开发和优化

Hitrap柱子可以用注射器或蠕动泵进行手动的填料筛选，方法开发和方法优化。然而，用注射器

限制了疏水相互作用的分离度，因为分离机制并非是简单的“开/关”过程，而需要一些梯度性洗脱来获得令人满意的分离。

这里的方法是为1毫升HiTrap柱优化的，如果使用其它柱体积应该按需调整。注意，由于样品或缓冲液的黏度，可能需要降低流速。

#### 用HiTrap HIC Selection Kit进行选择性筛选

1. 样品制备：已经建立盐溶解性窗口，从最高的能够保持生物学活力而不发生沉淀问题的盐浓度开始。调节样品到起始缓冲液的盐浓度来促进疏水相互作用。使用高浓度的储液调节盐浓度，以避免由于加入固体盐时局部盐浓度过高而造成沉淀。直接调节样品的pH。由于疏水相互作用对pH部非常敏感，不需要完全的缓冲液交换。
2. 准备起始和洗脱缓冲液：50mM 磷酸盐，pH7.0 加入硫酸铵（根据盐稳定性窗口，浓度最高至2M），至起始缓冲液中。
3. 用1毫升/分钟的流速使用 5-10毫升的无盐的洗脱缓冲液洗涤柱子。如果柱子保存在20%乙醇中，这可以避免盐析出。
4. 用1毫升/分钟的流速使用 5-10毫升的起始缓冲液平衡柱子。
5. 用1毫升/分钟的流速上样已知量的蛋白，收集穿透。
6. 用1毫升/分钟的流速至少用5毫升起始缓冲液洗涤柱子或直到洗脱物中没有物质流出，收集洗脱物。
7. 用1毫升/分钟的流速，用洗脱缓冲液洗脱。（3-5毫升通常就足够了，但是根据确定的实验条件，或许需要其它额外的体积洗脱。）收集洗脱物。
8. 分析所有的洗脱物（比如用活力检测）确定纯度和结合到柱子上的量。
9. 选择目的蛋白能够结合并且洗脱下来的填料。如果进行梯度洗脱，选择能够给出最好选择性和分辨率的填料。

#### 筛选结合（盐）条件

1. 用先前方案确定好的填料和缓冲液在相同的pH建立一系列起始缓冲液，但是在每个缓冲液中都有降低的硫酸铵的浓度（比如从1.5M, 1.0M, 0.5M最低浓度0.05M）
2. 在每个盐浓度下重复前一方案的2-7步。
3. 确定能够让目的蛋白结合而杂质或者流过或者仍然结合在柱子上的盐浓度。确定需要使目的蛋白完全洗脱的最低的盐浓度。

#### 优化梯度，流速和样品上样

1. 如果有梯度产生仪，确定最陡的能够给出可接受分辨率的梯度。
2. 梯度体积从10个柱体积开始。从能够让目的蛋白结合的盐浓度开始，直到洗脱所需要的最低盐浓度，这些需遵照筛选时确定的值。或者，从0-50%洗脱缓冲液的梯度开始，洗脱10-20个柱体积。
3. 为了节省时间，在保持分辨率和最小化分离时间的前提下确定最高流速。检查特定柱子的建议流速。
4. 确定最大的样品上样量，而保持令人满意的分辨率。总的来说，上样到柱子总结合能力的

20%-30%能够在梯度洗脱条件下给出优化的分辨率。

5. 当优化好的分离条件已经建立，可以通过转移至逐步洗脱而减少分离时间和缓冲液消耗。用逐步洗脱通常可以增加样品上样量。

## 样品性质和配基的选择

配基的种类和目的蛋白的性质在确定疏水相互作用层析的选择性方面是高度显著的参数。结果是：最合适的配基必须通过用目的蛋白进行筛选试验来确定（见筛选选择性一节）。被假定具有非常相似性质的蛋白在相同条件下进行的疏水相互作用层析中可以表现得非常不同，正如图21中三种单克隆抗体的行为可以说明的一样。

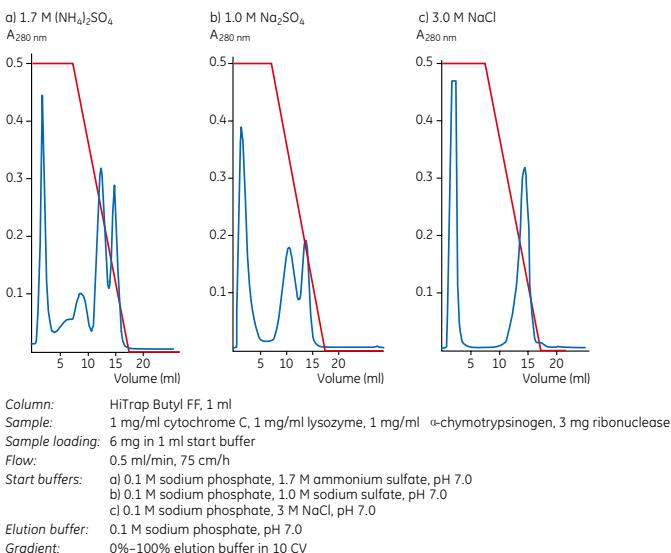


图21 在使用一种苯基配基、同样的运行条件下三种单克隆抗体相互作用不同。一种合适的配基必须经过经验确定。

## 盐的选择和缓冲液制备

### 盐

在疏水相互作用层析中，结合过程比洗脱过程更具有选择性。所以，优化起始缓冲液的条件很重要。正确选择的盐种类和浓度是影响载量和最终选择性的最重要参数。目的是优化条件获得需要的选择性结合目的蛋白，确认大多数的杂质都流过柱子。

在疏水相互作用中不同盐的影响在第1章有所解释。在实践中，钠、钾、或铵的硫酸盐有效的促进在疏水相互作用层析中配基-蛋白相互作用，在蛋白质结构上有稳定作用。因此，最常用的

盐是硫酸铵，硫酸钠，氯化钠，氯化钾和醋酸铵。图22显示了不同种类的盐是如何影响选择性的。四种标准蛋白在起始缓冲液中用1.7M的硫酸铵所获得的分辨率最高。

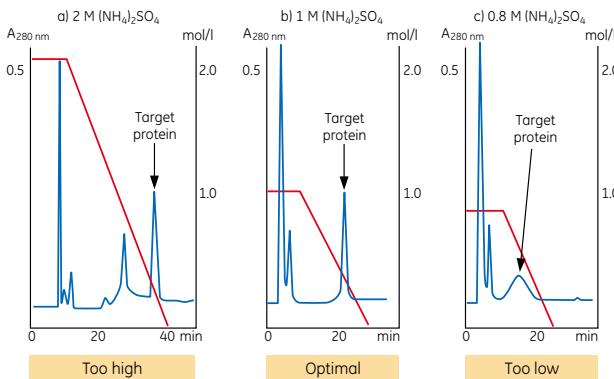


图22 不同盐对选择性的影响：按顺序增大洗脱体积洗脱：细胞色素C、溶菌酶、核糖核酸酶A、 $\alpha$ -糜蛋白酶原。

如同填料选择一样，疏水相互作用层析中盐的选择也是不断尝试的过程，因为每种盐在促进疏水相互作用方面的能力都不同。随着盐浓度的增加，结合的蛋白量几乎随着线性增加，直到一个特殊的盐浓度，然后随盐浓度的增加，结合的蛋白量呈指数形式增加。

- 在给定的浓度下，和其它的盐相比，硫酸铵能够给出最好的分辨率，它可以使用的最高浓度是2M。
- 3M的盐浓度通常需要使用氯化钠。
- 硫酸钠是一种非常好的盐析试剂，但是在高浓度下，蛋白稳定性的问题可能会阻碍它的应用。
- 硫酸铵在pH高于8.0的情况下不推荐使用。

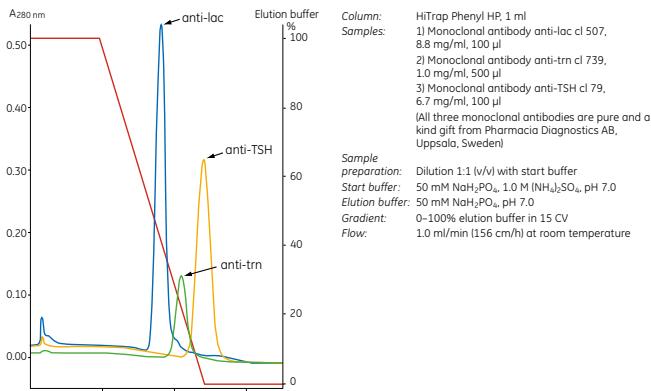


图23 起始溶液中的盐浓度影响选择性和分辨率。

图23显示盐浓度对选择性和分辨率的影响。在这个例子中，目的蛋白是最后一个洗脱峰。由于目的蛋白在梯度内洗脱而且和杂质分离，填料的选择性令人满意。在(a)中，目的蛋白在较窄的区域洗脱，但是在梯度的后段。降低起始的盐浓度(b)给出现四的分辨率，但是确保在上一次用较高盐浓度运行过程中结合的杂质蛋白现在在初始的洗涤阶段洗脱，只有目的蛋白结合着，降低了杂质和目的蛋白共同洗脱的风险，并且增加了柱子对目的蛋白的载量。一个在更低起始盐浓度的运行(c)显示好的选择性但是对目的蛋白效率不高。样品在上样的过程中结合的不够紧，导致在洗脱过程中洗脱峰显著的展宽。

- 如果目的分子洗脱得太晚或根本不洗脱，或者不能更换到不同的填料，尝试使用50%的盐浓度结合。
- 有些蛋白在高盐浓度下开始沉淀。起始缓冲液中的盐浓度需要降低以避免在运行中的沉淀。重复的以小量上样也能帮助避免由于沉淀引起的产量丢失。

#### 缓冲液和pH

对于疏水相互作用，选择缓冲液离子并不致关重要。最经常使用磷酸缓冲液。

pH的选择必须和蛋白稳定性和活力兼容。最好对于每个特定的应用都检查最优的pH条件。然而，在疏水相互作用层析过程中，pH5-8.5对于最终的选择性和分辨率的影响都非常小。pH的增加减弱疏水相互作用，在pH高于8.5或低于5的时候，蛋白的存留会更加显著的改变。

- 检查分离过程所用的pH和盐浓度下的蛋白质稳定性，尤其当生物学活力的恢复需优先考虑时。避免pH或其它条件的极端改变，那些可能会导致蛋白质的失活甚至沉淀。
- 通常使用20-50mM的缓冲液浓度，这些足够在样品上样或盐浓度改变时稳定缓冲能力。
- 如果蛋白需要被冻干，将纯化好的蛋白转移至可挥发性缓冲液中，表3显示了合适的挥发性缓冲液系统。

表3 挥发性溶液系统。

pH-范围	缓冲液系统	对于缓冲离子的pK <sub>a</sub> 值1
3.3-4.3	蚁酸	3.75
3.3-4.3; 4.8-5.8	蚁酸/吡啶	3.75-5.25
3.3-4.3; 8.8-9.8	蚁酸/氨水	3.75; 9.25
3.3-4.3; 9.3-10.3	蚁酸/三甲胺	3.75; 9.81
4.3-5.8	乙酸/吡啶	4.75; 5.25
4.3-5.3; 7.2-8.2	乙酸/N-乙基吗啉	4.75; 7.72
4.3-5.3; 8.8-9.8	乙酸/氨水	4.75; 9.25
4.3-5.3; 9.3-10.3	乙酸/三甲胺	4.75; 9.81
5.9-6.9; 8.8-9.8	碳酸/氨水	6.35; 9.25

1参考：化学和物理手册，第83版，CRC，2002-2003。



在需要使用的温度下准备缓冲液，以保证正确的pH。



在所有的盐和添加剂都加入后过滤缓冲液。使用高质量的水和化合物。对于颗粒直径大于90微米的填料，使用1微米滤膜，对于颗粒直径34微米的填料使用0.45微米滤膜，对于颗粒直径15微米及以下的填料或需灭菌或需额外清洁的样品，使用0.22微米滤膜。为了避免在填装好的柱子中产生气泡并确保可重复的结果，柱子和缓冲液都应该保持在准备运行的温度。



对于疏水性未知的样品，尝试以下配方：

起始缓冲液：1.5M 硫酸铵，50mM 磷酸钠, pH7.0

洗脱缓冲液：50mM 磷酸钠, pH7.0

## 缓冲液添加剂

添加剂可以用来改善选择性和分辨率。例如，样品和疏水相互作用层析填料结合太紧时。然而，如果在高浓度使用，就有使目的蛋白失活或/和变性的可能。添加剂可以通过促进蛋白溶解性，改变蛋白构象，促进结合着的蛋白的洗脱来影响分离。水溶性醇、去垢剂、离序性盐（限制使用）是疏水相互作用层析中最广泛使用的添加剂。典型的添加剂见表4。

表4 提高疏水相互作用层析分离的添加剂。

添加剂种类	典型的添加剂	效果
醇类	最多10%乙醇	改变溶液极性。减少水的表面张力，因此能够减弱相互作用并导致解离。
	最多30%的异丙醇	
	最多10%的甘油	
	20-80% v/v乙二醇	非极性区与蛋白竞争疏水配基造成解离。
去污剂	从 0.1 % 到 1 % v / v 的 Triton X-100	同上
离液盐	MgCl <sub>2</sub>	降低溶液的疏水效果因而减弱相互作用并导致解离。
	CaCl <sub>2</sub>	
	KI	也可能影响蛋白的构象。
	NaCNS	Ca <sup>2+</sup> 能增加纯化过程中钙结合蛋白的稳定性， Mg <sup>2+</sup> 降低稳定性。
	最多8M的尿素	



用含有添加剂的缓冲液进行空白梯度洗脱，以检查它们对洗脱图样的影响（进行一次运行，但是不上样蛋白）。

## 柱子和填料准备

用5-10个柱体积的起始缓冲液平衡柱子或直到紫外吸收回到基线，电导稳定。

使用预装柱来确保最好的性能和可重复的结果。一个填装均匀的柱子确保组分峰在样品流过柱子时不必要的展宽，所以能获得最好的分辨率。

 在使用前，让缓冲液、填料或预装柱达到相同的温度。温度的快速改变，比如说，把装好的柱子从冷室移出，然后使用室温的缓冲液能够导致气泡的产生而影响分离。

 在进行任何疏水相互作用层析前洗掉任何保存缓冲液和/或防腐剂。在用起始缓冲液平衡前，用10倍柱体积的无盐缓冲液洗涤柱子来避免储存缓冲液中的乙醇导致的盐沉淀。

附录2在填装柱子方面给出了详细信息。需要填装柱床的体积由需要纯化的样品量和填料的结合能力决定。需要填装一根结合能力大概多于样品5倍的柱子（总蛋白量应该是结合能力的20%），柱床最高可至20厘米。

 经常性的用柱子的效率和峰的对称性为指标检查柱子的性能。见附录2。注意，这些不适用于HiTrap柱。

## 样品制备

在上样前用简单的步骤净化所有的样品都可以避免堵柱子的风险，减少强力清洗步骤的需要，避免柱子性能的破坏和柱压的增加。附录1包含详细的样品制备技术的总览。

正确的样品制备对于获得良好的分离是重要的。在疏水相互作用层析中，起始的结合条件也会影晌最终分离的选择性。

在开始任何分离前，建立样品的“盐稳定窗口”，例如向粗提物中加入增加量的盐，用来确定沉淀发生的盐浓度。当样品上样时，确保其中的盐低于这个浓度，避免堵住柱子。使用硫酸铵进行沉淀实验的指南参见附录1。

如果可能，检验目的蛋白的生物学活力来确定活力能够保持的盐浓度范围（记住，在进行活力测定前可能需要降低高盐浓度）。如果已经确立盐稳定性窗口，从最高的能保持生物学活力而不导致沉淀的盐浓度开始。样品的盐含量和pH值应该和起始缓冲液相同来获得最优的结合条件。

疏水相互作用层析需要最少的样品制备工作。结合主要发生在高盐条件下而且该技术对pH不敏感。在样品上样到疏水相互作用层析柱前不需要完全的缓冲液交换；只需保证有足够的盐，如果需要的话直接调节样品的pH值就可以。使用高浓度的盐储液以避免加入固体盐时由于局部盐浓度过高造成沉淀的风险。

 样品必须澄清而且没有颗粒状物质，尤其是用34微米或更小颗粒的填料时。对于小样品体积来说，是用一个醋酸纤维素或PVDF材质的注射器末端滤膜进行过滤就足够了。在加入盐和任何其它添加剂后过滤样品。

 确认样品、缓冲液、柱子、层析设备都在相同的温度。

-  如果样品在起始缓冲液的盐浓度下开始沉淀，降低盐浓度，在上样前将样品分成小份。不需改变起始缓冲液的盐浓度。
-  样品中脂或其它非常疏水的物质可能会和填料有相互作用，在该次运行过程中和随后的运行过程中降低结合能力。用疏水性稍微弱一些的层析介质（比如butyl-S-sepharose fast flow）作为预处理柱是在主要分离前除去这些物质的一个手段。

### 浓度和黏度

黏度随着温度而变化，在高盐浓度下会增加。样品的可溶性或黏度可能会影响柱子的上样量。高样品黏度导致畸变的流速样式，最终导致变宽的、破坏的峰和压力问题。相对于洗脱物的黏度而言，更重要的参数是样品的黏度。

-  稀释粘稠的样品。如果不能稀释，用更低些的盐浓度或具有更大颗粒大小的填料可能会帮助克服黏度问题。如果黏度问题是由于核酸污染物的存在而导致的，除去它们的建议请参见附录1。
-  样品浓度通常应该不超过50毫克/毫升。但是会根据样品的类型和层析介质的类型而改变。

## 样品上样

调节样品到选择的盐浓度（如果需要调节pH）。过滤并上样。

用5-10倍柱体积起始缓冲液洗涤柱子或直到紫外吸光达到基线，电导稳定。表明所有未结合的物质都流过了柱子。

对于有效的结合，样品应该和起始缓冲液具有相同的盐浓度。样品体积可以相对的大而不影响分离，因为只要应用条件是正确的，样品应该结合在柱子顶端。

-  用层析系统、蠕动泵或注射器直接将样品上样到柱子上。仪器的选择主要决定于样品的体积，柱子的大小和种类，疏水相互作用层析介质和洗脱过程中梯度的准确性。

## 样品上样量

样品上样量（质量）比样品体积更重要。能够上样到柱子上的样品量依赖于填料的结合能力和需要的分辨率。结合能力大部分由填料，蛋白性质和结合条件，分子的大小和形状，基质的孔径决定，更弱的影响因素是流速，温度和pH。

样品上样量对分辨率有主要的影响，因为峰的宽度和物质存在的多少有直接关系。为了获得满意的分辨率，上样蛋白的总量和结合在填料上的量不能超过柱子的总结合能力。

-  在梯度洗脱时，为了获得较好的分辨率，最多上样到柱子结合能力的30%。如果分辨率令人满意或者使用逐步洗脱，可以增加上样量。

载量可以通过某些方式增加，比如说降低流速，优化起始条件来促进目的蛋白的结合而避免杂质的结合。

载量会在增加流速的条件下降低。所以，必须找到获得最大动态结合能力和快速分离的平衡

点，尤其是在上样大体积样品时。

对于直径或长度非常大的分子，比如说分子量大于400000的蛋白质复合体、不对称蛋白和DNA，载量也会下降。这些分子不能穿透基质的孔径，限制了它们的相互作用范围主要就是和基质表面的疏水基团相互作用。由于某些填料孔径的确切分布会发生变化，分子的形状可能会随缓冲液条件而变化，没有一定的分子量边界来衡量分子是否能够穿透基质孔。

## 样品体积

作为一种结合技术，只要确保样品和起始缓冲液有足够的盐浓度满足结合条件，疏水相互作用层析就独立于样品体积。

## 温度

温度扮演的角色是高度复杂的，这一点已经得到公认。实际上，这意味着在恒定的温度下工作会提高可重复性。在室温开发的分离可能在冷室条件下无法重复，反之亦然。

图24说明了样品、起始和洗脱缓冲液、柱子、层析设备在相同温度的重要性。两次分离都在室温（23度），相同的条件下（除了样品温度在23度或4度）进行。所有的组分都在同一温度时，目的蛋白结合了，然后在梯度的中间被洗脱，而样品的温度在4度时，目的蛋白在穿透中洗脱。

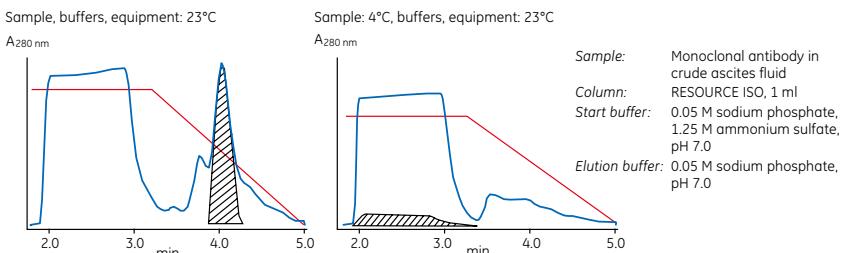
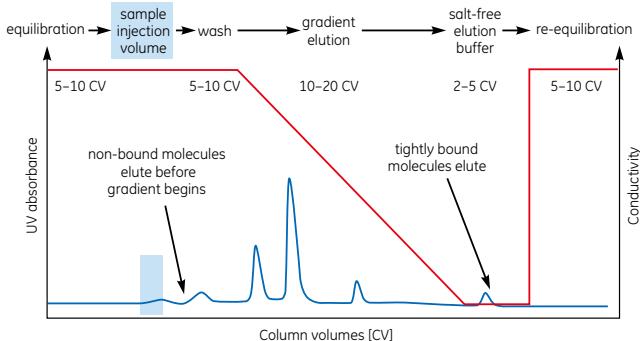


图24 温度对疏水相互作用层析分离的影响。

大多数条件下，增高温度会增强疏水相互作用，所以在更低的温度工作（通常低于10度）能够使由于疏水相互作用而导致的样品组分间的聚集最小化。降低温度可以作为通过加入去垢剂来提高可溶性的替代方案。

保样品，柱子，起始和洗脱缓冲液都在同样的温度。注意，温度也会影响样品和缓冲液的黏度。



## 洗脱

结合的蛋白通过有控制的降低盐浓度来洗脱。根据分离的目的可以选择线性梯度或逐步洗脱。

- 线性梯度洗脱:
  - 高分辨的分离或分析
  - 确定逐步洗脱的条件
  - 在保持需要的分辨率的条件下用增加的流速优化梯度洗脱
- 逐步洗脱
  - 更快的分离时间, 减少的缓冲液消耗
  - 组分离
- 疏水相互作用层析分离所收集到的组分会含有相对高浓度的盐, 可能会影响检测或随后的层析步骤。这些组分可以在随后的处理前脱盐 (详细信息见附录1, 样品制备, 尤其是缓冲液交换和脱盐)。

## 线性梯度洗脱

目的: 高分辨率分离, 填料筛选, 筛选最优的盐条件

用10-20个柱体积进行梯度洗脱。增加洗脱缓冲液的比例, 直到盐浓度达到最低, 就是说无盐缓冲液 (100% B)。

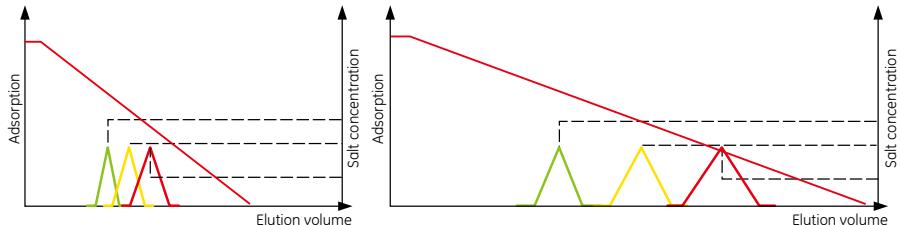


图25 使用线性梯度洗脱的典型疏水相互作用层析分离。紫外吸光 (蛋白) 和电导 (盐) 跟踪显示了蛋白的洗脱峰和洗脱过程中盐浓度的变化。

线性梯度洗脱，如图25所示，最常用于洗脱。当从一个未知的样品开始时，通常使用线性梯度洗脱，尽可能的让各种组分结合在填料上，然后分别洗脱来看总的蛋白图样。降低运行缓冲液中的盐浓度减弱疏水相互作用，结合的物质开始被洗脱。洗脱缓冲液和起始缓冲液的种类和pH通常是一样的，但是没有高盐组分。

- 强烈建议在方法开发过程中使用线性梯度洗脱。线性梯度容易准备，而且用合适的层析设备非常好重复。获得的结果可以作为优化分离的基础。
- 洗脱的梯度的变化可以像下文描述的那样改变疏水蛋白在介质上的存留：
- 长的，浅的梯度给出峰之间最大程度的分离，但是分离时间会长些，而且会有更大的峰变宽。
  - 短的，陡的梯度给出最快的分离和尖些的峰，但是峰之间会洗脱的近些。
  - 后洗脱出的峰比先洗脱出的峰宽。

选择能给出可接受分辨率的最陡的梯度，改变梯度斜率的效果见图26。

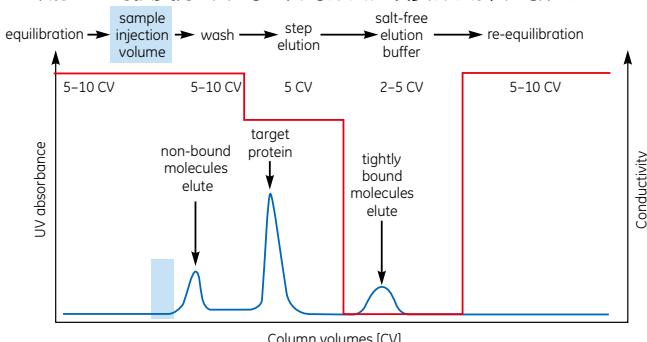


图26 示意的层析图显示了降低梯度斜率的影响。



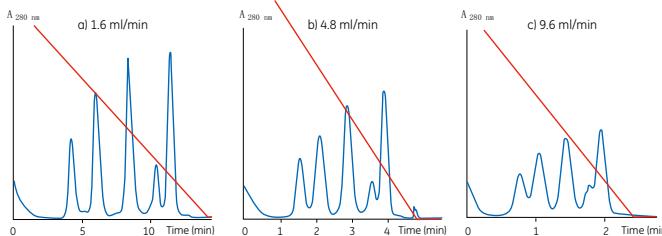
如果梯度洗脱的体积减少了，可能需要按比例减少样品上样量以便保持相同的分辨率。

如果样品上样量增加了（在柱子的总结合能力范围内），可能需要增加梯度体积来保持分辨率。

理想的梯度可以由专门的仪器产生，比如ÄKTAdesign系统能够在上样到柱子前自动控制溶液的混合。系统可以针对起始和洗脱缓冲液用两个分离的泵或用单泵和开关阀联用来混合缓冲液。使混合器和柱子顶端的流路最短有助于确定精确的梯度形成。

## 逐步洗脱

用最多5个柱体积的洗脱缓冲液（盐浓度低于起始缓冲液的浓度）洗脱结合蛋白。重复，降低每步的盐浓度，直到目的蛋白被洗脱下来。



Column: RESOURCE PHE, 1 ml  
Sample: Mixture of myoglobin, ribonuclease, lysozyme and chymotrypsinogen  
Sample load: 0.38 mg  
Start buffer: 2.0 M ammonium sulfate, 100 mM potassium phosphate, pH 7.0  
Elution buffer: 100 mM potassium phosphate, pH 7.0  
Flow:  
a) 1.6 ml/min, (300 cm<sup>3</sup>/h),  
b) 4.8 ml/min, (900 cm<sup>3</sup>/h),  
c) 9.6 ml/min, (1800 cm<sup>3</sup>/h)  
Gradient: 20–100% B, 20 column volumes

图27 使用逐步洗脱的典型的疏水相互作用层析分离。紫外吸收（蛋白）和电导（盐）跟踪显示了蛋白的洗脱峰和洗脱过程中盐浓度的变化。

正如图27所示，逐步洗脱通过逐步加入降低盐浓度的洗脱缓冲液来进行：

第一步：洗脱缓冲液的盐浓度和体积经过优化来洗脱所有和柱子结合能力比目的蛋白弱的物质。注意，盐浓度和缓冲液体积应该足够大，以用来洗脱结合弱的杂质，但是一定不能低过目的蛋白开始共同洗脱出峰的水平。

第二步：盐浓度降低到目的蛋白洗脱的水平。注意，盐浓度应该足够低来洗脱目的蛋白而不过分稀释，但是浓度又必须保持高于一定水平以防止结合的杂质被共同洗脱。

第三步：盐浓度进一步降低来洗脱残余的杂质，这一步也可以用水。

第四步：柱子用起始缓冲液平衡，为下一次运行做准备。

**逐步洗脱的目的：降低分离时间，降低缓冲液消耗**

当疏水相互作用层析已经用梯度洗脱优化过了，转换到逐步洗脱可以降低分离所用的总柱体积数。这有助于加快分离时间，减少缓冲液消耗，而保持需要的纯度水平。这种类型的逐步洗脱通常用于常规的，大规模的分离。

**逐步洗脱的目的：组分离**

在一次组分离中，目的蛋白或杂质能够在一步洗脱中分离。根据它们的疏水性质，蛋白或杂质能结合到柱子上，浓缩，然后快速分离。作为通常的逐步洗脱，选择条件使目的蛋白（或已知的杂质）在上样过程中最多的结合到柱子上。目的蛋白的组分在洗涤或洗脱物中以富集的浓缩的形式存在。在每种情况下，仅需要进行一次缓冲液交换。

 逐步洗脱可能在小量应用过程中具有优势。因为如果保持洗脱缓冲液的强度足够高，以至于可以防止结合更紧蛋白的共同洗脱，目的蛋白可以以一种更浓缩的形式洗脱。

 在上样时使用优化好的盐浓度来使杂蛋白结合最小化的情况下，使用逐步洗脱可以导致最终产品纯度显著的提高。

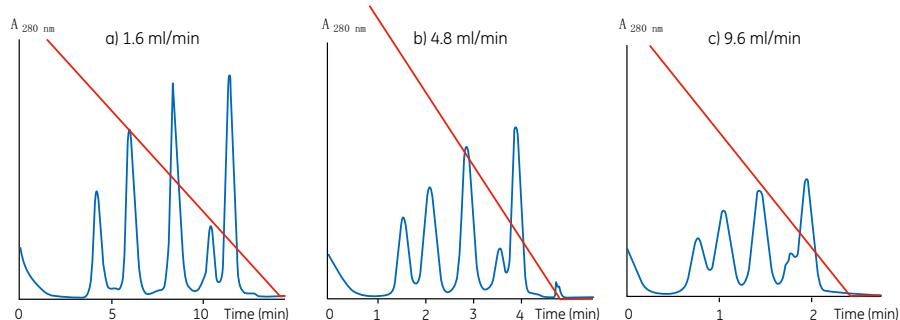
逐步洗脱可以提供一项技术，作为在没有梯度产生设备时的补充。然而，必须小心的进行步骤设计和结果分析。盐浓度的快速转变可能会导致物质的共同洗脱，给出一个包含很多组分的假峰。

峰可能会显示出尖的前沿和显著的拖尾，因为它们通常含有不止一个组分。如果盐浓度的变化起始的过早，拖尾可能导致假峰的出现。由于这些原因，建议在开发新的方法时，使用线形梯度洗脱。在对目的蛋白的层析行为进行分析后，用逐步洗脱来提高目的蛋白洗脱区域的分辨率就会变得容易些。

## 流速

根据分离的阶段，最大流速可以改变。例如，降低流速允许结合或洗脱。高流速可以在平衡、洗涤和再平衡过程中节约时间。流速主要被介质的强度和仪器的压力规格所限制。

每种疏水相互作用层析柱子的建议流速在第3章给出。分离过程的目的在于使用最高的流速而保持分辨率恒定，使分离的时间最短。例如，如果峰在低流速下分开的很好，增加流速来节省时间。或者，如果峰分开的很好，可以上样更多的样品，从高载量中获益而不显著的损失分辨率。图28显示在一个RESOURCE PHE柱子上如何保持分辨率而增加流速。



Column: RESOURCE PHE, 1 ml  
Sample: Mixture of myoglobin, ribonuclease, lysozyme and chymotrypsinogen  
Sample load: 0.38 mg  
Start buffer: 2.0 M ammonium sulfate, 100 mM potassium phosphate, pH 7.0  
Elution buffer: 100 mM potassium phosphate, pH 7.0  
Flow:  
a) 1.6 ml/min, (300 cm/h)  
b) 4.8 ml/min, (900 cm/h),  
c) 9.6 ml/min, (1800 cm/h)  
Gradient: 20–100% B, 20 column volumes

图28 在RESOURCE PHE上分离蛋白混合物时增加流速对分辨率的影响。

流速使用简单的体积单位度量，比如毫升/分钟，但是在规模化放大时，为了比较不同大小的柱子之间的结果时，使用线性流速厘米/小时（见附录3）是有效的。不同大小的柱子在相同的线性流速下的结果是具有可比性的，直到考虑到流速的效果。

对于填料或预装柱不要超过最大建议流速。

高流速和有黏度的缓冲液增加操作压力（记住，在4度运行时缓冲液的黏度增加）。检查装好的柱子的最大操作压力，据此在层析系统上设置最大压力限制。

## 流速控制

对于好的分辨率和可重复性，准确的，可重复的流速控制是必要的。

-  使用层析系统的泵而不是蠕动泵来充分利用例如SOURCE和Sepharose High Performance 的强度和良好的流速性质。
-  用泵将缓冲液泵入柱子而不是在柱子下用泵把缓冲液抽走可以降低由于吸入造成的气泡形成。
-  当使用在平常实验室条件下添装的柱子时，总是使用低于装柱时的流速来进行分离，以避免柱床由于压力而在上样时收缩。装柱的信息见附录2。

## 洗涤和再平衡

用2-5倍柱体积无盐的洗脱缓冲液洗脱任何疏水结合的物质。

大多结合蛋白可以简单的通过用无盐缓冲液洗涤柱子而有效的洗脱下来。在每次运行后包含无盐洗涤步骤来除去任何仍然结合在柱子上的物质。监测紫外吸收以便让洗涤步骤可以按需要减短或增长。

-  有时疏水作用很强可能需要使用比较苛刻的条件除去所有结合的物质，例如0.5-1.0M的NaOH，70%的乙醇或30%的异丙醇。这些洗涤步骤必须在使用水或无盐溶液洗涤之后，并且在使用高盐的起始缓冲液再平衡柱子之前进行。

用5-10倍柱体积的起始缓冲液再平衡柱子或直到电导达到需要的值。

在洗涤后，使用一个再平衡步骤将柱子准备好进行下一次运行。如果可能，监测电导来判断起始条件是否已经达到。再平衡步骤可以按需要减短或增长。

-  在柱子顶端出现有颜色的条带，在适配器和柱床表面的空间，分辨率的下降和柱压的显著增高表明需要进行清洗。对于任何的疏水相互作用层析都通用的清洗步骤在第三章，附录8包含除去严重污染物的建议步骤。在所有的情况下，预防比治疗好，建议进行常规清洗。

## 分析结果和下一步

分析第一次分离的结果可以表明是否可以通过改善条件来增加产量，获得更高的纯度，加速分离或增加单次运行可以处理的样品量。

用盐梯度洗脱下来的样品会包含一系列盐浓度。如果检测对盐浓度敏感，在分析前需稀释或者脱盐。通常使用的分析检测在附录6种列出。

## 规模化放大

对于快速的分离，在一根小柱子上重复多次，收集目的组分比较简单，而不用规模化到大些的柱子。然而，一根大些的柱子可能需要用来进行常规化的处理大样品体积。用于规模化放大的通用指导在表5中显示。

表5 规模化放大指南

保持	增加
柱床高度	柱体积，即柱子直径
线性流速 (cm/h)	体积流速 (ml/min)
样品浓度	上样量
梯度洗脱体积，即在梯度中使用的柱体积数	

用预装柱可以节省时间而且保证可重复性。例如，分离开发可以在1毫升 HiTrap HIC或5毫升 HiTrap HIC上进行，然后规模化至一根 HiPrep™ 16/10 HIC Sepharose Fast Flow (20毫升) HiLoad™ 16/10或26/10 Phenyl Sepharose HP (20毫升或53毫升)。

规模化疏水相互作用层析分离时，遵循如下的要点，以确保对于小规模和大规模分离具有相同的循环时间。

1. 在小规模优化分离。
2. 保持柱床高度，样品浓度，样品体积和柱体积的比例。
3. 通过增加横截面积（直径）的方式增加柱体积。
4. 使用和小柱子相同的线性流速进行分离（见附录3），相同的比例的梯度体积与柱体积。



