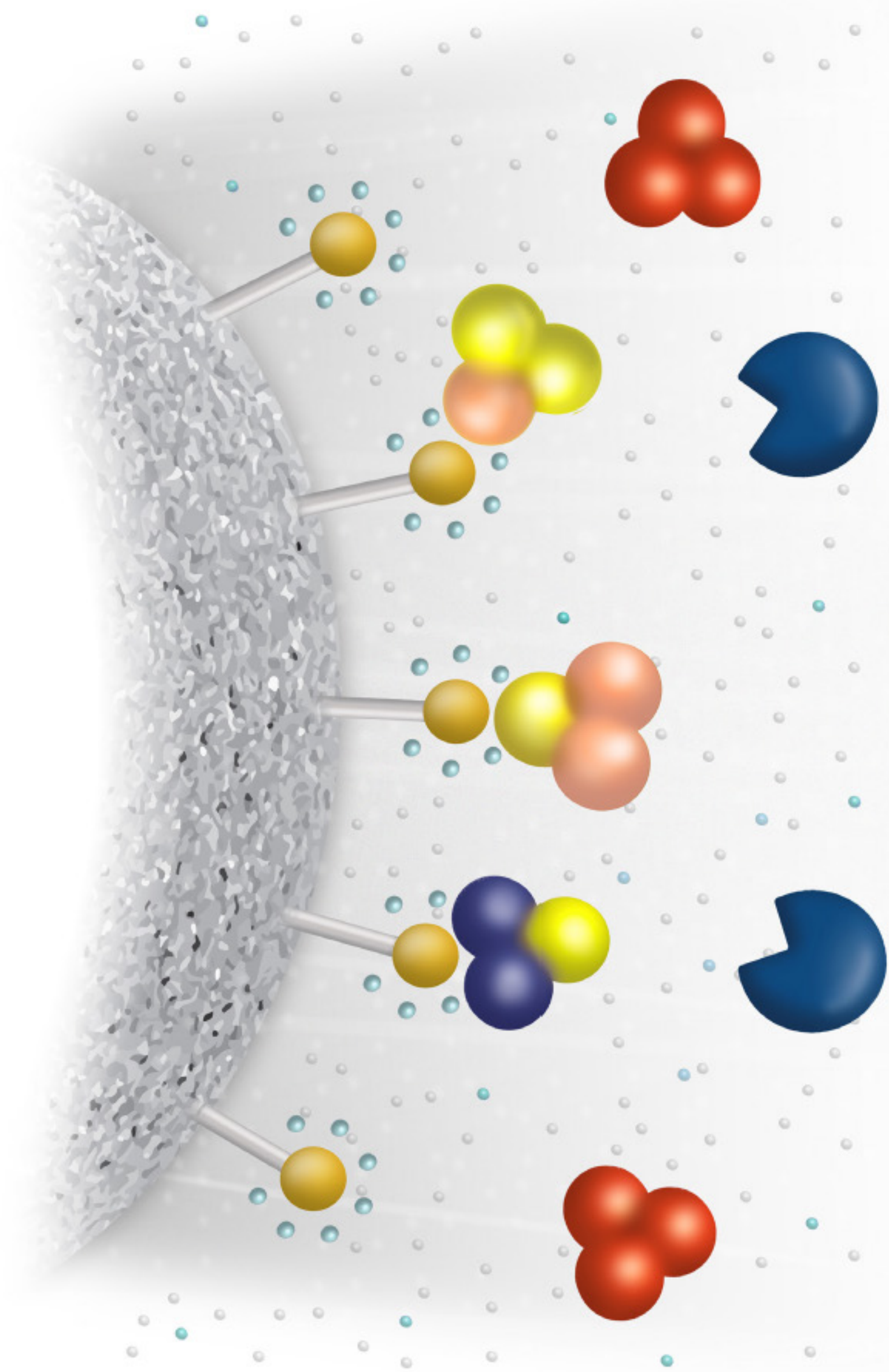


原理和方法

疏水相互作用 层析和反相层析



目录

	简介	4		• 工艺放大	44	04	纯化策略 (CIPP) 中的 HIC	81		• 结合载量	108
	• 符号	5		• 设备选择	44		• 应用 CIPP	83		• 实际情况下的 RPC	108
	• 层析中的常见缩写	5		• 维护 HIC 填料	45		• 纯化技术选择与组合	83		• 分离蛋白质和肽的典型洗脱方案	112
	• 产品名称中的缩写	5		• 问题排查	46		• 使用 HIC 用于捕获步骤	85		• 样品制备	113
01	疏水相互作用层析的原理	6	03	疏水相互作用层析填料	50		• 使用 HIC 进行中度纯化	87		• 样品溶解度	113
	• 理论情况下的疏水相互作用层析	8		Capto™ 填料: 具有高分辨率的高流速填料	51		• 使用 HIC 用于精纯步骤	89		• 故障排除	116
				• 纯化示例	56	05	大规模纯化	92		• SOURCE™ 层析填料: 快速分离, 高分辨率, 易于工艺放大	120
02	实际情况下的疏水相互作用层析	21		• 化学稳定性	59		• 适用于 HIC 的 BioProcess™ 层析填料	93		• 纯化示例	122
	• 填料选择			• 储存	59		• 捕获纯化	94		• 清洁	125
	• 纯化策略中的 HIC (CIPP)	22		SOURCE™ 填料	59		• 精纯纯化	95		• 化学稳定性	126
	• 进行 HIC 分离的实际考虑因素	23		• 纯化示例	61		• 预装填型一次性解决方案 — 加快下游工艺	95		• 储存	126
	• 筛选选择性	24		• 清洁	61		• 工艺表征套装	96			
	• 盐选择和缓冲液制备	25		• 化学稳定性	64		• 定制设计培养基 (CDM)	96		RPC 和 CIPP	127
	• 层析柱和填料制备	30		• 储存	65		• 机理层析建模 — 实现更智能、更快速的工艺开发	96		• 使用 RPC 用于捕获步骤	127
	• 样品制备	33		Sepharose™ High Performance 填料	66					• 使用 RPC 进行中度纯化	127
	• 样品上样和清洗	34		• 纯化示例	69					• 使用 RPC 用于精纯步骤	127
	• 上样量	35		• 清洁	72	06	反相层析: 原理和方法	97			
	• 样品体积	36		• 化学稳定性	72		• 术语	99			
	• 温度	36		• 储存	72		• 理论情况下的 RPC	99			
	• 洗脱	37		Sepharose™ Fast Flow 填料	73		• RPC 分离步骤	100			
	• 清洗和再平衡	38		• 纯化示例	75		• RPC 填料的组分	102			
	• 分析结果和后续步骤	43		• 清洁	80		• 洗脱液	103			
		43		• 化学稳定性	80		• 洗脱	106			
				• 储存	80						

目录

附录

01	样品制备	128
	• 样品稳定性	129
	• 样品澄清	130
	• 具体制样步骤	131
	• 缓冲液置换和脱盐	135
	• 去除脂蛋白	137
	• 去除酚红	137
	• 去除低分子量污染物	137
02	层析柱装填和准备	138
	• 层析柱选择	141
	• 层析柱装填和效率	141
03	选择实验室规模纯化设备	143
04	从线性流速转换为体积流速	145

05	转换数据: 蛋白质、层析柱压力	147
06	氨基酸表	149
07	分析测定	152
	• 总蛋白测定	153
	• SDS-PAGE 分析	153
	• 纯度测定	153
08	储存	155
	• 储存生物样品	156
09	HIC 层析柱的清洗	157
	去除常见污染物	158
	去除脂质、脂蛋白和疏水蛋白	158

Cytiva 手册	160
-----------	-----

订购信息	162
------	-----

疏水相互作用层析产品	163
• Capto™ HIC 产品	163
• SOURCE™ HIC 产品	163
• Sepharose™ HIC 产品	164
反相层析产品	165
其他层析柱和附件	166

简介

为了纯化生物分子，科研工作者使用层析技术，根据其特定属性的差异对它们进行分离，如图 I1.1 所示。根据您的要求，有不同的层析技术可供选择 (见表 I1.1)。疏水相互作用层析 (HIC) 根据生物分子疏水性的差异，在相对温和的条件下分离生物分子。

表 I1.1. 层析技术的类型及其特性

技术	特性
疏水相互作用层析 (HIC)	疏水
反相层析 (RPC)	疏水
离子交换层析 (IEX)	电荷
尺寸排阻层析法 (SEC, 也称为凝胶过滤)	尺寸
亲和层析 (AC)	生物识别 (配基特异性)
多模式层析 (MM, 也称为混合模式层析)	几种蛋白质特性的组合

许多科研工作者将 HIC 用于蛋白质纯化，作为根据电荷、尺寸或生物特异性识别进行分离等技术的补充。在对样品进行硫酸铵沉淀 (通常用于初始样品浓缩和净化) 或通过离子交换层析分离后，宜采取的下一步骤便是 HIC。在这两种情况下，样品的盐浓度都很高，可以直接上样到 HIC 层析柱，几乎不需要额外准备。随着盐含量升高，样品疏水组分和层析填料之间的相互作用增强。

在分离过程中，科研工作者以较小的体积纯化和洗脱样品，这样可以浓缩样品，使其可直接进行尺寸排阻层析，或者在缓冲液置换后进行离子交换分离。可以将 HIC 用于纯化方案中的捕获、中度纯化或精纯步骤。Cytiva 生产的填料可用于实验室的小规模分离，也可用于生产千克级产品。

本手册描述了该技术的理论和实践方面，可用的填料，如何选择它们，以及应用示例和常见程序的详细说明。本手册汇集了我们从 60 多年的层析纯化经验中总结的提示和技巧，能够为您提供诸多实用信息，将帮助初学者和专家从层析填料中获得理想结果。

第 6 章重点介绍了 RPC，该技术提供良好分辨率。您也可以使用 RPC 作为纯化策略中的最后精纯步骤，但应确保有机溶剂的存在不会损害生物活性或三级结构的恢复。

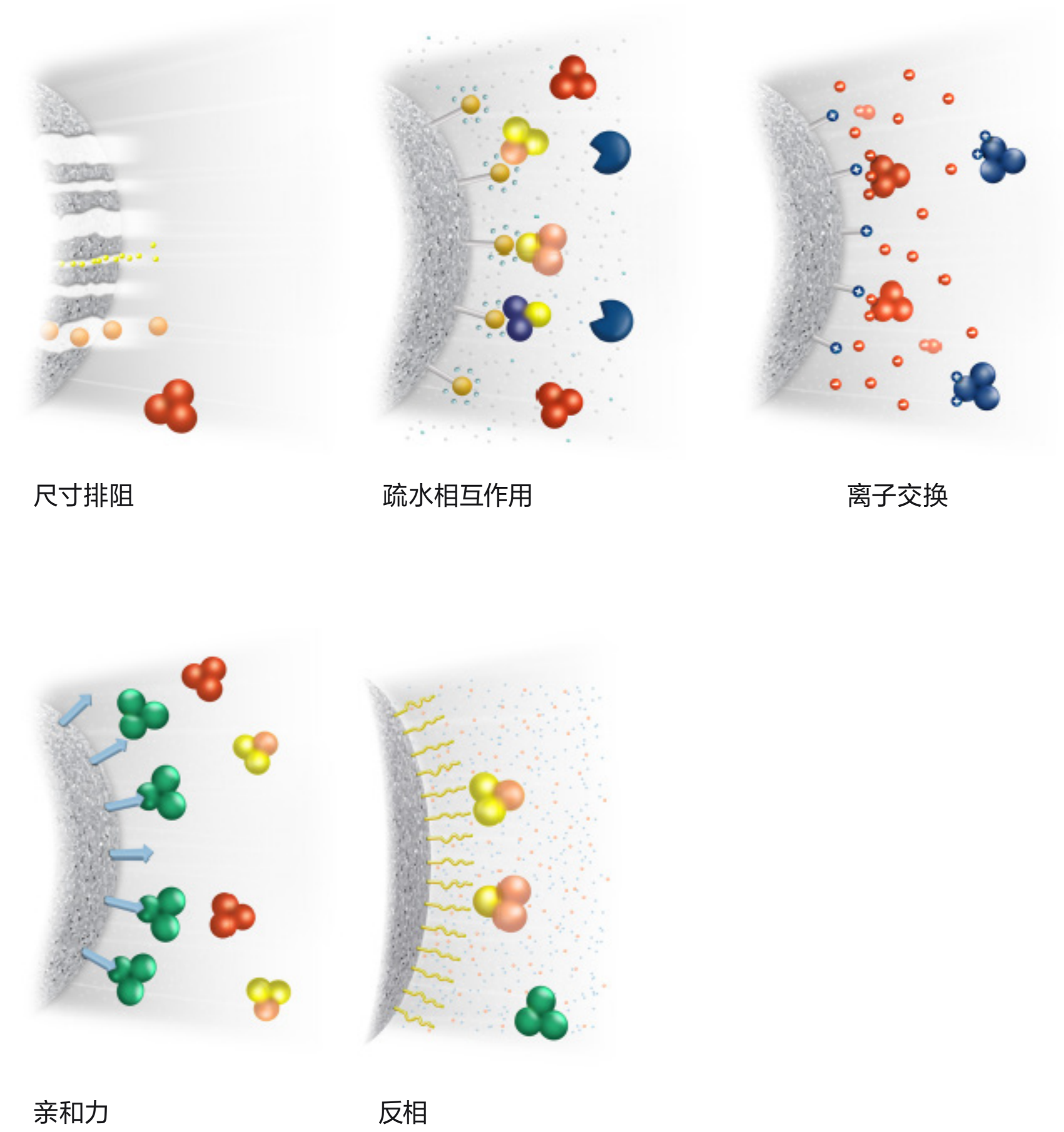


图 I.1. 层析纯化中的分离原理。

符号

- 突出显示故障排除建议, 以帮助分析和解决困难。
- 表示强制性劝告, 在需要特别注意时予以警示。
- 突出显示化学品、缓冲液和设备。
- 提供实验方案概要。

层析中的常见缩写

A_{280nm}, A_{214nm}	特定波长下的紫外线吸收率
AC	亲和层析
CF	层析聚焦
CIPP	捕获、中度纯化、精纯
CIP	在位清洗
CV	层析柱体积
DBC	动态结合载量
HIC	疏水相互作用层析
IEX	离子交换层析
MM	混合模式层析(也称为多模式层析)
MPa	megaPascal
M_r	相对分子量
N/m	以每米理论塔板数表示的柱效
PI	等电点, 蛋白质表面净电荷为零时的 pH 值
Psi	每平方英寸磅数
RPC	反相层析
R_s	分辨率, 峰之间的分离程度
SDS	十二烷基硫酸钠
SEC	尺寸排阻层析法有时也称为 GF: (凝胶过滤)