如果可能，在要进行大规模应用的介质上进行分离方法开发。



对于生产规模的分离，本手册中涉及的所有疏水相互作用层析填料 (SOURCE, Sepharose High Performance和Sepharose Fast Flow) 都适合工业规模的高通量和在位清洗。



柱子的选择和填装参见附录2。

## 仪器选择

附录3 提供了用于疏水相互作用层析系统的指南



总是在疏水相互作用层析后尽可能的润洗层析设备，包括阀和管。高盐可能会影响其它分离，破坏仪器，干扰缓冲液流动。

## 疏水相互作用层析介质的保养

在每个分离之间常规的用5到10个柱体积的蒸馏水清洗柱子足够保证柱子的良好状态。然而，如果柱子已经使用了一段时间，沉淀的蛋白或其它杂质可能积累起来了。在柱子顶端出现有颜色的条带，在适配器和柱床表面的空间，分辨率的下降和柱压的显著增高表明需要进行清洗。

对于任何的疏水相互作用层析都通用的清洗步骤在第三章，附录8包含除去严重污染物的建议步骤。在所有的情况下，预防比治疗好，建议进行常规清洗。样品制备的详细信息参见附录1。

总是过滤缓冲液、样品和清洁溶液来减少额外柱子维护的需要。

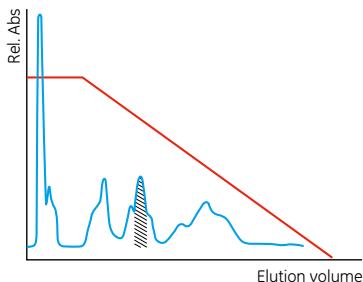
 总是将缓冲液脱气，保持缓冲液、柱子和样品在同样的温度以避免在柱子中形成气泡并确保可重复的结果。

 如果通过压力检测器显示或者柱床表面下移观察到压力的升高，在开始清洁过程前检查问题是否真的由柱子导致。从部分收集器开始，每次断开一个连接管，启动泵，检查每次断开后的压力。在线滤膜被堵住通常是压力增加的原因。在每次运行的同一阶段检查压力，因为在运行过程中，阀位可能在样品上样或转换至不同的缓冲液时改变。

 将填料和填装好的柱子保存在20%的乙醇中来避免微生物生长。

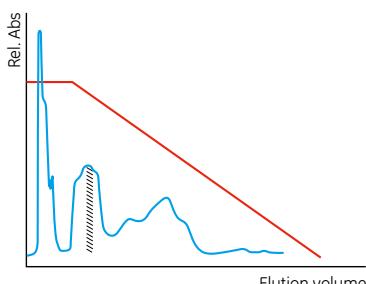
## 问题解决

理想的疏水相互作用分离：目的蛋白可以用梯度洗脱很好的分离



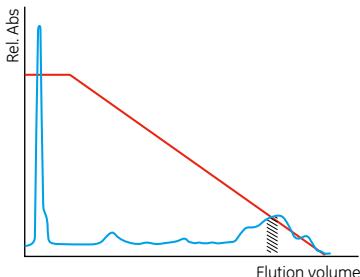
本节的其它部分将着力讲述可能导致非理想疏水相互作用层析分离的实际问题。

目的蛋白在梯度里很早洗脱，分辨率差



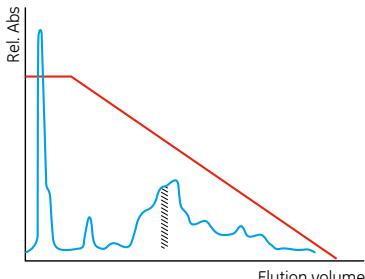
在高盐浓度的起始缓冲液条件下重复分离或者用一个具有强些“盐析”作用的盐（参照Hofmeister系列）。如果在获得的选择性上没有改善，尝试一种其它的配基或更高配基取代度的填料。

## 目的蛋白在梯度的末端洗脱，分辨率差



用低些的盐浓度的起始缓冲液条件重复分离，或者用一种具有弱一些“盐析”作用的盐（参照 Hofmeister 系列）。如果在获得的选择性上没有改善，尝试一种其它的配基或更低配基取代度的填料。降低起始缓冲液的盐浓度会减弱结合，导致蛋白洗脱靠前。然而，这可能对选择性没有太大的正面效果，因为杂质的洗脱峰非常靠近，不仅在目的蛋白前，也在目的蛋白后。

## 目的蛋白在梯度的中间洗脱，分辨率差



优化目的蛋白附近的分辨率，比如用分段梯度，在目的蛋白附近用缓些的梯度。也需要考虑用添加剂来提高分辨率（见35页）。如果分辨率不能提高，在其后使用其它的层析技术，例如离子交换层析。

情况	原因	补救措施
流出柱子的液体减少或消失	柱子出口关闭或泵不工作 滤膜、末端适配器或管子堵住了，脂蛋白或者蛋白聚集物沉淀了 蛋白沉淀在柱子上 样品过于粘稠 微生物在柱子内部生长	打开出口，检查泵有没有泄露的迹象，如果使用蠕动泵，同时检查管子 除去、清洗，有可能的话更换。在使用前总是过滤样品和缓冲液。 在样品制备过程中除去脂蛋白和聚集物，或者使用低疏水性的清洁柱（见附录1）进行清洁过程，附录8。 降低起始缓冲液的盐浓度。 用缓冲液稀释，保持蛋白浓度在50毫克/毫升以下 进行清洁过程，附录8。总是过滤缓冲液。在不使用时，用20%的乙醇保存柱子。
目的蛋白的峰和其它主峰分离的不好	在柱子顶端或底端有很大的混合空间 不正确的盐浓度 次优洗脱条件，比如梯度太陡，流速过高 柱子填装的不好 柱子被过量上样了 蛋白在柱子上沉淀了	尽可能的调节顶部的适配器到填料顶端，减少一切柱后体积。 检查结合条件，准备新溶液。 改变洗脱条件，用缓些的梯度，降低流速 检查柱效（见附录2）。如果需要重新填装柱子，使用重新填装的柱子。 减少上样量 进行清洁过程，附录8。降低缓冲液中的盐浓度，或者在低些的盐浓度下少量多次上样，而保持缓冲液中的盐浓度不变。
蛋白不结合或不洗脱	不正确的盐浓度 蛋白或脂在柱子或柱子滤膜上沉淀了 样品在储存的过程中改变了 蛋白可能在洗脱缓冲液中不稳定或失活 柱子平衡不完全 蛋白形成了聚集，并且和柱子结合很强 样品，缓冲液或温度条件与前一次运行不同	检查需要的条件，准备新溶液 清洗柱子，更换或清洗滤膜，检查样品的pH和盐稳定性。 准备新鲜的样品 确定目的蛋白的稳定性 重复或延长平衡步骤，直到电导和pH值恒定。 使用低些的盐浓度。考虑使用添加剂来降低疏水相互作用见35页的缓冲液添加剂 检查条件

蛋白比期待的洗脱晚或根本不洗脱	盐浓度过高 疏水相互作用过强	降低洗脱缓冲液中的盐浓度 使用疏水性弱些或配基浓度低些的填料。 考虑使用添加剂来降低疏水相互作用, 见35页的缓冲液添加剂
蛋白比期待的洗脱早, 在洗涤期间	样品的盐浓度太低 柱子平衡得不完全	增加样品和缓冲液中的盐浓度 重复或增长平衡步骤的时间, 直到电导稳定
层析中上升缓慢的或圆形的峰形	柱子中的空隙现象 柱子过载了 柱子污染了	用细些的填料泥浆重新填装柱子, 检查柱子填装 (见附录2) 降低样品上样量, 重复 用建议的步骤清洗柱子
峰形拖尾	柱子填装得太松	检查柱效 (见附录2) 用更高的流速 填装柱子, 使用预装柱。
峰形上升缓慢	柱子填装得太紧	检查柱效 (见附录2) 用低些的流速 填装柱子, 使用预装柱。
填料出现在洗脱物中	柱子填装得太紧 柱床下部的支撑物松了或坏了 柱子在过高的压力下运行 在柱子填装过程中, 介质损坏了	检查柱效 (见附录2) 用低些的流速 填装柱子, 使用预装柱。 重装或拧紧 对填料或柱子不要超过建议的最高 操作压力 平衡时不要使用磁力搅拌
活力回收率很低, 但是蛋白回收率正常	蛋白可能在缓冲液中不稳定或失活 酶可能同辅基分离或类似的现象	确定蛋白的pH和盐稳定性 通过取组分来检查, 重复检测
蛋白产量比期待的低	蛋白可能被蛋白酶降解了 在样品制备过程中吸附到滤膜上 样品沉淀了 蛋白没有洗脱	向样品和缓冲液中加入蛋白酶抑制剂, 避免降解。 将样品流过像Benzamidine 4 fast flow这样的柱子来除去胰蛋白酶类的丝氨酸蛋白酶 更换另一种滤膜 检查并调节盐条件以改善样品溶解性 考虑使用添加剂来降低疏水相互作用。见35页的缓冲液添加剂。使用疏水性弱些的柱子。
峰太小	样品在所选择的波长吸收较弱 在层析步骤前后使用了不同的检测条件 过分的峰展宽	如果合适, 检查在一个波段的吸收。如果令人满意的话, 使用其它波长, 比如214纳米而不是280纳米 在所有的检测中使用相同的条件 检查柱子的填装, 有可能的话重新填装。

回收到了比期待量更多的样品	蛋白和其它物质共同洗脱下来	优化条件来改善分辨率，检查运行前后检测的条件，检查柱子的选择，检查样品的纯度。
回收到了比上样量更多的活力	在层析步骤前后使用了不同的检测条件 在分离过程中除去了抑制剂	在所有的检测中使用相同的条件 在检测原始样品前透析或脱盐，因为细胞裂解物/粗提物通常包含能够影响活力的低分子量物质。
在运行或随后运行过程中柱压升高 降低起始缓冲液中盐的浓度	柱子被压缩了 样品过于粘稠 样品过滤得不恰当 微生物生长 浑浊的样品 蛋白在柱子滤膜上或/和柱床顶端沉淀了 在增加的盐浓度下脂蛋白沉淀了	如果可能的话重新填装柱子，或使用新柱子。检查样品制备 用缓冲液稀释，保持蛋白浓度低于50毫克/毫升 清洗柱子，过滤样品，重复进行清洁过程，附录8。在20%乙醇里保存柱子来避免微生物生长。 总是过滤缓冲液。 改善样品制备（见附录1） 用建议的方法清洗柱子。如果有可能的话更换或清洗滤膜或使用新柱子。 在层析前用如10%的硫酸葡聚糖（终浓度0.2% he 1M 氯化钙，终浓度0.5M）来除去脂蛋白
柱床里有气泡	缓冲液没有恰当的脱气 柱子在低温填装或储存，然后升温了	将缓冲液完全脱气 通过流过脱气的缓冲液来除去小气泡。如果缓冲液储存在冰箱或冷冻室里，使用时需格外小心。不要让柱子被阳光或加热系统加热。如果可能，重新填装柱子（见附录2）
柱床崩溃了	柱子里有大气泡泄露	检查所有可能泄露的连接，如果可能，重新填装柱子，见附录2
在溶剂前有负峰	折射指数效应	将样品更换到起始缓冲液中
层析中不应该出现的峰	缓冲液不纯	通过流过预处理柱来净化缓冲液，使用高质量试剂
在空白洗脱梯度中出现峰	前一个样品洗脱不完全	根据建议的方法清洗柱子
层析过程中的跳跃	紫外吸光检测仪的流动池里因有气泡 缓冲液不纯	总是使用脱气的缓冲液 用高纯试剂

## BioPress填料-专为生产设计的填料

已经为从捕获到精细纯化的生产过程的每个层析阶段都设计了特定的BioProcess填料。高流速，高载量，高回收率都有助于工业处理的总产率。大载量的生产和有效的定购-运送路线的整合确保了BioProcess填料可以在正确的质量，正确的地点，正确的时间提供。GE医疗集团可以确保今后BioProcess填料的供应，使它们作为长期生产的安全投资。

填料依照验证过的方法并在严格条件下检测，来满足高效率规格。每次定购都有一个分析证书。

普通支持文件包含性能、稳定性、可提取化合物和分析方法。这些文件中的必要信息给出了有重要价值的处理验证的起点，也提供对向普通权威提交的支持。在每个阶段使用BioProcess填料可以产生容易验证的过程。

所有的BioProcess填料都具有化学稳定性，允许有效的清理和灭菌过程。填装方法已经在广泛的规模下建立，兼容的大规模柱子和设备也有提供。关于BioProcess产品的最新信息请登陆[www.gehealthcare.com/protein-purification-bioprocess](http://www.gehealthcare.com/protein-purification-bioprocess).

## 客户定制的填料

客户定制的填料（CDM）是为工业客户提供的合作服务，用于开发定制的层析填料。CDM可以在标准范围内没有合适的填料时为特殊的工业过程分离而生产。GE医疗集团的CDM小组和它们的客户通过非常紧密的合作来设计，制作，和运输用于大规模纯化的填料。

在疏水相互作用层析中，所有的组分的组合（蛋白，缓冲液，和填料）对于成功的分离是重要的。填料必须表现出正确的特异性和批次间的最小差异，和窄的特异性区间。由于填料的疏水性质由填料、配基、配基密度的组合决定，这些参数可以改变以开发一种客户定制的填料，特异的适合于一种特定的疏水相互作用分离步骤。在疏水性上的微小差异可以确保特定应用的成功。

客户定制填料的例子包括：

- Butyl Sepharose High Performance被开发出来用于提供一种疏水性弱于标准的Phenyl Sepharose High Performance填料，用于在High Performance基质上进行分离。
- Butyl Sepharose 6 Fast Flow被开发出来用于满足客户对增加的生产率的要求。该填料和Butyl Sepharose 4 Fast Flow相比，是通过增加基质的强度来实现的。

CDM产品根据需要提供，详细信息请联系当地代表。

## 客户定制产品

GE医疗集团在预装柱和填料上提供最大的选择度。包括最多的液相色谱技术。然而，产品目录上没有的，特别的配置或柱子和填料的组合可以通过客户定制产品组来提供。该组能提供填装

在任何柱管中的任何层析介质，从HiTrap和Tricon到FineLine和BPG100 柱子。GE医疗集团的柱管被设计成确保最高性能和能够满足现代制药业需要。

客户定制小组和每个客户工作得非常紧密，从起始的讨论到建立特异性的需求，柱子和填料的选择以及最终带有质量认证的产品运输。每根柱子都被填装好、测试、并被在ISO9001标准下严格验证。证书、用户说明和每根柱子被一同提供，描述柱子的性能。通常只在预装柱中才有的，并由客户指定的包装大小和填料也可以提供。

运输时间是2-4周，依赖于特殊的填料和柱子规格。关于客户定制产品更详细的信息请咨询当地代表。

## 第3章 疏水相互作用层析的介质

### 简介

第一种商品化的疏水层析介质是在20世纪70年代诞生的，它是用苯基或辛基取代了Sephadex CL-4B制成的。用这些早期填料进行生物分子的分离的文献仍能在旧些的文章中发现。

更近一些开发的填料提供了改进的载量和更好的物理化学稳定性，和更优良的流速性能。需要时，可以使用强力清洗，不用经常进行柱子的重新填装。这些填料被设计用来满足大规模工业层析的在位清洗要求。

第一章描述了填料性能如何决定层析性质，比如性能，载量，回收率和物理、化学稳定性及流速性质。本章描述商品化的填料和它们的使用建议、纯化实例、分离和清洗方法以及获得最好性能的注意事项和提示。

 为了从快速的分离和改善的性能中受益，将旧的纯化方案转移并优化到在本章选定的一种填料上。

### SOURCE：用高分辨率纯化和简单放大

 在实验室或大规模应用中的精细纯化等需要高分辨的地方，使用SOURCE介质。如果没有具有合适选择性的填料或该填料没有大包装，也可以将SOURCE填料用于捕获或中度纯化步骤。

 在ÄKTAdesign, FPLC, 和HPLC上运行SOURCE柱子，附录3给出了如何选择最合适的ÄKTAdesign系统。

SOURCE介质基于均一的、刚性的、聚苯乙烯/联乙烯苯的亲水基质，并用疏水配基取代：苯基，醚或异丙基（图29）。这些填料展示了相当的化学和物理稳定性。小颗粒允许快速的结合和解离以有助于高分辨率，而颗粒的均一和稳定确保了高流速和低柱压。

分离方法可以简单的从预装的RESOURCE柱子规模化放大到大规模柱子比如FineLINE。



### Ligand

Ether (ETH)  $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CHOH}-\text{CH}_2-\text{OH}$

Isopropyl (ISO)  $-\text{O}-\text{CH}-\text{(CH}_3)_2$

Phenyl (PHE)  $-\text{O}-\text{C}_6\text{H}_5$



图29 配基通过不带电荷、化学稳定的氧-醚键偶联到均一的SOURCE颗粒上。

## 纯化选项



图30 基于SOURCE基质的疏水相互作用层析介质提供有预装柱和散装填料。

表6 基于SOURCE的疏水相互作用层析产品。

产品	配基*	推荐的工作流速	最大流速†	最大操作压力‡ (MPa/psi) 1MPa=10bar
RESOURCE PHE, 1ml	苯基	1.0-10ml/min	10ml/min	1.5/220
SOURCE 15PHE 4.6/100 PE, 1.7ml	苯基	0.5-2.5ml/min	5ml/min	4/580
SOURCE 15PHE	苯基	150-900cm/h	1800cm/h	0.5/72
RESOURCE ETH, 1ml	醚	1.0-10ml/min	10ml/min	1.5/220
SOURCE 15ETH	醚	150-900cm/h	1800cm/h	0.5/72
RESOURCE ISO, 1ml	异丙基	1.0-10ml/min	10ml/min	1.5/220
SOURCE 15ISO	异丙基	150-900cm/h	1800cm/h	0.5/72

\*SOURCE基质的性质使得它不能像基于Sepharose的填料那样定义配基浓度。

†直线流速(cm/h) 和体积流速(ml/min) 的相互转换见附录3。注意最终工作流速也取决于其它参数，如柱子尺寸和柱床高度、样品性质和上样条件、使用的仪器和仪器所能承受的压力等。

‡最大操作压力指超过这个压力介质将会收缩。

- 需要注意的是疏水相互作用层析的结合能力高度依赖于目的蛋白和杂质的性质，填料的选择性和结合条件。载量必须在介质筛选和方法开发过程中按照实验来确定。
- 使用RESOURCE HIC TEST KIT，包含了3根预装的RESOURCE 1毫升柱子（ETH, ISO和PHE），来快速的对最合适的介质和特定的应用进行筛选。选择能够在最低盐浓度下给出最好选择性、分辨率和载量的的填料。图31显示了在纯化IgM，进行介质选择过程中选择性差异的例子。

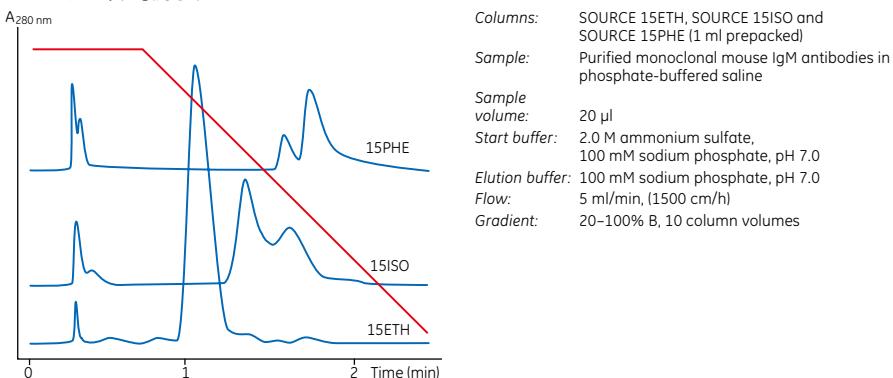


图31 为某种抗体纯化筛选疏水相互作用层析介质。

- 使用预装的RESOURCE柱子进行快速的介质选择、方法寻找和组分离或样品浓缩。
- 使用SOURCE15PHE 4.6/100 PE来通过增加柱子长度提高分辨率。可能需要进一步优化。在规模化过程中，首先使用优化好的条件。

表7 SOURCE介质的填充体积和柱床高度。

空玻璃柱 内径/长度 (mm)	体积	柱床高度
Tricorn 5/150	最多3ml	最高15cm
Tricorn 5/200	最多4ml	最高20cm
Tricorn 10/100	最多8ml	最高10cm
Tricorn 10/150	最多12ml	最高15cm
Tricorn 10/200	最多16ml	最高20cm

如使用大体积，请选择诸如FineLine柱子。

## 纯化案例

### 方法优化

图32 显示了纯化一个重组蛋白（酪氨酸磷酸酶）时进行中度纯化步骤的例子。蛋白在起始的捕获步骤被Q SepharoseXL离子交换层析部分的纯化了。活力组分被分离并上样到 SOURCE15PHE4.6/100PE柱子上，用疏水相互作用层析进行中度纯化。结果显示在样品上样过程中增加硫酸铵的浓度和增加梯度洗脱体积对于分辨率有最显著的影响。注意，在第一次运行后，加入了甘油以降低酪氨酸磷酸酶的强结合并有助于洗脱。（疏水相互作用层析中的添加剂的更详细信息请参见第35页）

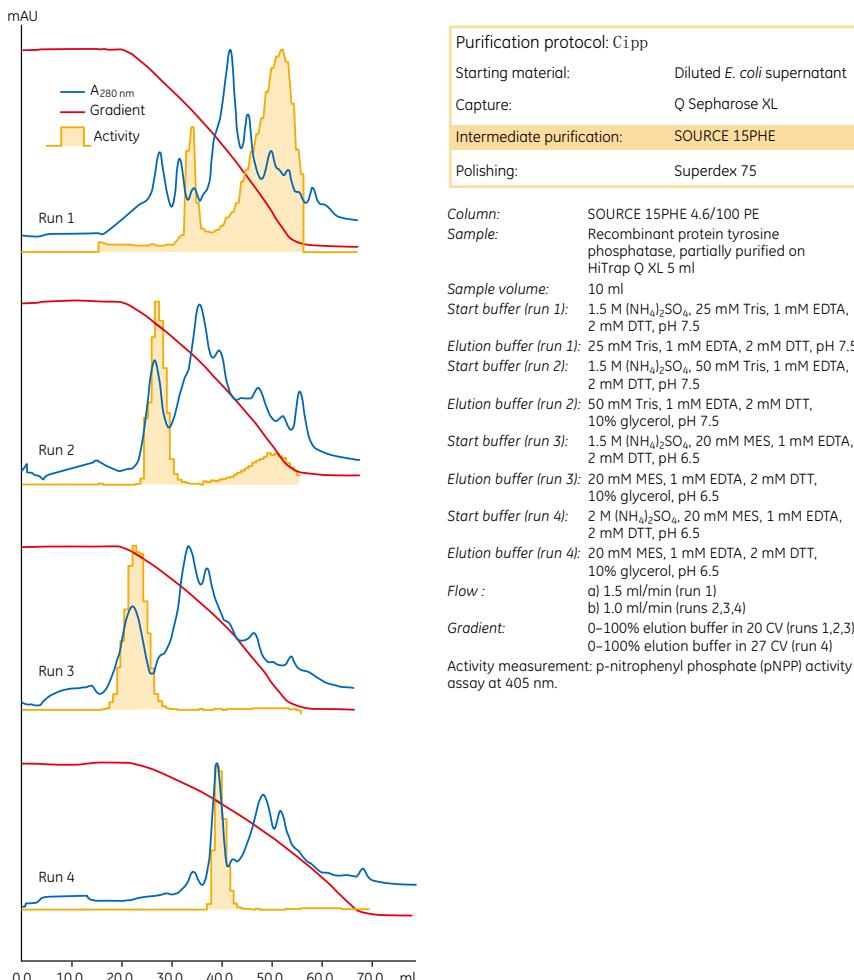
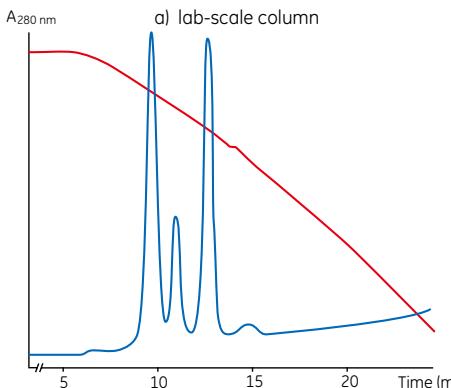


图32 重组蛋白中度纯化步骤的优化。

## 放大



Column: SOURCE 15ISO  
a) 7.5 x 50 mm (2.2 ml)  
b) FineLINE 100, 100x50 mm (400 ml)  
Sample: lactalbumin, chymotrypsinogen  
Sample load: 0.3 mg/ml medium  
Start buffer: 100 mM potassium phosphate, 2.0 M ammonium sulfate, pH 7.0  
Elution buffer: 100 mM potassium phosphate, pH 7.0  
Flow : a) 2.2 ml/min (300 cm<sup>3</sup>/h)  
b) 385 ml/min (300 cm<sup>3</sup>/h)  
Gradient: 20-100% elution buffer, 20 CV

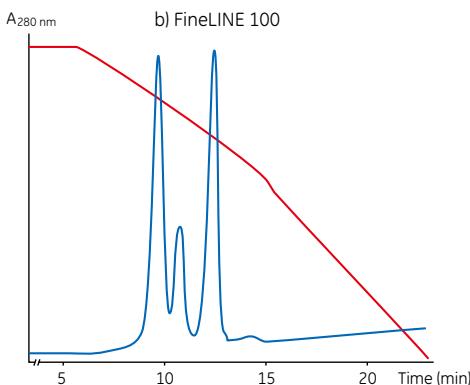
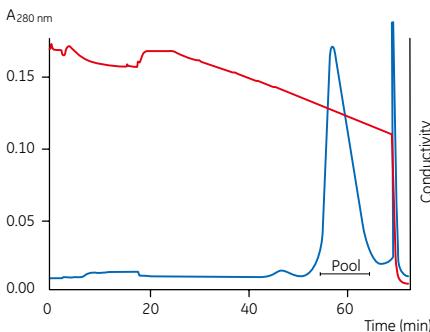


图33 用SOURCE 15ISO放大时的可重复结果。样品蛋白混合物的分离显示了从实验室规模用柱 (a) 到FineLINE 100产品规模柱 (b) 180倍的放大。

## 精细纯化

图34显示了在大规模纯化一个重组蛋白rExotoxinA (PE553D)过程中使用SOURCE15PHE作为最后的精细纯化。rExotoxinA (PE553D) 在rPseudomonas aeruginosa的周质中表达。在样品上样前, 向部分纯化的样品中加入了1.0M 硫酸铵。结合的rExotoxinA用1.0M到0.55M硫酸铵的线性梯度洗脱了15个柱体积。该步骤除去了剩下的杂蛋白, 如反相层析上的单峰所示 (图35)。

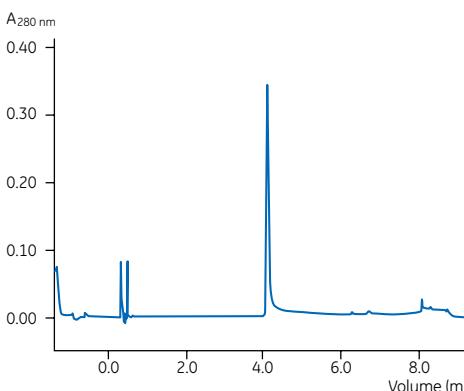


#### Purification protocol: Cipp

Starting material:	Unclarified <i>E. coli</i> homogenate
Capture:	STREAMLINE DEAE
Intermediate purification:	Phenyl Sepharose 6 Fast Flow
Intermediate purification:	SOURCE 30Q
Polishing:	SOURCE PHE

Column: SOURCE 15PHE, 35 mm i.d. x 100 mm  
 Sample: 0.5 l/cycle was applied from previous SOURCE 30Q step, adjusted to 1.0 M ammonium sulfate  
 Start buffer: 50 mM phosphate, 1.0 M ammonium sulfate, pH 7.4  
 Elution buffer: 50 mM phosphate, pH 7.4  
 Gradient: 0–45% elution buffer, 15 CV  
 Flow: 200 cm/h

图34 在大规模纯化重组蛋白rExotoxinA (PE553D) 的最终精细纯化中使用SOURCE 15PHE。



Column: μRPC C2/C18, SC 2.1/10  
 Sample: Pooled fractions from SOURCE 15PHE  
 Sample volume: 50 µl  
 Start buffer: 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) in water  
 Elution buffer: 0.1% TFA in acetonitrile  
 Gradient: 25–75% elution buffer over 47 min  
 Flow: 150 µl/min

图35 层析分析证实了在SOURCE 15PHE上精细纯化之后的纯度。

## 进行一次分离

选择填料、缓冲液、盐浓度、pH和方法优化的指导已经在第二章给出了。使用这里的指导作为进行优化分离的基础。

为了获得优化的分离和避免对柱子性能的任何损坏，正确的样品和缓冲液准备是必要的。样品必须完全溶解，没有任何颗粒或能够影响分离的物质。对于样品制备的建议请参见第二章和附录1。

在所有的盐和添加剂都包含之后进行样品和缓冲液过滤。使用高纯度的水和化合物。使用0.22微米的滤膜过滤。为了避免在装好的柱子里形成气泡和确保可重复的结果，在准备运行前，柱子和缓冲液应该在同一温度。



为了避免沉淀，检查样品组分的盐稳定性窗口。避免在目的蛋白溶解度极限附近的盐浓度工作。例如，对于一个疏水性未知的蛋白，尝试如下条件：

起始缓冲液：1.5M硫酸铵，50mM 磷酸缓冲液，pH7.0

洗脱缓冲液：50mM磷酸缓冲液，pH7.0



注意，由于选择的起始缓冲液的黏度、样品性质，上样需要和使用的仪器的影响，需要降低流速。

## 第一次使用或长期储存后使用

用5倍柱体积的水或洗脱缓冲液洗涤柱子，以除去乙醇。

流速： SOURCE15 PHE4.6/100 2毫升/分钟

RESOURCE 1 毫升 4毫升/分钟

用SOURCE填装的大柱子 200厘米/小时

1. 用5倍柱体积的起始缓冲液冲洗涤柱子，流速和第一步一样。
2. 进行空白运行来检测电导图样（比如进行不上样任何样品的运行）

## 用梯度洗脱分离

流速： SOURCE15 PHE4.6/100 2毫升/分钟

RESOURCE 1 毫升 4毫升/分钟

用SOURCE填装的大柱子 200厘米/小时

在所有分离过程中收集组分

1. 用5-10个柱体积的起始缓冲液平衡柱子，或直到紫外吸光和电导稳定。
2. 将样品调节到选择的盐浓度（如果需要的话调节pH），过滤并上样。
3. 用5-10个柱体积的起始缓冲液平衡柱子，或直到紫外吸光和电导稳定，以保证所有未结合的物质都被从柱子洗掉。
4. 用10到20个柱体积的梯度进行洗脱。增加洗脱缓冲液的比例，直到盐浓度到达最低，就是用无盐缓冲液。
5. 用2-5个无盐的洗涤缓冲液来洗脱仍然疏水结合的物质。
6. 用5-10个柱体积起始缓冲液重新平衡柱子或者到电导达到需要的值。

## 用逐步洗脱分离

流速： SOURCE15 PHE4.6/100 2毫升/分钟

RESOURCE 1 毫升 4毫升/分钟

用SOURCE填装的大柱子 200厘米/小时

在所有分离过程中收集组分

1. 用5-10个柱体积的起始缓冲液平衡柱子，或直到紫外吸光和电导稳定。

2. 将样品调节到选择的盐浓度（如果需要的话调节pH），过滤并上样。
3. 用5-10个柱体积的起始缓冲液平衡柱子，或直到紫外吸光和电导稳定，以保证所有未结合的物质都被从柱子洗掉。
4. 用5倍含有所选盐浓度的洗脱缓冲液洗脱。
5. 在更低的盐浓度重复步骤4，或直到目的蛋白被洗脱下来。
6. 用2-5个无盐的洗涤缓冲液来洗脱仍然疏水结合的物质。
7. 用5-10个柱体积起始缓冲液重新平衡柱子或者到电导达到需要的值。

#### 用逐步洗脱分离

- 在用无盐缓冲液洗涤和再平衡步骤中使用高流速以节省时间，但是不要超过填料的建议流速。
- 经常性的检查柱子的效率和峰的对称性（见附录2）。
- 勿将仪器或柱子保存在高盐溶液中。

#### 清洗

正确的样品和缓冲液制备以及在每次分离后都用无盐缓冲液洗涤应该能够保持柱子在一个好的状态。然而，降低的性能，缓慢的流速，增加的柱压或柱子的完全堵住都是填料需要用更强力的步骤清洗的表征。

- 如果有可能的话，在清洗时将柱子倒流，以免让杂质流过整个柱子。每次洗涤所需柱体积和时间可能根据污染的程度而变化。如果用来除去通常杂质的清洗步骤不能恢复柱子效率，在使用其它清洗方法前，更换柱子的上部滤膜。更换滤膜时需小心，这可能会影响柱子填装并干扰性能。

如下步骤可以除去通常的杂质，比如沉淀的蛋白：

流速： SOURCE15 PHE4.6/100 0.2毫升/分钟

RESOURCE 1毫升 1毫升/分钟

用SOURCE填装的大柱子 40厘米/小时，接触时间1-2小时。注意，可能根据柱子的情况 和样品、缓冲液或保存溶液的黏度，降低流速。

1. 用至少4倍柱体积的 1M 氢氧化钠洗涤。
2. 用至少3倍柱体积的水洗涤或直到pH为中性。
- 3a. 开始进行分离：用至少3倍柱体积的起始缓冲液再次平衡或直到流出液达到正确的pH.
- 3b. 用于储存：用至少5倍柱体积的储存缓冲液洗涤，在储存柱子前让紫外吸光稳定。

除去脂类，脂蛋白和非常疏水的蛋白的方法见附录1。

## 填料性质

组成：刚性的、均一的聚苯乙烯/联乙烯苯颗粒（15微米），具有优化好的孔径分布。填料的被

偶联了三种疏水配基之一：醚、异丙基或苯基。

表8 SOURCE 疏水相互作用层析介质的性质。

产品	基质	pH稳定性*	平均颗粒尺寸
SOURCE 15PHE	聚苯乙烯/二乙烯苯，均一的颗粒物	长期：2-12	15微米（均一尺寸）
SOURCE 15ETH		短期：1-14	
SOURCE15ISO			

\*长期pH稳定指介质能够长时间稳定并且不会对层析效果产生不良的副作用的pH范围。

短期pH稳定指进行再生、柱上清洁和消毒过程的pH范围。

所有范围的估计都根据GE医疗集团的经验和知识。

## 化学稳定性

日常使用条件下，基于SOURCE基质的疏水相互作用层析填料在所有的水溶性溶液中都是稳定的。1M盐酸，2M氢氧化钠，20%乙醇，100%异丙醇，变性剂（6M盐酸胍），1M醋酸，30%异丙醇，30%乙腈和高达2%的SDS。

## 保存

先用5倍柱体积的蒸馏水然后用5倍柱体积的20%乙醇洗涤柱子，用于储存。将乙醇/水的混合物充分脱气，用低流速上样，避免超压。确保柱子在储存的过程中封好。将柱子和未使用的填料储存在20%乙醇中，4到30摄氏度。不要冻上。

大规模生产柱通常在0.01M氢氧化钠中储存，作为对20%乙醇的替代。

 为了避免气泡的形成，使用前，确保柱子，缓冲液和仪器都在相同的温度。

## Sepharose High Performance：高分辨纯化

 在需要高分辨应用时使用Sepharose High Performance用作中度纯化或精细纯化阶段（建议流速可达300厘米/小时）。当SOURCE介质不能提供需要的选择性时使用。

 当选择性能令人满意，高分辨是首要选择，低流速（由于高压力）可以接受时，使用Sepharose High Performance（颗粒大小34微米）疏水相互作用层析填料用于捕获或规模化放大。

 在例如AKTAdesign，FPLC，HPLC系统上运行Sepharose High Performance。附录3给出了如何选择最合适的AKTAdesign系统的指南。

Sepharose High Performance基于为了达到化学和物理稳定性而高度交联的6%葡聚糖的基质颗粒（大小34微米）。小颗粒大小有助于在高样品上样量和高流速下的快速结合和解离。和选择性的正确组合，可以达到高分辨。尽管盐浓度发生变化，颗粒大小和柱床体积能够保持稳定，来确保在高流速下进行快速的分离。配基通过稳定的氧醚键连接（图36）。



Sepharose High Performance可用作组分离，样品浓缩或捕获阶段。然而，分离应该仅限于干净的样品，以避免堵住柱子的滤膜(34微米颗粒需要孔径更小的滤膜)。

使用Phenyl sepharose High performance的参考文献可以参见：

[www.healthcare.com/protein-purification-labresearch](http://www.healthcare.com/protein-purification-labresearch)

### Ligand

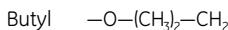
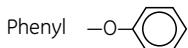


图36 配基通过不带电荷、化学稳定的氧-醚键偶联在Sepharose High Performance基质上。

### 纯化选择



图37 苯基Sepharose High Performance有预装的HiTrap或HiLoad柱和散装填料。

表9 基于Sepharose High Performance的疏水相互作用层析产品

产品	每毫升介质中配基密度‡	推荐的工作流速*	最大流速*	最大操作背压† (MPa/psi) 1 MPa=10bar
HiTrap Phenyl HP, 1ml	25μmol	最快1ml/min	4ml/min	0.3/43
HiTrap Phenyl HP, 5ml	25μmol	最快5ml/min	20ml/min	0.3/43
HiLoad 16/10 Phenyl Sepharose HP, 20ml	25μmol	最快5ml/min	5ml/min	0.3/43
HiLoad 26/10 Phenyl Sepharose HP, 53ml	25μmol	最快13ml/min	13ml/min	0.3/43
Phenyl Sepharose High Performance	25μmol	30-150cm/h	150cm/h	0.5/72

客户定制的介质，包括Butyl Sepharose High Performance也有提供，见第50页。

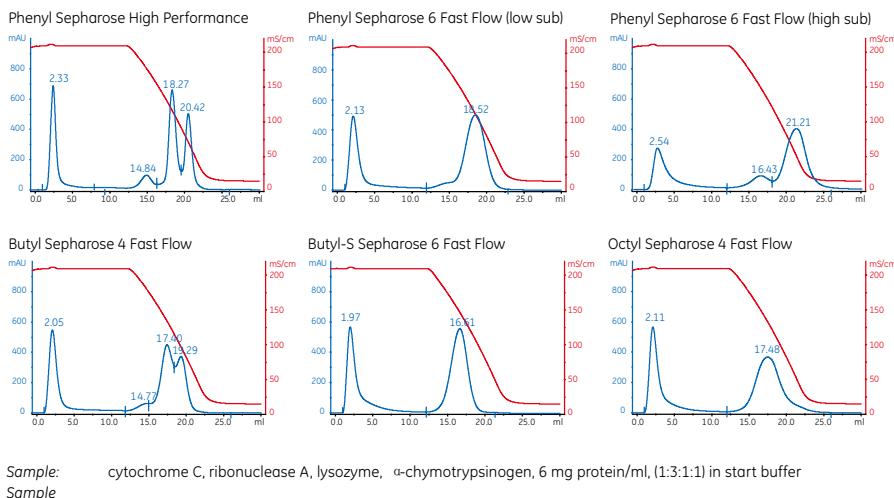
\*推荐适用于室温水溶液中的分离。直线流速 (cm/h) 和体积流速 (ml/min) 的相互转换见附录3。注意最终工作流速也取决于其它参数，如柱子尺寸和柱床高度、样品性质和上样条件、使用的仪器和仪器所能承受的压力等。

†最大操作压力指超过这个压力介质将会收缩。

‡配基密度影响的详细信息见第19页。

需要注意的是疏水相互作用层析的结合能力高度依赖于目的蛋白和杂质的性质，填料的选择性和结合条件。载量必须在介质筛选和方法开发过程中由实验来确定。

可以使用HiTrap HIC Selection Kit来为特定的应用快速筛选最合适的选择性。它由6种预装好的，具有不同疏水性的HiTrap毫升柱子组成（图38）。选择能够在最低盐浓度下，给出最好选择性、分辨率和上样载量的柱子。



Sample: cytochrome C, ribonuclease A, lysozyme,  $\alpha$ -chymotrypsinogen, 6 mg protein/ml, (1:3:1:1) in start buffer  
Sample volume: 1 ml  
Sample load: 6 mg protein/ml medium  
Flow: 1.0 ml/min, (150 cm/h)  
Start buffer: 1.7 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7.0  
Elution buffer: 0.1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7.0  
Gradient: 0%-100% elution buffer in 10 CV

Fig 38. Comparison of the different selectivity characteristics in a HiTrap HIC Selection Kit.

图38 HiTrap HIC Selection Kit中不同选择性质的比较。

使用预装的HiTrap（1毫升或5毫升）柱子用作方法建立，组分离，小规模纯化，样品浓缩或清洁。当需要增加的载量时，使用预装的HiLoad 16/10 Phenyl Sepharose HP（20毫升）或HiLoad 26/10 Phenyl Sepharose HP（53毫升）。

Phenyl Sepharose High Performance和Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (low sub)通常具有相似的疏水性质。用于捕获或中度纯化时，Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (low sub)能够在更高的流速下给出相似的选择性。

Butyl Sepharose High Performance只以客户定制的形式提供。丁基配基提供了与Phenyl Sepharose High Performance不同的选择性。

表10 Phenyl Sepharose High Performance和Phenyl Sepharose 6 Fast Flow的填充体积和柱床高度。

空玻璃柱 直径/长度 (mm)	体积	柱床高度
Tricorn 5/100	最多2ml	最高10cm
Tricorn 5/150	最多3ml	最高15cm
Tricorn 5/200	最多4ml	最高20cm
Tricorn 10/100	最多8ml	最高10cm
Tricorn 10/150	最多12ml	最高15cm
Tricorn 10/200	最多16ml	最高20cm
XK 16/20	最多30ml	最高15cm
XK 26/20	最多80ml	最高15cm
XK 26/40	最多196ml	>15cm

如使用大体积, 请选择诸如FineLine柱子。

## 纯化案例

填料筛选: 开发单克隆抗体纯化

单克隆抗体最常见的杂质是白蛋白和转铁蛋白。

然而, 由于大多数单克隆抗体比这些杂质的疏水性都高, 疏水相互作用层析可以用来结合抗体, 而杂质流过柱子。图39给出了用HiTrap Selection Kit中的柱子来进行疏水相互作用层析介质选择的例子, 目的是获得能给出用于纯化单克隆IgG而具有最好选择性和分辨率的填料。Phenyl Sepharose High Performance给出一个含有IgG的分离良好的峰 (注意, 该峰并不意味着纯的IgG, 而可能代表一系列和IgG具有相似疏水性的组分)。

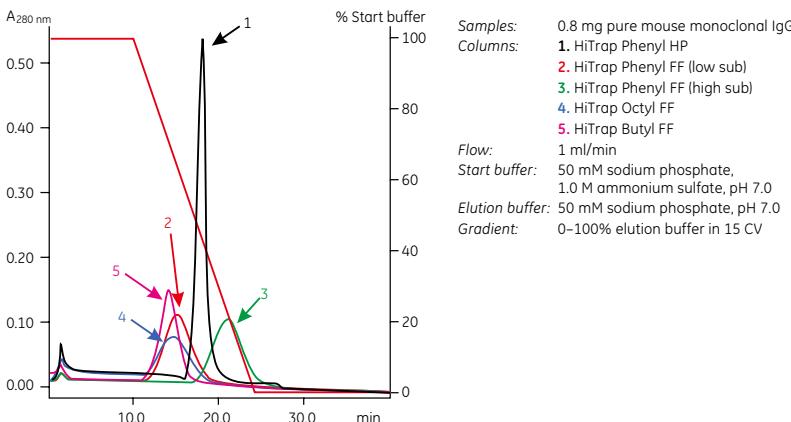
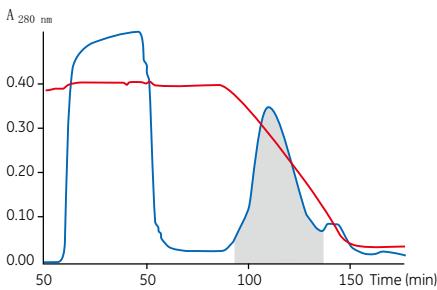


图39 单克隆抗体纯化的介质筛选。

捕获: 单克隆抗体纯化



Purification protocol:	Cipp
Starting material:	Hybridoma culture
Capture:	Phenyl Sepharose High Performance
Polishing:	Superdex 200 prep grade

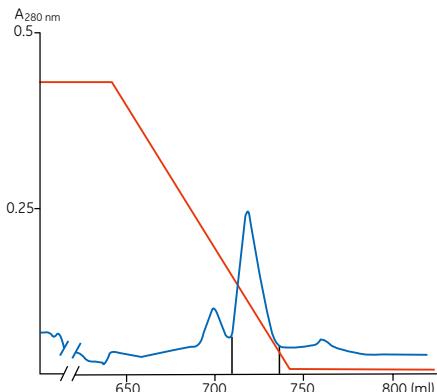
Sample: Hybridoma cell culture supernatant, mouse IgG<sub>1</sub>, anti-IgE. Ammonium sulfate added to 0.5 M  
Column: HiLoad 16/10 Phenyl Sepharose HP  
Start buffer: 20 mM potassium phosphate, 0.5 M ammonium sulfate, pH 7.0  
Elution buffer: 20 mM potassium phosphate, pH 7.0  
Gradient: 0–100% elution buffer in 10 CV  
Flow: 100 cm/h

图40 从杂交瘤细胞培养液中浓缩并纯化单克隆抗体。

图40显示了一个在捕获阶段高选择性的例子。纯化的目的是获得足够纯的单克隆抗体用于体外检测。在杂交瘤细胞培养液中产生的鼠IgG<sub>1</sub> anti-IgE, 和Phenyl Sepharose结合非常强，大多数的胎牛血清蛋白流过了柱子。由于捕获阶段获得了高于95%的纯度，不需要中度纯化步骤。样品浓缩到一个小体积，可以直接转移至精细纯化。

#### 中度纯化：重组HIV反转录酶

在本例中，大肠杆菌裂解物经过硫酸铵沉淀（附录1），然后用离子交换层析进行捕获。加如硫酸铵后，用疏水相互作用层析进行浓缩和用梯度洗脱进一步纯化，最后用另一种离子交换层析填料进行精细纯化。



Purification protocol:	Cipp
Starting material:	<i>E. coli</i> lysate
Capture:	Q Sepharose Fast Flow
Intermediate purification:	Phenyl Sepharose High Performance
Polishing:	Mono Q™

Column: HiLoad 16/10 Phenyl Sepharose HP  
Sample: 400 ml (10 mg protein) diluted to 600 ml with 3 M ammonium sulfate  
Start buffer: 10 mM Tris HCl, 1 M ammonium sulfate, 10% glycerol, 1 mM DTT, pH 8.0  
Elution buffer: 10 mM Tris HCl, 10% glycerol, 1 mM DTT, pH 8.0  
Flow: 3 ml/min, (90 cm/h)

图41 在HiLoad 16/10 Phenyl Sepharose HP上浓缩并纯化HIV反转录酶。

## 进行一次分离

选择填料、缓冲液、盐浓度、pH和方法优化的指导已经在第二章给出了。使用这里的指导作为进行优化分离的基础。

 为了获得优化的分离和避免对柱子性能的任何损坏，正确的样品和缓冲液准备是必要的。样品必须完全溶解，没有任何颗粒或能够影响分离的物质。对于样品制备的建议请参见第二章和附录1。

 在所有的盐和添加剂都包含之后进行样品和缓冲液过滤。使用高纯度的水和化合物。使用0.45或0.22微米的滤膜过滤。为了避免在装好的柱子里形成气泡和确保可重复的结果，在准备运行前，柱子和缓冲液应该在同一温度。

 为了避免沉淀，检查样品组分的盐稳定性窗口。避免在目的蛋白溶解度极限附近的盐浓度工作。例如，对于一个疏水性未知的蛋白，尝试如下条件：

起始缓冲液：1.5M硫酸铵，50mM 磷酸缓冲液，pH7.0

洗脱缓冲液：50mM 磷酸缓冲液，pH7.0

 注意，由于选择的起始缓冲液的黏度、样品性质，上样需要和使用的仪器的影响，需要降低流速。

## 第一次使用或长期储存后使用

- 用5倍柱体积的水或洗脱缓冲液洗涤柱子，以除去乙醇。

流速：Hitrap 1毫升 1毫升/分钟

Hitrap 5毫升 5毫升/分钟

Hiload 16/10 20毫升 0.8毫升/分钟

Hiload 26/10 53毫升 2.2毫升/分钟

用Sephadex G-25填装的大柱子使用2.5厘米/小时

- 用5倍柱体积的起始缓冲液冲洗柱子。

流速：Hitrap 1毫升 1毫升/分钟

Hitrap 5毫升 5毫升/分钟

Hiload 16/10 20毫升 3毫升/分钟

Hiload 26/10 53毫升 8毫升/分钟

用Sephadex G-25填装的大柱子使用50厘米/小时

- 进行空白运行来检测电导图样（比如进行不上样任何样品的运行）

用梯度洗脱分离

流速：Hitrap 1毫升 1毫升/分钟

Hitrap 5毫升 5毫升/分钟

Hiload 16/10 20毫升 3毫升/分钟

Hiload 26/10 53毫升 8毫升/分钟

用Sephadex G-25填装的大柱子使用50-100厘米/小时

## 在所有分离过程中收集组分

1. 用5-10个柱体积的起始缓冲液平衡柱子，或直到紫外吸光和电导稳定。
2. 将样品调节到选择的盐浓度（如果需要的话调节pH），过滤并上样。
3. 用5-10个柱体积的起始缓冲液平衡柱子，或直到紫外吸光和电导稳定，以保证所有未结合的物质都被从柱子洗掉。
4. 用10到20个柱体积的梯度进行洗脱。增加洗脱缓冲液的比例，直到盐浓度到达最低，就是用无盐缓冲液。
5. 用2-5个无盐的洗涤缓冲液来洗脱仍然疏水结合的物质。
6. 用5-10个柱体积起始缓冲液重新平衡柱子或者到电导达到需要的值。

## 用逐步洗脱分离

流速：Hitrap 1毫升 1毫升/分钟

Hitrap 5毫升 5毫升/分钟

Hiload 16/10 20毫升 3毫升/分钟

Hiload 26/10 53毫升 8毫升/分钟

用Sephadex G-25填装的大柱子使用50-100厘米/小时

1. 用5-10个柱体积的起始缓冲液平衡柱子，或直到紫外吸光和电导稳定。
2. 将样品调节到选择的盐浓度（如果需要的话调节pH），过滤并上样。
3. 用5-10个柱体积的起始缓冲液平衡柱子，或直到紫外吸光和电导稳定，以保证所有未结合的物质都被从柱子洗掉。
4. 用5倍含有选择盐浓度的洗脱缓冲液洗脱。
5. 在更低的盐浓度重复步骤4，或直到目的蛋白被洗脱下来。
6. 用2-5个无盐的洗涤缓冲液来洗脱仍然疏水结合的物质。
7. 用5-10个柱体积起始缓冲液重新平衡柱子或者到电导达到需要的值。

## 用逐步洗脱分离

-  在用无盐缓冲液洗涤和再平衡步骤用高流速以节省时间，但是不要超过填料的建议流速。
-  经常性的检查柱子的效率和峰的对称性（见附录2）。
-  勿将仪器或柱子保存在高盐溶液中。

## 清洗

正确的样品和缓冲液制备以及在每次分离后都用无盐缓冲液洗涤应该能够保持柱子在一个好的

状态。然而，降低的性能，缓慢的流速，增加的柱压或柱子完全堵住了都是填料需要用更强力步骤清洗的表征。

 如果有可能的话，在清洗时将柱子倒流，以免让杂质流过整个柱子。每次洗涤所需柱体积和时间可能根据污染的程度而变化。如果用来除去通常杂质的清洗步骤不能恢复柱子效率，在使用其它清洗方法前，更换柱子的上部滤膜。更换滤膜时需小心，这可能会影响柱子填装并干扰性能。

如下步骤可以出去通常的杂质，比如沉淀的蛋白：

流速：Hitrap 1毫升 1毫升/分钟

Hitrap 5毫升 5毫升/分钟

Hiload 16/10 20毫升 3毫升/分钟

Hiload 26/10 53毫升 8毫升/分钟

用Sephadex High Performance填装的大柱子使40厘米/小时，接触时间1-2小时。注意，可能根据柱子的情况和样品、缓冲液或保存溶液的黏度，降低流速。

1. 用至少4倍柱体积的 1M 氢氧化钠洗涤。
2. 用至少3倍柱体积的水洗涤或直到pH为中性。
- 3a. 开始进行新的分离：用至少3倍柱体积的起始缓冲液再次平衡或直到流出液达到正确的pH.
- 3b. 用于储存：用至少5倍柱体积的储存缓冲液洗涤，在储存柱子前让紫外吸光稳定。

除去脂类，脂蛋白和非常疏水的蛋白的方法见附录1。

## 填料性质

组成：Sephadex High Performance基于高度交联的6%的琼脂糖，该基质形成球形颗粒（34微米大小），用疏水配基通过不带电的化学稳定的氧醚键取代。

### 11 Phenyl 和Butyl Sephadex High Performance的性质

产品	基质	每毫升基质的配基密度	pH稳定性*	平均颗粒尺寸
Phenyl Sephadex High Performance	6%交联的琼脂糖，球形颗粒	25µmol	长期：3-13 短期：2-14	34µm
butyl Sephadex High Performance†	6%交联的琼脂糖，球形颗粒	尚未确定	长期：3-13 短期：2-14	34µm

\*长期pH稳定指介质能够长时间稳定并且不会对层析效果产生不良的副作用的pH范围。

短期pH稳定指进行再生、柱上清洁和消毒过程的pH范围。

所有范围的估计都根据GE医疗集团的经验和知识。

†为客户定制的基质。

## 化学稳定性

日常使用条件下，基于Sepharose High Performance基质的疏水相互作用层析填料在所有的水溶性溶液中都是稳定的。1M氢氧化钠，变性剂（8M尿素，6M盐酸胍），70%乙醇，1M醋酸，30%异丙醇，30%乙腈和高达2%的SDS。

## 保存

先用5倍柱体积的蒸馏水然后用5倍柱体积的20%乙醇洗涤柱子，用于储存。将乙醇/水的混合物充分脱气，用低流速上样，避免超压。确保柱子在储存的过程中封好。如果有可能的话，使用生产商提供的储存和装运设备。将柱子和未使用的填料储存在20%乙醇中，4到30摄氏度下。不要冻上。

大规模生产用柱通常在0.01M氢氧化钠中储存，作为对20%乙醇的替代。

 为了避免气泡的形成，使用前，确保柱子，缓冲液和仪器都需在相同的温度。

## Sepharose Fast Flow：用高分辨纯化，简单放大

 使用Sepharose Fast Flow用于需要好的分辨率的捕获或中度纯化步骤（建议流速可达300厘米/小时）。如果选择性在小些颗粒的介质不能达到时，也可用于中度纯化和精细纯化阶段。从不同选择性中达到良好的条件。

 在ÄKTAdesign，FPLC和HPLC系统上或者使用蠕动泵运行Sepharose Fast Flow柱子。附录3给出了如何选择最合适的ÄKTAdesign系统的指南。

Sepharose Fast Flow填料基于物理和化学上稳定的高度交联的4%或6%琼脂糖颗粒（平均大小90微米）。填料用疏水配基（苯基，丁基，辛基）通过稳定的氧或硫醚键取代（见图42）。苯基配基的两种不同取代程度的填料提供了进一步优化结合能力和洗脱条件的选择。颗粒大小和柱床体积在高盐下也保持稳定，来确保在高流速下进行具有良好分辨率的快速分离。方法可以简单的从小的HiTrap柱子放大到大规模柱子，例如BPG或Chromaflow。Sepharose Fast Flow的性能记录良好，而且有很多从实验室到小试到生产阶段平稳过渡的例子。

Sepharose Fast Flow介质应用的参考文献可以在

[www.gehealthcare.com/protein-purification-labresearch](http://www.gehealthcare.com/protein-purification-labresearch)上找到。

### Ligand

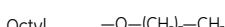
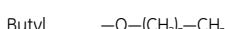
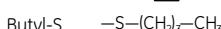


图42 配基通过不带电荷、化学稳定的氧醚键或硫醚键偶联到Sepharose基质上。

## 纯化选择



图43 大部分基于Sephadex 6 Fast Flow或Sephadex 4 Fast Flow的疏水相互作用层析介质提供有预装的HiTrap或HiPrep柱和散装填料。

表12 基于Sephadex Fast Flow的疏水相互作用层析产品。

产品	每毫升基质的配基密度‡	推荐的工作流速*	最大流速*	最大操作背压† (MPa/psi) 1 MPa=10bar
HiTrap Phenyl FF (high sub), 1ml	40μmol	最快1ml/min	4ml/min	0.3/43
HiTrap Phenyl FF (high sub), 5ml	40μmol	最快5ml/min	20ml/min	0.3/43
HiPrep 16/10 Phenyl FF (high sub), 20ml	40μmol	2-10 ml/min	10 ml/min	0.15/22
Phenyl Sephadex 6 Fast Flow (high sub)	40μmol	50-400cm/h	750cm/h	0.3/43
HiTrap Phenyl FF (low sub), 1ml	25μmol	最快1ml/min	4ml/min	0.3/43
HiTrap Phenyl FF (low sub), 5ml	25μmol	最快5ml/min	20ml/min	0.3/43
HiPrep 16/10 Phenyl FF (low sub), 20ml	25μmol	2-10ml/min	10ml/min	0.15/22
Phenyl Sephadex 6 Fast Flow (low sub)	25μmol	50-400cm/h	750cm/h	0.3/43
HiTrap Butyl FF, 1ml	40μmol	最快1ml/min	4ml/min	0.3/43
HiTrap Butyl FF, 5ml	40μmol	最快5ml/min	20ml/min	0.3/43
HiPrep 16/10 Butyl FF, 20ml	40μmol	2-10ml/min	10ml/min	0.15/22
HiTrap Butyl-S FF, 1ml	10μmol	最快1ml/min	4ml/min	0.3/43
HiTrap Butyl-S FF, 5ml	10μmol	最快5ml/min	20ml/min	0.3/43
Butyl Sephadex 4 Fast Flow	40μmol	50-300cm/h	400cm/h	0.1/14
Butyl-S Sephadex 6 FF	10μmol	50-400cm/h	750cm/h	0.3/43
HiTrap Octyl FF, 1ml	5μmol	最快1ml/min	4ml/min	0.3/43
HiTrap Octyl FF, 5ml	5μmol	最快5ml/min	20ml/min	0.3/43
HiPrep 16/10 Octyl FF, 20ml	5μmol	2-10ml/min	10ml/min	0.15/22
Octyl Sephadex 4 Fast Flow	5μmol	50-300cm/h	400cm/h	0.1/14

\*推荐适用于室温水溶液中的分离。直线流速 (cm/h) 和体积流速 (ml/min) 的相互转换见附录3。注意最终工作流速也取决于其它参数，如柱子尺寸和柱床高度、样品性质和上样条件、使用的仪器和仪器所能承受的背压等。

†最大操作背压指超过这个压力介质将会收缩。

‡客户定制的介质，同样可以提供，第50页。

- 需要注意的是疏水相互作用层析的结合能力高度依赖于目的蛋白和杂质的性质，填料的选择性和结合条件。载量必须在介质筛选和方法开发过程中由实验来确定。
- 原本用Phenyl Sepharose CL-4B或Octyl Sepharose CL-4B（不再由供应商提供）进行的分离可以首先转移至Phenyl Sephaose 6 Fast Flow或Butyl Sepharose 4 Fast Flow或Octyl Sepharose 4 Fast Flow作为一个起点。
- 可以使用HiTrap HIC Selection Kit来为特定的应用快速筛选最合适的选择性。它由6种预装好的，具有不同疏水性的HiTrap 1毫升柱子组成（图44）。选择能够在最低盐浓度下，给出最好选择性、分辨率和上样载量的柱子。

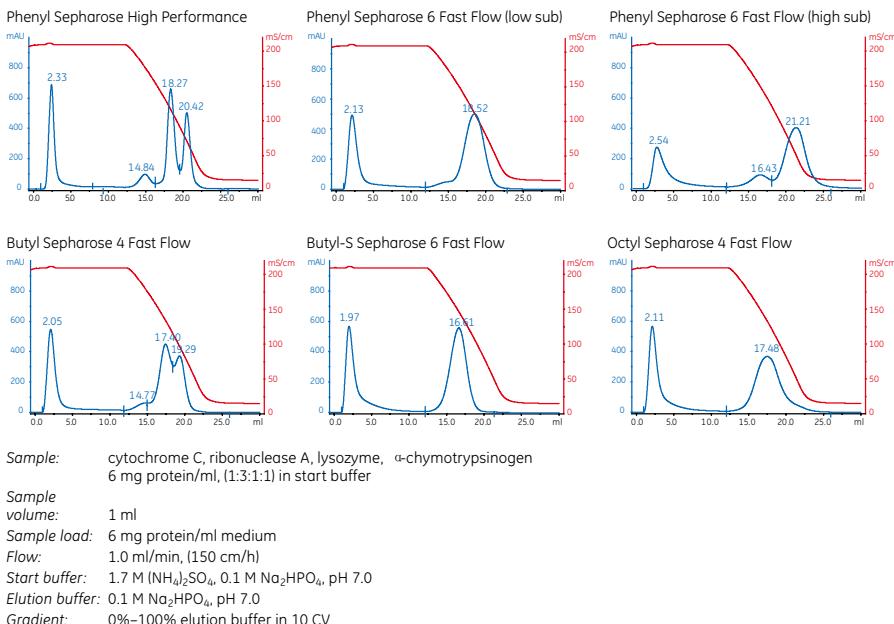


图44 HiTrap Selection Kit中不同选择性质的比较。

- 使用预装的Hitrap柱（1毫升或5毫升）用作方法选择，组分离，小规模纯化，样品浓缩或清洁。当需要增加载量时，使用预装的HiLoad 16/10 Phenyl Sepharose HP（20毫升）或HiLoad 26/10 Phenyl Sepharose HP（53毫升）。
- 使用Butyl-S-Sepharose 6 Fast Flow，Fast Flow系列中疏水性最弱的介质，来在相对低的盐浓度下结合和洗脱疏水性相对较强的蛋白。

Phenyl Sepharose High Performance和Phenyl Sepharose Fast Flow (low sub)通常具有相似的疏水性质。用于捕获和中度纯化，Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (low sub) 能在较高的流速给出相似的分辨率。

表13 用于疏水相互作用层析的Sephadex Fast Flow介质的填充体积和柱床高度。

空玻璃柱 直径/长度 (mm)	体积	柱床高度
Tricorn 5/100	最多2ml	最高10cm
Tricorn 5/150	最多3ml	最高15cm
Tricorn 5/200	最多4ml	最高20cm
Tricorn 10/100	最多8ml	最高10cm
Tricorn 10/150	最多12ml	最高15cm
Tricorn 10/200	最多16ml	最高20cm
XK 16/20	最多30ml	最高15cm
XK 26/20	最多80ml	最高15cm
XK 26/40	最多196ml	>15cm
XK 50/20	最多274ml	最高14cm
XK 50/30	最多559ml	最高28.5cm

更大体积的生产用柱请选择BPG或chromaflow柱子。

## 纯化案例

### 介质筛选

介质的筛选见图20。

### 捕获：酶的纯化

图45显示了用于从大肠杆菌裂解物中部分纯化一个酶，碱性磷酸酶的捕获步骤。条件被选择成为确保目的蛋白结合到柱子上，然而杂蛋白直接流过柱子。酶获得了浓缩而且达到了一个非常有效的纯化步骤。

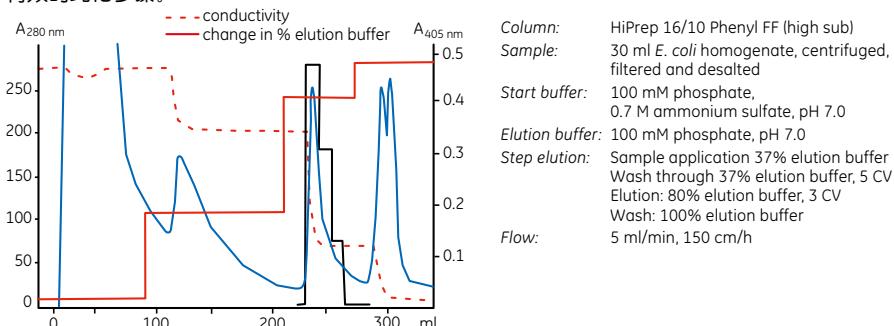
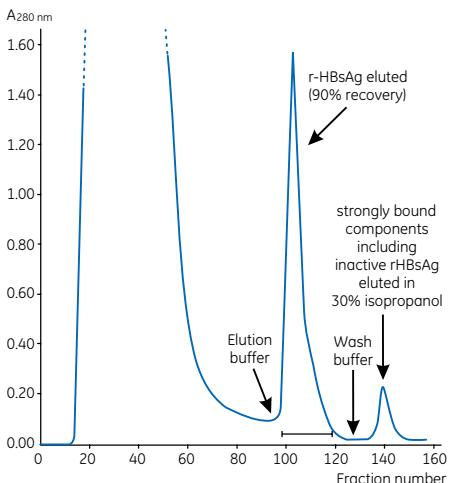


图45 在Phenyl Sephadex Fast Flow (high sub) 上纯化碱性磷酸酶。黑线代表酶活。

捕获：从CHO细胞中获得重组乙肝病毒表面抗原 (r-HBsAg)

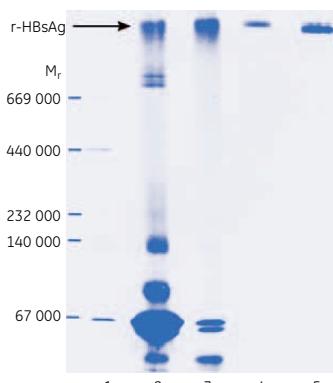
乙肝病毒是一种能导致急性和慢性肝炎，肝硬化和原发性肝癌的感染因子。据估计，世界上5%的人口都感染了这种病毒。可以用重组技术大规模生产重组乙肝表面抗原 (r-HBsAg) 来作为未感染人群的有效疫苗。图46显示了从一个CHO细胞培养上清中大规模纯化r-HBsAg。由于这个蛋白极端疏水，它和大多数疏水相互作用层析填料都能紧密结合。然而，Butyl-S Sephadex温和的疏水性质确保了成功的纯化，其中多余90% 的杂质都在捕获阶段被除去了。



Purification protocol: Cipp

Starting material:	CHO cell culture supernatant
Capture:	Butyl-S Sepharose 6 Fast Flow
Intermediate purification:	DEAE Sepharose 6 Fast Flow
Polishing:	Sepharose 4 Fast Flow

Column: Butyl-S Sepharose 6 Fast Flow packed in XK 50/20, 130 ml  
 Sample: 300 ml of concentrated CCS (containing ca. 12 mg of rHBsAg), 0.6 M ammonium sulfate, pH 7.0  
 Start buffer: 20 mM sodium phosphate, 0.6 M ammonium sulfate, pH 7.0  
 Elution buffer: 10 mM sodium phosphate, pH 7.0  
 Wash buffer: 30% isopropanol in elution buffer  
 Flow: 2 l/h, (100 cm/h)



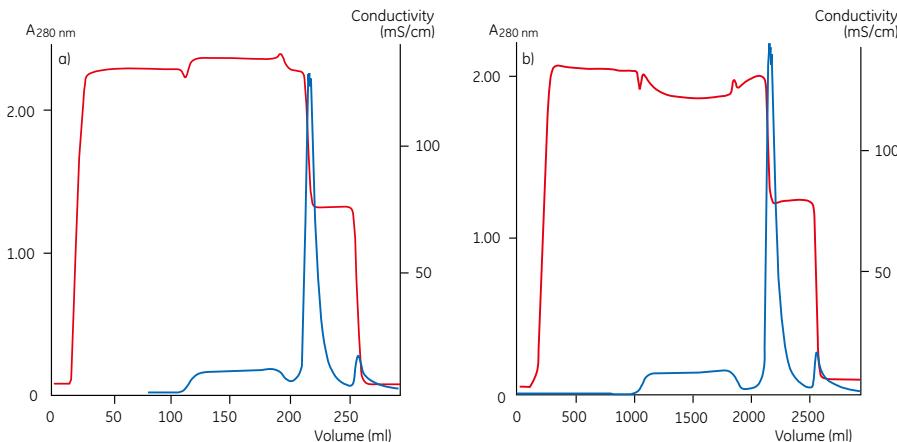
Lane 1 HMW native reference proteins  
 Lane 2 Cell culture supernatant  
 Lane 3 Pooled r-HBsAg fraction from HIC capture step  
 Lane 4 r-HBsAg fraction from HIC capture step  
 Lane 5 Reference r-HBsAg (obtained from a commercial source and used as vaccine)

图46 大规模纯化rHBsAg。超过90%的杂质在疏水相互作用层析捕获阶段被除去（第3道）。电泳分析（非变性条件下4-30%的梯度聚丙烯酰胺胶）显示了每步层析后纯度的提高。R-HBsAg是一种22nm的颗粒因此条带在胶的顶端。

## 中度纯化：Fab片段

图47显示了一个优化过的Fab片段的中度纯化洗脱样式，从图20进行的填料筛选开发而来。条件在一根20毫升的柱子上得到优化，应用了逐步洗脱来使通量最大化并充分利用疏水相互作用层析的浓缩效应。该步可以直接在200毫升柱子上进行规模化（在同一图中显示）。

Purification protocol: Cipp	
Starting material:	<i>E. coli</i> lysate
Capture:	STREAMLINE SP
Intermediate purification:	Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (high sub)
Polishing:	SOURCE 15S



Sample: Fab fraction from STREAMLINE SP, 80 ml  
 Columns: Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (high sub)  
 in XK 16/20 (10 cm bed height), 20 ml  
 Start buffer: 1 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 50 mM NaAc, pH 5.0  
 Elution buffer: 50 mM NaAc, pH 5.0  
 Gradient: Step gradient to 50% elution buffer  
 Flow: 5 ml/min

Sample: Fab fraction from STREAMLINE SP, 800 ml  
 Columns: Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (high sub)  
 in XK 50/20, 200 ml  
 Start buffer: 1 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 50 mM NaAc, pH 5.0  
 Elution buffer: 50 mM NaAc, pH 5.0  
 Gradient: Step gradient to 50% elution buffer  
 Flow: Equilibration: 100 ml/min  
 Loading and elution: 50 ml/min

图47 一种Fab片段在Phenyl Sepharose 6 Fast Flow(high sub)上的中度纯化和规模化放大。

## 中度纯化：重组蛋白Annexin V

图48显示了使用Butyl Sepahrose 4 Fast Flow从大肠杆菌中纯化重组蛋白Annexin V。

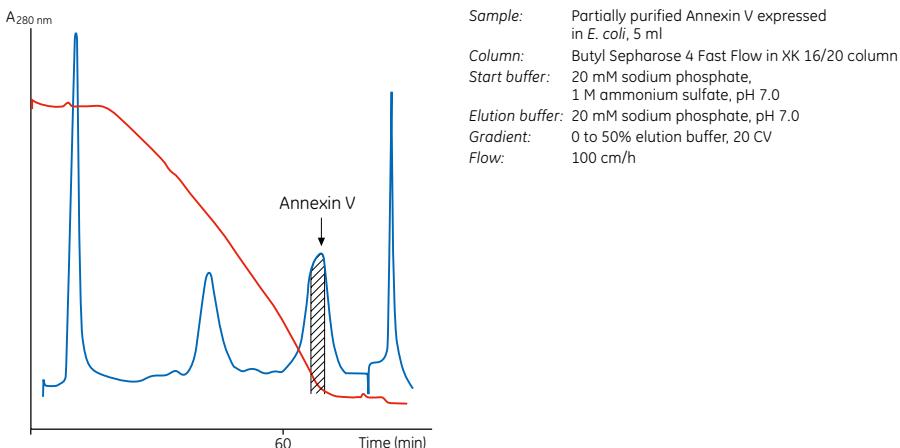


图48 一种重组蛋白的中度纯化。

## 进行一次分离

选择填料、缓冲液、盐浓度、pH和方法优化的指导已经在第二章给出了。使用这里的指导作为进行优化分离的基础。

为了获得优化的分离和避免对柱子性能的任何损坏，正确的样品和缓冲液准备是必要的。样品必须完全溶解，没有任何颗粒或能够影响分离的物质。对于样品制备的建议请参见第二章和附录1。

在所有的盐和添加剂都包含之后进行样品和缓冲液过滤。使用高纯度的水和化合物。使用0.45或0.22微米的滤膜过滤。为了避免在装好的柱子里形成气泡和确保可重复的结果，在准备运行前，柱子和缓冲液应该在同一温度。