产品名称中的缩写

FF	Fast Flow
HP	High Performance
i.d.	内径
PE	PEEK
ST	不锈钢层析柱

01

疏水相互作用层析 的原理

本章对疏水相互作用层析 (HIC) 进行了简要介绍, 重点介绍了分离的基本原理。我们将在第 2 章中讨论分离的实际操作方面。

HIC 是根据蛋白质表面疏水性的不同, 利用蛋白质和疏水层析介质疏水表面可逆的相互作用来分离蛋白质。尽管您可以在科学文献中找到一些解释, 但是还没有被广泛接受的关于 HIC 机制的理论。

您可以分离具有不同表面疏水性质的标准蛋白质。运行缓冲液中的某些盐会显著影响蛋白质和 HIC 填料相互作用的方式。高盐浓度会增强相互作用, 而低盐浓度会减弱相互作用。

在图 1.1 所示的例子中, 所有四种蛋白质都与 HIC 填料的疏水表面相互作用。但是当降低缓冲液的离子强度时, 这种相互作用就会逆转, 疏水性最低的蛋白质会首先洗脱。疏水性最强的蛋白质会最后洗脱, 这需要更大程度地降低盐浓度来逆转相互作用。

层析柱: Phenyl Sepharose™ High Performance 装填在 Tricorn™ 10/100 层析柱中
样本: 细胞色素 c、RNase A、溶菌酶、α-糜蛋白酶
起始缓冲液: 1.7 M 硫酸铵、0.02 M Tris-HCl, pH 7.5
流速: 0.8 毫升/分钟(24 厘米/小时)
洗脱缓冲液: 0.02 M Tris-HCl, pH 7.5
流速: 1 毫升/分钟, 76 厘米/小时
梯度: 洗脱缓冲液比例从 0% 至 100%, 洗脱 10 个柱体积

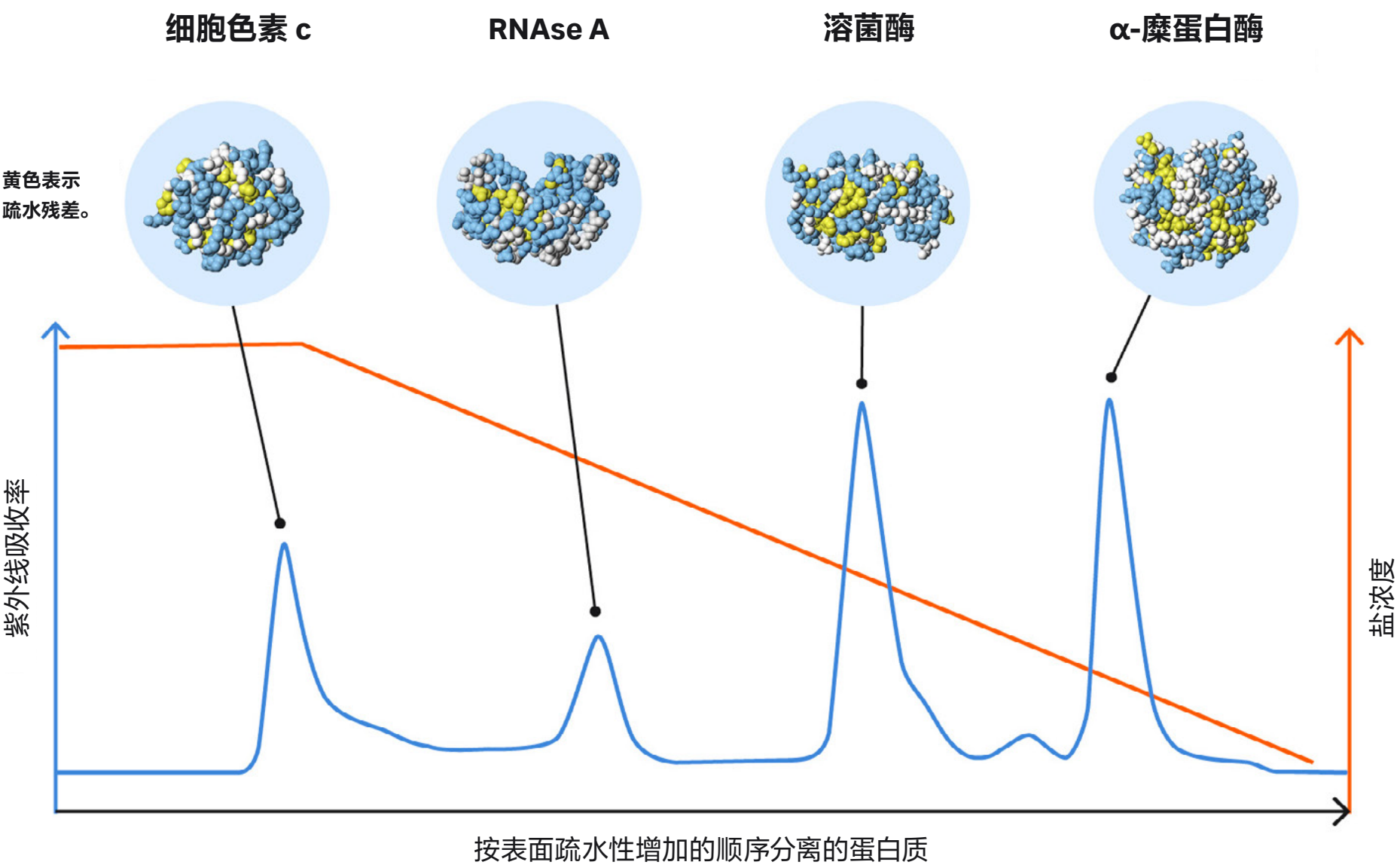


图 1.1. 蛋白质根据其表面疏水性的差异进行分离 (黄色表示疏水性氨基酸残差, 蓝色表示亲水性氨基酸残差), 如图所示标准蛋白在 Phenyl Sepharose™ High Performance 进行分离纯化。

理论情况下的疏水相互作用层析

水的作用

水是极性物质的良好溶剂，但却是非极性物质的不良溶剂。在任何液态水中，由于水分子之间的氢键作用，大多数水分子以簇的形式存在（图 1.2）。水团簇的半衰期很短，但是净效应是水分子之间的内聚力很强，这可以用水的高沸点来表示。

在空气-水界面，水分子排列形成一个具有高度有序结构的坚固外壳。在这里，形成氢键的可能性不再平衡，相反，界面的液体侧占主导地位。这就产生了一种有序的结构，这种结构表现出很强的表面张力。任何影响水壳稳定性的因素都会影响表面张力。

将蛋白质或疏水配基等疏水物质浸入水中时，会发生类似于表面张力的现象。水分子不能“润湿”疏水物质的表面。相反，由于它们不能在所有方向上形成氢键，所以，它们会在物质周围形成高度有序的壳层。

大幅度地降低该壳层的范围会减少有序水分子的数量，也就是说，在热力学上，熵增加是更有利的情况。为了获得熵，疏水物质需要合并，并使壳的总面积大幅度减少。这意味着，疏水相互作用取决于水分子的行为，而不是疏水分子之间的直接吸引（图 1.2）。

蛋白质结构

蛋白质的三维结构是分子内相互作用以及与周围溶剂相互作用的结果。对于易溶的蛋白质，这种溶剂是水，它通常将疏水侧链驱动到蛋白质内部。最终的结构是热力学折衷的结果，适合周围的溶液。因此，尽管球状蛋白质的内部包埋了大多数疏水性氨基酸残差，但仍有一些暴露在外，这导致在蛋白质表面形成疏水区域。

因为蛋白质在其表面既有亲水区域也有疏水区域，所以，在某种高浓度盐的存在下，它们可能由于增强的疏水相互作用而沉淀下来。离子强度的变化、有机溶剂的存在、温度和 pH 值（特别是在等电点 pI 没有净表面电荷时）都会影响蛋白质的结构和溶解度，并因此影响与其他疏水表面的相互作用，例如和 HIC 填料表面的相互作用。

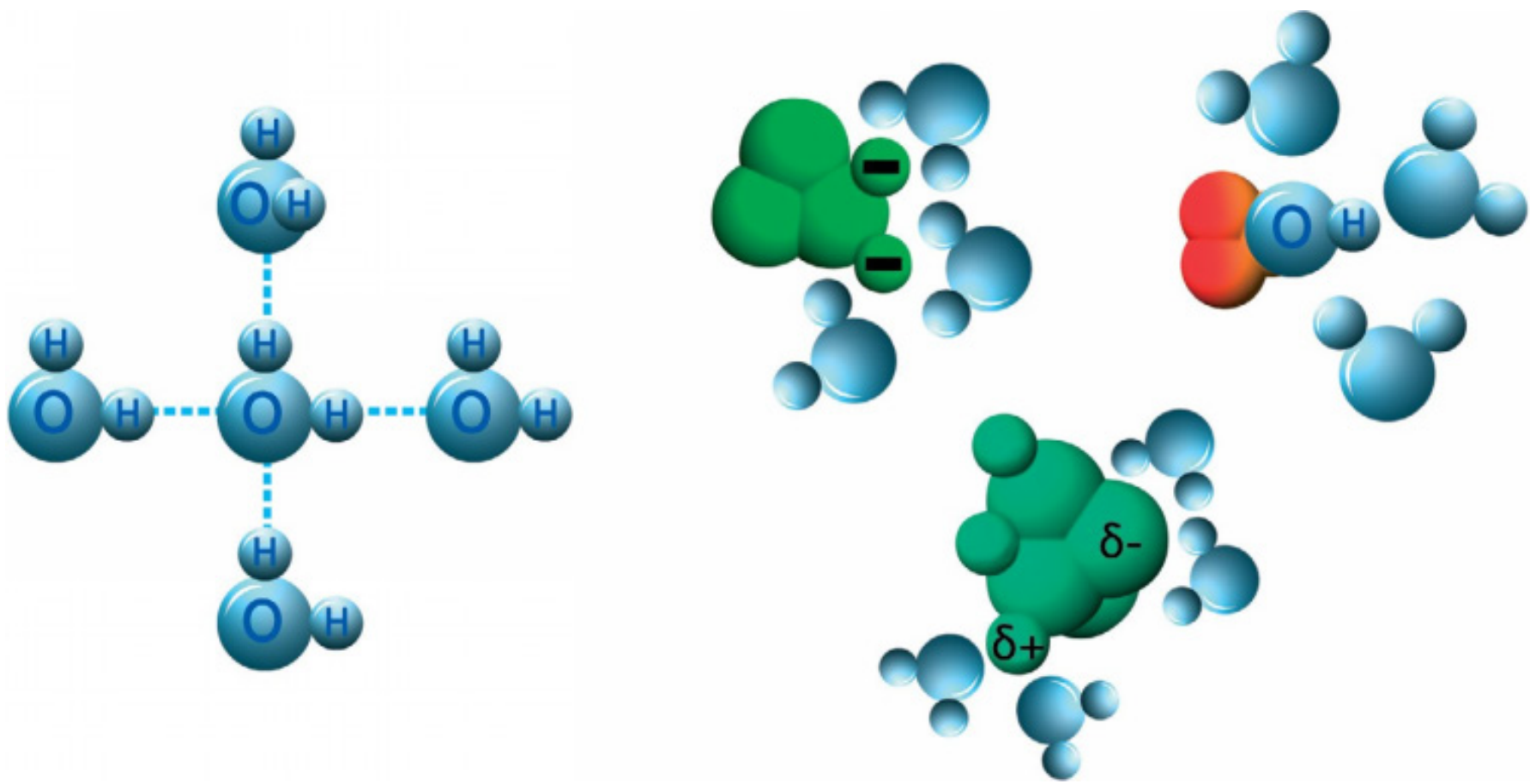


图 1.2. 水的溶解特性在于它与偶极相互作用并形成氢键的能力。

可逆的相互作用

HIC 填料上的疏水配基可以与蛋白质的疏水表面相互作用。在纯水中, 任何疏水作用都太弱, 不足以引起配基和蛋白质之间或蛋白质本身之间的相互作用。然而, 某些盐会增强疏水相互作用, 加入这些盐会导致与 HIC 填料的结合 (吸附)。对于选择性洗脱 (解吸), 科研工作者通过逐步降低盐浓度, 实现样品组分按疏水性强弱依次洗脱 (图 1.3)。