为了避免沉淀，检查样品组分的盐稳定性窗口。避免在目的蛋白溶解度极限附近的盐浓度工作。例如，对于一个疏水性未知的蛋白，尝试如下条件：

起始缓冲液：1.5M硫酸铵，50mM 磷酸缓冲液，pH7.0

洗脱缓冲液：50mM磷酸缓冲液，pH7.0

注意，由于选择的起始缓冲液的黏度、样品性质，上样需要和使用的仪器的影响，需要降低流速。

## 第一次使用或长期储存后使用

- 用5倍柱体积的水或洗脱缓冲液洗涤柱子，以除去乙醇。

流速：Hitrap 1毫升 1毫升/分钟

Hitrap 5毫升 5毫升/分钟

Hiload 16/10 20毫升 2毫升/分钟

用Sepharose Fast Flow填装的大柱子使用50厘米/小时

- 用5倍柱体积的起始缓冲液冲洗涤柱子。

流速：Hitrap 1毫升 1毫升/分钟

Hitrap 5毫升 5毫升/分钟

Hiload 16/10 20毫升 5毫升/分钟

用Sepharose Fast Flow填装的大柱子使用最高至150厘米/小时

- 进行空白运行来检测电导图样（比如进行不上样任何样品的运行）

用梯度洗脱分离

流速：Hitrap 1毫升 1毫升/分钟

Hitrap 5毫升 5毫升/分钟

Hiload 16/10 20毫升 5毫升/分钟

用Sepharose Fast Flow填装的大柱子使用最高至150厘米/小时

## 在所有分离过程中收集组分

- 用5-10个柱体积的起始缓冲液平衡柱子，或直到紫外吸光和电导稳定。
- 将样品调节到选择的盐浓度（如果需要的话调节pH），过滤并上样。
- 用5-10个柱体积的起始缓冲液平衡柱子，或直到紫外吸光和电导稳定，以保证所有未结合的物质都被从柱子洗掉。
- 用10到20个柱体积的梯度进行洗脱。增加洗脱缓冲液的比例，直到盐浓度到达最低，就是用无盐缓冲液。
- 用2-5个无盐的洗涤缓冲液来洗脱仍然疏水结合的物质。
- 用5-10个柱体积起始缓冲液重新平衡柱子或者到电导达到需要的值。

## 用逐步洗脱分离

流速: Hitrap 1毫升 1毫升/分钟

Hitrap 5毫升 5毫升/分钟

Hiload 16/10 20毫升 5毫升/分钟

用Sepharose Fast Flow填装的大柱子使用高达150厘米/小时

1. 用5-10个柱体积的起始缓冲液平衡柱子，或直到紫外吸光和电导稳定。
2. 将样品调节到选择的盐浓度（如果需要的话调节pH），过滤并上样。
3. 用5-10个柱体积的起始缓冲液平衡柱子，或直到紫外吸光和电导稳定，以保证所有未结合的物质都被从柱子洗掉。
4. 用5倍含有选择盐浓度的洗脱缓冲液洗脱。
5. 在更低的盐浓度重复步骤4，或直到目的蛋白被洗脱下来。
6. 用2-5个无盐的洗涤缓冲液来洗脱仍然疏水结合的物质。
7. 用5-10个柱体积起始缓冲液重新平衡柱子或者到电导达到需要的值。

## 用逐步洗脱分离

-  在用无盐缓冲液洗涤和再平衡步骤用高流速以节省时间，但是不要超过填料的建议流速。
-  经常性的检查柱子的效率和峰的对称性（见附录2）。
-  勿将仪器或柱子保存在高盐溶液中。

## 清洗

正确的样品和缓冲液制备以及在每次分离后都用无盐缓冲液洗涤应该能够保持柱子在一个好的状态。然而，下降的性能，缓慢的流速，增加的柱压或柱子完全堵住了都是填料需要用更强力的步骤清洗的表征。

-  如果有可能的话，在清洗时将柱子倒流，以免让杂质流过整个柱子。每次洗涤所需柱体积和时间可能根据污染的程度而变化。如果用来除去通常杂质的清洗步骤不能恢复柱子效率，在使用其它清洗方法前，更换柱子的上部滤膜。更换滤膜时需小心，这可能会影响柱子填装并干扰性能。

如下步骤可以除去通常的杂质，比如沉淀的蛋白：

流速: Hitrap 1毫升 1毫升/分钟

Hitrap 5毫升 5毫升/分钟

Hiload 16/10 20毫升 5毫升/分钟

用Sepharose Fast Flow填装的大柱子使40厘米/小时，接触时间1-2小时。

注意，可能根据柱子的情况和样品、缓冲液或保存溶液的黏度，降低流速。

1. 用至少4倍柱体积的 1M 氢氧化钠洗涤。
2. 用至少3倍柱体积的水洗涤或直到pH为中性。
- 3a. 开始进行新的分离：用至少3倍柱体积的起始缓冲液再次平衡或直到流出液达到正确的pH.
- 3b. 用于储存：用至少5倍柱体积的储存缓冲液洗涤，在储存柱子前让紫外吸光稳定。

除去脂类，脂蛋白和非常疏水的蛋白的方法见附录1。

## 填料性质

组成：Sepharose 6 Fast Flow基于高度交联的6%的琼脂糖，该基质形成球形颗粒（90微米大小），用疏水配基通过不带电的化学稳定的氧醚键或硫醚键取代。有两种苯基取代度的填料可供选择。

Sepharose 4于高度交联的4%的琼脂糖，该基质形成球形颗粒（90微米大小），用疏水配基通过不带电的化学稳定的氧醚键取代。

表14 用于疏水相互作用层析的Sepharose Fast Flow填料的性质

产品	基质	每毫升基质的配基密度	pH稳定性*	平均颗粒尺寸
Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (high sub)	6%交联的琼脂糖，球形颗粒	40μmol	长期：3-13 短期：2-14	90μm
Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (low sub)	6%交联的琼脂糖，球形颗粒	20μmol	长期：3-13 短期：2-14	90μm
Butyl-S Sepharose 6 Fast Flow	6%交联的琼脂糖，球形颗粒	10μmol	长期：3-13 短期：2-14	90μm
Butyl Sepharose 4 Fast Flow	4%交联的琼脂糖，球形颗粒	50μmol	长期：3-13 短期：2-14	90μm
Octyl Sepharose 4 Fast Flow	4%交联的琼脂糖，球形颗粒	5μmol	长期：3-13 短期：2-14	90μm

\*长期pH稳定指介质能够长时间稳定并且不会对层析效果产生不良的副作用的pH范围。

短期pH稳定指进行再生、柱上清洁和消毒过程的pH范围。

所有的范围都依照GE医疗集团的使用经验和知识来粗略估计。

## 化学稳定性

日常使用条件下，基于Sephaorse High Performance基质的疏水相互作用层析填料在所有的水溶性溶液中都是稳定的。1M氢氧化钠，变性剂（8M尿素，6M盐酸胍），70%乙醇，1M醋酸，30%异丙醇，30%乙腈和高达2%的SDS。

## 保存

先用5倍柱体积的蒸馏水然后用5倍柱体积的20% 乙醇洗涤柱子，用于储存。将乙醇/水的混合物充分脱气，用低流速上样，避免超压。确保柱子在储存的过程中封好。如果有可能的话，使用生产商提供的储存和装运设备。将柱子和未使用的填料储存在20% 乙醇中，4到30 摄氏度下。不要冻上。

大规模生产用柱通常在0.01M氢氧化钠中储存，作为对20% 乙醇的替代。



为了避免气泡的形成，使用前，确保柱子，缓冲液和仪器都需在相同的温度。

## 第四章 纯化策略中的疏水相互作用层析

为了在给定的纯度要求下，确保有效的，可重复的纯化，用捕获、中度纯化和精细纯化（如图49所示）的纯化策略（CIPP）开发多步纯化过程是有效的。

CIPP不仅在制药工业也在研究实验室广泛应用，来确保快速的方法开发，获得产品的时间更短和好的经济效益。本章给出该方法的大概总览，可以用于任何多步蛋白纯化。GE医疗集团的《蛋白质纯化手册》是计划有效蛋白纯化的指南。任何纯化重要的第一步是正确的样品准备，这在附录1和第二章有详细介绍。

疏水相互作用层析根据目的蛋白的疏水性提供选择性，作为对根据蛋白电荷、大小、生物特异性识别等来进行分离的其它方法的有效补充，可以根据特定的需要用于捕获、中度纯化、精细纯化等步骤。需要样品在提高盐浓度的条件下促进疏水相互作用使疏水相互作用层析适合于在用硫酸铵沉淀清洁样品后的捕获阶段或在离子交换分离后。在这两种条件下，部分纯化的样品都已经在高盐溶液中，并且，除了加入更多的盐以外，不需要额外进行更多的准备，节省时间。由于在疏水相互作用层析过程中，样品可以被浓缩，并被减少的体积洗脱，组分可以直接用于分子筛。疏水相互作用层析可以用逐步洗脱来进行快速的捕获步骤或用梯度洗脱来在精细纯化阶段获得最高的分辨率。

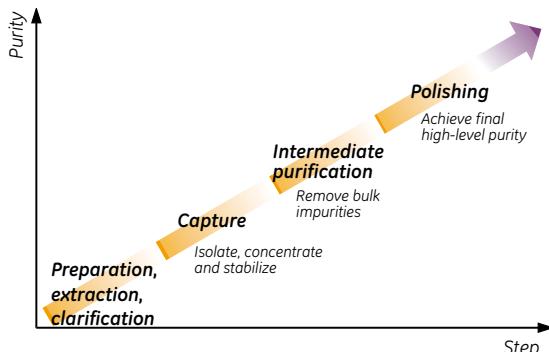


图49 蛋白纯化策略。

## 应用CIPP

想象纯化有三个阶段：捕获、中度纯化和精细纯化



为纯化步骤中的每一步分配一个特定的目的

特定步骤的纯化问题很大程度上依赖于起始材料的性质。这样，纯化的目的就会根据过程中的位置而变化。

在捕获阶段，目的是分离、浓缩，稳定目的蛋白，产品应该被浓缩并转移至一个能够保持潜能或活力的环境。

在中度纯化步骤，目的是除去大多数杂质，比如蛋白或核酸，内毒素和病毒。

在精细纯化阶段，大多数杂质已经被除去了，目的是通过出去残存的痕量杂质或极度相似的物质而达到最后的纯度。



捕获、中度纯化和精细纯化的优化选择和组合对于有效的纯化是重要的。

## 纯化技术的选择和组合

根据蛋白特定性质的差异，使用纯化技术可以将蛋白纯化出来，见表15。

表15 纯化过程中使用的蛋白性质。

蛋白性质	技术
大小	凝胶过滤 (GF)
电荷	离子交换 (IEX)
疏水性	疏水作用 (HIC)，反相 (RPC)
生物识别 (配基特异性)	亲和 (AC)

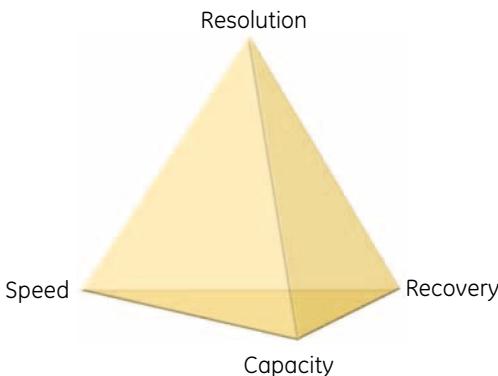


图50 每种技术都是分辨率、载量、速度和回收率的平衡。

载量：如简单的图示，载量指在纯化过程中上样的目的蛋白量。在有些情况下，样品的量被体积所限制（比如凝胶过滤层析）或者被大量的杂蛋白而不是目的蛋白而限制。

速度：速度在纯化的起始阶段最为重要，比如蛋白酶之类的杂质必须尽可能快地除去。

**回收率：**回收率随着纯化的进行显得更加重要，这是因为纯产物价值的增加。产率被样品中的破坏过程和柱子上不合适的条件所影响。

**分辨率：**分辨率通过纯化技术的选择性和效率以及层析介质产生窄峰的选择性而获得。总的来说，在纯化的最后阶段，当目的蛋白和杂质性质非常相近时，分辨率最难达到。

-  选择一种能满足纯化步骤目的的方法。
-  基于技术的主要优点和样品在纯化步骤起始和结束阶段的条件，依照逻辑，选择纯化技术的组合。

每种纯化技术适用于CIPP各阶段的指南在表16中显示。

表16 适用于CIPP的纯化技术

技术	主要特点	捕获	中度纯化	精细纯化	样品起始条件	样品结束条件
IEX	高分辨率				低离子强度，样品体积不限	高离子强度或pH变化，浓缩的样品
	高载量					
	高速					
HIC	分辨率好				高离子强度，样品体积不限	低离子强度，浓缩的样品
	载量好					
	高速					
AC	高分辨率				特定的结合条件，样品体积不限	特定的洗脱条件，浓缩的样品
	高载量					
	高速					
GF	高分辨率				样品体积(<总柱体积的5%)和流速范围受限	更换缓冲液(如果需要)，稀释的样品
	使用Superdex介质					
RPC	高分辨率				样品体积通常不限，可能需要添加剂	无机溶剂，有损失生物活性的风险

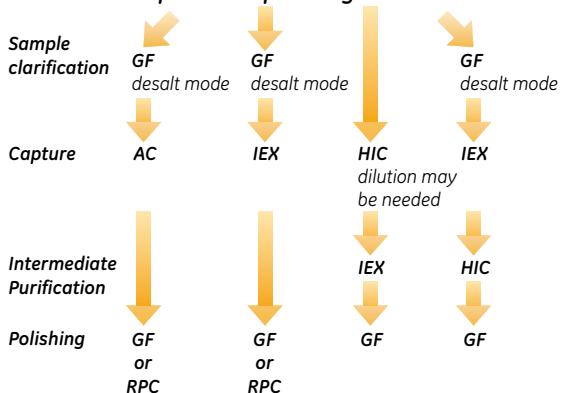
-  在步骤间，通过技术的组合避免样品变换条件的需求来使样品处理最小化。产品应该从第一根柱子上以合适第二根柱子的条件洗脱下来（见表16）。

-  硫酸铵，通常用于样品净化和浓缩（见附录1），使样品在高盐环境中。疏水相互作用层析需要高盐来促进蛋白和介质的结合，因而成为随后捕获阶段的理想选择。当从疏水相互作用层析上洗脱下来的时候，样品的盐浓度和体积都显著的减少。将收集的组分稀释或用脱盐柱进行快速的缓冲液交换都可以使样品适于下一个离子交换层析或亲和层析步骤。

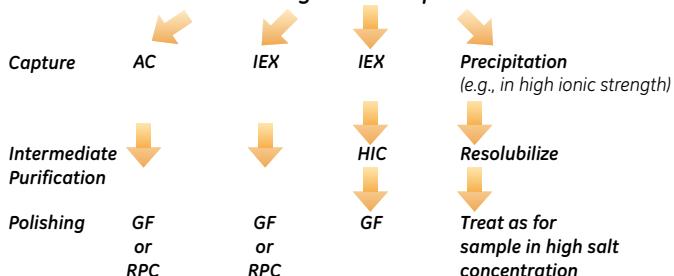
-  凝胶过滤层析是一种非结合技术，不被缓冲液条件所影响，但是体积载量有限。凝胶过滤层析适合于在任何浓缩技术（离子交换层析，疏水相互作用层析，亲和层析）后使用，因为目的蛋白可以减少的体积被洗脱下来而且缓冲液的组分不会影响凝胶过滤层析过程。

最终策略的选择通常依赖于特定的样品性质和纯化需要的水平。纯化技术符合逻辑的组合如图51所示。

### Crude sample or sample in high salt concentration



### Clear or very dilute samples



- 对于任何捕获阶段，选择对目的蛋白结合最有效的技术，而尽可能少的结合杂质蛋白。换句话说就是对目的蛋白具有最高选择性和/或载量的技术。
- 样品通过技术的组合和不同的选择性被纯化出来。例如，在一个离子交换-疏水相互作用层析-凝胶过滤层析策略中，捕获阶段根据电荷的不同（离子交换层析），中度纯化步骤根据疏水性的不同（疏水相互作用层析），最终精细纯化阶段根据大小的不同（凝胶过滤层析）来进行分离。
- 如果对目的蛋白一无所知，使用离子交换层析-疏水相互作用层析-凝胶过滤层析技术。该技术的组合可以认为是标准步骤。
- 考虑既使用阴离子交换层析又使用阳离子交换层析来在相同的纯化策略中给出不同的选择性。

## 疏水相互作用层析作为捕获步骤

捕获步骤的目的是从粗样品中快速的结合目的蛋白并将它们从主要的杂质比如蛋白酶或去糖基化酶中移除。目的蛋白被浓缩并转移到一个能保持活力的环境中。也可以通过仔细的优化结合条件而除去其它的杂质。

捕获步骤的注意力主要集中于载量和速度。可以在该步骤中为了载量和速度而折衷分辨率。作为捕获步骤的疏水相互作用层析介质应该提供高速度和高载量。

1. Sepharose Fast Flow (平均颗粒大小90微米) 能够给出好的分辨率，流速可达300厘米/小时。
2. 当选择性可以满足要求，分辨率是主要目的，低些的流速（为了补偿高压力）可以接受时，使用Sepharose High Performance (34微米颗粒直径) 疏水相互作用填料作为捕获或放大纯化。
3. 如果大些颗粒的填料不能提供所需选择性时，使用SOURCE (15微米平均颗粒大小)。

 选择能够使杂质结合最小的起始条件，用来使目的蛋白的结合载量最大化。这有助于浓缩的目的蛋白、快速，简单的洗脱。

## 纯化重组人表皮生长因子 (h-EGF)

该纯化展示了一个人经典的使用疏水相互作用层析-离子交换层析-凝胶过滤层析三步纯化表达在面包酵母细胞外的人表皮生长因子 (h-EGF) 的过程。

### Purification protocol: Cipp

Starting material: Cell culture supernatant

Capture: Phenyl Sepharose 6  
Fast Flow (high sub)

Intermediate purification: Q Sepharose High Performance

Polishing: Superdex 75 prep grade

图52 经典的HIC-IEX-GF纯化策略。

该纯化策略描述如下：最初在4种不同的疏水相互作用层析介质上筛选用于捕获步骤中的介质(图53)。Phenyl Sepharose 6 Fast Flow(High Sub)由于对EGF的最好选择性，具有高结合载量和低压力而被选中。

### 用于EGF纯化的介质性质

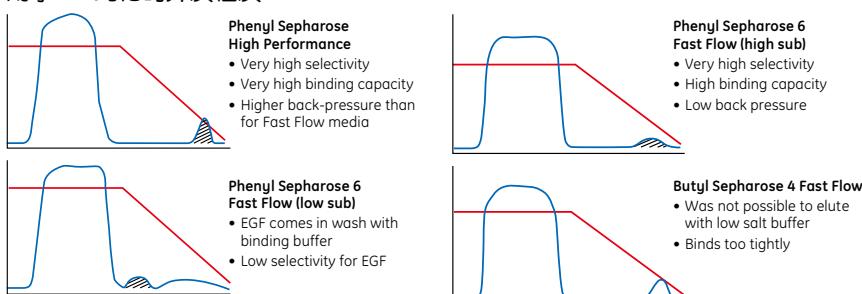
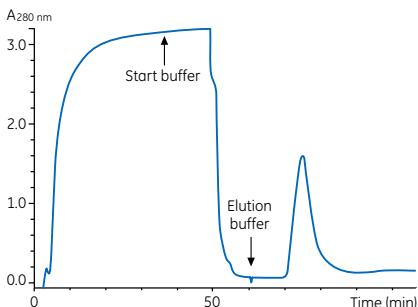
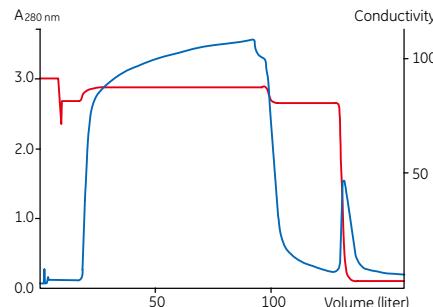


图53介质筛选。



**Column:** Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (high sub) in XK/16/20 column, 10 cm bed height, 20 CV  
**Sample:** Yeast supernatant, ammonium sulfate added to 0.5 M  
**Sample volume:** 450 ml  
**Sample load:** 0.41 mg h-EGF/ml medium  
**Flow:** 300 cm/h, 10 ml/min (loading)  
60 cm/h, 2 ml/min (elution)  
**Start buffer:** 20 mM sodium phosphate, pH 7.0  
0.5 M ammonium sulfate  
**Elution buffer:** 20 mM sodium phosphate, pH 7.0  
**Purification time:** 90 min



**Column:** Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (high sub) in BPG 300/500, 10 cm bed height, 3.5 L CV  
**Sample:** Yeast supernatant, ammonium sulfate added to 0.5 M  
**Sample volume:** 80 l  
**Sample load:** 0.36 mg h-EGF/ml medium  
**Flow:** 300 cm/h, 212 l/h (loading)  
60 cm/h, 42 l/h (elution)  
**Start buffer:** 20 mM sodium phosphate, pH 7.0  
0.5 M ammonium sulfate  
**Elution buffer:** 20 mM sodium phosphate, pH 7.0  
**Purification time:** 90 min

图54 捕获步骤的开发和规模化放大。

如图54显示，开发工作在填装了Phenyl Sepharose 6 Fast Flow(High Sub)的XK柱子上用逐步洗脱进行小量试验，然后使用BPG300/500放大至生产规模。

一个高分辨的，阴离子交换层析Q-sepharose High Performance被选择用于中度纯化，以在第二步达到高纯度（大于96%）。

在Superdex75 Prep Grade上进行的凝胶过滤层析被选中，以作为最后的精细纯化，来从EGF产品中分离多聚体和不需要的缓冲液盐而获得最终的高纯度。

起始的物质是由Chiron-Cetus公司 Emeryville, USA 提供的澄清细胞培养物上清。起始物质的EGF浓度为0.018毫克/毫升，总蛋白含量为63毫克/毫升。这个三步纯化步骤给出了最终99%的纯度（由反相层析鉴定），和73%的总产率。

## 用于中度纯化的疏水相互作用层析

中度纯化的目的是除去大部分的明显的杂质，比如蛋白，核酸，内毒素和病毒。典型的中度纯化步骤中，速度是次要因素，因为样品体积已经减少了，有害的杂质已经在捕获阶段被去除了。需要集中精力的是载量和分辨率，以便维持产率（在单位时间内每根柱子产出的目的蛋白的量）和获得尽可能高的选择性（纯度）。结果，通常会使用梯度洗脱。

使用和捕获步骤选择性互补的技术。

用于中度纯化的填料应该提供高载量和高分辨率，选择如下：

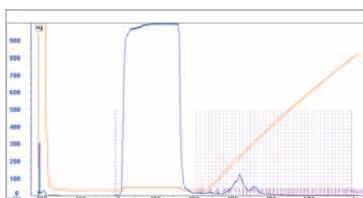
1. Sepharose High Performance（平均颗粒大小134微米）用于高分辨，流速可达150厘米/小时。

2. Sepharose Fast Flow (平均颗粒大小90微米) 用于高分辨，流速可达300厘米/小时。或者当所需选择性在Sepharose High Performance介质不能提供时。
3. SOURCE15 (平均颗粒大小15微米) 如果需要的选择性在大颗粒填料不能提供时使用该填料。样品应该没有颗粒状物质。

## 纯化Fab片段

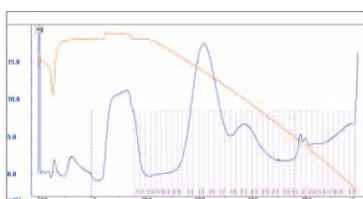
图55显示了经典的方案，离子交换层析-疏水相互作用层析-凝胶过滤层析来纯化HIV-1病毒gp120的一个Fab片段。这个片段在大肠杆菌周质中表达，具有50000的相对分子量，等电点在11。高等电点使阳离子交换层析成为起始捕获阶段的最合适选择。Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (high sub) 的高载量和好的分辨率使其成为适合中度纯化的填料，最后由凝胶过滤层析进行精细纯化。

Purification protocol: Cipp	
Starting material:	<i>E. coli</i> periplasmic expressed target protein
Capture:	SP Sepharose Fast Flow
Intermediate purification:	Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (high sub)
Polishing:	Superdex 75 prep grade



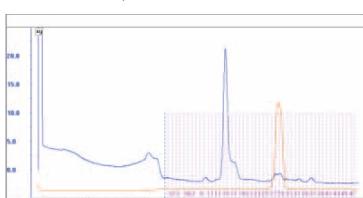
Active fractions pooled: 10-14

Column: SP Sepharose Fast Flow packed in XK 16/10, 20 ml  
Sample volume: 150 ml  
Buffer: BufferPrep CIEH, pH range 3–7.5, running pH 4.5  
Gradient: 0–1.0 M NaCl in 20 CV  
Flow: 150 cm/h, (5 ml/min)  
System: AKTAexplorer



Active fractions pooled: 11-16

Column: Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (high sub) packed in XK 16/10, 20 ml  
Sample volume: 50 ml, pooled from SP Sepharose Fast Flow  
Start buffer: 1.0 M ammonium sulfate, 30 mM phosphate, pH 6.0  
Elution buffer: 30 mM phosphate, pH 6.0  
Flow: 150 cm/h, (5 ml/min)  
Gradient: 0–100% elution buffer in 20 CV  
System: AKTAexplorer



Column: HiLoad 26/60 Superdex 75 prep grade, 320 ml  
Buffer: 150 mM NaCl, 20 mM phosphate, pH 7.0  
Sample volume: 8 ml, pooled from Phenyl Sepharose 6 Fast Flow  
Flow: 50 cm/h, (4.4 ml/min).

图55 纯化Fab片段。

## 疏水相互作用层析作为精细纯化

在纯化的精细纯化，大多数杂质已经被除去，除了那些痕量的或非常相近的物质，比如目的蛋白的结构变体，核酸，病毒或内毒素。该分离的目的是减少这些变体，和任何其它的痕量杂质到应用可接受的水平。与捕获阶段所需快速，高载量，通常使用逐步洗脱相比，通常使用梯度洗脱，因此，精细纯化阶段主要着力于获得尽可能高的分辨率。

用作精细纯化的填料应该提供最高可能的分辨率，选择如下：

1. SOURCE15（平均颗粒大小15微米）-在实验室或大规模应用过程中用作需要高分辨和高通量的精细纯化。（流速可达1800厘米/小时）
2. 如果SOURCE介质不能提供需要的选择性时，使用Sepharose High Performance（平均颗粒大小34微米），
3. 如果更小颗粒的填料不能提供需要的选择性时，使用Sepharose Fast Flow（平均颗粒大小90微米）。



优化梯度洗脱来使选择性最大化。使用小直径颗粒的高效填料，来提高分辨率。



注意，如果疏水相互作用层析被用作精细纯化，可能需要脱盐/缓冲液交换步骤来除去多余的盐。

## 纯化重组的Pseudomonas aeruginosa exotoxin A, PE553D

图56 显示用扩展柱床吸附（EBA）以及后续的疏水相互作用层析-离子交换层析-疏水相互作用层析的四步纯化过程，用来纯化遗传修饰的，在大肠杆菌周质进行重组表达的Pseudomonas aeruginosa exotoxin，PE553D（相对分子量66000）。这里使用的策略能在比通常方法一半不到的时间内，产出高纯度的exotoxin A。

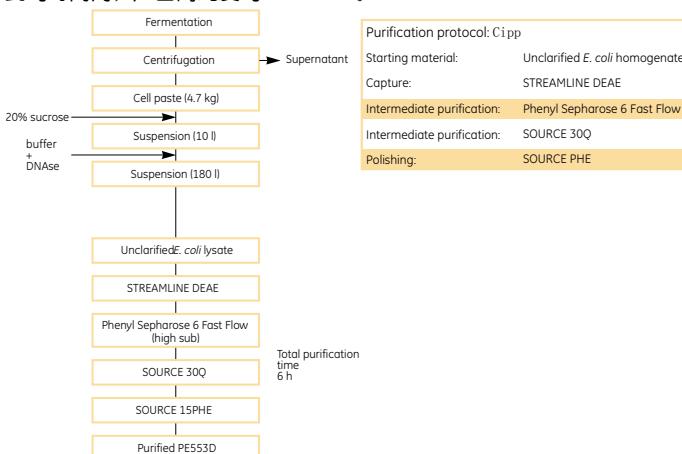


图56 四步纯化过程。

使用STREAM LINE DEAE吸附体和STREAM LINE200柱子，Exotoxin A从未净化的大肠杆菌裂解物中用扩展柱床吸附技术直接捕获。收集的组分直接转移到中度纯化步骤Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (High sub)，用逐步洗脱，来除去小部分有紫外吸收的杂质，该杂质会影响随后的步骤(图57a)。注意，使用的是Sepharose 6 Fast Flow填料而不是Sepharose High Performance填料，因为这是大规模纯化和快速洗脱步骤而不需要高分辨率的梯度洗脱。

第二步中度纯化使用离子交换层析SOURCE30Q，基于表面电荷的不同，来除去大多残存的杂质。

疏水相互作用层析再一次被用作精细纯化，这次使用梯度洗脱来完全利用SOURCE15PHE提供的高分辨率和小颗粒大小(图57C)。纯化过程的结果是纯蛋白(根据SDS-PAGE和反相层析分析)，总产率是51%。

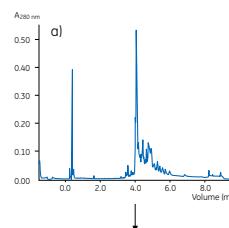
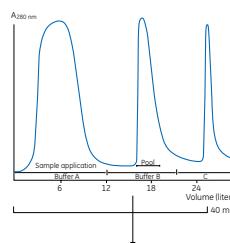
**Column:** Phenyl Sepharose 6 Fast Flow  
(high sub), in BPG 200/500  
(i.d. 200 mm, 150 mm bed height),  
4.7 l

**Sample:** 4.5 l of pool from EBA adjusted to  
0.6 M ammonium sulfate

**Start buffer:** 50 mM phosphate,  
0.7 M ammonium sulfate,  
pH 7.4

**Elution buffer:** 20 mM phosphate, pH 7.4

**Flow:** 120 cm/h



**Column:** SOURCE 30Q in FineLINE 100,  
(50 mm bed height), 375 ml

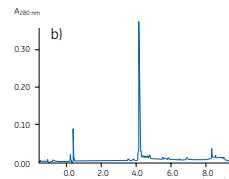
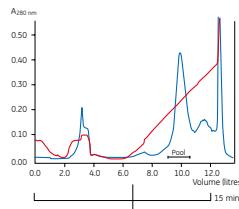
**Sample:** pooled fraction from Phenyl  
Sepharose 6 Fast Flow,  
diluted 1 to 3 with distilled water,  
1.5 l/cycle applied

**Start buffer:** 20 mM phosphate, pH 7.4

**Elution buffer:** 1.0 M sodium chloride,  
20 mM phosphate, pH 7.4

**Gradient:** 0–50% elution buffer, 20 CV

**Flow:** 600 cm/h



**Column:** SOURCE 15PHE, column 35 mm i.d.,  
100 mm bed height

**Sample:** pooled SOURCE 30Q fraction,  
adjusted to 1.0 M ammonium sulfate,  
0.5 l/cycle applied

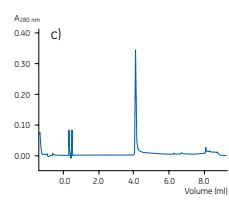
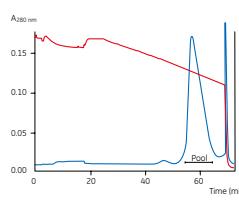
**Start buffer:** 1.0 M ammonium sulfate,

50 mM phosphate, pH 7.4

**Elution buffer:** 50 mM phosphate, pH 7.4

**Gradient:** 0–45% elution buffer, 15 CV

**Flow:** 200 cm/h



**Column:** μRPC C2/C18, SC 2.1/10

**Sample:** a) Pool from Phenyl  
Sepharose 6 Fast Flow  
(high sub)

b) Pool from SOURCE 30Q

c) Pool from SOURCE 15PHE

**Sample**

**load:** 50 µl

**A:** 0.1% trifluoroacetic  
acid (TFA) in water

**B:** 0.1% TFA in acetonitrile

**Gradient:** 25–75% B over 47 min

**Flow:** 150 µl/min

图57 纯化Exotoxin A。

## 用作精细纯化的其它技术

通常来说，根据样品的电荷、疏水性或亲和性来进行分离已经在特定的策略的早些阶段用过了，所以高分辨率的凝胶过滤层析成为最后精细纯化的理想选择。产品可以在一个步骤里被纯化，转移至需要的缓冲液、双体和聚集体能够被除去（如图58所示）。

凝胶过滤层析也是层析技术中最慢的，柱子的大小决定着可以上样的样品量。因此，最逻辑的做法是在减少样品体积的技术后使用凝胶过滤层析，以便可以使用小些的柱子。用于精细纯化的填料应该能够提供最高可能的分辨率。Superdex是实验室规模凝胶过滤层析的首选，而 Superdex Prep Grade用于大规模应用。

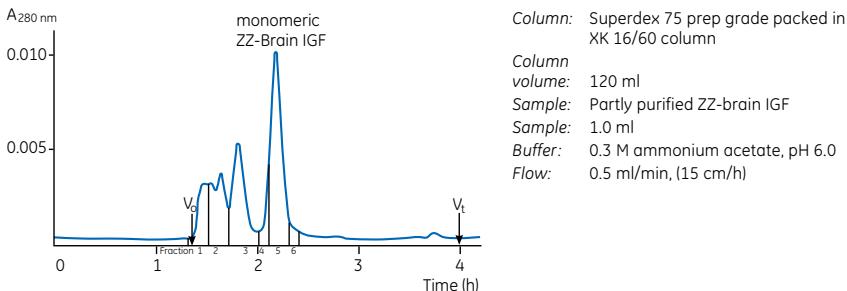


图58 最终精细纯化：用Soperdex 75 prep grade分离单体、二聚体和多聚体。

反相层析也可以作为精细纯化，只要目的蛋白能够忍受运行条件。反相层析根据疏水性分离蛋白和肽。反相层析是一种高选择性（高分辨率）的技术，通常需要使用有机溶剂。该项技术广泛用于活力的回收或蛋白四级结构并不重要时的纯度检测。由于许多蛋白被有机溶剂变性，反相层析通常不建议用作蛋白纯化，因为活力的回收和复性回正常的四级结构可能被折衷掉了。然而，在精细纯化阶段，当大多数的蛋白杂质已经被除去了，反相层析可以作为非常好的的技巧，尤其对于通常不被有机溶剂变性的小蛋白而言。



CIPP并不意味着必须有三个纯化步骤。例如，捕获和中度纯化或者中度纯化和精细纯化阶段由一步完成。类似的，纯度要求可能很低，以至于快速的捕获阶段就足够达到所需纯度了。对于纯化治疗用途的蛋白，可能需要第四步或第五步纯化，用来满足高纯度和安全性的要求。使用步骤的数目总是依赖于纯度的要求和蛋白的使用目的。

# 第五章 反相层析：原理和方法

## 简介

本章回顾总结了用于纯化和分析蛋白、肽和寡核苷酸的反相层析（反相层析）的原理和方法。

反相层析对于蛋白、肽和寡核苷酸的高分辨分离和分析变得越来越重要了。该技术对于肽谱、纯度检查都是理想的，也常用于寡核苷酸和肽纯化的精细纯化阶段。

反相层析根据分子疏水性的不同而分离它们。理论上，疏水相互作用层析和反相层析是紧密相关的技术，因为它们都是基于生物分子表面的疏水区域和层析介质的疏水表面的相互作用。然而，实际上，这两种技术完全不同。反相层析介质的表面通常比疏水层析介质更加疏水。这导致更强的相互作用，以至于为了成功的洗脱，需要用非极性的有机溶剂比如乙腈或甲醇。疏水相互作用层析则提供了利用生物分子疏水性的另一种方法，即通过在更极性的，变性能力更弱的环境下工作。



蛋白在280或254nm检测，寡核苷酸在260nm检测，肽在215nm检测。

反相层析给分离条件提供了很大弹性。极度高分辨率的分离可以通过分离只具有微弱疏水性差异的组分而获得。分离可以用均一浓度洗脱；然而，更频繁使用的是梯度洗脱，来使运行时间最小化（图59）。反相层析也可以用逐步洗脱分离具有明显疏水性差异的分子，如图60所示。

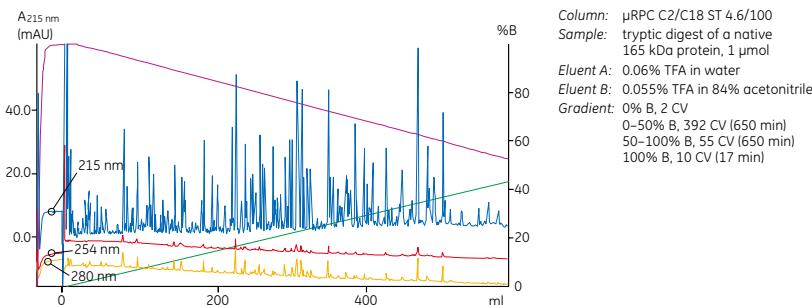


图59 从用胰酶消化的165kDa蛋白中高分辨分离多肽。消化产物应含有约150个蛋白片段，分离出了100多个峰，大部分峰都是基线分离。为确定所有多肽，分离过程在215nm处监测，并且在254nm和280nm监测以确定含有芳香氨基酸残基的片段。

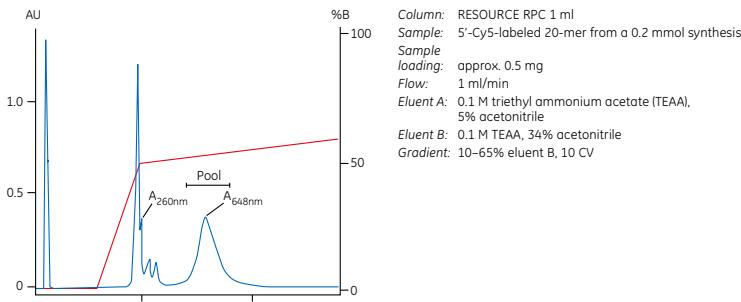


图60 寡核苷酸经常被如荧光素、Dye667和Dye550等标记。反相层析能够被用于从自由的寡核苷酸中分离出更疏水、被标记的寡核苷酸。具有不同选择性的反相层析介质通常被用于高分辨率条件下的纯度检测。

反相层析也可以用于对样品疏水组分的脱盐和浓缩。盐离子流过反相层析柱，而疏水组分结合着，这样就在柱子上有效地浓缩了它们，直到被一步洗脱下来。疏水相互作用层析因此被用于需要高选择性的样品制备和分离。脱盐和使用有机溶剂的能力使反相层析作为与质谱联用的理想技术。

反相层析经常成功的和其它层析技术联用来确定和鉴别未知的蛋白或肽。多维液相色谱和质谱联用是一个在蛋白质组学中用于确定和鉴别蛋白的快速、准确的手段，反相层析是这个过程中使用的一个关键技术。

在非极性溶剂的存在下，复杂的酶和多组分蛋白比小肽、寡核苷酸或高度稳定、交联的小蛋白更加容易失活。在有机溶剂的存在下，蛋白或多肽和疏水表面的相互作用导致四级结构的部分消失，通常会导致和反相层析填料具有不同相互作用的不同的构象状态。然而，变性和随后的活性丢失可以通过将生物分子返回到适合天然结构的条件下来最小化，正如反相层析广发的用于大规模纯化重组和合成蛋白、多肽，比如胰岛素和生长激素。除非发生沉淀，变性并不是使用反相层析来纯化蛋白或多肽做一级结构分析所面临的问题。

## 术语

某些和反相层析联系的术语反映了该技术的发展史。“反相”一词是从“常相”衍生出来的。常相层析是一种使用亲水固定相和含有己烷或氯甲烷等有机溶剂作为流动相的技术。在反相层析中，固定相是疏水的，所以使用了水/有机溶剂作为流动相使用，就是说，固定相比流动相更加疏水。反相层析填料作为吸附体而洗脱溶液作为流动相。

## 反相层析理论

用反相层析分离生物分子依赖于洗脱液中样品分子和介质可逆的疏水相互作用。起始条件主要

是水相的，有利于高度有序的水结构围绕着样品分子。通常的，一小部分有机修饰剂，通常是3%-5%的乙腈用来造成“湿”表面。样品结合到填料上，暴露给洗脱液的疏水区域最小化了。

分离依赖于样品分子在洗脱液中和填料表面达到的平衡。样品的分布依赖于填料的性质，样品的疏水性，洗脱液的组成（流动相），如图61所示。起初，条件有助于100%样品都结合在柱子上的极端平衡。由于蛋白和肽都有一些可及疏水和亲水氨基酸，而且相对的大，它们和填料的相互作用具有多点接触的性质。

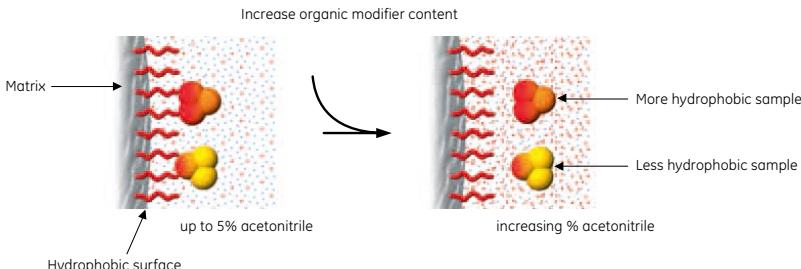


图61 在水样条件下结合在反相层析介质上的蛋白和多肽被洗脱后变得更加疏水。

开始洗脱时，有机溶剂的量在增加，以至于条件变得越来越疏水。结合和洗脱在样品流过柱子时一直在发生着。越疏水的样品流过柱子的越慢。结果是样品根据疏水性的增加，先后流过柱子。

## 反相层析分离的步骤

有两种主要的反相层析填料，一种基于亲水的硅球基质，被疏水的碳链包裹着，通常是n-烷基或芳香烃基，另一种是基于裸露的，疏水的多聚体基质。高度多孔的基质为高结合载量提供了大的内部表面。具有均一颗粒大小的基质能在高些的流速下使用。

如同其它的层析技术一样，反相层析柱才被填装在柱子中形成填好的柱床。柱床用洗脱液平衡来填满基质孔以及颗粒之间的空隙。反相层析所能达到的性能，尤其是分辨率，被柱子填装的效率所影响。因此，建议使用预装柱，尤其是使用小于15微米的填料时。

典型的生物样品包含分子的复杂混合体，其中组分的疏水性在一个广泛的范围内。大多数生物分子在含有低浓度的有机溶剂添加剂的水溶液下具有足够的疏水性，以和反相层析填料结合，并能在很窄的有机溶剂添加剂范围内被洗脱。因此，实际上，用于分离复杂生物样品的最经常使用的反相层析方法是梯度洗脱。样品在结合过程中被浓缩。分离的关键阶段在图62中显示。

样品在有利于结合的条件下被上样，通常是带有如三氟乙酸类离子偶试剂的水相溶液来促进疏水相互作用（见图99），并且带有低浓度的有机修饰剂，如5%的乙腈。在上样结束后，所有未结合的分子都流过了（自外吸光回到基线），条件被改变以开始洗脱结合的样品。洗脱通过增加有机体修饰剂，比如乙腈的浓度来实现。具有最低疏水性的分子被首先洗脱。通过控制有机

修饰剂的增加，分子被分别洗脱下来。那些具有最高疏水性的分子最后被洗脱下来。在洗脱的末尾，一个清洗步骤除去大多数紧密结合的分子。然后柱子在下一次运行前被再次平衡。

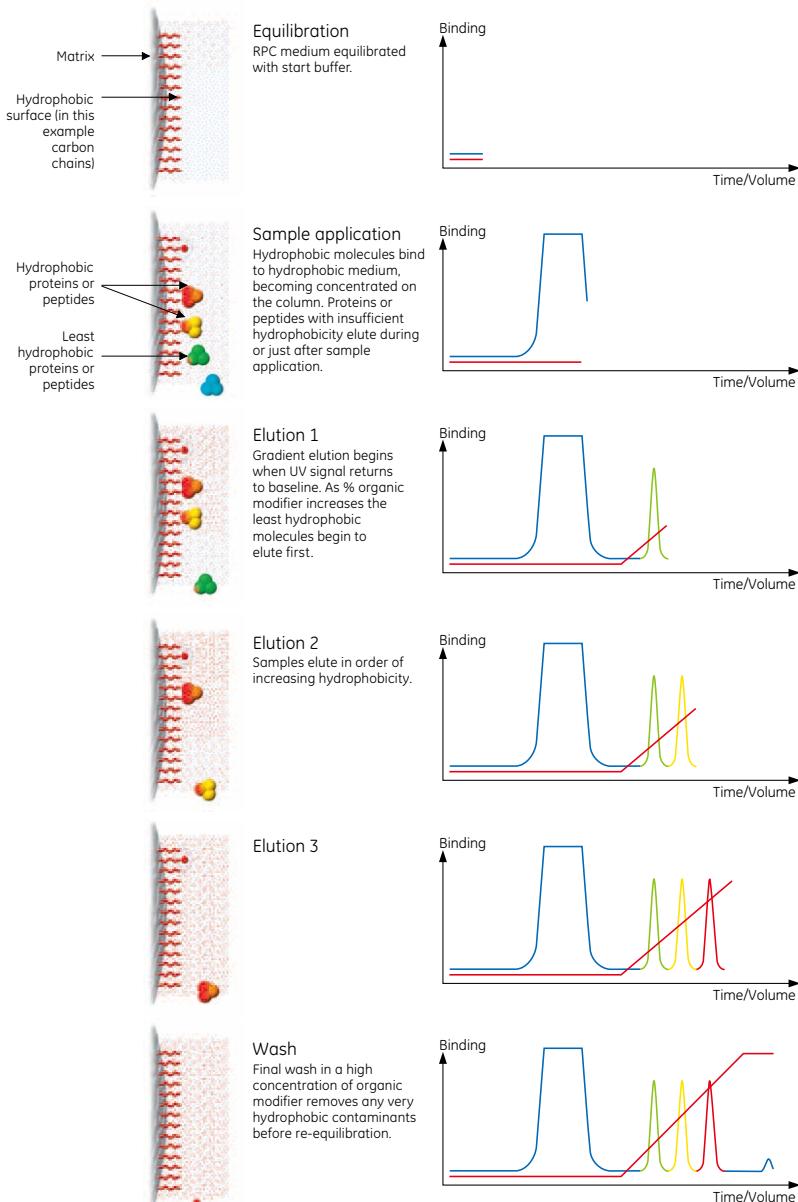


图62 使用梯度洗脱的反相层析分离步骤。

## 分辨率

反相层析是所有层析技术中分辨率最高的。分辨率是如下一些指标的组合：从柱子上洗脱的峰之间的分离度（选择性）；柱子产生窄的，对称的峰（效率）；当然还有样品上样的量和样品在柱上的停留时间。这些因素由实际的情况，比如填料性质、溶剂条件、柱子填装和流速所影响。所有这些都在本章的实践章节中详细讲述。

分辨率 (RS) 定义是两个峰尖之间的距离与两个峰覆盖的宽度的比值。RS可以从色谱图中决定，如图63所示。

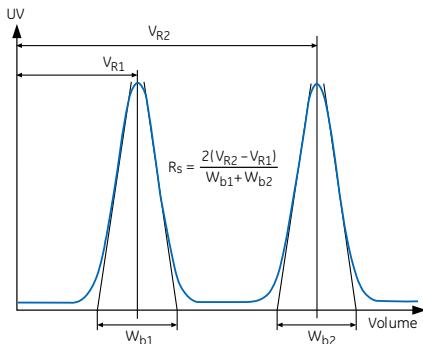


图63 两个峰尖之间分辨率 (RS) 的确定。

洗脱体积和峰宽都用相同的单位，以便给出一个无量纲的分辨率值。RS给出的是两个峰之间的相对分离度，可以用来确定是否有必要进行进一步的层析步骤优化。

如果  $RS = 1.0$  (图64)，那么在98%的峰回收条件下可以获得98%的纯度，假设峰是对称的，而且具有相似的大小。基线分离需要  $RS > 1.5$ 。在这个值下，峰的纯度是100%。

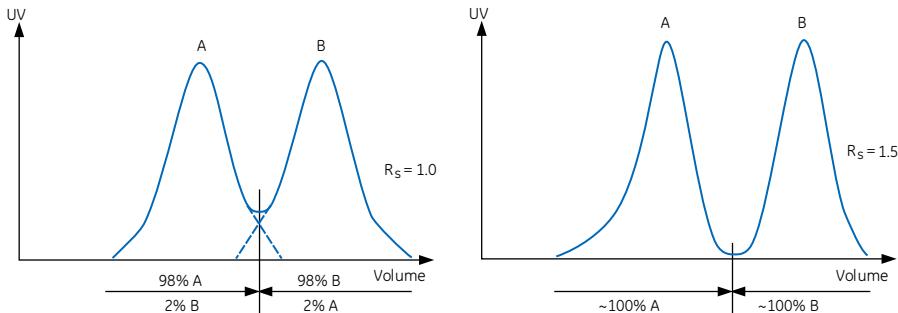


图64 不同分辨率的分离结果。



一个单独的，分离良好的峰并不必须是一种纯物质，可能代表在所选择的洗脱条件下不能被分离的一系列组分。

## 效率

柱效（从填装好的柱床上洗脱出窄的、对称峰的能力）和在柱子上发生的区域变宽有关，而且常常用理论塔板的数目来表示（测定柱效请参见附录2）。

区域变宽的主要原因是溶质分子（蛋白质）的纵向扩散。如果可供扩散的距离达到最小化，那么可以将区域变宽最小化。在所有条件下，一个填装好的柱子对分辨率贡献最大。柱子的不均匀填装会导致通道效应（缓冲液流过不均匀），区域变宽，结果是分辨率的丢失。图65描述了会产生好柱效的因素。很明显，颗粒大小是影响分辨率的一个显著因素。总的来说，最小的颗粒会在一个填装完好的柱床上，正确的洗脱条件下产生最窄的峰。

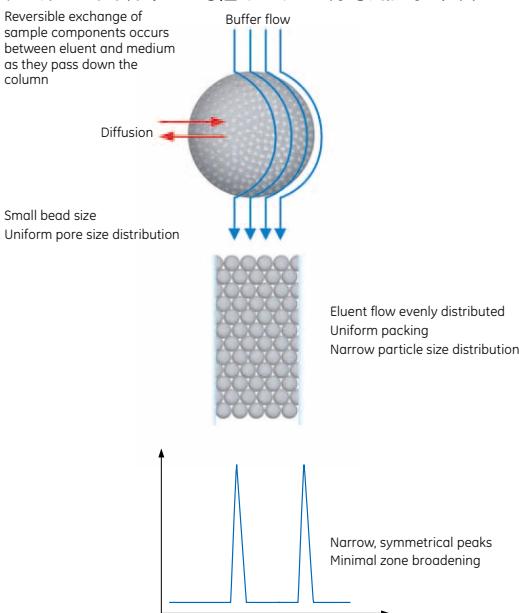


图65 影响柱效的因素。

虽然用柱效描述的分辨率可以通过减小基质的颗粒大小来提高，使用小的颗粒通常导致压力的增加，以至需要降低流速，延长洗脱时间。这可以在某种程度上通过使用短些的柱子来补偿。

与其它层析技术相比，反相层析的分辨率可能更依赖于柱子填装的效率。颗粒越小，柱子的有效填装越困难。由于大多分析用反相层析填料由小于15微米颗粒制成，因此，高度建议使用商品化的，预先填装好的柱子来获得最好的性能。

 温度可以显著的影响最终分辨率。通常，选择性随着温度的下降而增加。而温度上升时，洗脱液的黏度下降，导致洗脱液中的组分和介质更有效的转移（扩散），提高了分辨率。因此需优化温度以平衡选择性和效率来获得最终的分辨率。有在低温和高温进行分离的例子，虽然在分离小分子量分子时，通常使用高温。

## 柱子长度

高分子物质比如蛋白或小肽的分辨率与小有机分子相比，对柱子长度不太敏感。由于高分子量分子与疏水表面的结合对洗脱液成分的微小变化非常敏感，这些分子在非常窄的有机修饰剂浓度范围内被洗脱。梯度洗脱的应用保证了洗脱下所有结合的分子，每种都具有不同的疏水性，这降低了柱子长度的重要性。

## 选择性

好的选择性（峰之间的分离度）在决定分辨率方面是一个重要因素（图66），而且很大程度上依赖于反相层析填料的性质，洗脱液的性质和组成，用于洗脱的梯度和其它诸如温度和样品性质等因素。

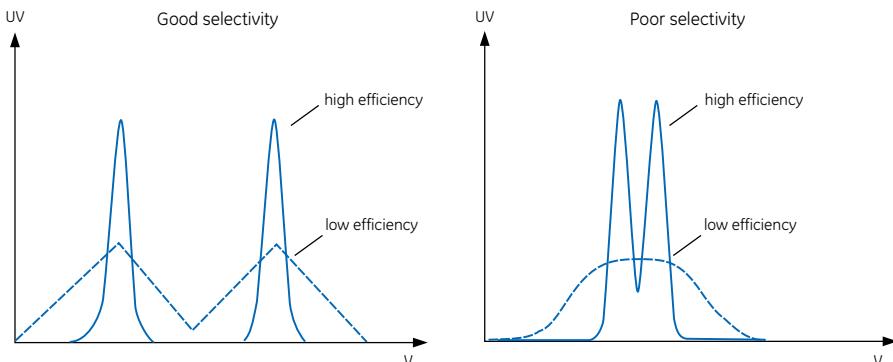


图66 选择性和柱效对分辨率的影响。

## 反相层析介质的组成

能够影响最终分辨率和选择性的因素包括基质的化学组成，颗粒大小，疏水配基的性质，配基的表面浓度（如果有的话），封闭化学（如果使用了）和孔径大小。

### 硅基基质

任何用于结合/洗脱技术的基质都必须在化学和物理上稳定，而且最好是多孔的以确保足够的结合能力。历史上，硅是最早使用的物质。通常，硅颗粒通过硅烷醇基与各种链长度的疏水配基以不同的表面浓度偶联，如图67所示。

这些介质最先是被开发用来纯化小有机分子的，最近用来纯化肽。硅在低pH到中性pH的有机溶剂中是化学稳定的，通常用于在反相层析中分离小分子。

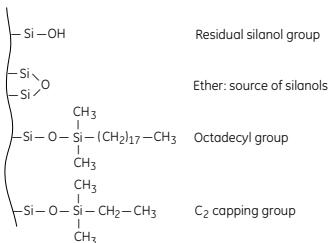


图67 硅基反相层析介质表面的典型结构。疏水的十八烷基团是最常用的配基之一。

### 硅基介质的配基

总的来说，疏水性越强的样品需要疏水性越弱的配基来进行成功的分离。反之，越亲水的样品需要疏水性越强的配基，以便为随后的分离达到足够的结合。

 最通常的，合成的肽，短些的肽和寡核苷酸在C18配基的柱子上进行分离。

硅基最大的缺点是在高pH水溶液中的化学不稳定性（pH高于7.5），以及在某些应用中，它导致混合模式滞留的趋势。

### 多聚体基质

合成的有机多聚体，比如球型聚苯乙烯，提供优良的化学稳定性。尤其在强酸或强碱的条件下（pH1到12）。这些稳定的填料在分离蛋白或肽的复杂混合物时提供了关键的优势：广泛的pH范围提供了对选择性更大的控制（见pH和样品性质）；更高的化学稳定性有助于生物样品分离后必需的清洗过程（图68）。此外，高物理稳定性和均一的颗粒有助于高流速，尤其在清洗和再平衡步骤，以此提高通量和产率，使柱压最小化。

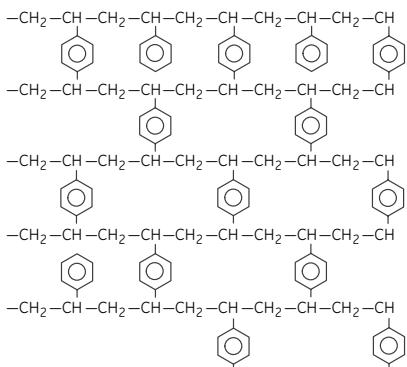


图68 基于聚苯乙烯的反相层析介质的部分结构。

GE医疗集团提供的反相层析填料的基质和配基见表17。

表17 GE医疗集团提供的用于反相层析介质的基质。

产品	基质	配基	平均颗粒尺寸	pH稳定性
$\mu$ RPC C2/C18(孔径120Å)	极性(亲水)硅	非极性(疏水)碳链:C2/C18	3微米	2-8
SOURCE 5RPC	非极性(疏水)聚苯乙烯/二乙烯基苯，高度球形，均一	基质表面	5微米	1-12
SOURCE 15RPC	同上	基质表面	15微米	1-12
SOURCE 30RPC	同上	基质表面	30微米	1-12

- 使用填装了3微米( $\mu$ RPC C2/C18)或5微米 (SOURCE 5RPC) 颗粒进行小规模制备和分析性分离。
- 使用5微米或15微米填料用作实验室规模的中度纯化或精细纯化。15微米介质更适合于粗样品。
- 使用15微米或30微米填料将进行大规模制备和处理性分离，例如SOURCE 15RPC或SOURCE 30RPC。这些介质提供低压力和高流速，并且已经为高通量优化过（在给定的时间内处理的样品的量）而保持高性能。SOURCE 30RPC对于工业过程的精细纯化阶段是理想的。

### 洗脱液

#### pH

最优的pH是需要建立得最重要的参数。图69显示了通过增加分离过程所用的pH，来获得选择性方面的显著不同。样品是其它条件都相同的两种血管紧张素。

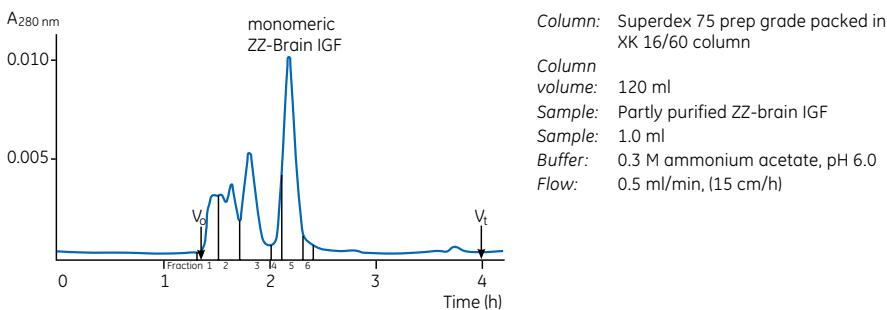


图69 被pH值改变的选择性。

当使用硅基填料时，分离通常在pH2到4进行，虽然pH值可以使用到7.5。低pH条件给出好的样品溶解性，并且增强结合（见离子对试剂），并且将混合模式滞留的风险最小化（见混合模式滞留和离子抑制）。

当使用聚苯乙烯基的填料时，分离可以在广泛的pH范围内进行（pH1-12）。由于蛋白和肽的性质在不同的pH值下可以显著的不同，在pH上的变化可以给出对样品新的选择性，这些样品需具有pKa 3-12的侧链基团。改变pH也能够提高对选择性的控制，有些情况下，也能提高溶解度和生物活力的产率。碱性肽通常在低pH下洗脱峰脱尾，所以在pH高于8时会有好些的分辨率。此

外，广泛的pH工作范围有助于方法优化。

在样品中添加离子对试剂能够提高样品的疏水性，因此，增加滞留，某些情况下也会增加最终选择性。

用于维持所需pH的试剂在表18中列出。

表18 用于维持pH和/或作为离子对试剂的成分举例。

洗脱液	pH	离子对试剂	浓度	评价
盐酸	2.0	否	0.01M	挥发性
氢氧化钠	12	否	0.01M	不挥发。只用于聚苯乙烯基的填料
也可以作为正电分子（蛋白、多肽和亲水多肽）离子对试剂使用的洗脱液组分。				
三氟乙酸(TFA)	2-3	成对离子：CF <sub>3</sub> COO <sup>-</sup>	(典型0.1%)	酸性氨基酸侧链不会解离。 与氨基形成离子对 低紫外吸收。 挥发 注意：为维持基线稳定应低于0.3%
醋酸铵	6 - 10 和 4.3-5.3	成对离子：CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup>	10-100mM	挥发性
磷酸	2-3	成对离子：H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup> , HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> , PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	10-100mM	疏水性比TFA弱。 离子对特性比较弱。 不挥发。用NaOH调节至合适的pH。
同时也可作为负电分子（如寡核苷酸）的离子对试剂的洗脱液组分				
三乙醇胺(TEA)	4-8	成对离子： NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> [C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ] <sub>3</sub>	10-100mM	抑制负电。主要用于掩盖带负电的硅基。同时也是带负电样品的离子对试剂。
四甲基氯化铵	4-12	成对离子：+N(CH <sub>3</sub> ) <sub>4</sub>	5-100mM	
四丁基氯化铵	4-12	成对离子：+N(C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> ) <sub>4</sub>	5-100mM	

### 离子对试剂

增加带电组分的疏水性，提高其与填料的结合，并因此改变滞留时间的通常方法是向洗脱液中添加离子对试剂。这些试剂通过离子相互作用和带电基团结合，因此抑制它们对整体疏水性的影响（图70）。由于大多数蛋白和肽具有轻微的碱性，离子对试剂通常是酸，比如三氟乙酸(TFA)，例如三乙胺之类的碱用于带负电的分子。

有些情况下，离子对试剂的添加对于结合到反相层析填料上是绝对必需的。例如，类似于三氟乙酸的离子对试剂对于亲水肽的结合是必需的。可作为离子对试剂的化合物的例子在表18中列出。

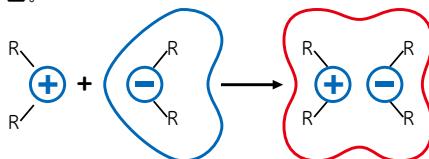
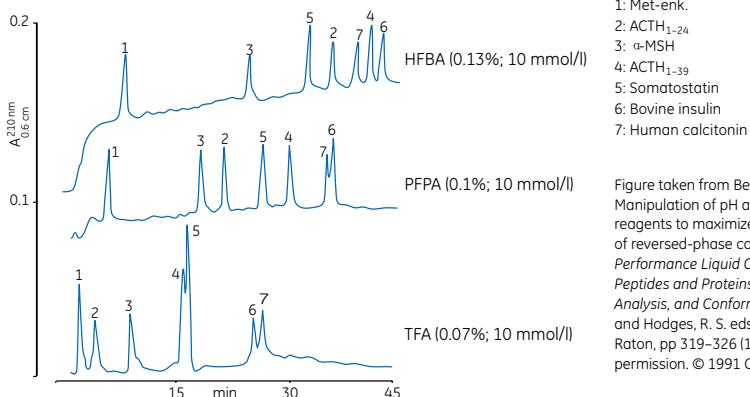


图70 离子对试剂改变净疏水性质。

离子对试剂的类型和浓度也能影响滞留行为和随后的选择性，如图71和72所示。



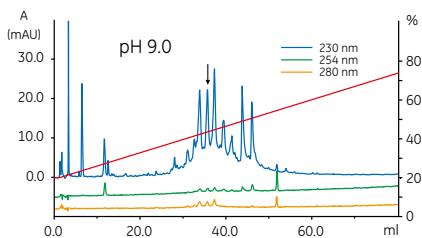
- 1: Met-enk.
- 2: ACTH<sub>1-24</sub>
- 3: α-MSH
- 4: ACTH<sub>1-39</sub>
- 5: Somatostatin
- 6: Bovine insulin
- 7: Human calcitonin

Figure taken from Bennett, H. P. J. Manipulation of pH and ion-pairing reagents to maximize the performance of reversed-phase columns, in *High-Performance Liquid Chromatography of Peptides and Proteins: Separation, Analysis, and Conformation* (Mant, C. T. and Hedges, R. S. eds.), CRC Press, Boca Raton, pp 319–326 (1991). Used with permission. © 1991 CRC Press.

图71 离子对试剂显著影响选择性甚至洗脱顺序。注意在这个例子中也包含了pH。

Eluent A: NH<sub>4</sub>OH/HCOOH

Eluent B: CH<sub>3</sub>CN, 60%



Sample: Amyloid-β1-42

Sample load: 622 μg of crude material

Column: SOURCE 5RPC ST 4.6/150

Gradient: 20–80% eluent B over 87.5 ml

Flow rate: 0.5 ml/min

Eluent A: NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>

Eluent B: CH<sub>3</sub>CN, 60%

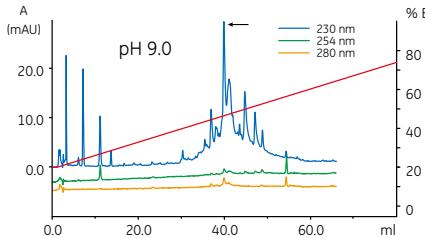


图72 离子对试剂对选择性的影响，pH恒定。

#### 混合模式的滞留和离子抑制

混合模式的滞留可以被看作是增加的滞留时间和显著的峰展宽，如图73所示。

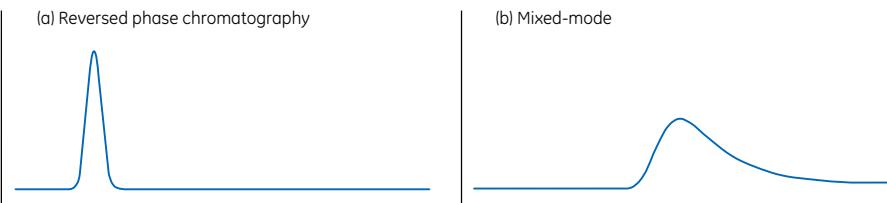


图73 典型的混合模式滞留的影响。峰更宽、更倾斜，保留时间增加。

这个现象只需在使用硅基填料时考虑，因为用于反相层析的聚苯乙烯和其它合成有机高分子是一均一的，而且在pH1-12稳定。峰展宽和增加的滞留时间是由硅基介质表面暴露在外带负电的硅

烷醇基团与样品分子中带正电的氨基发生的离子相互作用而导致的。

在制造过程中，在配基固定后，硅烷醇基团仍然在硅基的表面上，因为C8或C18侧链的空间阻碍导致不能将所有的硅烷醇基团完全取代。为了降低混合模式滞留的风险，生产商将硅烷醇基团和小的烷基硅醇试剂，比如氯三甲基硅醇和氯三乙基硅醇，反应。这个过程被称为封闭。封闭的程度也影响选择性。所以，在封闭过程中的重复性是至关重要的。

可离子化的硅烷醇基团不仅产生于不完全的封闭，也产生于柱子的衰老，后者通常会由于长时间暴露于水相溶液而加速。

选择具有高度批次间重复性和具有严格质量控制方法的商品化硅基填料，能够使混合模式滞留的几率最小化。

pH低于3的洗脱液会阻碍硅烷醇和带正电样品分子的相互作用。带电的硅烷醇的存在通常会被在洗脱液中加入的TEA所掩盖。

## 洗脱

### 有机修饰剂

开始洗脱时，需向洗脱液中添加有机修饰剂来增强洗脱力量。有机修饰剂必须可以和水互溶，不具有紫外吸光，以便检测正在洗脱的分子。沸点必须足够低以便洗脱后的挥发。表19总结了通常使用的有机修饰剂，按它们对于蛋白和肽分离方面的适合度来分类。图74显示了有机修饰剂在洗脱强度上的不同。

表19 乙腈是蛋白和多肽分离中推荐的有机修饰剂。

有机修饰剂	适用性	沸点 (°C)	紫外截止波长 (nm)	黏度 (20°C时cP)	评价
甲醇	有机小分子	65	210	中-低: 0.60	可能会使蛋白结构不稳定
乙醇	有机小分子	78	205	中-低: 1.20	可能会使蛋白结构不稳定
异丙醇	蛋白 多肽	82	210	高: 2.30	对蛋白结构的影响最小
乙腈	有机小分子 蛋白 多肽	82	190	低: 0.36	对蛋白结构的影响最大。 比醇类更强的变性剂。 有毒。

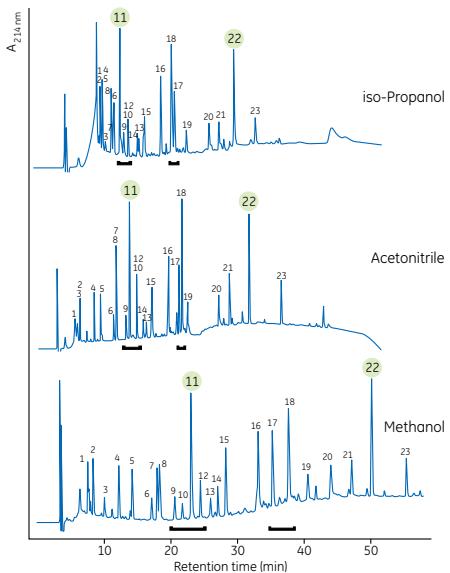


Figure taken from Aguilar, M.-I. and Hearn, M. T. W. High-resolution reversed-phase high-performance liquid chromatography of peptides and proteins. *Meth. Enzymol.* **270**, 3–26 (1996). Used with permission. © 1996 Academic Press, Inc.