HIC 分离的结果是如下几个因素交互作用的结果: 分子表面暴露的疏水性氨基酸残差的数量和分布、填料的疏水性、样品的性质和成分, 以及缓冲液中盐的种类和浓度。

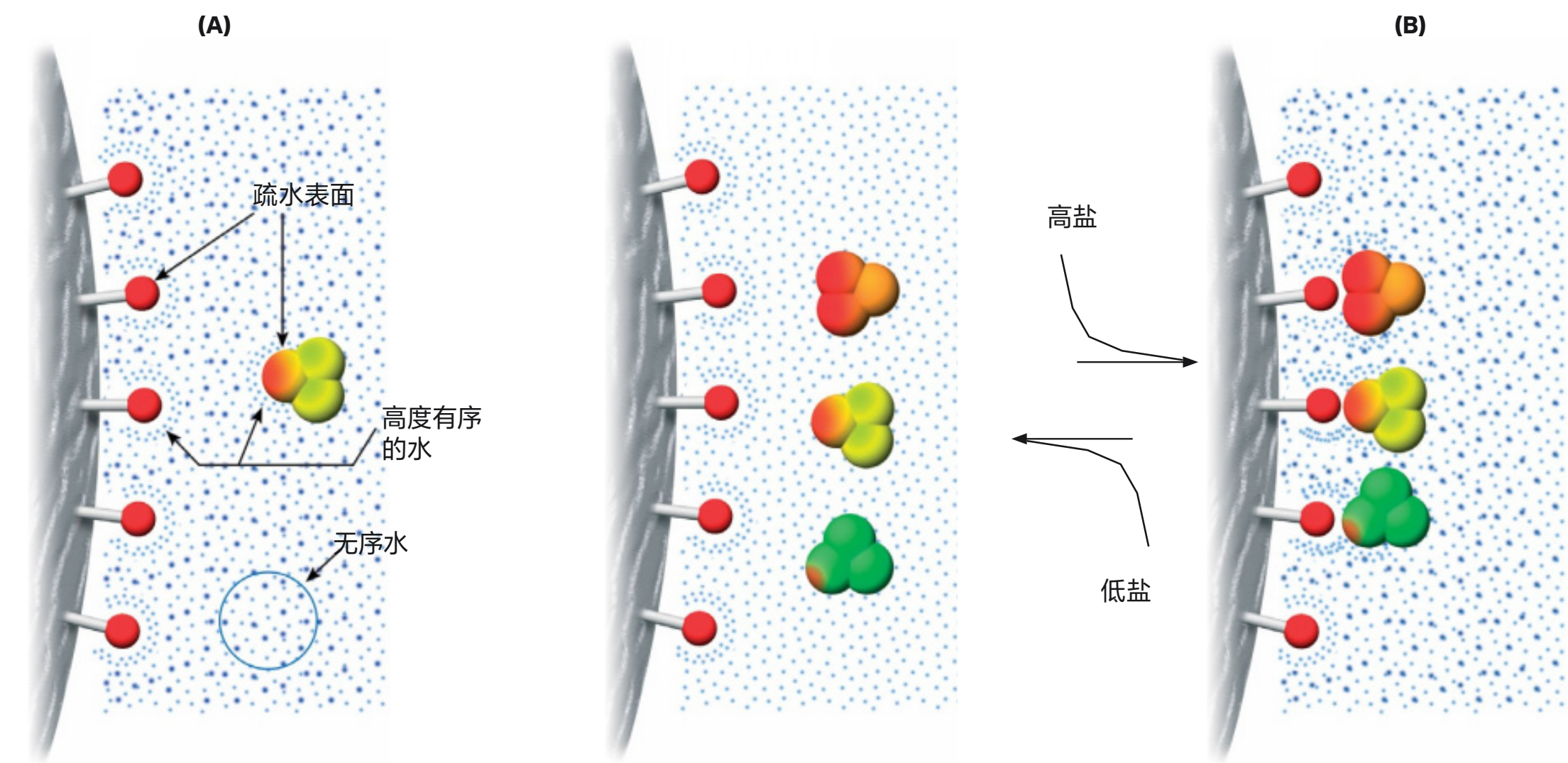


图 1.3. (A) 高度有序的水壳层包围在配基和蛋白质的疏水表面周围。疏水物质被迫融合, 以大幅度减少这种壳层的总面积 (最大化熵)。盐增强了疏水相互作用。(B) 疏水相互作用的平衡主要由盐浓度控制。

HIC 分离步骤

HIC 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架上。基架具有多孔结构, 以提供较高的内表面积, 而配基在填料的最终疏水性中起重要作用。填料被装填到层析柱中形成柱床。有关层析柱装填的更多详细信息, 请参见附录 2。用缓冲液平衡柱床, 可填充基架的孔隙和颗粒之间的缝隙。图 1.4 说明了随后的分离过程。

适度高的盐浓度促进了蛋白质和填料之间的相互作用, 通常使用 1-2 M 硫酸铵或 3 M 氯化钠。科研工作者选择盐的种类和起始缓冲液中所需的浓度, 以确保目标蛋白质与填料结合, 同时其他疏水性较低的蛋白质和杂质直接从层析柱中流穿。

- 

结合条件 is 任何 HIC 分离的关键因素。在该阶段, 它们可以显著影响目标蛋白质的最终选择性、分辨率和结合能力。样品应处于和起始缓冲液相同的盐条件下, 但很少需要进行缓冲液置换, 因为缓冲离子和 pH 的作用较小。如果需要, 可以直接调节 pH 值。
- 

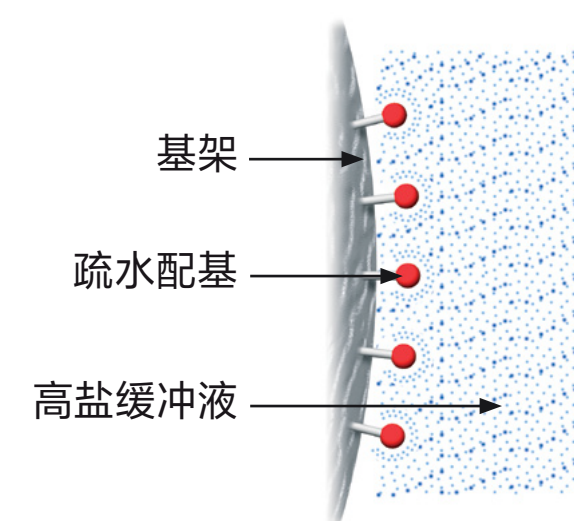
由于许多蛋白质会在高盐浓度下沉淀, 在优化结合条件之前, 您应该检查不同盐浓度下目标蛋白质的“稳定窗口”。目标蛋白质的沉淀可能会导致无法分离, 至少会显著降低产量。确定“稳定窗口”最简单的方法是观察试管中不同盐浓度的样品, 并检测上清液中残留的蛋白质活性。

当完成样品上样并已冲洗层析柱后, 使得所有未结合的蛋白质都已从层析柱流穿 (即, UV 信号已回到基线), 将改变条件以开始洗脱。可以通过降低洗脱缓冲液中的盐浓度来洗脱蛋白质。随着盐浓度降低, 疏水性最弱的蛋白质开始从层析柱上洗脱下来。您可以采用梯度洗脱方式来控制盐浓度的变化, 蛋白会以纯的、浓缩的形式被分离开。疏水性最高的蛋白质的结合能力最强, 会被最后洗脱。

在洗脱结束后, 用不含盐的缓冲液进行冲洗可以去除结合最紧密的蛋白质。如果您已经准确地判断了填料和样品中蛋白质的疏水性, 所有的蛋白质都将在该阶段脱。然后, 在下一次运行中上样前, 您可以用起始缓冲液中重新平衡层析柱。

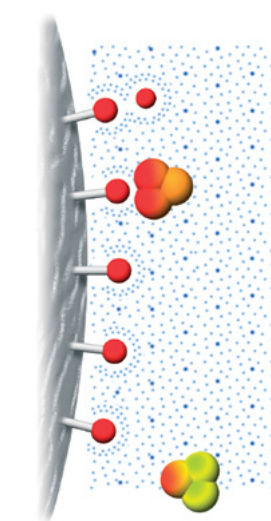
- 

有时疏水相互作用很强, 以至于您可以选择更严苛的条件洗掉所有结合的物质, 例如, 0.5 至 1.0 M 氢氧化钠、70% 乙醇或 30% 异丙醇。在用含有高盐的起始缓冲液重新平衡层析柱之前, 您需要按照这些清洗步骤, 用水或不含盐的缓冲液进行清洗。另请参见附录 9 中的层析柱清洗。
- 或者, 您可以选择一个条件, 使疏水的杂质大多结合在柱子上, 而让目标蛋白质从层析柱流穿以实现杂质去除。



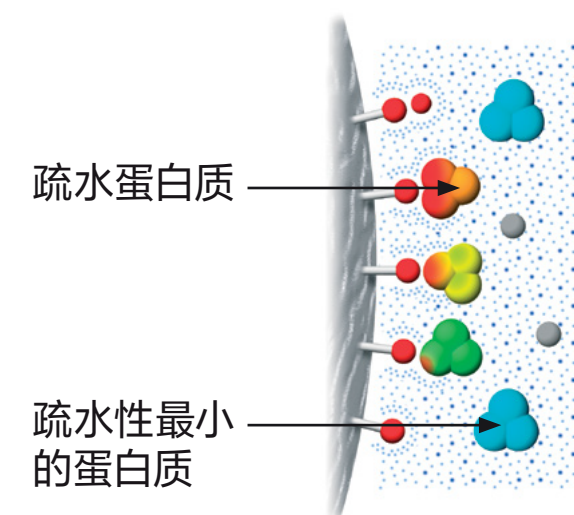
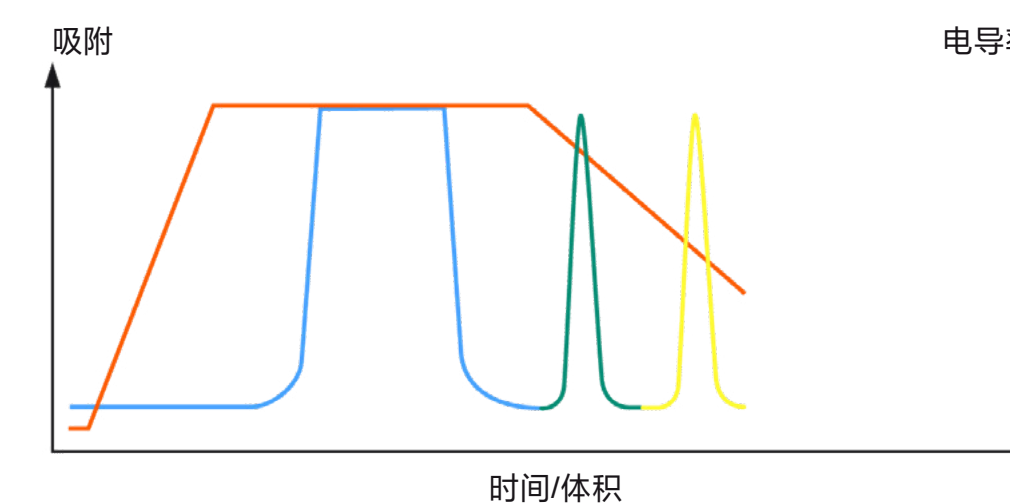
平衡

用含有高盐的起始缓冲液平衡的 HIC 填料。



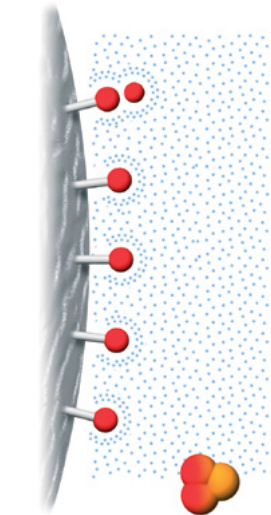
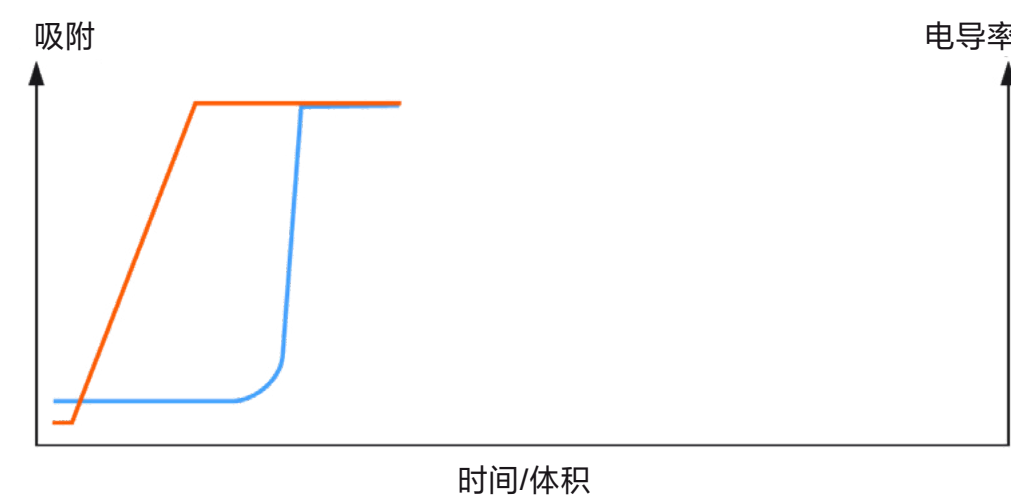
洗脱液 2

盐含量的进一步减少会洗脱下疏水性较强 (结合更紧密) 的蛋白质。



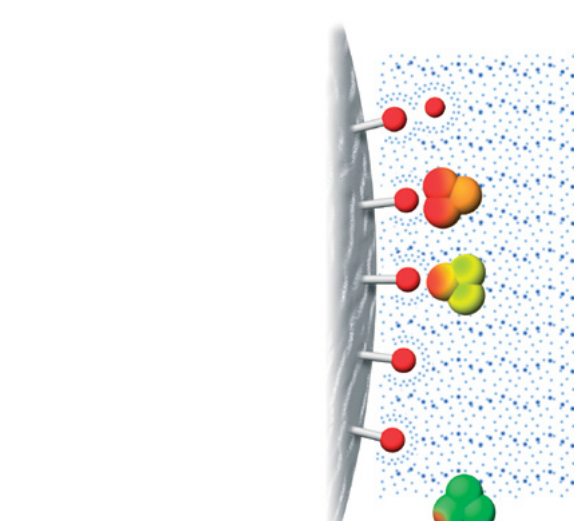
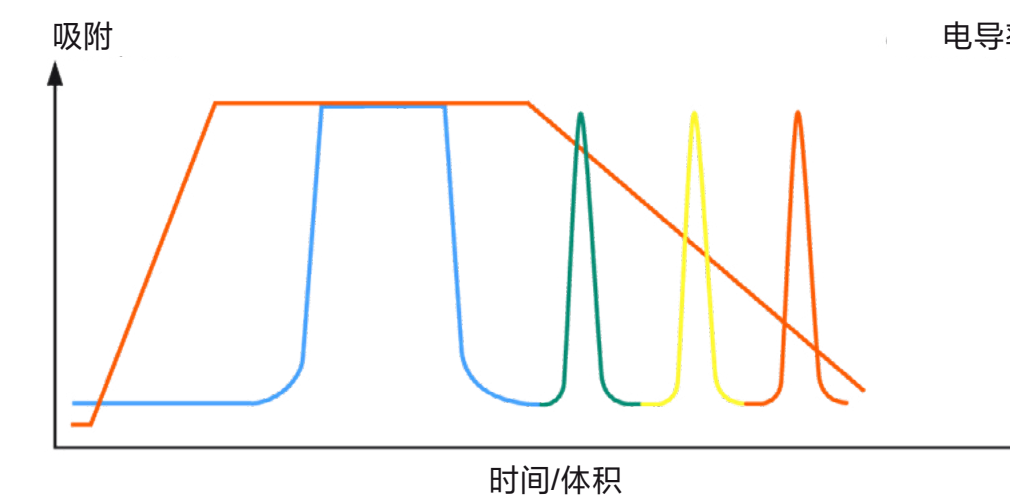
上样

起始缓冲液允许疏水蛋白质与填料上的疏水配基结合, 这使得蛋白质在配基上浓缩。疏水性弱的蛋白质会在上样过程中或上样后立即洗脱。



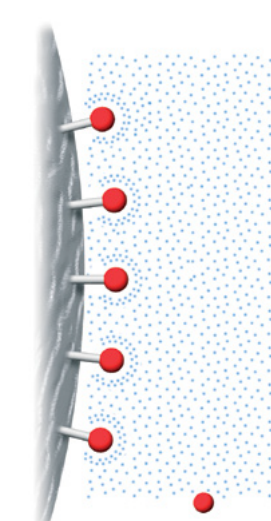
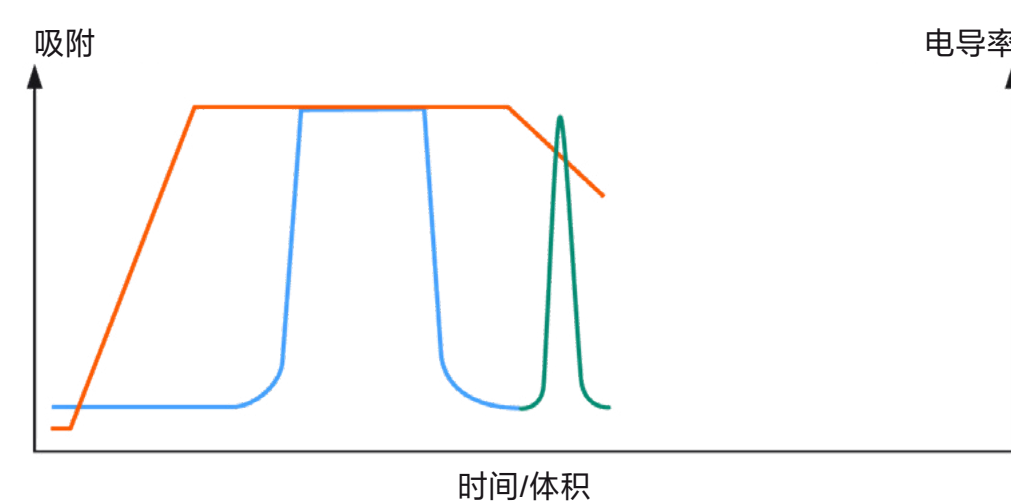
洗脱液 3

随着盐含量的继续减少, 更多的蛋白质被洗脱下来。



洗脱液 1

降低盐含量 (使用线性梯度) 可以实现疏水蛋白的洗脱。疏水性最弱的蛋白质会首先被洗脱。



清洗

在再平衡前, 用不含盐的缓冲液除去所有疏水结合的蛋白质。

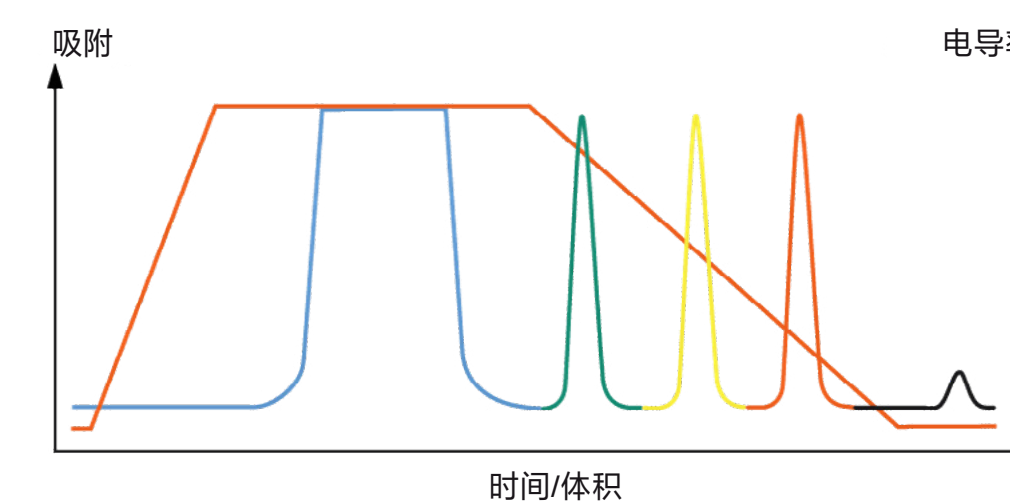


图 1.4. HIC 分离步骤

分辨率

以下因素共同决定了 HIC 分离纯化的分辨率: 从层析柱洗脱的峰之间的分离度 (选择性)、层析柱产生窄而对称的峰的能力(效率) 以及所用样品上样量 (质量)。这些因素受实际情况的影响, 例如基架性质、结合和洗脱条件、层析柱装填情况以及流速; 我们将在第 2 章详细讨论这些内容。分辨率 (R_s) 被定义为峰尖的距离与两个峰宽平均值的之比, R_s 可以从色谱图中确定, 如图 1.5 所示。

使用相同的单位测量洗脱体积和峰宽, 将得到无量纲化的分辨率值。 R_s 提供了两个峰之间的相对分离度, 您可以用它来确定是否需要进一步优化层析步骤。

如果 $R_s = 1.0$ (图 1.6), 则在 98% 的峰回收率下达到了 98% 的纯度, 前提是峰对称且大小大致相等。基线分辨率要求 $R_s >1.5$ 。在此值下, 峰纯度为 100%。

👉 一个单一的、分离良好的峰代表的不一定代表纯的物质, 但它可能代表一系列在所选择的洗脱条件下无法分离的组分。您可能需要使用其他层析介质进行进一步纯化。有关纯化策略的建议, 请参见第 4 章。

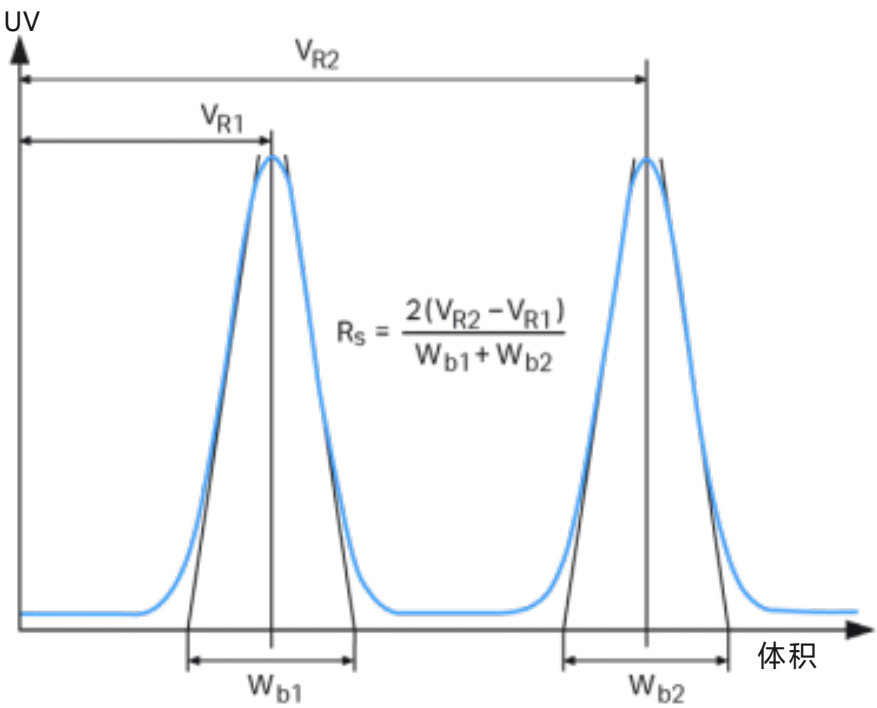


图 1.5. 确定两个峰之间的分辨率 (R_s)。

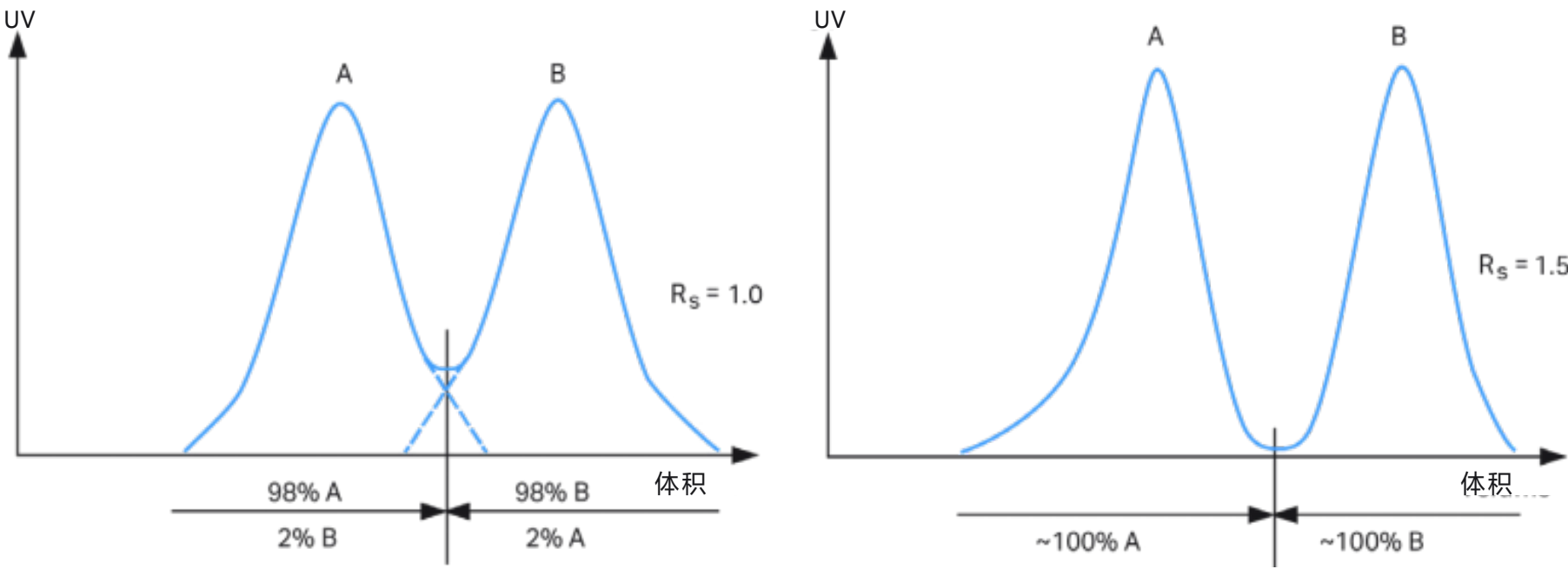


图 1.6. 具有不同分辨率的分离结果。

柱效

柱效是指从装填柱床中洗脱出窄而对称的峰的能力。它与层析柱上出现的谱带展宽有关，科研工作者通常用理论塔板数来表示（有关层析柱效率的测定，请参见附录 2）。

谱带展宽的主要原因之一是溶质分子（蛋白质）的纵向扩散。如果您将扩散的距离减到最小，您就可以将谱带展宽减到最小。在所有情况下，装填良好的层析柱有利于获得更高的分辨率。填充不均匀、过紧、过松或含有气泡的层析柱会涡流效应（缓冲液不均匀地通过层析柱）和谱带展宽，从而导致分辨率下降。图 1.7 显示了有助于提高层析柱效率的因素。粒径是分辨率的一个重要因素，通常，最小的颗粒在装填良好的层析柱中，会在正确的洗脱条件下产生最窄的峰。

- 

虽然可以通过减小基架的粒径来提高分辨率，但使用较小的颗粒通常会导致反压的增加。意味着您需要降低流速，延长运行时间。因此，您应该根据纯化要求（速度、分辨率和纯度）来选择合适的填料。
- 