图74 在分离蛋白和多肽时有机修试剂的主要区别在于洗脱强度而不是它们对选择性的影响。

#### 洗脱类型

对于制备和分析，蛋白和肽的高分辨率分离来说，常用梯度洗脱来使分离时间最小化。在图75中显示的紫外吸光值和理论梯度表示在梯度洗脱中，增加有机修饰剂浓度的情况下，样品组分的洗脱。

虽然反相层析分离通常用流速（毫升/分钟或厘米/小时）和时间（分钟）表示，用柱体积表示洗脱体积（例如对于有1毫升柱床的柱子来说，5个柱体积=5毫升），从而描述洗脱样式，极大地方便了方法开发和在规模化放大时将方法转移至其它规格的柱子上。

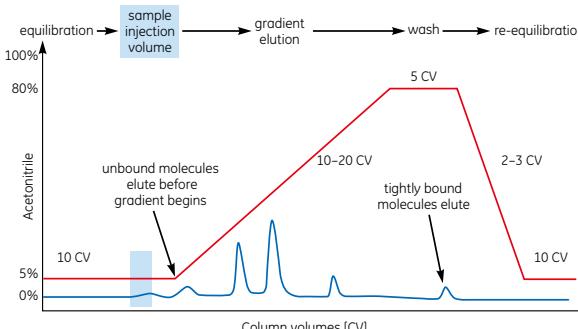


图75 典型的使用梯度洗脱的高分辨率反相层析分离。

对于高分辨的分析，会使用一个宽广的梯度来结合尽可能多的组分然后分别洗脱它们以获得一个全面的图样。

对于制备性应用，梯度洗脱的条件可以被优化以便将目的分子从所有的杂质中分离。

逐步洗脱最常用于脱盐（缓冲液交换）。用低分辨的分离将疏水组分同亲水杂质和盐分离开。在等浓度洗脱中，分离只用一种洗脱液进行。等浓度洗脱主要用于对有机小分子的高分辨率分析，偶尔也会用作优化分离的一部分，比如在制备性应用时，当杂质和目的分子洗脱在非常近的区域里的情况下。

等浓度洗脱也用于为样品脱盐。用反相层析为样品脱盐通常用于层析分离前的制备，比如在离子交换层析前的除盐和在线或离线质谱分析前。大体积的样品可以上样到柱子上（仅受填料的结合能力所限）。疏水的分子结合，亲水分子包括盐流过。结合的，浓缩的分子然后用小体积的疏水洗脱液，通常含有乙腈来洗脱。这种挥发性的溶剂可以被蒸发掉，残余的物质在新的缓冲液中重新溶解。凝胶过滤层析也可以用做脱盐，将低分子量杂质和盐和高分子量生物分子分开（见附录1）。然而，虽然凝胶过滤层析是一个简单的，温和的技术，它的缺陷就是上样蛋白的体积是有限的，而且样品被稀释了。图76显示了用于脱盐时凝胶过滤层析和反相层析的理论比较。

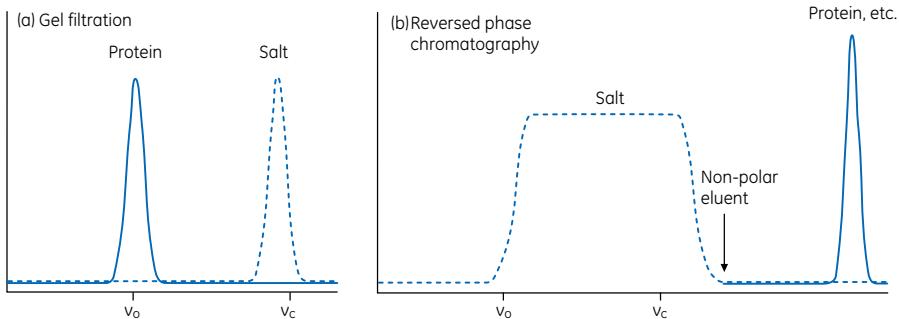


图76 反相层析上的脱盐。

### 结合载量

反相层析填料的可及载量是在确定的静态条件下对它结合样品组分能力的定量测量。如果给定的条件包括操作填料时的流速，结合的量被称为动态结合载量。孔径度是决定载量的重要因子。所有多孔介质的疏水表面都可用于结合样品组分，但是高分子量组分可能被排阻在小孔径外，只有一小部分的疏水表面可以用于结合。高度多孔，并且具有开放孔结构（比如SOURCE RPC填料）因此在分离大分子如蛋白和肽时具有优势。孔径必须大到足以允许整个目的分子自由的进出，来获得高结合载量。载量也被其它性质，如样品组分的性质，在结合时的洗脱液，温度，pH等所影响。

结合载量在本章每种填料的“纯化选项”下提供。然而，这些值只能作为指南。相对于上样到柱子上的样品量的最优选择性必须通过实验来确定。

## 反相层析的实践

本节涵盖了反相层析分离实际方面的细节，和用于提高分辨率和整体性能的提示。建议主要集中于蛋白和肽类的生物分子的分离。

图77总结了实际操作中用于进行经典的反相层析分离的步骤。

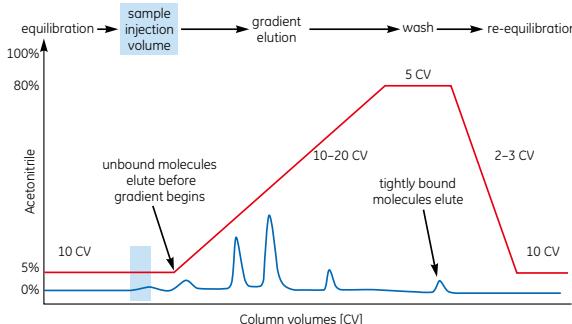


图77 使用梯度洗脱的典型反相层析分离。

正如同在理论章节中讨论的那样，一个成功的反相层析被很多参数影响，而且总需要被优化来满足应用的要求。选择和优化介质和条件来用反相层析进行生物分子分离的步骤在此按重要性的先后顺序给出。

1. 选择能够在最简单起始条件下提供最好分辨率的填料。比如，在洗脱液中有TFA和乙腈（在这些条件下，蛋白和肽在使用硅基或基于多聚物的填料时，选择性方面显示出非常少的差异）。
2. 寻找能够提供最好分辨率的pH。这可能是决定使用硅基还是基于多聚物的填料的决定因素。
3. 如果需要的话，寻找合适的离子对试剂来提高选择性。
4. 优化梯度洗脱来使选择性最大化（梯度的斜率只影响峰之间的距离，而不会改变它们洗脱的次序）。选择能够在可接受范围内最陡的梯度（最少的梯度体积）。
5. 寻找能给出可接受分离的最高流速。

## 填料和柱子选择

选择正确的反相层析填料和柱子规格对于成功的分离是必要的，而且这种选择应该基于应用目的和样品成分的性质。

样品成分：疏水性

反相层析填料的选择涉及样品组成的疏水性，必须通过实验确定。和其它层析技术相比，几乎不可能预测生物分子在反相层析上的滞留。影响肽滞留的重要参数是该肽氨基酸序列的组合以及任何二级结构，比如 $\alpha$ 螺旋和 $\beta$ 片层。对蛋白来说，情况由于受四级结构的影响而变得更加复杂。



当分离已知高度疏水的组分的时候可以选择疏水性弱些的填料来方便洗脱。和填料结合非常强的样品可以从疏水性弱些的填料上更容易的被洗脱下来。

### 分离的目的

应用总是包含将多组分样品分成不同组分，比如肽段图谱，需要极高的分辨率。制备性反相层析应用，比如纯化成肽，则更关心通量。分辨率在速度和载量面前可以被折衷。然而，如果用在最终的精细纯化阶段，分辨率是重要的。

反相层析的分辨率依赖于柱效和选择性。能够显著影响选择性的参数在本章前一部分已经讨论了（第95页）。



尽可能使用商品化的预装柱，因为最高的柱效依赖于填装过程和填料的颗粒大小。最小的3微米填料能给出最高的效率，例如SOURCE 5RPC等大些的5微米填料次些。

### 分离的规模



将用3微米颗粒填装的柱子（ $\mu$ RPC C2/C18）用于微量制备和分析分离。



将5微米或15微米填料用于实验室规模分离的中度纯化或精细纯化阶段。15微米填料更适合用于粗样品。



将15微米或30微米填料用于大规模制备和处理分离。例如，SOURCE 15RPC或SOURCE 30RPC。这些填料在高流速下提供低压力，而且已经经过优化来确保高通量（在给定时间内处理的样品量）的分离而保持高性能。SOURCE 30RPC对于工业生产的精细纯化阶段是理想的选择。



注意，由于反相层析分离的性质，改变颗粒大小可能会导致选择性的轻微改变。

### 洗脱条件



当起始的选择性或样品的稳定性和溶解度因子表明需要使用pH高于7.5的洗脱液，总是使用基于多聚物的填料，例如SOURCE RPC。



当需处理粗蛋白或肽样品时，使用基于多聚物的填料的优势是能够用碱方便的进行清洁（硅基介质在pH高于7.5时溶解）。

### 柱子长度



在处理大体积样品时，增加柱子长度可以提高分辨率。



长些的柱子能够提高复杂的肽混合物的分辨率，例如肽酶切产物。



如果使用缓的有机溶剂添加剂的梯度，长些的柱子能够提高非常相关肽或蛋白的分辨率。

## 洗脱液选择和准备

使用最高的纯度，只要有可能，使用HPLC级的溶剂，酸，碱，离子对试剂和水。化学品的纯度很重要，因为杂质会产生不想要的额外的峰，鬼峰或污染最终产品。

所有的组分必须在220纳米以下无吸收，在分离进行的低极性条件下可溶。虽然蛋白在280纳米有吸收，合成的寡核苷酸在250-260纳米有吸收，在分离缺少芳香氨基酸例如色氨酸和酪氨酸的

短肽时，在220纳米以下（通常是215纳米）的监测也是必要的。在表18和19中建议的组分是根据能在低本底吸收的情况下提供良好分离的基础选择的。

 如果可能，使用可挥发组分。这些可以从洗脱的组分中和有机修饰剂一起通过蒸发而除去。非挥发的盐必须通过额外的脱盐柱除去。

### pH和离子对试剂

表18显示了为设定洗脱液pH而最常用的酸、碱和它们作为离子对试剂的影响。由于蛋白和肽的净电荷随着pH的变化而变化，它们的净疏水性也随pH的改变而改变。因此，洗脱液的pH是洗脱次序和最终选择度的重要影响因素。

 对于性质未知的样品，从最通常使用的强酸开始，它也可以用作离子对试剂：0.1%三氟乙酸作为洗脱液A（如果需要提高基线稳定性，可以降低至0.065%）。

加入表18建议浓度的离子对试剂来提高疏水组分和填料的结合。注意，其他的离子对试剂不和TFA混合。

如果是使用硅基填料，使用离子对试剂来使混合模式滞留（能够破坏分辨率）最小化（第100页）。

 对于具有已知特定性质的样品，参见表18。

 离子对试剂的存在可以影响紫外吸光，随着有机修饰剂浓度的改变可以看到紫外吸光的改变。这可能在梯度洗脱过程中导致上升的或者下降的基线。总是在分离前进行空白运行来确定任何添加剂的影响。如果必要，调节浓度（参照洗脱平衡，第112页）。注意，改变浓度能够改变样品离子化的程度，并影响他们在分离过程中的行为。

### 有机修饰剂

 对于性质未知的样品，从最通常使用的有机修饰剂乙腈开始。

在210nm以下，乙腈比其他通常使用的有机溶剂在这些低波长下具有更低的本底吸收。提供好的基线稳定性，（因为有机修饰剂的浓度在运行过程中是变化的）因此，确保良好的检测灵敏性。

 离子对试剂可能需要被添加（见上）。

 当需要更强的洗脱性质或保持样品稳定性，使用异丙醇。注意，高黏度会导致低柱效和增加的压力。

 如果洗脱样式仍然不令人满意，参照表19的有机修饰剂总览。注意，改变有机修饰剂可能会影响滞留时间。蛋白洗脱顺序的改变可能是变性导致的明显的疏水性改变的结果。

### 分离蛋白和肽的经典洗脱方案

这部分展示了一些最通常使用的洗脱方案。大多数方案在洗脱液A中包含5%或更少的有机修饰剂，在洗脱液B中包含80%或更多的有机修饰剂。注意，高于80%的有机溶剂可能会影响PEEK管，该种管在高效液相色谱系统中广泛使用。

### 硅基填料

洗脱液A和B应该包含至少0.1%的强酸作为离子对试剂，来保持低pH并使混合模式滞留最小化（第100页）。洗脱液B应该包含显著的高浓度的有机修饰剂，例如

洗脱液A: 0.1% TFA, 溶于水, 5%乙腈

洗脱液B: 0.1% TFA, 溶于乙腈 (最高80%)

### 基于高聚物的填料

由于基于高聚物的填料能在更广泛的pH使用，并且无需担心混合模式滞留以及抑制和硅烷醇基团的离子相互作用的需要，可以使用更广泛的洗脱方案。

对于性质未知已知需要酸性条件的样品：

洗脱液A: 0.065% TFA在2%乙腈中

洗脱液B: 0.065% TFA在80%乙腈中

对于已知需要碱性条件的样品：

洗脱液A: 0.125% 的氨溶液, pH10, 2%乙腈

洗脱液B: 80%的乙腈在溶液A中。

其它系统：

洗脱液A:

pH2.1 0.1% 甲酸, 2%乙腈

pH2.0 0.1% 乙酸, 2%乙腈

pH2.0 0.1% TFA, 2%乙腈

pH4.5 10mM 醋酸钠, 2%乙腈

pH7.0 10mM 磷酸钾, 2%乙腈

pH9.0 10mM Tris-HCl, 2%乙腈

pH12 10mM 氢氧化钠, 2%乙腈

洗脱液B: 在洗脱液A中的70%乙腈

 虽然大多数洗脱液含有强酸和有机溶剂，又很小的缓冲能力，当在生理条件附近工作时，应该保持足够的缓冲能力。

### 准备

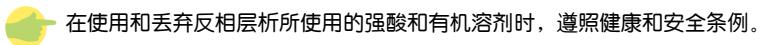
1. 过滤所有的加入了固体的洗脱液，使用0.22微米滤膜，这可以防止颗粒堵住柱子。
2. 分别测量有机溶剂和水溶液的体积，然后混合（这避免了当直接混合有机溶剂和水相时产生的体积变化）。
3. 脱气：在超声浴中（小于15分钟），在真空中用磁力搅拌（小于5分钟）或者通过吹进氮气（小于5分钟）。这可避免在洗脱过程中气泡的形成。注意保持脱气时间尽可能的短来避免有机溶剂的挥发。
4. 加入挥发性的离子对试剂。

 使用新鲜准备的洗脱液

 总是使用限流阀（与适当的压力范围匹配）连接在层析系统的检测器后，来避免检测器中气泡的聚集。

 如果洗脱液需要储存，容器必须封好以避免由于挥发导致的溶液组成变化，最好保存在4度。不要在中性的pH下储存水溶液多于2-3天，因为可能会有微生物生长的危险。为了降

低气泡形成的危险，将冷溶液达到运行温度，然后在使用前脱气。

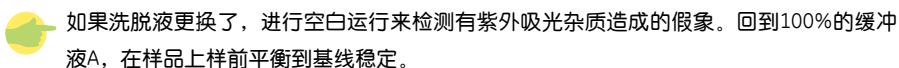


在使用和丢弃反相层析所使用的强酸和有机溶剂时，遵照健康和安全条例。

## 柱子和填料准备

第一次使用反相层析柱前，或长时间使用后，或洗脱条件显著的改变时，需要进行保养。用于保养柱子的洗脱液应该和在即将进行的分离中使用的一样。保养反相层析柱的通用过程如下：

1. 用大概3个柱体积的洗脱液B，在对特定柱子来说从低到中等流速下洗涤柱子。
2. 运行2-3个柱体积从100% B到100%A的线性梯度，使用同步骤1相同的流速。
3. 用10个柱体积的洗脱液A来平衡柱子，持续平衡直到所有的检测器信号都稳定。



如果洗脱液更换了，进行空白运行来检测有紫外吸光杂质造成的假象。回到100%的缓冲液A，在样品上样前平衡到基线稳定。

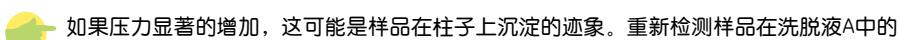
## 样品制备

样品制备至关重要，尤其对于使用颗粒小至3微米的填料进行的高分辨分离来说。简单的净化样品的步骤可以避免堵塞的风险，降低强力使用的需要，避免柱子性能的变坏和压力的增加。对于有效的结合，将样品溶解在起始洗脱液中或具有稍低浓度的有机修饰剂的溶液中。

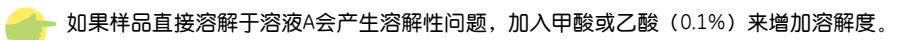
- 样品必须澄清，没有颗粒状物质。用凝胶过滤层析将非常粗的样品脱盐（附录1），或用更大颗粒填装的反相层析柱来除去可能堵住高分辨反相层析柱的杂质。有些反相层析柱也提供有连在一起的保护柱，来保护主柱。
- 1. 将样品溶解在洗脱液A中。
- 2. 在10000g离心10分钟，或者用0.22微米或0.45微米的无菌滤膜过滤。如果在洗脱液A中有有机修饰剂的存在，使用防溶剂的滤膜。尽可能快的上样到柱子中以避免诸如氧化之类的副反应。

## 样品溶解性

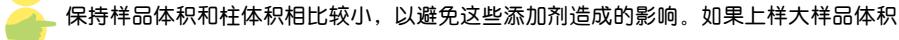
在样品上样过程和分离过程中保持样品的稳定性以避免在柱子上沉淀是重要的。



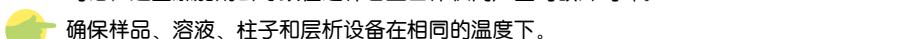
如果压力显著的增加，这可能是样品在柱子上沉淀的迹象。重新检测样品在洗脱液A中的溶解性。洗脱液A中低浓度的有机修饰剂，比如5%的乙腈有助于克服溶解度问题而不破坏分离。



如果样品直接溶解于溶液A会产生溶解性问题，加入甲酸或乙酸（0.1%）来增加溶解度。



保持样品体积和柱体积相比较小，以避免这些添加剂造成的影响。如果上样大样品体积的话，这些添加剂会导致在进样后空白体积内产生的额外的峰。



确保样品、溶液、柱子和层析设备在相同的温度下。



不要过量上样，这也可能导致沉淀。

### 浓度和黏度

黏度随温度改变而改变，而且随有机修饰剂浓度的增加而增加。样品和洗脱液A的组成差异可以导致在上样后短时间内的紫外吸光波动。

## 样品上样量

样品上样量（质量）对于样品体积来说有更大的影响，因为反相层析是一种结合技术，能够上样到柱子上的样品量决定于柱子的结合能力和需要的分辨率（见选择性和结合能力，95页）

样品上样量影响分辨率，因为峰的宽度直接和存在的物质的量相关。为了达到令人满意的分辨率，上样蛋白的总量应该比装好的柱子的总结合能力少。

 对于梯度洗脱来说，为了获得良好的分辨率，上样总蛋白结合能力的20%-25%。如果分辨率令人满意，可以增加上样量。

增加流速载量会降低，所以必须在获得最大动态结合能力和快速分离（尤其是上样大体积样品时）之间寻找一个平衡。

## 样品体积

作为结合技术，反相层析和样品体积无关。可以上样大体积稀样品，以便浓缩和分离样品。

## 温度

在整个分离过程中，保持样品，洗脱液，柱子和层析设备在相同的恒定的温度下来确保一致的，可重复的结果。温度会影响样品和洗脱液的黏度，也会影响分辨率（95页）。增加或降低温度都可能改善分辨率。当分离小分子量样品时，增加温度对于改善分辨率最有效。

### 梯度，等浓度或逐步洗脱

对于高分辨的反相层析分离，使用逐步的或连续的梯度来洗脱组分。对每个分离来说，理想的梯度形状和体积必须根据试验来确定。梯度的斜率用单位时间内洗脱液B含量的改变来描述，(%B/分钟) 或每单位体积 (%B/毫升)。

在任何梯度洗脱中，有机修饰剂在洗脱液A中的浓度都比在洗脱液B中的浓度低，并且抛开有机修饰剂绝对含量的变化不谈，梯度通常是由相对亲水的条件（高水含量，低有机修饰剂含量）向疏水条件（低水含量，高有机溶剂含量）进行。

梯度可以以体积模式或时间模式衡量。注意，流速的变化（在恒定的梯度斜率下）对于分离的影响很小，但是，在恒定流速下，梯度斜率的影响很大。

1. 从宽些的线性梯度开始，来确定目的分子是否会结合并洗脱，或复杂的混合物组分能分离的多好。

- 在样品上样前进行空白梯度运行，来确定任何从柱子或洗脱液中杂质/组分造成的基线扰动。从5%B到80% B运行多于10-20个柱体积。
- 如果基线漂移过大，调节洗脱条件（见112页平衡洗脱液）。如果有鬼峰的出现，检查洗脱液成分和柱子的清洁度（见鬼峰，112页）。
- 当获得了令人满意的基线，重复运行，这次上样样品。

## 优化

在起始的梯度运行后，可以改变分离条件以改进选择性和分辨率。可以改变的关键参数在表20中列出。

表20 优化过程中考虑的参数

效果	参数
改变选择性	改变有机修试剂（洗脱能力：异丙醇>乙腈>乙醇>甲醇）
改变选择性/保留时间	改变pH
改变选择性	改变离子对试剂
提高分辨率	使用更浅的梯度（如增加梯度体积或时间或使用分段梯度）。 对蛋白分离非常有效，因为保留时间对洗脱液中的细微变化非常敏感。
提高分辨率	降低流速
提高分辨率	改变温度

最终的梯度形状可以是线性梯度和等浓度步骤的混合。梯度斜率的选择依赖于杂质在目的分子周围多近的地方洗脱或一些峰的分离情况。

 浅梯度和短柱子对于高分子量的生物分子来说通常是最优的。

逐步梯度（比如在不同B%下进行一系列的等浓度洗脱），对于诸如脱盐和进行处理规模的应用来说能够提供需要的分辨率。

### 流速

流速对于分离小分子来说是一个重要的因素，包括小肽和蛋白酶解物。使用最优的流速在等浓度假设中也是重要的，它可将区域变宽最小化。流速的作用在梯度洗脱中不那么重要，因为最合适的颗粒大小已经被选定了。

-  选择最高的流速来在最短的时间内获得最大的分辨率。
-  将样品直接上样到柱子上时使用合适的流速确保最优的结合时间。
-  使用可以产生精确梯度的层析设备。仪器的选择很大程度上依赖于样品的体积，柱子的大小和类型。当用时间模式编程层析系统时，记住流速的改变会影响梯度斜率，因此，也会影响分辨率。
-  通过降低流速来降低压力。但是记住，这会增加运行时间，分离需要重新优化。
-  对于大规模制备性反相层析，样品上样过程中的流速是重要的，因为这会影响动态结合载量（103页）。上样时使用的最优流速必须通过实验来确定。

## 洗涤和再平衡

1. 用至少5倍体积的100% B洗涤来除去任何结合的分子。
2. 用2-3个柱体积从100% B到0% B的梯度洗涤柱子，以避免成分突然改变对柱子的损坏。
3. 用至少10倍柱体积的A再平衡柱子。



有时，疏水相互作用非常强以至于需要高效的有机溶剂来洗脱所有结合的物质。由于用反相层析分离蛋白是洗脱和变性、失活的平衡，如果这些情况发生了，应该考虑疏水相互作用层析作为合适的技术。肽含有低程度的四级结构，因此更适合有机溶剂。

## 问题解决

### 鬼峰

低质量的洗脱组分可能导致被称作“鬼峰”的情况。痕量的有机杂质结合在柱子上，在平衡和样品上样过程中被浓缩。当洗脱开始时，这些杂质就在色谱图上以未知的“鬼峰”出现。鬼峰的大小通常依赖于平衡时间和洗脱液中有机杂质的含量。

鬼峰也可能由前一次运行中分子的不完全洗脱造成。运行一次没有样品的空白梯度作为检查，尤其是随后的运行需要进行高灵敏度检测时。

### 基线漂移：平衡洗脱液

在典型的运行过程中，基线可能会随着洗脱液B的增加，呈线性的逐渐的增加或降低。这个现象可能由于离子对试剂（或强酸组分）或有机修饰剂在检测波长的吸收显著。由洗脱组分导致的本底吸光可在柱子平衡时校正。有机组分的比例发生变化，所以吸收性质也随之变化。



通过在洗脱液A和B中使用不同浓度的具有紫外吸收的离子对试剂（或缓冲酸）来补偿基线漂移。具体的，根据它们紫外吸收的性质来平衡浓度以给出大体上平稳的基线。因为洗脱组分的吸光性质可能存在批次间差异，以及在不同运行间条件的差异，所以，不能给出一个特定的建议。如下的例子能够帮助说明原理：从水溶液的TFA到乙腈中的TFA通常需要乙腈中的TFA浓度比水中的低10-30%。平衡用的紫外吸收的组分的浓度应该根据经验确定。两种洗脱液中离子对试剂的浓度的差异通常不会高到足以反过来影响分离。通常的例子是在洗脱液A中0.065% TFA和洗脱液B中0.05%的TFA。

情况	原因	补救措施
柱子没有流出或流速降低	出口堵住了或者泵不工作	打开出口, 检查泵是否泄漏
	滤膜、柱子末端、适配器、管子或柱前堵住了,	除去并清洗, 如果可能的话替换掉。在使用前总是过滤样品和洗脱液。
柱子流速降低 在运行或随后运行过程中柱压升高	在柱子上发生了沉淀	遵循清洗步骤, 调节洗脱液来维持样品溶解度
	柱床被压缩了	重新填装柱子
在运行或随后运行过程中柱压升高	上样了混浊的样品	调节洗脱液提高样品稳定性, 比如增加有机修饰剂或调节pH
样品在梯度洗脱过程中并不被洗脱	pH导致沉淀	调节pH避免沉淀
	有机修饰剂的终浓度过低	增加洗脱液B中的有机修饰剂浓度
	有机修饰剂的洗脱能力过低	更换到疏水性更弱的反相层析柱或更换有机修饰剂
样品在梯度洗脱前就被洗脱	样品组分不够疏水	添加或增加离子对试剂的浓度, 或者使用洗脱能力弱些的有机修饰剂, 或者更换到疏水性更强的反相层析柱。
	pH不合适	调节pH增强结合
	杂质结合到了柱子上	清洗并重新平衡柱子
	起始洗脱液中的有机修饰剂浓度过高	降低有机修饰剂浓度
	柱子没有平衡好	重新平衡柱子
峰前沿长或峰形较圆	柱子过载了	降低样品上样量, 重复
	柱子污染了	用建议的方法清洗
峰形拖尾	柱子填装的不好	重新填装, 或使用预装柱
	样品在柱子上沉淀了	清洗柱子, 如果可能, 替换顶部滤膜或预处理柱
峰形拖尾或前沿很长	柱子被压缩了	检查柱效(见附录2), 用低流速填装, 使用预装柱
峰太小	样品不吸光	如果合适, 在监视器上检查吸光范围。如果令人满意, 使用另一波长。检查洗脱液组分的紫外吸光范围
	在层析前后使用了不同的检测条件 过分的峰展宽	对于所有的检测, 使用相同的条件 检查柱效, 如果需要, 重新填装柱子, 调节洗脱液来抑制硅烷醇的离子化, 或更换预处理柱, 如果必要, 更换柱子
分辨率不及预期	在柱子顶端或柱子后有大部分的混合空间	如果可能, 加高填料的上表面, 减少柱子后体积
	不合适的洗脱条件, 比如梯度过陡, 流速过高	改变洗脱条件, 使用缓的或平台式洗脱, 降低流速
	柱子填装的不好	检查柱效(见附录2), 如需要重新填装, 使用预装柱
	柱子过载了	清洗和重新平衡柱子, 降低样品上样量

	脂蛋白或蛋白质聚集体沉淀了	清洗和再平衡柱子，调节洗脱液来维持溶解性
	柱子老化了	调节洗脱液来改善离子抑制或更换预处理柱
		如果需要，更换柱子
	由于表面的硅烷醇导致混合模式滞留	降低pH抑制硅烷醇或更换柱子
	样品没有被合适的过滤	清洗柱子，过滤样品，重复
	选择性差	增加或调节离子对试剂，更换到其它填料。
样品不像预期的那样结合或洗脱	样品没有过滤	准备新鲜的样品
	柱子平衡不完全	重复或延长平衡步骤，直到基线稳定
	脂蛋白或蛋白聚集体沉淀了	清洗，再平衡柱子
	和先前的运行相比，不正确的洗脱条件（可能是洗脱液挥发了）	检查需要的条件，准备新鲜的溶液
填料/珠子出现在洗脱物中	柱子在过高的压力下工作	不要超过填料或柱子的建议限压
活力回收率低，但是质量回收率正常	样品可能在洗脱液中变性或失活了	确定样品的pH和有机溶剂稳定性。减少分离时间来限制在有机条件下暴露或更换到弱些的有机修饰剂或使用疏水性弱些的反相层析柱子
	酶和辅酶分开了，或类似的现象	通过从组分中取少量样品来重复检测
样品产量比预期的低	样品可能被蛋白酶或核酸酶降解了	加入抑制剂或使分离时间最小化
	在样品制备过程中吸附到滤膜上	使用另一种类型的滤膜
	样品沉淀了	降低样品上样量或改变洗脱条件
	碱性的样品组分通过离子相互作用结合在柱子上	增加pH或增加/调节离子对试剂的浓度
比上样到柱子上的样品获得了更多的活力	在层析步骤前后使用了不同的检测条件，	在所有检测过程中使用相同的条件
	分离过程中除去了抑制剂	
柱床中有气泡	洗脱液没有恰当的脱气	将缓冲液充分的脱气
	柱子在冷的条件下填装或储存，然后升温了	通过流过脱气的水来除去小气泡。如果洗脱液在冰箱里或冷冻室里储存，需格外小心。不要让柱子由于阳光照射或加热系统而升温。如果有可能重新填装柱子。
负峰	折射率指标效应	确认样品溶解在起始的洗脱液中
层析图中末期待的峰或突跃。空白	洗脱液不纯	是用高纯度的HPLC级别的试剂
洗脱时出峰		
空白洗脱时出峰	前一个样品的不完全洗脱	根据建议的方法洗涤柱子
层析中的突跃	紫外池有气泡被困住	总是使用脱气的洗脱液。 确保限流阀有一个正确的压力范围，用100%的甲醇润洗层析系统。
紫外吸光随梯度升高而升高	洗脱液A, B在同一波长吸光不同。	平衡洗脱组分或使用不同的波长。
	洗脱液不纯	使用高纯度的HPLC级别的试剂。

组分的滞留时间随时间的增长而增长。峰的宽度随时间的增长而增宽	由于表面的硅烷醇导致的混合模式滞留	降低pH来抑制硅烷醇或更换柱子
过分的基线噪音	洗脱液中组分有紫外吸光	监测不同波长的紫外吸收或降低紫外吸收组分的浓度（通常是离子对试剂）。如果是有机修饰剂的吸收，就更换它。

- $\mu$ RPC2/C18进行如肽谱和液质联用的高分辨分析性分离。
- 在AKTAdesign或其它的高效液相色谱系统上运行 $\mu$ RPC C2/C18柱子。附录3给出了如何选择最合适的层析系统的指南。

$\mu$ RPC C2/C18是多孔的，微颗粒的硅基填料（图78），颗粒大小是3微米，共价结合了C2/C18烷基配基。小颗粒大小确保了高柱效以有助进行如肽谱和液质联用的高分辨分析性分离。

如果需要，SOURCE RPC提供了在pH7.5以上工作的选择和能力。

## 纯化选项C C2/C18:对复杂样品的高分辨分离

### 使用 $\mu$ RPC



图78  $\mu$ RPC C2/C18以预装柱的形式提供。

表21 基于 $\mu$ RPC的反相层析填料

产品	每根柱子的动态结合容量*	最优分辨推荐的上样量	柱效 (Nm-1)	推荐的工作流速†	最大流速	最大操作背压‡ (MPa/psi) 1MPa=10bar
$\mu$ RPC C2/C18 SC 2.1/10 $\mu$ , 0.35ml	1-2mg 多肽	~0.5mg	>100000	0.01-0.25ml/min	0.25ml/min	25/3625
$\mu$ RPC C2/C18 ST 4.6/100, 1.6ml	4-9mg多肽	~2mg	>100000	0.1-1.2ml/min	1.2ml/min	35/5000
$\mu$ RPC C2/C18 ST 1.0/150, 120 $\mu$ l	0.3-0.6mg多肽	~150 $\mu$ g	无可用信息	25-50 $\mu$ l/min	62 $\mu$ l/min	31/4500
$\mu$ RPC C2/C18 ST 300 $\mu$ m/150, 11 $\mu$ l	30-60 $\mu$ g多肽	~15 $\mu$ g	无可用信息	5 $\mu$ l/min	5 $\mu$ l/min	31/4500

\*反相层析填料的动态结合容量取决于多种因素，包括目标分子的性质、介质的选择性和孔径、洗脱条件和流

速。

†使用的流速也取决于层析系统的压力特性、使用的溶剂和柱床高度。

#最大操作背压指超过这个压力填料开始收缩。

¶连接至ÄKTAdesign和其它高效层析系统时需要Column Holder 10cm (17-1550-01)。

- 为了最优的分辨率，将样品量和柱子大小匹配。
- 使用最长的柱子产生最高的分辨率。

## 分离案例

图79显示了高分辨反相层析用于肽质量指纹的使用案例。这个例子也说明了洗脱条件如何显著影响质谱分析所能达到的灵敏度。

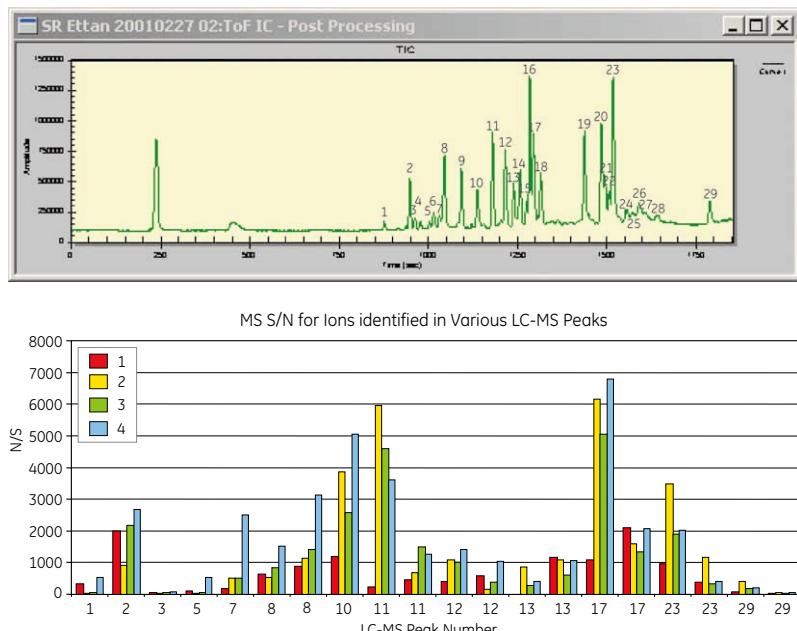


图79 多肽质量指纹：显示了一种经过胰酶消化的 $\beta$ -lactoglobulin的层析图。

## 进行分离

使用这些说明作为优化分离的基础。

洗脱液B应该包含相同浓度的离子对试剂和更高浓度的有机修饰剂，例如：

对于性质未知或已知需要酸性条件的样品：

洗脱液A：0.1% TFA，2%乙腈

洗脱液B：0.1% TFA，80%乙腈

对于已知需要碱性条件的样品：

洗脱液A：0.125% 的氨溶液，pH10, 2%乙腈

洗脱液B：80%的乙腈在溶液A中。

## 第一次使用或长期储存后使用

1. 用至少5倍柱体积的A液洗掉储存溶液。
2. 用5倍柱体积0-100%洗脱液B的梯度或一直使用100%洗脱液B来清洗柱子，直到紫外信号稳定。
3. 用2倍柱体积的100%-0的洗脱液B的梯度来洗涤柱子。

## 用梯度洗脱分离

流速：

0.5毫升/分钟（μRPC C2/C18 ST4.6/100）

0.5毫升/分钟（μRPC C2/C18 SC2.1/10）

50微升/分钟（μRPC C2/C18 ST1.0/150）

5微升/分钟（μRPC C2/C18 ST300um/150）

1. 用至少10倍柱体积的洗脱液A平衡柱子，直到紫外吸光值稳定。
2. 将样品溶解到小体积的洗脱液A中。如果需要，过滤或离心除去颗粒状物质。上样到柱子上。
3. 当紫外信号稳定，所有未结合的样品都流过柱子了，用10-20个柱体积0-100%洗脱液B的梯度洗脱。
4. 用至少5倍柱体积的100% 洗脱液B洗涤柱子（或直到紫外信号稳定）来洗脱任何未结合的物质。
5. 用2-3个柱体积的100%-0洗脱液B的梯度洗涤柱子。
6. 用10倍柱体积的洗脱液A重新平衡柱子或直到紫外信号稳定。



不要超过建议的柱子最大流速。



经常性的通过检查柱效和峰的对称性来检查柱子的性能，见附录2。

## 清洁

正确的样品和洗脱液制备，包括过滤，任何颗粒状物质的除去，最后用100% 洗脱液B的等浓度洗脱步骤应该能够保持柱子的良好状态。

然而，降低的性能，降低的流速。分辨率的下降，增加的压力或柱子完全的堵住都是填料需要用更强力的清洗过程以除去紧密结合的，沉淀的或变性的物质的表征。

建议在清洗过程中将流速反向，以便杂质不需穿过整个柱子。每次清洗步骤所需的柱体积和接触时间可以根据污染的程度而定。

接触时间，有机溶剂和pH对于成功的清洗来说是重要的参数。根据污染物性质的不同，可以开发不同的步骤或将其组合使用。

清洗步骤的例子如下：

洗脱液A: 0.1% TFA

洗脱液B: 0.1% TFA在80%的乙腈中

流速:

0.25毫升/分钟 ( $\mu$ RPC C2/C18 ST4.6/100)

0.25毫升/分钟 ( $\mu$ RPC C2/C18 SC2.1/10)

25微升/分钟 ( $\mu$ RPC C2/C18 ST1.0/150)

5微升/分钟 ( $\mu$ RPC C2/C18 ST300um/150)

1. 用至少10倍柱体积的洗脱液A平衡柱子，直到紫外吸光值稳定。
2. 用20-30个柱体积，0-100%洗脱液B的梯度洗涤柱子。
3. 用至少10个柱体积的100% 洗脱液B洗涤柱子。
4. 用20-30个柱体积，100%-0洗脱液B洗涤柱子。
5. 用至少10倍柱体积的洗脱液A洗涤柱子。
6. 如果在分离过程中需使用不同于步骤5的洗脱液A，用至少10倍柱体积的洗脱液A平衡柱子。如果两种洗脱液间的差别很大，应该用2-3个柱体积的梯度来更换缓冲液。

 如果柱效没有恢复，更换到在异丙醇中的0.1%TFA作为洗脱液B。注意，异丙醇会增加柱压，流速可能需要降低。

 更强劲的清洗:

1. 用10倍柱体积90%的乙酸洗涤柱子。
2. 立即用10倍柱体积的洗脱液A再平衡。不要将柱子保存在乙酸中！  
不要打开柱子。

## 填料性质

组成：多孔的微颗粒硅基，共价连接了C2/C18烷基链。

表22 μRPC C2/C18柱的性质

填料	配基	孔径	日常使用的温度 稳定性	pH稳定性*	平均颗粒尺寸
μRPC C2/C18	C2/C18烷基链	120Å	4°C到70°C	长期：2-8 短期：2-8	3μm

\*长期pH稳定指介质能够长时间稳定并且不会对层析效果产生不良的副作用的pH范围。

短期pH稳定指进行再生、柱上清洁和消毒过程的pH范围。

所有范围的估计都根据GE医疗集团的经验和知识。

## 化学稳定性

对于日常使用，μRPC在如下环境下稳定：

- 水相溶液，pH2-8，可含有TFA（最高0.3%），PFA（最高0.3%）HFA（最高0.3%），高氯酸（最高0.3%），甲酸（最高60%），乙酸（最高90%），乙酸铵（10-50mM），磷酸（10-50mM）。离子和非离子去垢剂，盐酸胍。
- 水溶性有机溶剂，包括甲醇，乙醇，乙腈，正丙醇，异丙醇。
- 离子对试剂，如三氟乙酸，三丁基磷酸，磷酸三乙胺，四丁胺盐，硫酸己烷。