如果使用装填小粒径填料的层析柱，大量高浓度样品的粘度会降低分辨率。您可能需要稀释样品或使用更大粒径的填料。

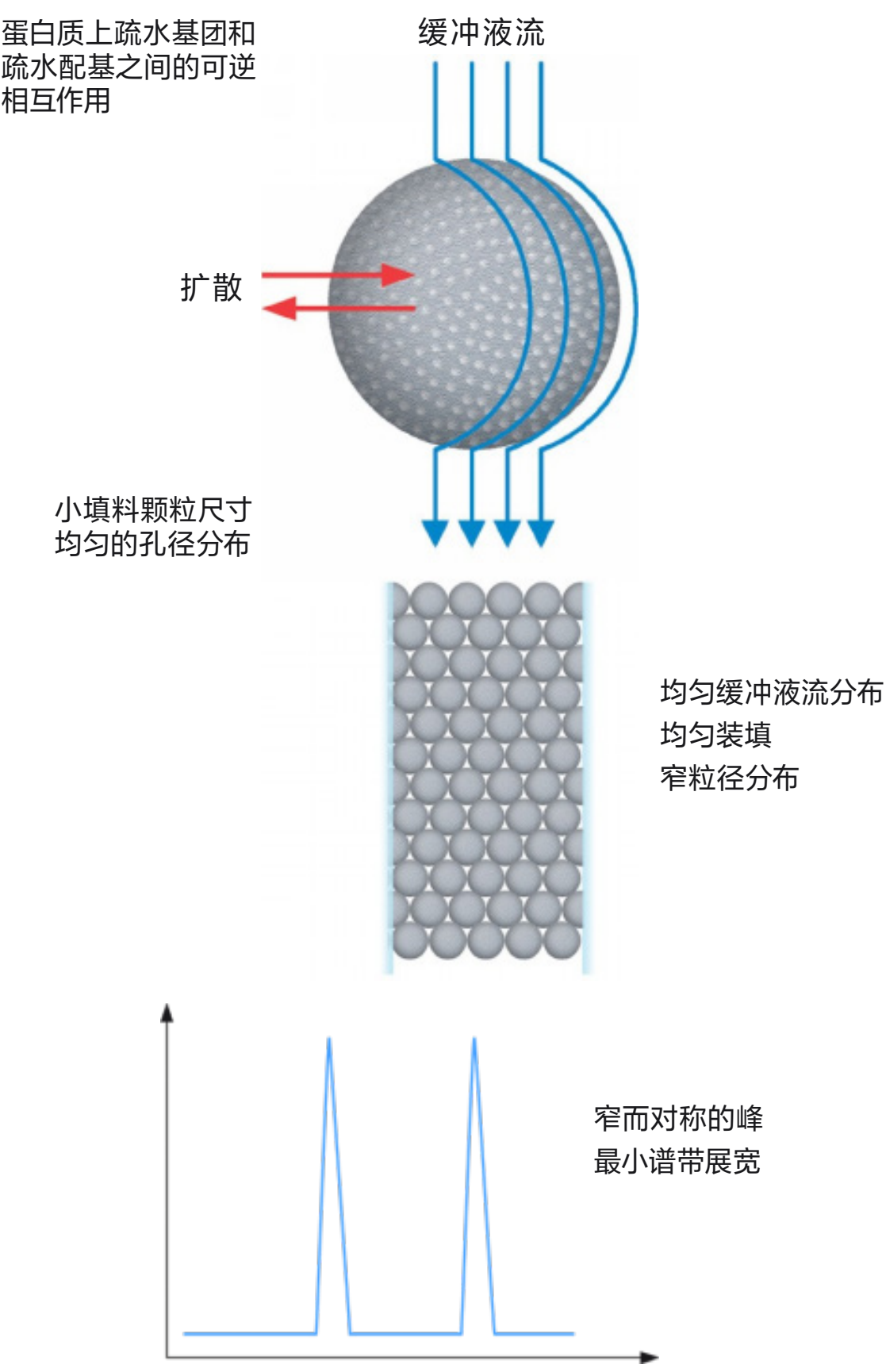


图 1.7. 影响层析柱效率的因素。

选择性

在确定分辨率时, 良好的选择性 (峰之间的分离度) 是比高的柱效更重要的因素 (图 1.8)。

在 HIC 中, 选择性很大程度上取决于配基的性质、配基在基架上的取代度、基架的性质、目标蛋白质的性质、盐的类型以及用于结合的盐的浓度。在这些性质之间建立平衡可进行解析良好的高选择性 HIC 分离。

选择性和结合载量

虽然 HIC 填料是根据配基的类型 (有时是配基密度) 来描述的, 但在您的实验条件下, 更为相关的是可以结合到 HIC 填料上的实际蛋白质量。这被称为填料对特定蛋白质的有效载量。如果定义的条件包括填料的流速, 您可以参考结合量作为填料动态载量。HIC 填料的动态载量取决于填料的性质、被纯化的蛋白质和实验条件, 例如盐浓度、流速、温度, 以及在较小程度上的 pH 值。

 配基、目标蛋白质、盐和盐浓度的特性在决定 HIC 填料的最终选择性和结合载量方面起着非常重要的作用, 因此您需要通过实验来确定和优化这些参数。这与离子交换或亲和层析等技术不同, 在这些技术中, 您可以使用“标准蛋白质”作为预测选择性和载量的指南。

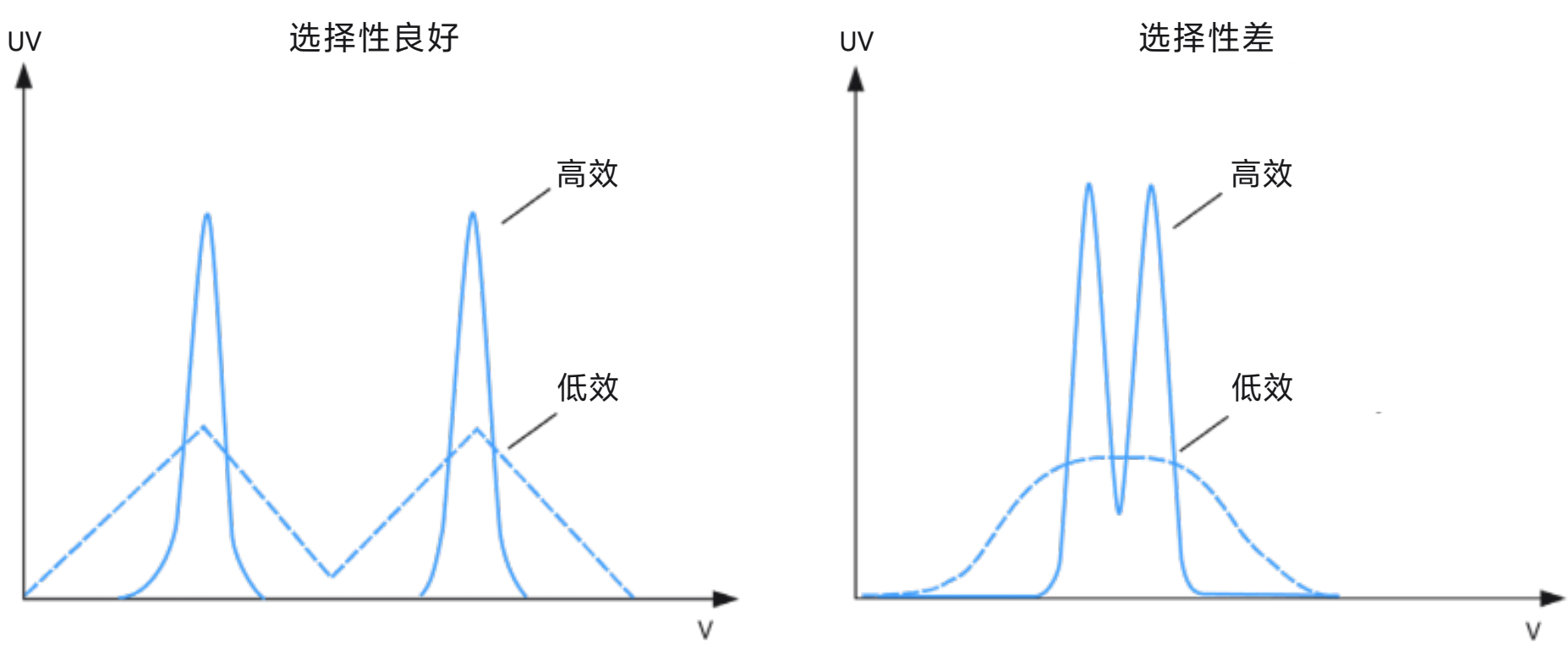


图 1.8. 选择性和效率对分辨率的影响。

选择性和盐选择

使用 HIC 填料时, 特定盐促进疏水相互作用的能力取决于存在的离子种类及其浓度 (图 1.9)。当疏水蛋白质与疏水填料相互作用时, 蛋白质沉淀具有相同的驱动力。也可以通过增加周围缓冲液的离子强度 (浓度) 来增强驱动力。

霍夫梅斯特序列描述了离子的洗脱和沉淀强度。小的高电荷离子是强沉淀剂 (抗离液序列高), 而有机酸和碱对溶液中的蛋白质有更稳定的作用 (离液序列高)。术语“离液序列高”指的是离子在水结构中产生有序或混乱的能力。根据霍夫梅斯特序列的描述, 钙盐和镁盐不是强沉淀剂, 因为这些离子可以结合到蛋白质表面的特定位点。

阴离子: $\text{SO}_4^{2-} > \text{HPO}_4^{2-} > \text{CH}_3\text{COO}^- > \text{Cl}^- > \text{NO}_3^- > \text{Br}^- > \text{ClO}_3^- > \text{I}^- > \text{ClO}_4^- > \text{SCN}^-$

阳离子: $\text{NH}_4^+ > \text{K}^+ > \text{Na}^+ > \text{Li}^+ > \text{Mg}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{胍盐}$

 钠、钾和铵硫酸盐产生相对较多的沉淀。这些盐有效地促进疏水相互作用, 并对蛋白质结构有稳定作用。实际上, 这些硫酸盐可有效促进 HIC 中配基 - 蛋白质的相互作用, 并对蛋白质结构有稳定作用。因此, 科学家常用的是 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 Na_2SO_4 、 NaCl 、 KCl 和 $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 。

 可以与 HIC 填料结合的蛋白质的量几乎线性增加, 直到特定的盐浓度。在较高的盐浓度下, 结合量继续呈指数增长。如果蛋白质不稳定或其稳定性未知, 我们建议在蛋白质结合量随盐浓度线性增加的区域进行蛋白质结合。

HIC 填料的选择性和特性

虽然配基对填料的疏水性有显著贡献, 但基架也会影响最终的选择性。用于疏水相互作用的层析填料由多孔基架制成。选择这些基架是因为它们的物理稳定性、对严格清洁条件的耐化学性以及低水平的非特异性相互作用。

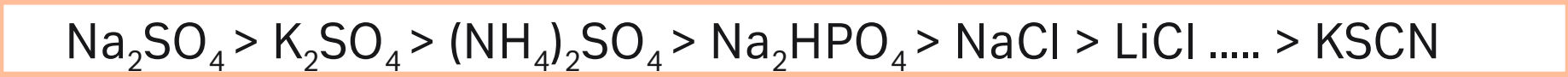


图 1.9. 某些盐对蛋白质沉淀的相对影响。

基架

- 1. 孔隙率和粒径之间的良好平衡提供了被配基覆盖的较大表面积, 并确保了高结合载量。当分离大的生物分子时, 具有开孔结构的高孔隙率是一个优势。
- 2. 惰性基架大幅度地减少了与样品成分的非特异性相互作用。
- 3. 高度的物理稳定性可确保填充填料的体积保持恒定, 即使盐浓度或 pH 值发生剧烈变化, 也有助于提高重现性, 避免重新填充层析柱。
- 4. 粒径的高物理稳定性和均匀性有利于高流速, 特别是在清洁和再平衡步骤中, 从而提高产量和生产率。
- 5. 高度的化学稳定性确保您可以在需要时使用严格的清洁溶液清洁基架。
- 6. 现代 HIC 填料使用基于琼脂糖的基架来满足化学和物理稳定性、高结合载量和不同粒径的要求 (表 1.1)。

我们的 Capto™ 和 Capto™ ImpRes 现代填料基于化学改性的高度交联琼脂糖基架 (表 1.1)。这种基架在不影响孔径的情况下提供颗粒刚性、出色的压流特性和高化学稳定性, 以支持在位清洗 (CIP)。您可以使用 Capto™ 和 Capto™ ImpRes 填料进行放大和大规模生物工艺纯化, 也可以在实验室规模进行研究和工艺开发。要选择合适的基架, 请考虑所需的分辨率程度、结合载量和流速。例如, Capto™ ImpRes 填料 (40 μm) 上的梯度洗脱将提供高分辨率分离, 而较大颗粒的 Capto™ 填料 (75 μm) 适合高流速下的大载量步级洗脱。

我们提供传统的 Sepharose™ High Performance (34 μm) 和 Sepharose™ Fast Flow (90 μm) 作为现代填料的替代品。Sepharose™ 基架基于成束排列的琼脂糖亲水链, 链内交联程度不同。要在 Sepharose™ High Performance (34 μm) 和 Sepharose™ Fast Flow (90 μm) 之间进行选择, 请考虑您需要的分辨率程度、结合载量和流速。

表 1.1. 用于 HIC 填料的基架

	填料	基架和形式	粒径 ¹
现代 填料	Capto™ ImpRes	高度交联琼脂糖, 球形	40 μm
	Capto™	高度交联琼脂糖, 球形	75 μm
传统 填料	Sepharose™ High Performance	交联琼脂糖, 球形	34 μm
	Sepharose™ 6 Fast Flow	交联琼脂糖 6%, 球形	90 μm
	Sepharose™ 4 Fast Flow	交联琼脂糖 4%, 球形	90 μm
	SOURCE™ 15	球形和单分散、多孔、刚性聚苯乙烯/二乙烯基苯颗粒	15 μm ²