注意，乙醇，正丙醇，异丙醇会产生高压力，流速需要降低。

避免氧化试剂以及低于2和高于8的pH。

## 储存

对于柱子储存，用至少5倍柱体积的70%甲醇或70-80%乙腈来洗柱子。溶液应该不具有任何其它如TFA的添加剂。储存在4度到30度。确保柱子被封好以避免流干。



不要保存在水相溶液中。

## SOURCE：快速高分辨分离，简单规模化放大

使用SOURCE反相层析填料，用于纯化和分析蛋白、肽和寡核苷酸。

- 当需要pH高于8或者不同的选择性或高载量时，使用SOURCE反相层析填料作为对硅基填料的补充。
- 在需要高流速和低压力的工业处理中使用SOURCE 30RPC作为精细纯化阶段。
- 在需要高分辨和高速度的大规模应用和实验室中，使用SOURCE15RPC用于精细纯化阶段（最高流速1800厘米/小时）。
- 使用SOURCE 5RPC 用于如肽谱和液质联用的高分辨分析性分离。



在ÄKTAdesign, FPLC系统, 和HPLC系统上运行SOURCE RPC柱子。附录3给出了如何选择最合适的ÄKTAdesign系统的指南。

SOURCE填料基于均一的, 刚性的聚乙烯本/联乙烯苯基质(图80)。填料显示出极端的化学和物理稳定性, 而且与硅基填料不同, 可以用于极端pH条件。一系列的颗粒大小(30微米, 15微米或5微米)使SOURCE 15 RPC可用于大规模纯化到高分辨分析。SOURCE介质的均一性和稳定性确保高流速和低压力。如此高流速对于加速清洗和再平衡步骤非常有用。流速更容易被可用的仪器和洗脱液所限制而不是填料本身。

分离方法可以简单的从预装的柱子比如RESOURCE和 SOURCE 15RPC ST4.6/100放大到大规模柱子, 比如FineLINE。



图80 SOURCE 15RPC的扫描电镜照片显示了其均一的尺寸分布。

#### 纯化选项

表23 基于SOURCE基质的反相层析填料提供有预装柱和散装的基质形式。

产品	每个柱子或每毫升填 料的动态结合容量*	推荐的工作流速†	最大流速†	最大操作背压 ‡ ( MPa / psi ) 1MPa=10bar
SOURCE 5 RPC ST 4.6/150, 2.5ml	~80mg杆菌肽	1ml/min	未检测	40/5800
SOURCE 15RPC ST 4.6/100, 1.7ml	~17mg BSA ~85mg胰岛素	0.5-2.5ml/min	5ml/min	4/580
SOURCE RPC, 1ml	~10mg BSA ~30mg杆菌肽 ~50mg胰岛素	1-5ml/min	10ml/min	4/580
SOURCE RPC, 3ml	~10mg BSA ~30mg杆菌肽 ~50mg胰岛素	1-5ml/min	10ml/min	4/580
SOURCE 15RPC	~10mg BSA ~30mg杆菌肽 ~50mg胰岛素	150-900cm/h	1800cm/h	4/580
SOURCE 30RPC	~14mg BSA ~23mg杆菌肽 ~72mg胰岛素	100-1000cm/h	2000cm/h	1.5/220

\*在10%的穿透，由前沿分析确定。反相层析填料的动态结合容量取决于多种因素，包括目的分子的性质、介质的选择性和孔径、洗脱条件和流速。这里给出的容量是在300cm/h的流速下使用0.1%的TFA确定的。

†直线流速 (cm/h) 和体积流速 (ml/min) 之间的相互转换见附录3。使用的流速也取决于层析系统的压力特性、使用的洗脱液以及柱床高度。

#最大操作背压指超过这一压力填料会开始收缩。

 在反相层析中，许多参数，比如蛋白的性质，流速和填料的选择性都在决定结合能力上扮演着重要角色。最终的载量必须通过实验来确定。

 使RESOURCE RPC 1毫升用作快速方法筛选和开发。转移至RESOURCE RPC 3毫升柱在10厘米柱床高度上进行更高分辨率的方法开发。

 如果需要，比如进行肽谱实验，使用SOURCE5RPC来获得最高分辨率。

表24 用于反相层析的SOURCE介质的填充体积和柱床高度。

	体积	柱床高度
Tricorn 10/100	最多8ml	最高10cm
Tricorn 10/150	最多12ml	最高15cm
Tricorn 10/200	最多16ml	最高20cm

选择如FINELINE之类的生产柱用作更大体积应用。

## 纯化案例

### 一个合成肽的捕获和纯化

图81显示合成的 $\beta$ 淀粉样蛋白1-42粗混合物的纯化和质谱分析结果。该肽从大的跨膜前体蛋白切割下来并能够多聚化形成刚性的，线性的，无分支的纤维，积累成为衰老斑块，并作为阿尔海默病的特征。 $\beta$ 淀粉样蛋白1-42被合成用于研究纤维形成的机制。然而，该肽在碱性条件下溶液溶解，但在传统反相层析纯化中使用的低pH下基本不溶。SOURCE填料广泛的pH稳定性适合这样的纯化挑战。

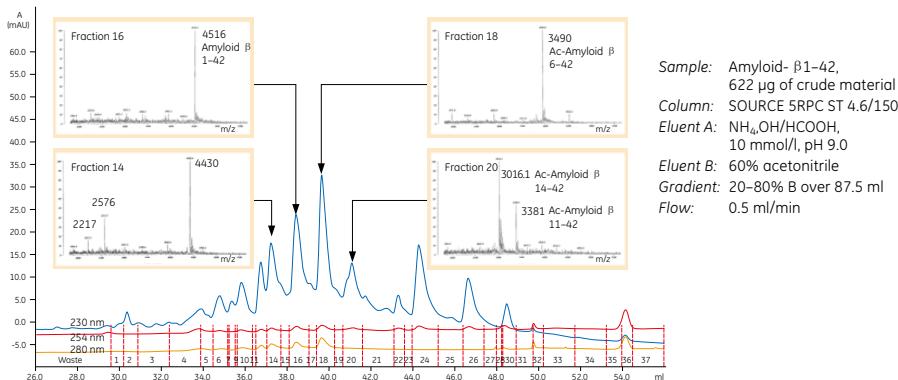


Fig 81.

图81 一种合成多肽的纯化和质谱分析

## 在高pH纯化

图82显示对beta-lipotropin 1-10 (分子量950, Sigma) 片断的成功纯化，使用高pH条件，pH12，这只能在基于多聚物的填料上实现。在pH2,杂质在beta-lipotropin的峰里洗脱。

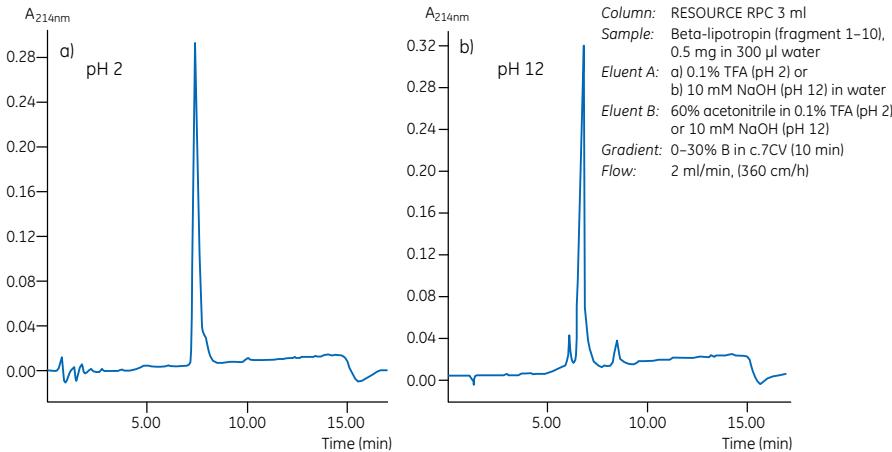
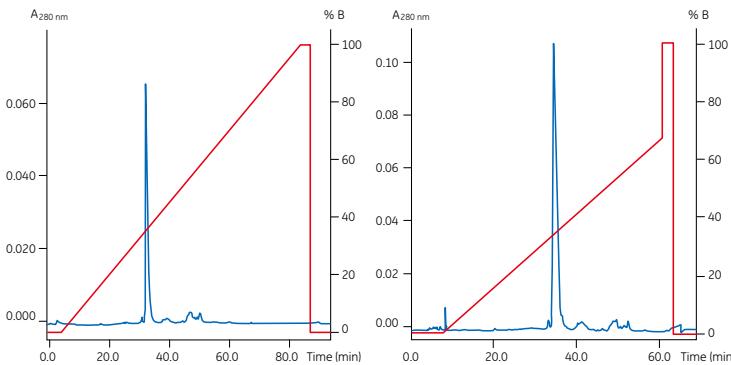


图82 高pH下的纯化。

## 精细纯化阶段和放大

图83显示了对酵母中表达的重组人上皮生长因子（EGF）的高分辨制备性分离。大多数杂质被起始在Phenyl Sepharose 6 Fast Flow上的疏水相互作用层析和随后的Q sepharose High Performance除去了。最后的精细纯化阶段在使用SOURCE15 RPC进行初试规模化放大前首先在RESOURCE 3毫升上进行优化。



Column: RESOURCE RPC 3 ml  
Sample: 2.14 ml EGF pooled from separation on Q Sepharose High Performance  
Eluent A: 0.05% TFA, 5% acetonitrile  
Eluent B: 0.05% TFA, 80% acetonitrile  
Gradient: 0-100% B in 40 CV  
Flow: 1.6 ml/min, (300 cm/h)

Column: SOURCE 15RPC, 35  $\times$  100 mm  
Sample: 62.5 ml EGF pool after Q Sepharose High Performance  
Load: 0.1 mg/ml media, 10 mg total load  
Eluent A: 0.05% TFA, 5% acetonitrile  
Eluent B: 0.05% TFA, 80% acetonitrile  
Gradient: 0-100% B in 40 CV  
Flow: 50 ml/min, (300 cm/h)

Fig 83. Preparative separation of a recombinant protein.

图83 一种重组蛋白的制备性分离。

## 规模化放大

图84显示了SOURCE30RPC优异的可放大性。填料容易被填装并在规模化过程中保持性能。模式蛋白混合物的分离可以以400的系数，从24毫升放大到10升的FineLINE200L柱子。

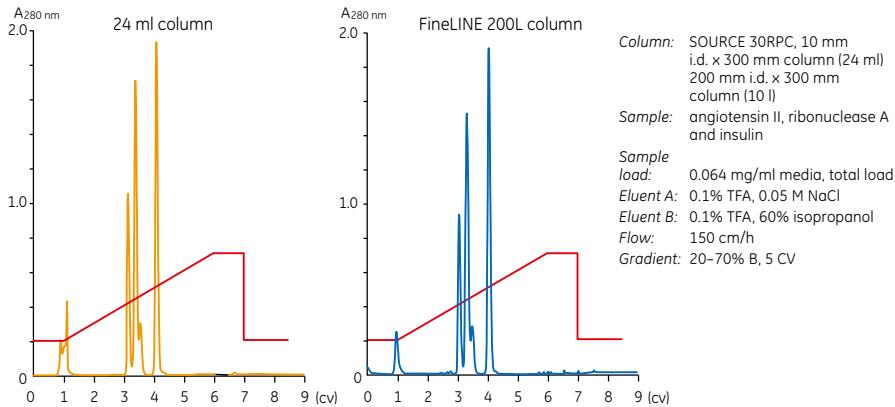


图84 SOURCE 30RPC的可放大性。

## 进行分离

使用这里给出的说明作为优化分离的基础

对于性质未或已知需要酸性条件的样品：

洗脱液A: 0.1% TFA, 2%乙腈

洗脱液B: 0.1% TFA, 80%乙腈

对于已知需要碱性条件的样品：

洗脱液A: 0.125% 的氨溶液, pH10, 2%乙腈

洗脱液B: 80%的乙腈在溶液A中。

## 第一次使用或长期储存后使用

- 用至少5倍柱体积的A液洗掉储存溶液。
- 用5倍柱体积0-100%洗脱液B的梯度或一直使用100%洗脱液B来清洗柱子，直到紫外信号稳定。
- 用2倍柱体积的100%-0的洗脱液B的梯度来洗涤柱子。

## 用梯度洗脱分离

流速:

0.2毫升/分钟 (SOURCE5RPC ST2.1/150 )

1毫升/分钟 (SOURCE5RPC ST4.6/150)

2毫升/分钟 (SOURCE15RPC ST4.6/100)

1-5毫升/分钟 (RESOURCE 1毫升)

1-5毫升/分钟 (RESOURCE 3毫升) 或对于更大的体积, 200厘米/小时 (SOURCE15RPC) 和100-1000厘米/小时 (SOURCE30RPC) 。

在整个分离过程中收集组分。

1. 用至少10倍柱体积的洗脱液A平衡柱子, 直到紫外吸光值稳定。
2. 将样品溶解到小体积的洗脱液A中。如果需要, 过滤或离心除去颗粒状物质。上样到柱子上。
3. 当紫外信号稳定, 所有未结合的样品都流过柱子了, 用10-20个柱体积0-100%洗脱液B的梯度洗脱。
4. 用至少5倍柱体积的100% 洗脱液B洗涤柱子 (或直到紫外信号稳定) 来洗脱任何未结合的物质。
5. 用2-3个柱体积的100%-0洗脱液B的梯度洗涤柱子。
6. 用10倍柱体积的洗脱液A重新平衡柱子或直到紫外信号稳定。

 不要超过建议的柱子最大流速。

 经常性的通过检查柱效和峰的对称性来检查柱子的性能, 见附录2。

## 清洗

正确的样品和洗脱液制备, 包括过滤, 任何颗粒状物质的除去, 最后用100% 洗脱液B的等浓度洗脱步骤应该能够保持柱子的良好状态。

然而, 降低的性能, 降低的流速。分辨率的下降, 增加的压力或柱子完全堵住都是填料需要用更强烈的清洗过程以除去紧密结合的, 沉淀的或变性的物质的表征。

 建议在清洗过程中将流速反向, 以便杂质不需穿过整个柱子。每次清洗步骤所需的柱体积和接触时间可以根据污染的程度而定。如果清洗步骤没有恢复柱子性能, 在尝试使用其它清洗方法前更换顶部滤膜。当更换滤膜时需小心, 因为这可能会影响柱子填装进而影响性能。

接触时间, 有机溶剂和pH对于成功的清洗来说是重要的参数。根据污染物性质的不同, 可以开发不同的步骤或将其组合使用。

清洗步骤的例子如下:

洗脱液A: 0.1% TFA

洗脱液B：0.1% TFA在80%的乙腈中

注意：乙腈不能用于生物处理应用，异丙醇可作为替代。

流速：

0.5毫升/分钟 (SOURCE5RPC ST4.6/150)

0.5毫升/分钟 (SOURCE15RPC ST4.6/100)

1.0毫升/分钟 (RESOURCE 1毫升)

1.0毫升/分钟 (RESOURCE 3毫升) 或对于更大的体积, 100厘米/小时 (SOURCE15RPC) 和100厘米/小时 (SOURCE30RPC) 。

1. 用至少10倍柱体积的洗脱液A平衡柱子, 直到紫外吸光值稳定。
2. 用20-30个柱体积, 0-100%洗脱液B的梯度洗涤柱子。
3. 用至少10个柱体积的100% 洗脱液B洗涤柱子。
4. 用20-30个柱体积, 100%-0洗脱液B洗涤柱子。
5. 用至少10倍柱体积的洗脱液A洗涤柱子。
6. 如果在分离过程中需使用不同于步骤5的洗脱液A, 用至少10倍柱体积的洗脱液A平衡柱子。如果两种洗脱液间的差别很大, 应该用2-3个柱体积的梯度来更换缓冲液。

 如果柱效没有恢复, 更换到在异丙醇中的0.1%TFA作为洗脱液B。注意, 异丙醇会增加柱压, 流速可能需要降低。

 对于除去已知能溶于酸或碱的杂质, 可以使用如下的洗脱液, 遵循上面的同样的步骤:

除去溶于酸的杂质:

洗脱液A: 90%乙酸

洗脱液B: 80%乙腈或50%异丙醇

除去溶于碱的杂质:

洗脱液A: 0.5M 氢氧化钠

洗脱液B: 50%乙腈或50%异丙醇

 如果对于酸溶和碱溶杂质的方案都不成功, 用6M盐酸胍洗涤5-10个柱体积。

 SOURCE RPC介质能够用强力的化学试剂清洗, 因为聚苯乙烯基的基质极端稳定。氢氧化钠是一种非常有效的清洗试剂, SOURCE RPC可以用几个柱体积的0.5-1.0M 氢氧化钠清洗。使用如此强力的清洗试剂是使用SOURCE RPC作为大规模分离的优势。在生产规模, 可以应用其它的清洗方案来满足可调整的需要。

## 填料性质

组成: 刚性的, 均一的聚乙烯/联乙烯苯颗粒 (5微米, 15微米或30微米) 具有良好的孔径分布。

表25 SOURCE RPC介质的填料性质。

产品	日常使用的温度稳定性	pH稳定性*	平均颗粒尺寸
SOURCE 5RPC	4°C到60°C	长期: 1-12	5μm
		短期: 1-14	
SOURCE 15RPC	4°C到40°C	长期: 1-12	15μm
		短期: 1-14	
SOURCE 30RPC	4°C到40°C	长期: 1-12	30μm
		短期: 1-14	

\*长期pH稳定指介质能够长时间稳定并且不会对层析效果产生不良的副作用的pH范围。

短期pH稳定指进行再生、柱上清洁和消毒过程的pH范围。

所有范围的估计都根据GE医疗集团的经验和知识。

## 化学稳定性

对于日常使用, SOURCE RPC在如下溶液中稳定:

- 所有日常使用的缓冲液: 1M盐酸, 1M氢氧化钠, 1M盐酸/90%甲醇, 90%乙酸, 0.45M 氢氧化钠/40% 异丙醇, 6M盐酸胍, 正丙醇, 20%乙醇, 丙酮。
- pH1-12的水溶液, 可含有TFA (最高0.3%), PFA (最高0.3%) HFA (最高0.3%), 高氯酸 (最高0.3%), 甲酸 (最高60%), 乙酸 (最高90%), 乙酸铵 (10-50mM), 磷酸 (10-50mM)。
- 水溶性有机溶剂, 包括甲醇, 乙醇, 乙腈, 正丙醇和异丙醇。
- 离子对试剂, 如三氟乙酸, 三丁基磷酸, 磷酸三乙胺, 四丁胺盐, 硫酸己烷。
- 注意, 乙醇, 正丙醇, 异丙醇会产生高压力, 流速需要降低。
- 避免氧化试剂以及低于1和高于12的pH。

## 储存

SOURCE 5RPC柱: 用70%的乙腈洗涤。SOURCE15RPC和SOURCE30RPC柱: 用至少10倍柱体积的蒸馏水洗涤, 用至少10倍柱体积20%的乙醇或70%的乙腈来平衡。注意, 用于生物处理应用的柱子只能储存在20%乙醇中。

保存在4°C到30°C间, 确认柱子密封良好来避免流干。将未使用的填料保存在4°C到8°C间的20%乙醇中, 不要冻上。

## 反相层析和CIPP

反相层析可以在活力和四级结构回收不重要的情况下, 对于复杂混合物给出极高的分辨率的分析性分离。反相层析有高分辨纯化的能力, 也具有低分辨脱盐的能力。在纯化步骤中, 当在大部分杂质已经被除去, 而需要高分辨的分离相似组分时, 反相层析最适合精细纯化阶段。关于

将CIPP应用于纯化的策略请参见第二章。

## 反相层析作为捕获步骤

反相层析是适合捕获合成肽和合成寡核苷酸的方法。但是不太适合从生物来源中捕获肽和蛋白，因为脂和其它极度疏水组分结合很紧，会影响目的分子的动态载量，而且很难从柱子上除去。颗粒大小在90微米以上的离子交换层析和疏水相互作用层析更加适合。

### 反相层析作为中度纯化

当分离相似组分更加重要，并且精力将集中于分辨率和回收率，来将目的分子和大多数例如其它蛋白、肽、核酸、内毒素和病毒分开的时候，反相层析可以适合中度纯化

## 反相层析作为精细纯化

精细纯化用来除去痕量的污染物和杂质，而将纯化的生物分子保持在一种合适于使用的形式。目的是在少于两步中以高收率获得100%的纯度。反相层析优异的分离能力使它成为处理轻微的结构变体（二体，寡聚体，聚集物，氧化氨基酸，蛋白酶切后的分子，脱氨基氨基酸）和其他的微观不均一性的首选方法。使用反相层析作为精细纯化的例子如图83。

### 反相层析用于鉴定和性质确定-多维液相色谱（MDLC）

CIPP 策略适合纯化目的蛋白或肽。然而，层析技术也可以组合来达到对通常存在于复杂混合物中的未知蛋白的鉴定和性质确定。多维液相色谱和质谱是蛋白质组学中用于蛋白鉴定和性质确定的最快的，最准确的解决方案，反相层析是该过程中关键的技术。随着肽混合物变得更加复杂，需要更多的努力来获得单独肽的良好分离。结果，达到了一个所有肽不能单独被反相层析这一项技术分离的地步。一个色谱单峰包含了多于一个的肽。质谱在每次扫描过程中可以检测很多肽，即使它们没有被层析技术分离。然而，有些情况下，对于非常复杂的样品，比如血浆酶解物和组织裂解物，反相层析在分离肽的能力上有着显著的局限。色谱峰中可能含有太多种的肽以至于质谱不能把它们都检测到。样品可能含有的有价值的信息会丢失。

多维液相色谱通过串联使用两个或更多的层析分离技术来克服用一维色谱分离复杂样品的局限。

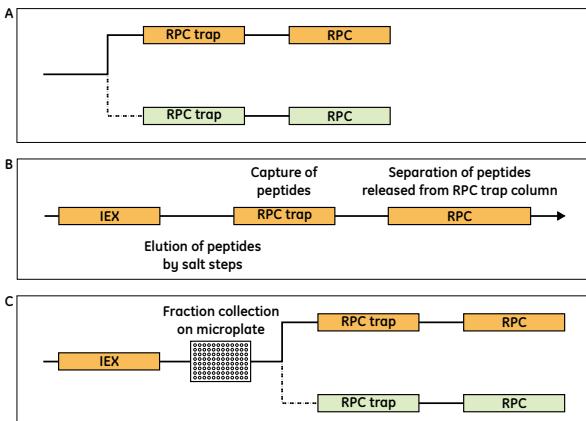


图85 不同方法的示意图：(A) 高通量 (B) 在线盐逐步梯度注射 (C) 离线分级

图85说明了技术如何组合来获得对复杂肽混合物更大程度分离的例子。离子交换层析和反相层析可以在单独的自动的方法中使用或者在第一维离子交换层析后，第二维反相层析前离线收集。

在线或离线多维液相色谱的原理是相同的：样品被上样到强阳离子交换层析，并被通过逐步增加盐的浓度或梯度洗脱分离成为一些组分。这些盐组分被分别的用捕获柱捕获和脱盐，然后用乙腈梯度在反相层析上洗脱，并被质谱检测。多蛋白样品内在的复杂性被通过将样品在到达质谱前分离为不同组分而降低。结果，与一维色谱相比，在同一时间有少些的肽被呈现给质谱，这导致鉴定到肽的可能性提高了。

## 附录1 样品制备

用于层析纯化的样品应当比较干净并且不含颗粒物。开始纯化前对样品进行简单地净化能够避免堵塞柱子，减少严格的清洗过程，并能延长层析介质的寿命。

样品的提取过程和缓冲液、添加剂以及去污剂的选用主要取决于材料的来源、目的分子的稳定性、所用的层析技术以及产品的计划用途。这些话题主要在《蛋白纯化手册》中有所讨论，特异性针对不同目的分子的介绍见GE医疗集团的《重组蛋白手册》、《蛋白扩增和简单纯化》和《抗体纯化手册》。

## 样品的稳定性

大部分情况下样品都需要在纯化后保留其生物学活性。在纯化过程中保留目的分子的活性具有很大优势，因为对目的分子的检测通常依赖于其生物活性。样品成分的变性通常会导致沉淀或增强非特异吸附，这些都会影响柱子的功能。因此检测样品的稳定极限并且在纯化过程中保持样品在稳定极限范围内将具有众多优势。

蛋白质通常具有高度的三级结构，由范德华力、离子和疏水作用以及氢键维持。任何能够破坏这些作用力的条件都可能导致变性或沉淀。相反，多肽具有比较低级的三级结构，它们的天然状态由二级结构决定，主要由氢键维持。因此，多肽通常能够比蛋白质耐受更广泛的条件。这些在天然结构上的基本区别也体现在蛋白质通常不容易被复性而多肽经常能够同时复性。



建议在开发纯化步骤前进行稳定性测试，下述步骤可以作为这种测试的基础：

- 以一个pH单位为步长在pH2到pH9之间检测pH稳定性。
- 以0.5M为步长用0-2M NaCl和0-2M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>检测盐稳定性。
- 以10%为步长在0%和50%之间检测对于乙腈和甲醇的稳定性。
- 以10°C为步长在4°C到40°C之间检测温度稳定性。

## 样品净化

离心和过滤是样品净化的标准实验室技术，在处理小量样品时经常使用。



推荐在层析纯化过程之前离心和过滤任何样品。

### 离心

离心能够除去脂类和颗粒物，如细胞碎片。如果样品在离心之后仍未澄清，可使用滤纸或5微米的滤膜作为第一步过滤，之后用下述的滤膜进行第二步过滤。

- 对于小体积样品或能够吸附滤膜的蛋白，10000×g离心15分钟。
- 对于细胞裂解物，40000-50000×g离心30分钟。
- 血清样品可在离心后用玻璃纤维过滤以除去可能存在的脂类。

### 过滤

过滤能够除去颗粒物。非特异吸附蛋白最少的滤膜由醋酸纤维素或PVDF组成。

对于层析前的样品制备，选择适合层析介质颗粒尺寸的滤器孔径。

表26 基于介质颗粒尺寸的滤器孔径

滤膜的表观孔径	层析介质的颗粒尺寸
1μm	90μm及以上
0.45μm	30或34μm
0.22μm	3、10、15μm或者需要超清样品或过滤除菌时



在测试运行中检测目的蛋白的回收率。有些蛋白可能会非特异地吸附在滤膜表面。

### 脱盐

脱盐柱适用于任何体积的样品，并且能够在将样品转移至正确的缓冲液条件时一步迅速除去小

分子量杂质。仍旧建议在样品脱盐之前进行离心或过滤。更换缓冲液和脱盐的详细过程见第136页。

在实验室规模下，如果样品在离心或过滤之后已经足够澄清，可以不用更换缓冲液和脱盐。对于亲和层析和疏水相互作用层析，调节样品的pH值可能就足够了，如果需要的话可以进行稀释以降低溶液的离子强度。

- 迅速处理少量或大量体积的样品。如果需要，可在纯化之前或纯化过程中进行（注意额外步骤会降低产量，而且脱盐也会使样品稀释）。
- 去除分子量大于5000的蛋白中的盐。
- 如果需要使用挥发性溶液，使用100mM的醋酸铵或100mM的碳酸氢铵。

## 特定的样品制备步骤

如果已知粗样品中含有脂类、脂蛋白或酚红等可能结合柱子的污染物或一些显著的杂质如大量蛋白等，则需要特殊的步骤将它们在层析之前除去。

### 分级沉淀

分级沉淀经常在实验室规模中用于从小体积样品中除去大量杂质，在小规模商业化生产中也偶尔使用。沉淀的方法是根据不同组分的溶解度不同从而进行分离。例如，由于不同蛋白样品的疏水程度不同，提高盐浓度能够增强蛋白之间的疏水作用而导致沉淀。分级沉淀能够在三种不同方式下去除大量杂质，如图86所示。

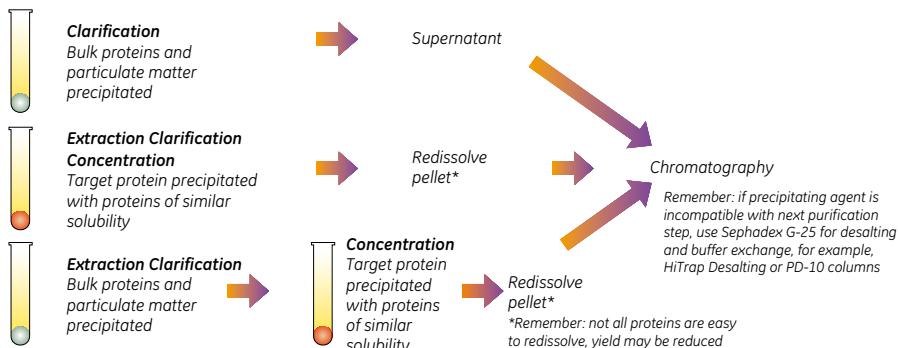


图86 使用沉淀的三种方法。

沉淀剂总结在表27中。稍后详细介绍最常用的硫酸铵沉淀方法。

表27 沉淀技术举例。

沉淀剂	典型使用的沉淀条件	样品类型	评论
硫酸铵	描述见下	>1mg/ml蛋白，尤其是免疫球蛋白	稳定蛋白，没有变性，上清可以直接用于疏水相互作用层析，可以有助于减少脂含量。
硫酸葡聚糖	每毫升样品加入0.04ml 10%硫酸葡聚糖和1ml 1M氯化钙混合15分钟，10000×g离心，弃去沉淀。	样品具有高水平的脂蛋白，比如腹水	沉淀脂蛋白
聚乙烯基吡咯烷酮	加入3% (w/v)，搅拌4h，17000×g离心，弃去沉淀。	样品具有高水平的脂蛋白，比如腹水	硫酸葡聚糖的替代方法。
聚乙二醇 (PEG, 分子量高于4000)	最多20% (w/v)	细胞浆蛋白	无变性，上清直接上样到离子交换层析或亲和层析。完全除去可能会比较困难。稳定蛋白。
丙酮 (冷)	最多80% (v/v) 在0°C。全速离心后在EP管中收集沉淀，		可能不可逆地变性蛋白。对于沉淀肽和浓缩样品电泳有用。
聚乙烯亚胺	0.1% (w/v)		沉淀聚集的核蛋白。
硫酸鱼精蛋白	1% (w/v)		沉淀聚集的核蛋白。
硫酸链霉素	1% (w/v)		沉淀核酸
正辛酸	(X/15) g X=样品体积	抗体浓度应该大于1mg/ml	从血清或腹水中沉淀大部分蛋白。把免疫球蛋白留在溶液中。

细节从此处摘录: Scopes R.K.著, 《蛋白纯化, 原理与实践》, Springer出版社, 1994年出版。J.C. Janson 和 L. Rydén著, 《蛋白纯化, 原理, 高分辨方法和应用, 第二版》Wiley Inc出版社, 1998年出版。  
个人间交流。

## 硫酸铵沉淀



硫酸铵可能会损坏某些蛋白。加入硫酸铵晶体时应小心：局部浓度过高可能会造成不需要的蛋白沉淀。



对于常规可再生的纯化过程，可以避免使用硫酸铵沉淀以利于层析。



通常沉淀对于浓度低于1mg/ml的蛋白几乎无效。

沉淀所需溶液：

饱和硫酸铵溶液（在100ml蒸馏水中加入100g硫酸铵，搅拌溶解）。

1M Tris-HCl, pH 8.0

用于第一步纯化的缓冲液。

- 过滤 (0.45μm) 或离心样品 (4°C 10000×g)。
- 每10倍体积的样品中加入一倍的1M Tris-HCl, pH 8.0以维持pH值。

3. 温和搅拌。逐滴加入硫酸铵溶液，最高至50%饱和度\*。搅拌1小时。
  4. 10000×g离心20min。
  5. 去除上清，用等体积相同浓度的硫酸铵溶液（如不能溶解沉淀也不会造成进一步沉淀的溶液）洗涤重悬沉淀两次。再次离心。
  6. 使用少量体积后面步骤所需的溶液溶解沉淀。
  7. 硫酸铵在净化/更换缓冲液步骤中使用脱盐柱与SephadexTM G-25一起除去。
- \*饱和度百分数可改变以适应于沉淀目的分子或者杂质。

不同温度时达到给定饱和度所需的硫酸铵的量也不同。表28给出了20°C时所需的量。

表28 20°C时达到给定饱和度所需的硫酸铵的量。

起始饱和度	所要达到的最终饱和度																
	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
20°C时每升溶液所需加入的硫酸铵的量（克）																	
0	113	144	176	208	242	277	314	351	390	430	472	516	561	608	657	708	761
5	85	115	146	179	212	246	282	319	358	397	439	481	526	572	621	671	723
10	57	86	117	149	182	216	251	287	325	364	405	447	491	537	584	634	685
15	28	58	88	119	151	185	219	255	293	331	371	413	456	501	548	596	647
20	0	29	59	89	121	154	188	223	260	298	337	378	421	465	511	559	609
25		0	29	60	91	123	157	191	228	265	304	344	386	429	475	522	571
30			0	30	61	92	125	160	195	232	270	309	351	393	438	485	533
35				0	30	62	94	128	163	199	236	275	316	358	402	447	495
40					0	31	63	96	130	166	202	241	281	322	365	410	457
45						0	31	64	98	132	169	206	245	286	329	373	419
50							0	32	65	99	135	172	210	250	292	335	381
55								0	33	66	101	138	175	215	256	298	343
60									0	33	67	103	140	179	219	261	305
65										0	34	69	105	143	183	224	267
70											0	34	70	107	146	186	228
75												0	35	72	110	149	190
80													0	36	73	112	152
85														0	37	75	114
90															0	37	76
95																0	38

## 蛋白沉淀的重新溶解

多数蛋白质都可用少量随后用于层析步骤中的溶液重新溶解。但对于溶解性较低的蛋白可能需要变性剂。蛋白不同其情况也有所不同。为保证蛋白的完全复性和质量及活性最大程度的还原，这些试剂必须除去。纯化过程中层析步骤经常能去除变性剂。表29给出了常用变性剂的实例。

表29

变性剂	使用的典型条件	去除/评论
尿素	2M-8M	用Sephadex G-25去除
	3M-6M	用Sephadex G-25或在EX过程中去除
Triton X-100	2%	用Sephadex G-25或在EX过程中去除
十二烷基肌氨酸钠	1.5%	用Sephadex G-25或在EX过程中去除
正辛基葡萄糖苷	2%	用Sephadex G-25或在EX过程中去除
十二烷基硫酸钠 (SDS)	0.1%-0.5%	在第一步层析中用非离子去污剂交换，避免阴离子交换层析
碱性pH	>pH 9, NaOH	为维持溶解性在层析过程中可能需要调节pH值

细节从此处摘录: Scopes R.K.著, 《蛋白纯化, 原理与实践》, Springer出版社, 1994年出版。J.C. Janson 和 L. Rydén著, 《蛋白纯化, 原理, 高分辨方法和应用, 第二版》Wiley Inc出版社, 1998年出版, 以及其它资料。

## 更换缓冲液和脱盐

文献中经常提到用透析方法除去盐或其它小分子, 以及更换样品的缓冲液成分。但透析通常是一种比较慢的方法, 需要很大体积的缓冲液。在处理过程中或由于蛋白水解被分解或者与透析膜非特异性结合, 都可能造成样品损失。一种简单迅速的方法是使用填充有Sephadex G-25的脱盐柱, 能够在高分子量和低分子量物质中进行组分离, 将蛋白与盐和其它一些小分子成分分开。

用一种简捷的步骤将样品脱盐并转移至一种新的缓冲液中, 同时除去低分子量物质。

脱盐柱不仅用于除去盐成分等一些小分子量杂质, 也用于在不同层析步骤之前或之后更换缓冲液成分, 以及为终止反应而迅速去除某些试剂。

脱盐柱能处理至多达到柱体积30%的样品体积。只要在正常水溶液中蛋白的浓度不超过70mg/ml, 样品的浓度就不会影响分离效果。样品应当充分溶解, 可离心或过滤以除去颗粒物。

对于小量体积的样品, 可能需要将样品用在层析纯化中所使用的起始缓冲液稀释, 但必须除去细胞碎片和颗粒物。

为避免可能的离子作用, 建议在脱盐过程中和最终的样品缓冲液中加入低浓度的盐(25mM NaCl)。

如果不能使用NaCl, 可使用挥发性溶液如100mM醋酸铵或100mM碳酸氢铵。

图87显示了一种典型的溶液更换和脱盐分离, 通过UV吸收和电导率的变化进行监测。

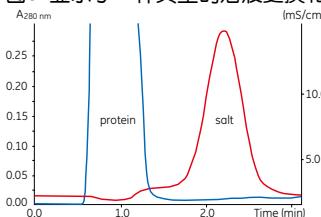


Fig 87. Buffer exchange of mouse plasma (10 ml) on HiPrep 26/10 Desalting.

图87 在HiPrep 26/10脱盐柱上更换小鼠血浆的缓冲液。

对于实验室规模的操作，表30给出了预装即用型脱盐柱和更换缓冲液柱的选择指南。

表30 脱盐和更换缓冲液的选择指南。

柱子	样品体积	样品洗脱体积
MicroSpin™ G-25	0.1-0.15ml	0.1-0.15ml
PD-10（重力流柱）	1.5-2.5ml	2.5-3.5ml
HiTrap Desalting 5ml	0.25-1.5ml	1.0-2.0ml
HiPrep 26/10 Desalting	2.5-15ml	7.5-20ml

对于较大体积样品：

--为增加样品体积容量可将最多5个HiTrap Desalting 5ml柱串联使用。例如，2个柱子串联，样品体积为3ml；5个柱子样品体积为7.5ml。

--为增加样品体积容量可将最多4个HiPrep 26/10 Desalting柱串联使用。例如，串联2个柱子样品体积为30ml，4个柱子样品体积60ml。即使串联4个柱子，也可在室温水溶液中20-30分钟内处理完样品。

每种柱子都提供有说明，每个样品可在5分钟内完成脱盐和缓冲液更换，并且对大多数蛋白来说可获得超过95%的回收率。

#### 替换方案1：用注射器和HiTrap Desalting 5ml柱手动脱盐

1. 将注射器或泵管装满缓冲液，移开塞子。将柱子连接在注射器（通过连接器）上，为避免将空气引入柱子，连接过程中要始终保持有水存在。
2. 划掉柱子出口的封口。
3. 用25ml缓冲液以5ml/min的速度洗涤柱子以完全去除存储液，存储液含有20%的乙醇。如果柱中留有空气，用去除气体的缓冲液洗涤直到空气消失。在加样品过程中因意外引入柱中的空气不影响分离。
4. 使用2-5ml的注射器以1-10ml/min之间的流速加样品，弃去柱子中流出的液体。
5. 如果样品体积少于1.5ml，换用缓冲液，继续注射直到总体积达到1.5ml，弃去流出液。
6. 选用表31所示合适体积的缓冲液洗脱蛋白。用指定的体积收集脱盐后的蛋白。

注意：5ml/min相当于使用HiTrap 5ml柱时约每分钟120滴。

可使用简单的蠕动泵加样品和溶液。



建议样品体积最多为1.5ml。减少上样到柱子的样品体积所产生的效果见表31所示。



可使用简单的蠕动泵加样品和溶液。

表31 使用注射器或Multipipette™推荐的样品和洗脱体积。

样品上样体积ml	加入缓冲液ml	洗脱和收集体积ml	产率%	残留的盐%	稀释倍数
0.25	1.25	1.0	>95	0.0	4.0
0.50	1.0	1.5	>95	<0.1	3.0
1.00	0.5	2.0	>95	<0.2	2.0
1.50	0	2.0	>95	<0.2	1.3

## 替换方案2：使用ÄKTAprime Plus简单脱盐

ÄKTAprime Plus含有为单独的HiTrap Desalting 5ml 和HiPrep 26/10 Desalting柱预先设好的程序模板。



### 准备缓冲液

准备至少500ml所需的溶液

1. 按照ÄKTAprime Plus提示卡的指示连接柱子并向系统中加入溶液。
2. 选择应用模板。
3. 开始方法。
4. 输入样品体积并按OK。

图88显示了一个由ÄKTAprime Plus获得的典型结果。UV（蛋白）和电导（盐）跟踪使得脱盐的组分得到聚集。

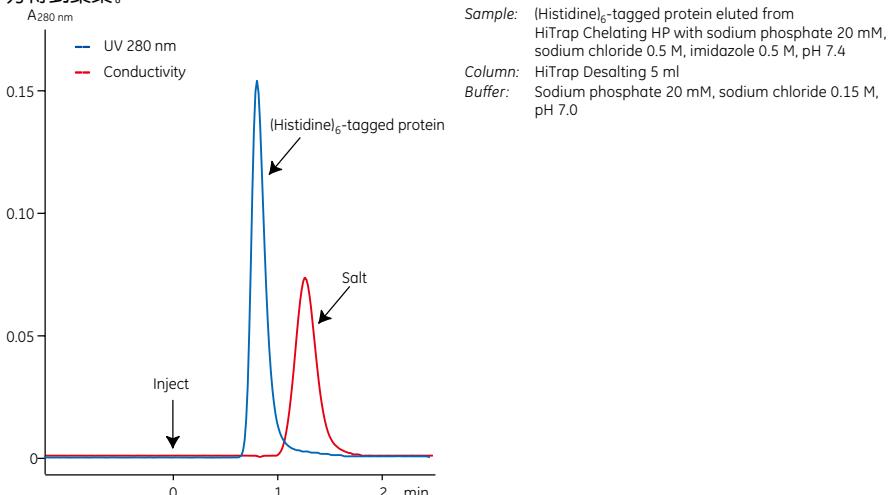


图88 一种带有六个组氨酸标签的蛋白在ÄKTAprime Plus上的脱盐。

## 除去脂蛋白

脂蛋白和其它脂类成分能够迅速堵塞层析柱，建议在开始纯化之前将它们除去。建议使用在分级沉淀中介绍的沉淀剂如硫酸葡聚糖和聚维酮除去腹水等样品中高含量的脂蛋白。

-  将样品离心可避免目的分子非特异结合到滤膜上的风险。
-  诸如血清之类的样品可用玻璃棉过滤—除去残留的脂类。

## 除去酚红

酚红在实验室规模的细胞培养中经常被用作pH指示剂。酚红虽然不会直接干扰纯化过程，但它可能会与某些纯化基质结合，因此应当尽早除去以避免污染。已知在 $\text{pH} > 7$ 时酚红能够与阴离子交换介质结合。

-  使用脱盐柱同时除去酚红（分子量很小）并能将样品转移到后续纯化所需的合适的缓冲液中，见缓冲液更换和脱盐中的介绍。

## 除去小分子量杂质

-  如果样品中小分子量的杂质含量较高，可在第一步层析纯化步骤之前使用脱盐柱，见缓冲液更换和脱盐中的介绍。

## 附录2 填充和制备柱子

GE医疗集团提供的预装柱能够保证高效、可重复的结果。

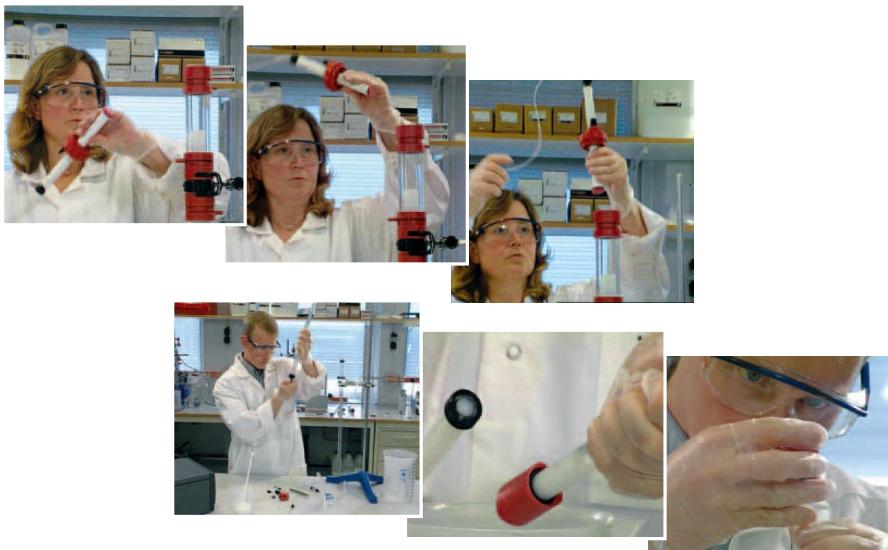


在方案开发阶段，使用小的预装柱筛选介质并优化方法以提高效率。例如HiTrap HIC Selection Kit、RESOUCE HIC Test Kit和RESOUCE RPC柱子。

有效填充柱子对于达到较好的分离效果尤其在使用梯度洗脱时非常重要，未能填充好的柱子将会导致不均衡的流速、峰宽和分辨率的降低。如果需要填充柱子，下述指导适用于所有规模的操作：

- 当需要使用结合技术时，使用短而粗的柱子（通常柱床高度为5到15厘米）用于快速纯化，即使线形流速低。
- 所需的基质取决于基质的结合能力和样品量。基质的结合能力通常受基质本身和样品疏水性的影响，因此必须凭经验确定。首先估计结合目标样品所需的基质量，使用五倍的量填充柱子。如果分辨率符合要求则可减少所用的基质量。
- 一旦确定了分离常数，可以通过增加柱子的直径以增大其体积将纯化体系放大，而不能增加柱子的高度因为这样会改变分离条件。

疏水相互作用层析介质可以填充在GE医疗集团提供的Tricorn或XK柱子中。SOURCE RPC可填充在同样由GE医疗集团提供的Tricorn或HR柱子中。逐步填充的示范见以CD形式提供的“柱子填充影片”（见订购信息）。



1. 分离时将所有材料平衡至所需的温度。
  2. 用所需溶液冲洗柱子底端以赶除气泡，确定柱网下没有气泡。关掉柱子出口，在柱管中留下1到2厘米的缓冲液。
  3. 温和重悬基质。

注意GE医疗集团提供的疏水相互作用层析基质可以直接使用，不需要为防止柱子堵塞而除去微小杂质。

禁止使用磁珠以免破坏介质。
  4. 根据建议，估计需要的悬浊液（重悬的基质）总量。
  5. 加入所需体积的混合物至柱子中，使用玻璃棒引流可以避免出现气泡。
  6. 立即将缓冲液装满柱子。
  7. 装入柱子顶部部件，并将柱子连接到泵上。
  8. 打开柱子出口，设定泵的流速。

若混合物体积大于柱体积，则应另外连接一个储存用的玻璃柱（详见订购信息）。这样使得混合物在填充时的直径维持恒定，从而减少紊流并提高柱子的填充状态。

如果不能达到所需的流速，则使用泵能承受的最大流速。

不要超过基质或柱子的最大操作压力。
  9. 达到柱床高度后继续维持至少3倍柱体积的填充流速，在柱子上标记柱床高度。

在任何纯化过程中的流速都不能超过填充流速的75%。
  10. 关闭泵和柱子出口，移除上盖加入缓冲液充满柱子使之产生向上的凸面。
  11. 将接头以一定角度插入柱子中，确保在网下无气泡。
  12. 将接头沿柱子向下滑行（打开接头的出口）直到标记的位置，锁上接头。
  13. 将柱子与泵连接开始平衡柱子，可根据需要改变接头的位置。
-  基质必须彻底清洗以除去贮存液（通常为20%的乙醇），少量的乙醇会影响后续的实验。
-  使用含抗微生物剂的无菌PBS缓冲液平衡的柱子可以在4°C保存一个月以上，但通常需要按照产品要求的特殊方法保存柱子。

## 选择柱子

Tricorn和XK柱完全符合现代基质所能达到的高流速要求，且有较宽范围的尺寸可供选择。每种疏水相互作用层析基质最适合填充的柱子列表在柱子填充选择之后（第3章）。多数情况下所需的柱子大小由基质的结合能力和需要纯化的样品量决定，所有柱子的列表信息参考GE医疗集团的目录。

## 柱子填充和柱效

柱效通常用每米层析床的理论塔板数（N）或每个塔板的柱床长度H（理论塔板高度，HETP）表

示。柱效与色谱柱上峰宽度的增加有关，因此可用下面的表达式计算：

$$N=5.54 \times \left( \frac{V_e}{W_h} \right)^2$$

$V_e$ =从样品起始直到峰出现最大值所用的洗脱体积。

$W_h$ =峰宽，为峰高一半处记录的峰的宽度。

H用下述表达式计算：

$$H=\frac{L}{N}$$

L=填充的柱床高度

 测量  $V_e$  和  $W_h$  可用距离 (mm) 或体积 (ml) 单位，但二者必须用相同的单位。

柱子性能可定期通过注入丙酮检测柱效 (N) 和峰对称性 (不对称因子，AS) 衡量。由于N的观测值与实验参数如流速和所加的样品相关，因此必须在同一条件下进行比较。在疏水相互作用层析中柱效在相同浓度下通过注入丙酮（不与填料反应）测量洗脱峰进行检测，如图89所示。

Absorbance

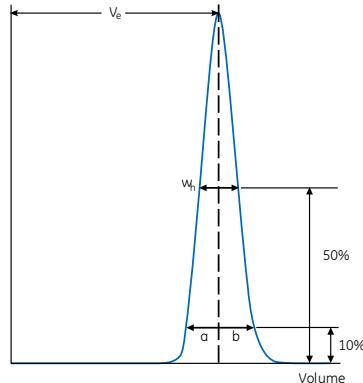


图89 柱效的测量。

通常情况下，一个好的H值大约是填充的填料颗粒平均直径的2-3倍。如对于90 $\mu\text{m}$ 的颗粒H值为0.018-0.027cm。

对称因子AS表述为：

$$AS =$$

其中

=10%峰高处第一次半峰宽

=10%峰高处第二次半峰宽

AS应当接近1。对于短柱子当使用疏水相互作用层析或反相层析时合理的AS为0.80-1.80。

 如果前沿扩展说明填料被填充得太紧密，如果拖尾说明填料填充得太松散。

 对于新填充的柱子，用至少两个柱体积的缓冲液运行以确保填料用起始缓冲液平衡。使用pH计监测洗脱物的pH。

### 附录3 选择纯化设备

如果需要使用精确控制的线性梯度洗脱达到高分辨的分离，或者需要利用现代基质的高流速优势，以及当同一柱子需要在多次运行中使用时，则需要使用层析系统。最简单的疏水相互作用层析分离，如逐步梯度洗脱，可以使用预装的HiTrap柱用注射器或蠕动泵操作。ÄKTAdesign系统可以被选择以适合从实验室使用的简单逐步洗脱到必须满足cGMP要求的分离。EttanTM MDLC是一种用于蛋白质鉴定和蛋白组学研究的多维液相色谱系统，非常适合与电喷雾串联质谱联用(ESI-MS/MS)。

	标准的ÄKTAdesign配置							
工作方法	process	primeplus	FPLC	purifier	explore	pilot	xpress	crossflow
制造和生产	•					•		
UNICORN™软件	•		•	•	•	•	•	•
简单的单步纯化		•						
通常纯化所需的可重复性	•	•	•	•	•	•	•	•
调节所需的系统控制和数据处理	•		•	•	•	•	•	•
自动方法开发和优化				•	•	•		•
自动的缓冲液制备				•	•			
自动的pH监测				•	•			
自动的介质或柱子监测					•	•		
自动的多步纯化					•		•	
方法开发并规模化放大					•	•		•
符合cGMP规范	•					•		•
规模化放大，过程开发，转移到生产						•		•



Ettan MDLC



ÄKTApilot™



ÄKTAxpress™



ÄKTAxplorer



ÄKTAfPLC™



ÄKTApurifier™



ÄKTAprime Plus

## 直线流速 (cm/h) 和体积流速 (ml/min) 之间的相互转换

在比较不同尺寸柱子的结果时使用直线速度 (cm/h) 十分方便, 但是流速通常用体积流速 (ml/min) 计算, 可用下面的公式进行直线速度和体积流速的换算。

从直线速度 (cm/h) 到体积流速 (ml/min)

$$\text{体积流速 (ml/min)} = \frac{\text{直线速度 (cm/h)}}{60} \times \text{柱子横截面积 (cm}^2\text{)}$$

$$= \frac{Y}{60} \times \frac{\pi \times d^2}{4}$$

其中Y=直线速度 (cm/h)

d=柱子内径 (cm)

例如:

XK 16/70柱子 (内径为1.6cm) 直线速度为150cm/h时的体积流速是多少?

Y=直线速度=150cm/h

d=柱子内径=1.6cm

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

$$= 5.03 \text{ ml/min}$$

从体积流速 (ml/min) 到直线速度 (cm/h)

$$\text{直线速度 (cm/h)} = \frac{\text{体积积流 (ml/min)} \times 60}{\text{柱子横截面积 (cm}^2\text{)}} = Z \times 60 \times \frac{4}{\pi \times d^2}$$

$$= Z \times 60 \times \frac{4}{\pi \times d^2}$$

其中

Z=体积流速 (ml/min)

d=柱子内径 (cm)

例如：

Tricorn 5/50柱子（内径0.5cm）的体积流速为1ml/min时的直线速度是多少？

Z=体积流速=1ml/min

d=柱子内径=0.5cm

$$\text{直线速度} = 1 \times 60 \times \frac{4}{\pi \times 0.5 \times 0.5} \text{ cm/h} = 305.6 \text{ cm/h}$$
$$= 305.6 \text{ cm/h}$$

从ml/min到使用注射器

1ml/min=HiTrap 1ml柱子约30滴/分钟

5ml/min=HiTrap 5ml柱子约120滴/分钟

#### 附录4 换算数据：蛋白、柱压

质量 (g/mol)	1μg	1nmol
10000	100pmol; 6×10 <sup>13</sup> 个分子	10μg
50000	20pmol; 1.2×10 <sup>13</sup> 个分子	50μg
100000	10pmol; 6.0×10 <sup>12</sup> 个分子	100μg
150000	6.7pmol; 4.0×10 <sup>12</sup> 个分子	150μg

蛋白	1mg/ml的A280
IgG	1.35
IgM	1.20
IgA	1.30
蛋白A	0.17
亲和素	1.50
链霉亲和素	3.40
牛血清白蛋白	0.70

1kb DNA =333个编码氨基酸

=37000g/mol

270bp DNA=10000g/mol

1.35kb DNA=50000g/mol

2.70kb DNA=100000g/mol

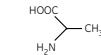
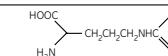
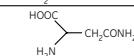
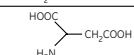
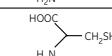
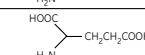
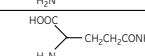
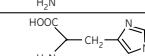
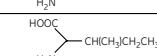
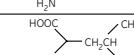
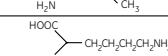
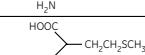
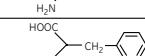
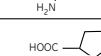
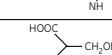
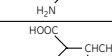
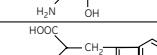
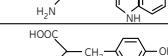
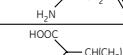
一个氨基酸的平均分子量=120g/mol

#### 柱压

最大操作压力指超过该压力柱溶物可能会被压缩。

压力单位可以用MPa、bar或psi表示，它们之间换算如下：1MPa=10bar=145psi

## 附录5 氨基酸表

Amino acid	Three-letter code	Single-letter code	Structure
Alanine	Ala	A	
Arginine	Arg	R	
Asparagine	Asn	N	
Aspartic Acid	Asp	D	
Cysteine	Cys	C	
Glutamic Acid	Glu	E	
Glutamine	Gln	Q	
Glycine	Gly	G	
Histidine	His	H	
Isoleucine	Ile	I	
Leucine	Leu	L	
Lysine	Lys	K	
Methionine	Met	M	
Phenylalanine	Phe	F	
Proline	Pro	P	
Serine	Ser	S	
Threonine	Thr	T	
Tryptophan	Trp	W	
Tyrosine	Tyr	Y	
Valine	Val	V	

Formula	M <sub>r</sub>	Middle unit residue (-H <sub>2</sub> O)	M <sub>r</sub>	Charge at pH 6.0–7.0	Hydrophobic (non-polar)	Uncharged (polar)	Hydrophilic (polar)
C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub>	89.1	C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> NO	71.1	Neutral	■		
C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	174.2	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub> O	156.2	Basic (+ve)		■	
C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	132.1	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	114.1	Neutral		■	
C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>4</sub>	133.1	C <sub>4</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>3</sub>	115.1	Acidic(-ve)		■	
C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub> S	121.2	C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> NOS	103.2	Neutral	■		
C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>4</sub>	147.1	C <sub>5</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>3</sub>	129.1	Acidic (-ve)		■	
C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	146.1	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	128.1	Neutral	■		
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>	75.1	C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> NO	57.1	Neutral	■		
C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	155.2	C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> N <sub>3</sub> O	137.2	Basic (+ve)		■	
C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	131.2	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> NO	113.2	Neutral	■		
C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	131.2	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> NO	113.2	Neutral	■		
C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	146.2	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O	128.2	Basic(+ve)		■	
C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub> S	149.2	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NOS	131.2	Neutral	■		
C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	165.2	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> NO	147.2	Neutral	■		
C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	115.1	C <sub>5</sub> H <sub>7</sub> NO	97.1	Neutral	■		
C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>3</sub>	105.1	C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>	87.1	Neutral	■		
C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>3</sub>	119.1	C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub>	101.1	Neutral		■	
C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	204.2	C <sub>11</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O	186.2	Neutral	■		
C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>	181.2	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	163.2	Neutral		■	
C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	117.1	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO	99.1	Neutral	■		

## 附录6 纯化过程中的分析检测

分子检测在纯化过程中非常重要。它被用于评估每个步骤的效率，用产量、生物活性、回收率表示，并且能帮助优化实验条件。对目的分子的可靠检测的重要性怎么强调都不过分。

 检测层析组分时确定在纯化过程中使用的溶液不会干扰检测。

### 全蛋白检测

Lowry或Bradford检测方法是最常用的检测全蛋白含量的方法。当样品中脂含量较高时尤其适合用Bradford方法，脂成分可能会对Lowry方法有干扰。

### 纯度检测

纯度最常使用SDS-PAGE进行评估。或者也可使用等电聚焦、毛细管电泳、反相色谱或质谱。

### SDS-PAGE分析

#### 需要的试剂

6×SDS上样缓冲液：0.35M Tris-HCl (pH6.8) , 10.28% (w/v) SDS, 36%的甘油, 0.6M的DTT (或5%的2-巯基乙醇), 0.012% (w/v) 的溴酚蓝。

分装成0.5mL储存在-80°C。

1. 每5-10μL粗提物、细胞裂解物的上清或纯化的组分中加入2μL 6×SDS上样缓冲液。
2. 震荡混合, 90°C-100°C加热5分钟。
3. 将样品上样到SDS聚丙烯酰胺胶中。
4. 跑胶, 用CoomassieTM Blue (考马斯亮蓝R药片) 染色或银染 (PlusOneTM Silver Staining Kit, 蛋白)。

 SDS胶中丙烯酰胺的浓度根据目的蛋白的分子量选择（见表32）。

表32 丙烯酰胺胶的分离范围。

分离胶中的丙烯酰胺百分数%	分离范围
单一百分数: 5%	36000-200000
7.5%	24000-200000
10%	14000-200000
12.5%	14000-100000
15%	14000-60000*
梯度: 5-15%	14000-200000
5-20%	10000-200000
10-20%	10000-150000

\*更大的蛋白在胶中的迁移不明显

 有关电泳技术的信息和建议, 请参阅附加阅读部分和参考书目。

### 功能检测

特定的免疫反应为评估目的分子的活性浓度提供了许多可供替换的检测系统。

- 当使用考马斯亮蓝和银染的SDS-PAGE的灵敏度不够时可使用蛋白印迹分析。
- 1. 用SDS-PAGE分离蛋白样品。

2. 将分离的蛋白从胶上转移至合适的膜上，如Hybond<sup>TM</sup> ECL<sup>TM</sup>（用于后续的ECL检测）或Hybond P（用于后续ECL Plus<sup>TM</sup>检测）。
3. 用适当的试剂显影。

电泳和蛋白转移可使用多种设备和试剂。详细信息请参考《蛋白电泳技术手册》和《Hybond ECL指导手册》，都出自GE医疗集团且可从[www.gehealthcare.com/lifesciences](http://www.gehealthcare.com/lifesciences)处获得。

 ELISA是活性检测最常用的方法。

 使用表面等离子共振现象检测特异的免疫反应（如使用BIACORE<sup>TM</sup>系统）能够确定活性浓度、抗原表位，并可研究反应动力学。

#### 检测带标签蛋白

SDS-PAGE、蛋白免疫印迹和ELISA都可用于检测经过遗传操作添加了特定标签的分子。某些情况下可开发只针对标签本身的检测方法，如GST检测模块可用于酶的检测和定量GST标签的蛋白。检测和定量GST和六个组氨酸标签的蛋白的详细信息见GE医疗集团的《重组蛋白手册：蛋白扩增和简单纯化》以及《GST基因融合系统手册》。

## 附录7 生物样品的保存



这里给出的是常规建议，不适用于所有的生物样品。在采用这些建议之前请参考样品特定的性质以及计划的用途。

### 常规建议

- 必要时添加稳定剂。稳定剂通常对于保存纯的蛋白是必需的。
- 血清、培养物的上清和腹水应当分装成小份后保存在-20°C或-70°C。
- 避免反复冻融或冻干/重溶解过程，这样很可能会降低生物活性。
- 避免接近稳定极限的条件，如pH值或盐浓度、还原剂或螯合剂等。
- 存放于密闭容器中保存在4°C可以减少细菌生长并降低蛋白酶活性。如果在4°C超过24小时，可添加防腐剂（如0.01%的硫柳汞）。
- 叠氮化钠可干扰多种偶联方法和生物学检测，并且有毒，可用脱盐柱除去（见第136页）。

### 已纯化的蛋白的常规建议

- 以沉淀形式保存在高浓度的硫酸铵（如4.0M）中。
- 添加50%甘油冷冻，尤其适用于酶类。
- 如果样品要用于生物学检测，避免使用防腐剂。在体内（*in vivo*）实验中不能添加防腐剂，而应当将样品分装成小份冷冻。
- 可使用无菌滤器以延长保存时间。
- 添加稳定剂，如甘油（5-20%）、血清白蛋白（10mg/ml）、配基（浓度取决于活性蛋白的浓度）以帮助维持生物活性。记住任何一种添加剂都会降低蛋白的纯度，可在后续步骤中除去。
- 避免反复冻融或冻干/重溶解过程，这样很可能会降低生物活性。



叠氮化钠可干扰多种偶联方法和生物学检测，并且有毒，可用脱盐柱除去（见第136页）。



冷沉淀蛋白是一类在4°C能够沉淀的蛋白，包括一些小鼠IgG3亚族的抗体，它们不能保存在4°C，可添加防腐剂保存在室温。

# Ordering information

## Hydrophobic interaction media

SOURCE, Sepharose High Performance and Sepharose Fast Flow media are all available as BioProcess media for large-scale production. Please contact your local GE Healthcare representative for details.

Product	Quantity	Code No.
RESOURCE HIC Test Kit	3 x 1 ml	17-1187-01
RESOURCE PHE; RESOURCE PHE; RESOURCE ISO		
HiTrap HIC Selection Kit	6 x 1 ml	11-0034-53
Phenyl Sepharose High Performance,		
Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (high sub),		
Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (low sub),		
Butyl Sepharose 4 Fast Flow,		
Butyl-S Sepharose 6 Fast Flow		
Octyl Sepharose 4 Fast Flow		
<b>SOURCE</b>		
RESOURCE PHE	1 x 1 ml	17-1186-01
SOURCE 15PHE 4.6/100 PE	1 x 1.7 ml	17-5186-01
SOURCE 15PHE	50 ml	17-0147-01
SOURCE 15PHE	200 ml	17-0147-02
RESOURCE ETH	1 x 1 ml	17-1184-01
SOURCE 15ETH	50 ml	17-0146-01
SOURCE 15ETH	200 ml	17-0146-02
RESOURCE ISO	1 x 1 ml	17-1185-01
SOURCE 15ISO	50 ml	17-0148-01
SOURCE 15ISO	200 ml	17-0148-02
<b>Sepharose High Performance</b>		
HiTrap Phenyl HP	5 x 1 ml	17-1351-01
HiTrap Phenyl HP	5 x 5 ml	17-5195-01
HiLoad 16/10 Phenyl Sepharose HP	1 x 20 ml	17-1085-01
HiLoad 26/10 Phenyl Sepharose HP	1 x 53 ml	17-1086-01
Phenyl Sepharose High Performance	75 ml	17-1082-01
<b>Sepharose Fast Flow</b>		
HiTrap Phenyl FF (high sub)	5 x 1 ml	17-1355-01
HiTrap Phenyl FF (high sub)	5 x 5 ml	17-5193-01
HiPrep 16/10 Phenyl FF (high sub)	1 x 20 ml	17-5095-01
Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (high sub)	25 ml	17-0973-10
Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (high sub)	200 ml	17-0973-05
HiTrap Phenyl FF (low sub)	5 x 1 ml	17-1353-01
HiTrap Phenyl FF (low sub)	5 x 5 ml	17-5194-01
HiPrep 16/10 Phenyl FF (low sub)	1 x 20 ml	17-5094-01
Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (low sub)	25 ml	17-0965-10
Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (low sub)	200 ml	17-0965-05

<b>Product</b>	<b>Quantity</b>	<b>Code No.</b>
<b>Sepharose Fast Flow (continued)</b>		
HiTrap Butyl FF	5 x 1 ml	17-1357-01
HiTrap Butyl FF	5 x 5 ml	17-5197-01
HiPrep 16/10 Butyl FF	1 x 20 ml	17-5096-01
Butyl Sepharose 4 Fast Flow	25 ml	17-0980-10
Butyl Sepharose 4 Fast Flow	200 ml	17-0980-01
HiTrap Butyl-S FF	5 x 1 ml	17-0978-13
HiTrap Butyl-S FF	5 x 1 ml	17-0978-14
Butyl-S Sepharose 6 Fast Flow	25 ml	17-0978-10
Butyl-S Sepharose 6 Fast Flow	200 ml	17-0978-02
HiTrap Octyl FF	5 x 1 ml	17-1359-01
HiTrap Octyl FF	5 x 5 ml	17-5196-01
HiPrep 16/10 Octyl FF	1 x 20 ml	17-5097-01
Octyl Sepharose 4 Fast Flow	25 ml	17-0946-10
Octyl Sepharose 4 Fast Flow	200 ml	17-0946-02

## Reversed phase media

SOURCE 15 and SOURCE 30 are available as BioProcess media for large-scale production. Please contact your local GE Healthcare representative for details.

<b>Product</b>	<b>Quantity</b>	<b>Code No.</b>
<b><math>\mu</math>RPC</b>		
$\mu$ RPC C2/C18 ST 4.6/100	1 x 1.7 ml	17-5057-01
$\mu$ RPC C2/C18 SC 2.1/10 (requires Precision Column Holder 17-1455-01 for attachment to chromatography systems)	1 x 0.35 ml	17-0704-01
$\mu$ RPC C2/C18 ST 1.0/150	1 x 120 $\mu$ l	17-6002-88
$\mu$ RPC C2/C18 ST 300 $\mu$ m/150	1 x 11 $\mu$ l	17-6002-89
<b>SOURCE 5RPC</b>		
SOURCE 5RPC ST 4.6/150	1 x 2.5 ml	17-5116-01
<b>SOURCE 15RPC</b>		
SOURCE 15RPC ST 4.6/100	1 x 1.7 ml	17-5068-01
RESOURCE RPC, 1 ml	1 x 1 ml	17-1181-01
RESOURCE RPC, 3 ml	1 x 3 ml	17-1182-01
SOURCE 15RPC	10 ml	17-0727-20
SOURCE 15RPC	200 ml	17-0727-02
SOURCE 15RPC	500 ml	17-0727-03
<b>SOURCE 30RPC</b>		
SOURCE 30RPC	10 ml	17-5120-20
SOURCE 30RPC	200 ml	17-5120-02
SOURCE 30RPC	500 ml	17-5120-03

## Other columns and accessories

Product	Quantity	Code No.
<b>Desalting columns</b>		
HiTrap Desalting	5 × 5 ml	17-1408-01
HiTrap Desalting (available by special order)	100 × 5 ml	11-0003-29
HiPrep 26/10 Desalting	1 × 53 ml	17-5087-01
HiPrep 26/10 Desalting	4 × 53 ml	17-5087-02
PD-10 Desalting columns	30	17-0851-01
<b>Column Packing CD</b>		
Column Packing-The Movie	1	18-1165-33
<b>Empty Columns</b>		
Complete information on the range of Tricorn columns is available at <a href="http://www.gehealthcare.com/protein-purification-labresearch">www.gehealthcare.com/protein-purification-labresearch</a>		
Tricorn 5/100 column	1	18-1163-10
Tricorn 5/150 column	1	18-1163-11
Tricorn 5/200 column	1	18-1163-12
Tricorn 10/100 column	1	18-1163-15
Tricorn 10/150 column	1	18-1163-16
Tricorn 10/200 column	1	18-1163-17
Tricorn columns are delivered with a column tube, adaptor unit, end cap, a filter kit containing adaptor and bottom filters and O-rings, two stop plugs, two fingertight fittings, adaptor lock and filter holder, and two M6 connectors for connection to FPLC System. if required.		
XK 16/20 column	1	18-8773-01
XK 26/20 column	1	18-1000-72
XK 50/20 column	1	18-1000-71
XK columns are delivered with one AK adaptor, T EZEL tubing (0.8 mm i.d. for XK 16 and XK 26 columns, 1.2 mm i.d. for XK 50 columns, with M6 connectors, thermostatic jacket, support snap-on net rings, dismantling tool (XK 16 and XK 26 only), and instructions.		
HR 16/5 column	1	18-1000-98
HR 16/10 column	1	19-7403-01
HR 16/50 column	1	18-1460-01
HR columns are delivered with a column tube, adaptor unit, end cap, a filter kit containing adaptor and bottom filters and O-rings and M6 male fittings for connection to FPLC System.		
Empty disposable PD-10 Desalting columns	50	17-0435-01

<b>Product</b>	<b>Quantity</b>	<b>Code No.</b>
<b>Accessories and spare parts</b>		
For a complete listing refer to GE Healthcare BioDirectory or <a href="http://www.gehealthcare.com/protein-purification">www.gehealthcare.com/protein-purification</a>		
LabMate PD-10 Buffer Reservoir	10	18-3216-03
Packing Connector XK 16	1	18-1153-44
Packing Connector XK 26	1	18-1153-45
Tricorn packing equipment 10/100 includes Tricorn packing connector 10-10, Tricorn 10/100 glass tube, bottom unit and stop plug.	1	18-1153-25
Tricorn packing connector 10-10*	1	18-1153-23
Connects extra glass column to a Tricorn 10 column to act as a packing reservoir for efficient packing.		

[www.gehealthcare.com/protein-purification](http://www.gehealthcare.com/protein-purification)  
[www.gehealthcare.com](http://www.gehealthcare.com)

GE Healthcare Bio-Sciences AB,  
a General Electric Company.

GE Healthcare Bio-Sciences AB  
Björkgatan 30  
751 84 Uppsala  
Sweden

BioProcess, BPG, Drop Design, ECL, ECL Plus, Etan, FineLINE, FPLC, HiLoad, HiPrep, HitTrap, Hybond, MicroSpin, Mono Q, PlusOne, RESOURCE, Sephadex, Sepharose, SOURCE, STREAMLINE, Superdex, Tricorn, UNICORN, ÄKTA, ÄKTAdesign, ÄKTAexplorer, ÄKTAfPLC, ÄKTAfPlot, ÄKTAfPrime, ÄKTAfPurifier, and ÄKTAfPress are trademarks of GE Healthcare companies. GE, imagination at work, and GE monogram are trademarks of General Electric Company.

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

Multipipette is a trademark of Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH.

Coomassie is a trademark of ICI plc.

Biacore is a trademark of Biacore AB.

Purification and preparation of fusion proteins and affinity peptides comprising at least two adjacent histidine residues may require a license under US pat 5,284,933 and US pat 5,310,663, including corresponding foreign patents (assignee: Hoffman La Roche, Inc).

All goods and services are sold subject to the terms and conditions of sale of the company within GE Healthcare which supplies them. GE Healthcare reserves the right, subject to any regulatory and contractual approval, if required, to make changes in specifications and features shown herein, or discontinue the product described at any time without notice or obligation. Contact your local GE Healthcare representative for the most current information.

© 2006 General Electric Company - All rights reserved.

GE Healthcare Europe GmbH  
Munzinger Strasse 5  
D-79111 Freiburg  
Germany

GE Healthcare UK Ltd.  
Amersham Place  
Little Chalfont  
Buckinghamshire, HP7 9NA  
UK

GE Healthcare Bio-Sciences Corp.  
800 Centennial Avenue  
P.O. Box 1327  
Piscataway, NJ 08855-1327  
USA

GE Healthcare Bio-Sciences KK  
Sanken Bldg.  
3-25-1, Hyakunincho  
Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073  
Japan



imagination at work