¹ 累积体积分布的中值粒径。

² 中值粒径 (单分散粒径分布)。

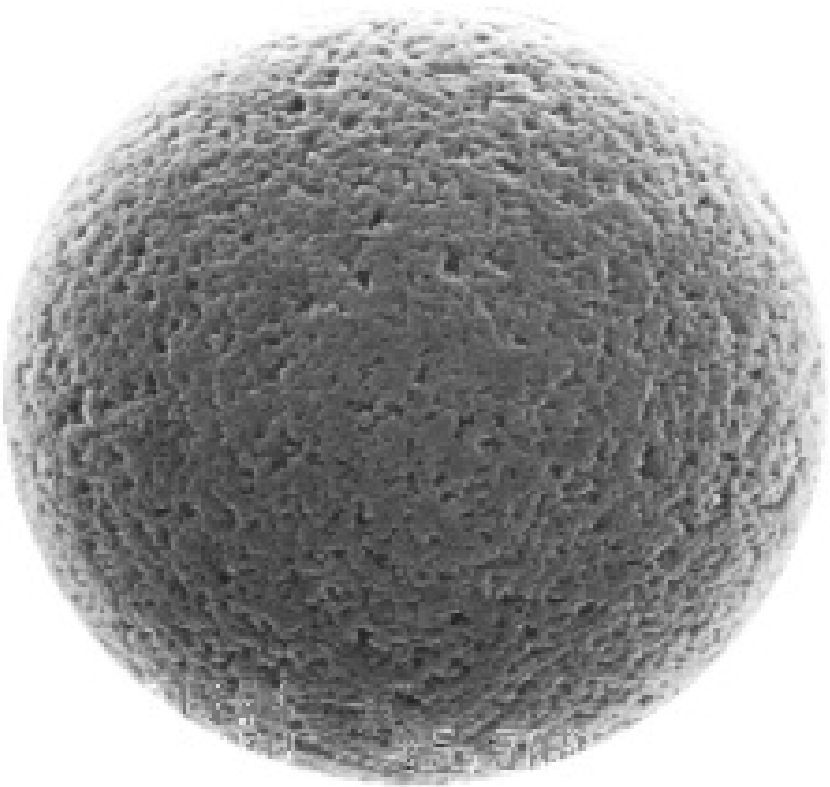


图 1.10. 高度交联的琼脂糖, 球形颗粒 (Capto™ 填料)。

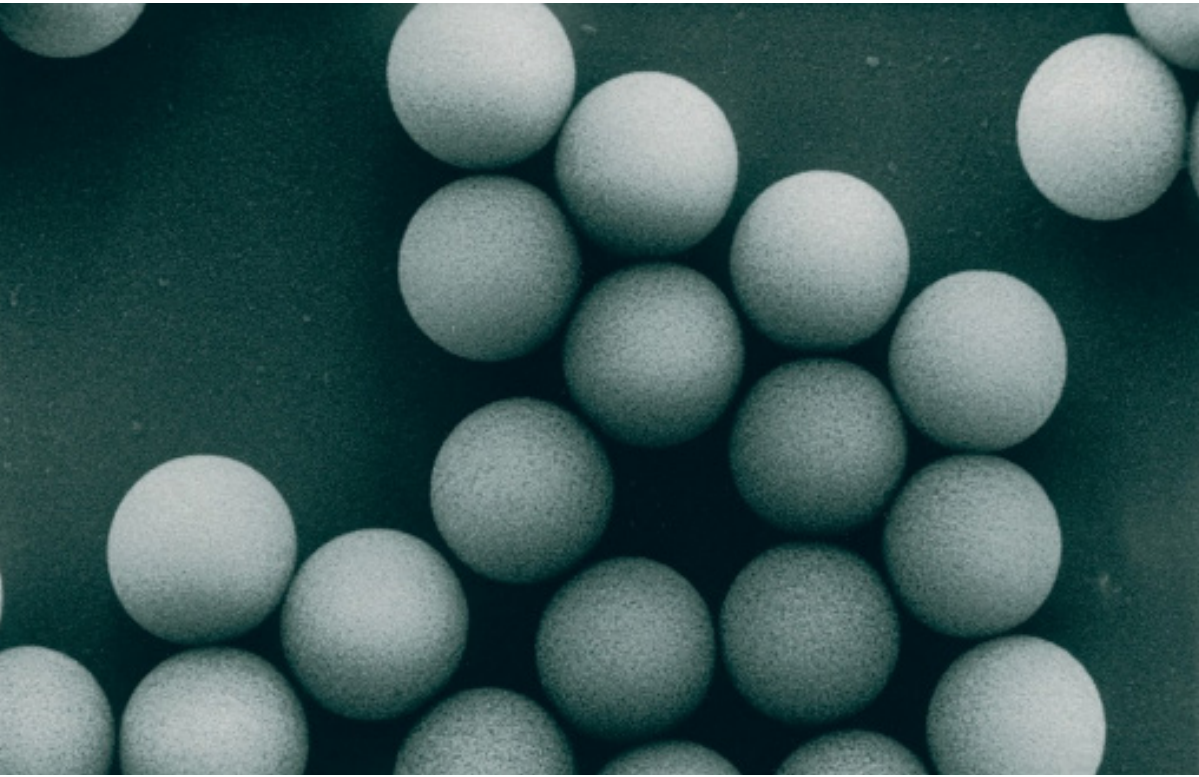


图 1.11. SOURCE™ 的电子显微照片显示球形单分散颗粒。

多年来, 科学家们已经为 HIC 填料使用了不同的基架, 例如 Sepharose™ Fast Flow 或用各种配基取代的 High Performance 基架, 您仍然可以在科学文献中找到它们的参考文献。时至今日, 一些已建立的工艺仍然包括它们。然而, 最近开发的 Capto™ 和 Capto™ ImpRes 填料基于非常坚硬的高流动性琼脂糖基架, 具有优化的孔结构, 可提供出色的压力和流动性。如果您想从显著加快的分离速度和改进的性能中获益, 您可以测试 Capto™ 和 Capto™ ImpRes 填料的选择性, 并重新优化旧方案。

SOURCE™ 基架由聚苯乙烯和二乙烯基苯制成, 产生高度球形 (单分散)、小 (15 µm) 的多孔颗粒 (图 1.11), 有助于在高流速下实现高分辨率分离。

配基和取代度

层析基架上的配基和配基取代度也有助于填料的最终疏水性及其选择性。图 1.12 显示了在相同基架上分离的蛋白质混合物的示例，但是有四种不同的配基条件；苯基（高取代）、苯基（低取代）、丁基和辛基。

配基:	(A) 苯基（高取代） (B) 苯基（低取代） (C) 丁基 (D) 辛基
样品:	细胞色素 C (1) 10 mg/mL、核糖核酸酶 A (2) 30 mg/mL、溶菌酶 (3) 10 mg/mL、α-糜蛋白酶原 (4) 10 mg/mL
进样量:	起始缓冲液中 2 mL
起始缓冲液:	100 mM 磷酸钠, 1.5 M 硫酸铵, pH 7.0
洗脱缓冲液:	100 mM 磷酸钠,
流速:	2 毫升/分钟, 60 厘米/小时
梯度:	洗脱缓冲液比例从 0% 至 100%, 洗脱 10 个柱体积
检测:	280 nm

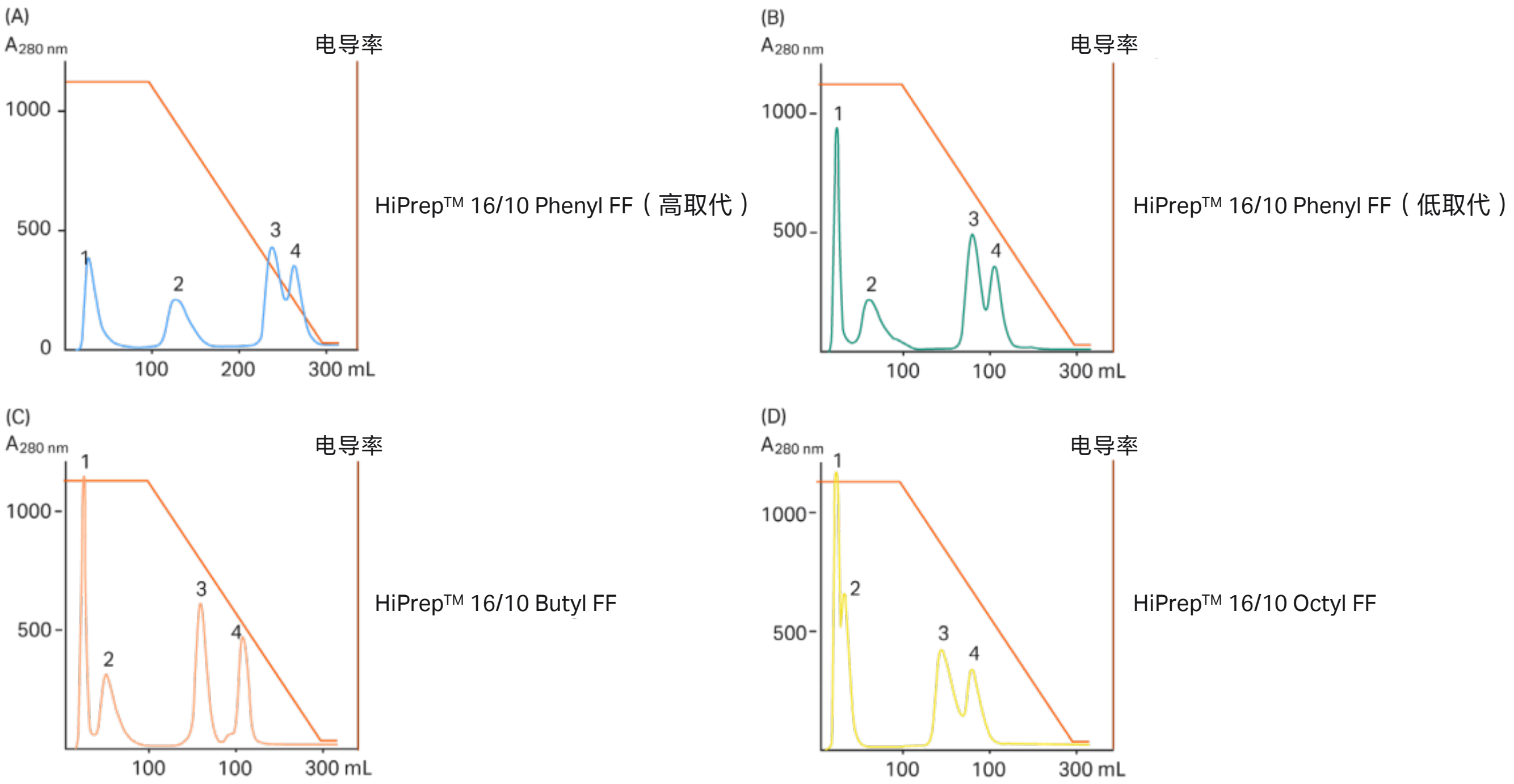


图 1.12. 不同的配基和配基密度差异影响 HIC 填料的选择性。

在一定程度上, HIC 填料的结合载量随着配基密度的增加而增加。同时, 相互作用的强度增加, 这可能导致难以洗脱结合的成分。选择用相同配基取代但配基密度较低的填料可以解决这个问题。图 1.12 A 和 B 显示了两种填料之间配基密度的差异如何影响选择性。

常见的疏水配基如表 1.2 所示。通常, HIC 填料根据其与样品成分的相互作用分为两类。直链烷基链 (丁基、辛基、醚基、异丙基) 表现出“纯”疏水特性, 而芳基配基 (苯基) 则表现出混合模式行为, 其中芳族和疏水相互作用以及电荷缺失都对其最终层析特性起作用。



如果目标蛋白质在高盐条件下不能结合, 请使用疏水性更强的填料。如果目标蛋白质结合非常强烈, 以至于需要非极性添加剂进行洗脱, 请降低起始缓冲液中的盐浓度或使用疏水性较低的填料。

表 1.2. HIC 填料上被取代的配基

苯基	—O— 
丁基-S	$\text{—S—(CH}_2\text{)}_3\text{—CH}_3$
丁基	$\text{—O—(CH}_2\text{)}_3\text{—CH}_3$
辛基	$\text{—O—(CH}_2\text{)}_7\text{—CH}_3$
醚类	$\text{—O—CH}_2\text{—CHOH—CH}_2\text{—OH}$
异丙基	$\text{—O—CH—(CH}_3\text{)}_2$

选择性和洗脱

图 1.13 和 1.14 显示了常见的 HIC 分离形式，其中通过使用线性梯度或步级洗脱降低缓冲液的盐含量来洗脱蛋白质。紫外线吸收率和电导率曲线分别显示了蛋白质峰的洗脱，以及洗脱期间盐浓度的变化。样品上样、洗脱、清洗和再平衡过程中使用的缓冲液体积以层析柱体积 (CV) 表示。例如，对于具有 1 mL 柱床体积的层析柱，5 CV = 5 mL。使用 CV 描述分离曲线支持方法开发，并在放大时将方法转移到不同尺寸的层析柱。

当从未知样品开始时 (尽可能多的成分结合到层析柱上，并以不同的方式洗脱，以观察总的蛋白质图谱)，我们经常使用梯度洗脱 (图 1.13) 进行高分辨率分离和分析。

我们以几种方式使用步级洗脱 (图 1.14)。使用梯度洗脱优化 HIC 分离后，改为步级洗脱可加快分离时间，减少缓冲液消耗，同时保持所需的纯度水平。

您还可以使用相同的洗脱步骤进行组分离，以浓缩目标蛋白质，并快速将它们从不想要的物质中去除。在这种方法中，您以富集、浓缩的形式洗脱目标蛋白质。

有时，您可以通过选择可最大化污染物结合并允许目标蛋白质通过层析柱的条件，使用步级洗脱来去除污染物。如果使用这种方法，应确保层析柱的结合载量足以结合所有污染物。

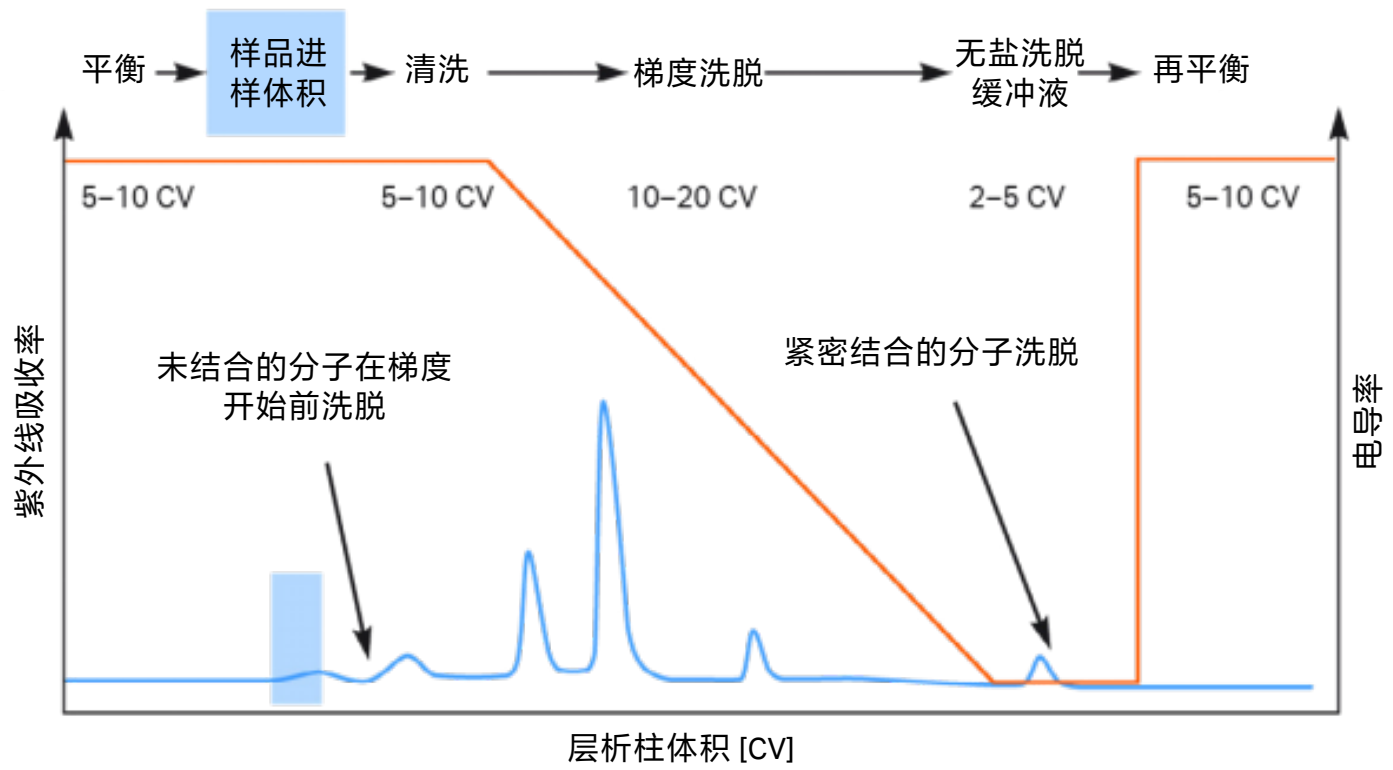


图 1.13. 使用线性梯度洗脱的典型高分辨率 HIC 分离。

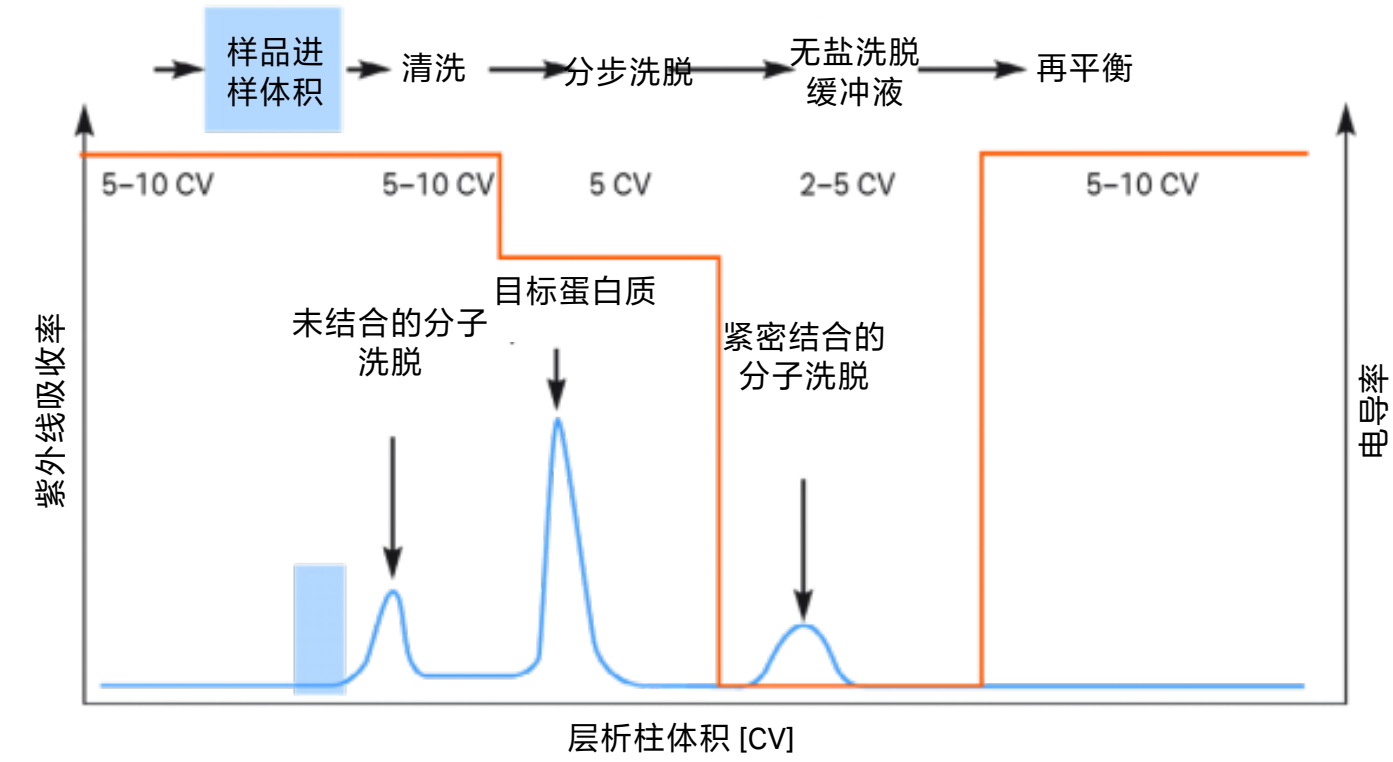


图 1.14. 使用分步洗脱的典型 HIC 分离。

02

实际情况下的疏水 相互作用层析

本章就如何控制实验条件以实现成功分离提供了实用建议, 并针对如何为每种应用选择适当的填料或预装填层析柱提供了指导。您可以在第 3 章中找到更多应用示例和产品相关信息。

填料选择

我们在第 1 章解释了各种 HIC 填料的来源和区别。总体而言, 许多参数会影响 HIC 填料的性能 (选择性、分辨率和结合载量): 蛋白质性质、配基类型、配基取代度、浓度和样品上样过程中所用盐的类型、去垢剂的存在, 以及具有轻度影响的温度、pH 和基架类型。了解各参数的作用和重要性后, 将有助于以所需分辨率、通量和速度进行每次分离。鉴于要考虑如此多的参数, 我们建议按如下方式对分离开发步骤进行优先级排序:

1. 筛选, 以便选择具有正确选择性的填料。*
 2. 选择结合期间要使用的盐的类型和浓度。
 3. 优化梯度洗脱以最大化分辨率和/或回收率。
 4. 如果未达到理想分辨率或回收率, 尝试使用添加剂和/或调节 pH 值。

*选择 HIC 填料时, 选择性是最重要的参数。如果存在多种合适的填料, 根据预期的最终纯化规模和分离目的 (捕获、中度纯化或精纯; 参见图 2.1) 重新选择。对基架的选择通常取决于具有正确选择性的填料的可用性。

 在所有分离过程中保持温度恒定。

纯化策略中的 HIC (CIPP)

为了确保高效且可重复的蛋白质纯化达到所需纯度, 应开发一个遵循捕获、中度纯化和精纯 (CIPP) 策略的多步骤流程。我们在图 2.1 中展示了这一策略, 并在第 4 章中予以详述。

每个阶段都有一个具体目标, 该目标主要取决于起始物料的性质。您可以根据纯化步骤的目的和起始物料的状态选择 HIC 填料。制药行业和科研实验室通常使用 CIPP 来加快方法开发进程, 以便在较短时间内生产纯净产品, 并获得良好的经济效益。

可以将 HIC 用于捕获、中度纯化或精纯步骤。由于样品应该拥有较高的盐浓度, 以促进疏水相互作用, 因此 HIC 非常适合通过硫酸铵沉淀粗纯样品后的捕获步骤。HIC 也非常适用于离子交换分离后的中间步骤。在这两种情况下, 样品已处于高盐溶液中, 只需添加更多的盐即可完成制备。由于 HIC 分离将目标蛋白质浓缩到缩小体积中, 因此, 也可以将组分直接转移到尺寸排阻层析中。可以将 HIC 与步级洗脱组合用于快速捕获步骤, 或使用梯度洗脱在精纯步骤中获得最高分辨率。

任何纯化的首要步骤都是正确制备样品。我们将在附录 1 和第 2 章中详细介绍这一点。有关在纯化策略中使用 CIPP 步骤的更多详细信息, 请参见第 4 章。

捕获

用于主要捕获步骤的填料旨在分离、浓缩和稳定目标产物, 应具备速度快、载量大的特性。对于捕获, 我们建议使用基于 Capto™ 基架 (75 µm 粒径, Capto™ Phenyl、Capto™ Butyl 或 Capto™ Octyl) 的 HIC 填料, 因为它具有出色的压力和流动性 (流速最高达 600 cm/h)。

 选择 Capto™ PlasmidSelect (40 µm 粒径) 纯化超螺旋 DNA。

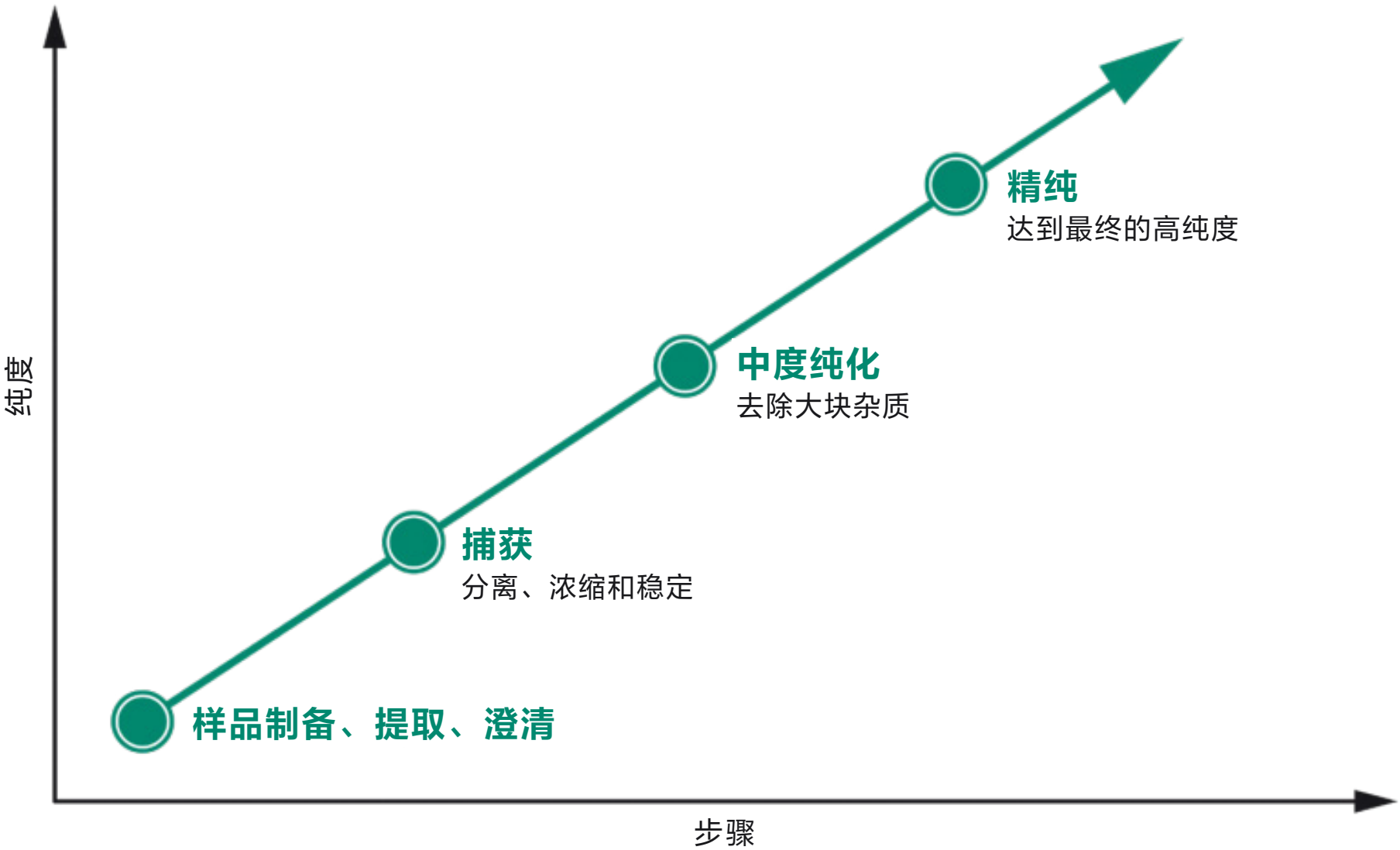


图 2.1. 样品制备、提取、澄清和 CIPP。

中度纯化

用于中度纯化的填料旨在去除大部分大块杂质, 应具备载量大、分辨率高的特性。我们建议使用粒径较小 (40 μm) 且具有出色压力 - 流动性的 Capto™ ImpRes 填料 (丁基或苯基填料)。

精纯

用于精纯步骤的填料旨在通过去除痕量杂质或密切相关的物质来达到最终纯度, 应具备尽可能高的分辨率。进行如下选择:

- Capto™ ImpRes (40 μm 粒径): 选择用于以下环境中的精纯: 实验室或需要高分辨率和高通量的大规模应用。
- 如果较大粒径的填料不具备所需的选择性, 请尝试使用 SOURCE™ 15 (15 μm 粒径) 进行 HIC 分离。

进行 HIC 分离的实际考虑因素

本节涵盖了 HIC 分离中每个步骤的细节, 以及有关如何提高分辨率和整体性能的实用提示和技巧。实际上, 分离步骤可以总结为右边绿色框中所述步骤:

实际考虑因素

1. 用 5 至 10 个柱体积 (CV) 的起始缓冲液平衡层析柱, 或直到紫外基线和电导率稳定。
2. 将样品调节至选定的盐浓度 (如有必要, 调节 pH 值)。过滤, 并上样到层析柱。
3. 用 5 至 10 个 CV 的起始缓冲液清洗, 或直到紫外基线和电导率稳定, 即所有未结合的物质都已通过层析柱进行清洗。
4. 使用 10 至 20 个 CV 的梯度体积开始洗脱, 逐渐增加洗脱缓冲液的比例, 直到盐浓度达到最低, 即不含盐的缓冲液 (100% 洗脱缓冲液)。
- 或者, 如果梯度构建设备不可用, 则使用最多 5 个 CV 的洗脱缓冲液, 以低于起始缓冲液的盐浓度洗脱结合的蛋白质。重复上述操作, 逐步降低盐含量, 直到目标蛋白被洗脱。
5. 用 2 至 5 个 CV 的无盐洗脱缓冲液清洗, 洗脱任何残留的疏水结合物质。
6. 用 5 至 10 个 CV 的起始缓冲液再平衡, 或直到电导率达到所需值。

在本节中, 我们将重点介绍这些步骤以及更详细的提示和建议。

缓冲液体积用 CV 表示, 例如, 对于柱床体积为 1 mL 的层析柱, 3 CV = 3 mL。使用 CV 描述分离曲线有助于方法开发和将方法转移到不同尺寸的层析柱。通常, 通过优化, 可以减少每个分离阶段的 CV 数量。例如, 如果可以保持分辨率, 则可以减少梯度体积, 并且在分离相当干净的样品时, 可能只需少量缓冲液进行清洗。

 在整个分离过程中, 将样品、起始和洗脱缓冲液、层析柱和层析设备保持在相同的恒温下, 以确保结果的一致性和可重现性。



图 2.2. HiTrap™ Capto™ HIC 选择套件和 PreDictor™ Capto™ HIC 筛选套件。

筛选选择性

在开发的初始阶段, 您可以节省时间, 使用小型 (1 mL) 预装填层析柱, 例如 HiTrap™ Capto™ HIC 选择套件中的层析柱 (图 2.2), 或预装填有不同 Capto™ HIC 填料 (例如 PreDictor™ Capto™ HIC 筛选套件) 的 96 孔板进行采样。您可以根据所需的选择性快速、高效地筛选各种填料。这种方法非常有用, 因为即使您知道目标蛋白质的性质, 最终的选择性、结合载量和回收率在很大程度上仍取决于填料与特定目标蛋白质的相互作用。

HiTrap™ Capto™ HIC 选择套件包含基于高流动性琼脂糖的填料 (Capto™ 和 Capto™ ImpRes):

- HiTrap™ Capto™ Phenyl (高取代)
- HiTrap™ Capto™ Butyl
- HiTrap™ Capto™ Octyl
- HiTrap™ Capto™ Phenyl ImpRes
- HiTrap™ Capto™ Butyl ImpRes

您可以使用所有 HiTrap™ 层析柱进行小规模纯化, 每种层析柱都包含详细的使用方案。这些测试套件中的填料可用于大规模生产, 因此您可以轻松地将优化方法转移到您需要的操作规模。

PreDictor™ Capto™ HIC 筛选套件 (图 2.2) 支持高通量工艺开发 (HTPD), 允许使用 96 孔板平行筛选多种层析条件。它包含基于高流动性琼脂糖 Capto™ 和 Capto™ ImpRes 的填料:

- Capto™ Phenyl (高取代)
- Capto™ Butyl
- Capto™ Butyl-S
- Capto™ Octyl
- Capto™ Phenyl ImpRes
- Capto™ Butyl ImpRes

 在开始任何 HIC 分离之前, 建立样品的“盐稳定窗口”。例如, 向粗样品中加入越来越多的盐, 以确定沉淀发生时的浓度。为避免沉淀, 确保样品上柱时低于该盐浓度。关于使用硫酸铵沉淀粗纯样品的指南, 请参见附录 1。如可能, 测试目标蛋白质的生物活性, 以确定可以保持活性的浓度范围, 要记住的是, 在活性测试之前, 可能需要对样品进行脱盐处理。

自动化 HIC 填料筛选、方法开发和优化

AKTA™ 层析系统用户可以选择方法模板, 并对系统进行编程, 以使用一系列层析柱和缓冲液条件自动进行分离。

1. 样品制备: 建立了盐稳定窗口后, 从可以保持生物活性且不会导致沉淀问题的最高盐浓度开始。将样品调节至起始缓冲液的盐浓度, 以促进疏水相互作用。当添加固体盐时, 为了避免由局部高盐浓度引起的沉淀, 可以从高浓度储备溶液中添加盐。直接调节样品的 pH 值。HIC 对 pH 条件不太敏感, 因此不必彻底置换缓冲液。

2. 制备起始和洗脱缓冲液: 50 mM 磷酸盐, pH 7.0。向起始缓冲液中添加硫酸铵 (根据盐稳定窗口, 最多 2 M)。
 3. 在高盐起始缓冲液中平衡之前, 先在无盐洗脱缓冲液中清洗每个层析柱。这可以避免在 20% 乙醇中储存层析柱时出现盐沉淀。
 4. 寻找理想选择性, 在一系列盐浓度下将样品上样到各层析柱。在整个运行过程中收集洗脱液。选择一种填料, 在梯度内洗脱目标蛋白质。
 5. 寻找起始缓冲液中的最低盐浓度, 使目标蛋白质的结合载量最大化, 保持或提高分辨率, 并大幅度地降低其他结合蛋白质的污染。
 6. 优化最陡梯度, 以获得可接受的分辨率。
 7. 优化最高流速, 以保持分辨率并大幅度地减少分离时间。检查特定填料的推荐流速。
 8. 在保持良好分辨率的同时, 优化可行最大上样量。一般来说, 在梯度洗脱的情况下, 上样层析柱总结合载量的 20% 至 30% 可获得理想分辨率。

 优化分离条件后, 通过转移到步级洗脱来减少分离时间和缓冲液消耗。使用步级洗脱时, 通常可以增加上样量。

图 2.3 显示了在 HiTrap™ 1 mL 层析柱中使用预装填有各种配基和粒径的不同 HIC 填料进行填料筛选的示例。为了大幅度地减少捕获后的样品调节需求, 我们将缓冲液的 pH 值保持在 5.0。我们选择了含苯基 (高取代) 的填料, 因为这种填料对目标蛋白质表现出理想选择性。我们在梯度内洗脱蛋白质, 并将其与大块污染物分离。然后, 我们优化了条件, 以便在工艺放大之前, 使用步级洗脱来最大化通量和目标蛋白质的浓度 (图 3.23, 第 3 章显示了优化的洗脱方案和随后的工艺放大)。

手动填料筛选、方法开发和优化

您可以将 HiTrap™ 层析柱与注射器或蠕动泵配合使用, 进行手动填料筛选、方法开发和方法优化。但是, 使用注射器会限制 HIC 分离程度, 因为分离机制并非简单的“开/关”过程, 要实现理想分离, 需要一定程度的梯度洗脱。

此处所述的方法针对 1 mL HiTrap™ 层析柱进行了优化, 如果您采用另一种 CV, 则应进行调整。另外, 请注意, 根据样品或缓冲液的粘度, 可能需要降低流速。

层析柱:

HiTrap™ Phenyl HP
HiTrap™ Phenyl FF(低取代)
HiTrap™ Phenyl FF(高取代)
HiTrap™ Butyl FF
HiTrap™ Octyl FF

样品:

来自离子交换获得的 Fab 组分,

上样量:

2 mL

层析柱体积:

1 mL

起始缓冲液:

1.0 M (NH₄)₂SO₄, 50 mM NaAc, pH 5.0

洗脱缓冲液:

50 mM NaAc, pH 5.0

流速:

2 mL/min (300 cm/h)

梯度:

20 CV 中 0% 至 100% 洗脱缓冲液

系统:

ÄKTA™ 层析系统

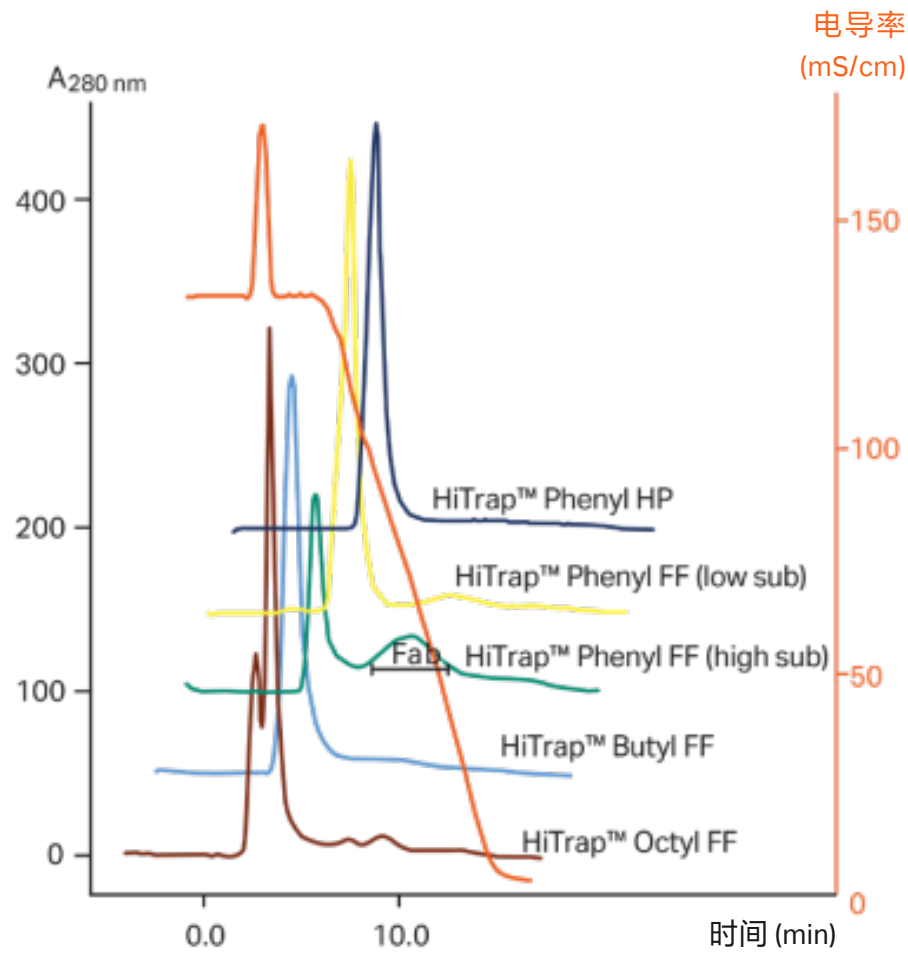


图 2.3. 对预装填在 HiTrap™ 1 mL 层析柱中的不同 HIC 填料进行填料筛选。

使用 HiTrap™ Capto™ HIC 选择套件进行选择性筛选

- 1. 样品制备: 建立了盐稳定窗口后, 从可以保持生物活性且不会导致沉淀问题的最高盐浓度开始。将样品调节至起始缓冲液的盐浓度, 以促进疏水相互作用。从高浓度储备溶液中添加盐, 以避免因盐浓度高 (如果添加固体盐, 可能会在局部发生)而导致沉淀。直接调节样品的 pH 值。由于 HIC 对 pH 条件不太敏感, 因此不必彻底置换缓冲液。
- 2. 准备起始和洗脱缓冲液: 50 mM 磷酸盐, pH 7.0。向起始缓冲液中添加硫酸铵 (根据盐稳定窗口, 最多 2 M)。
- 3. 用 5 至 10 mL 无盐洗脱缓冲液以 1 mL/min 的速度清洗层析柱。当层析柱储存在 20% 乙醇中时, 这可以避免盐沉淀。
- 4. 用 5 至 10 mL 起始缓冲液以 1 mL/min 的速度平衡层析柱。
- 5. 以 1 mL/min 的速度加入已知量的样品。收集洗脱液。
- 6. 用至少 5 mL 起始缓冲液以 1 mL/min 的速度清洗, 或者直到洗脱液中没有出现任何物质。收集洗脱液。
- 7. 用洗脱缓冲液以 1 mL/min 的速度洗脱结合的物质 (通常使用 3 至 5 mL 便足够, 但根据实验条件可能需要其他体积)。收集洗脱液。
- 8. 分析所有洗脱液 (例如, 通过活性测定), 并测定纯度和与层析柱结合的量。
- 9. 选择与目标蛋白质结合并可被洗脱的填料。如果运行梯度, 选择具有理想选择性和分辨率的填料。

筛选结合 (盐) 条件

- 1. 使用从先前方案中选择的填料和缓冲液, 在相同 pH 值下设置一系列起始缓冲液, 但每种缓冲液中的硫酸铵浓度降低 (例如, 从 1.5 M、1.0 M、0.5 M 开始, 最低浓度为 0.05 M)。
- 2. 对于每个盐浓度, 重复之前方案中的步骤 2 至 7。
- 3. 测定符合以下条件的盐浓度: 允许结合目标蛋白质, 同时污染物要么被洗出, 要么保持结合在层析柱上。测定实现目标蛋白质完全洗脱所需的最低盐浓度。

优化梯度、流速和上样

1. 如果您拥有梯度制备设备, 应测定提供可接受分辨率的最陡梯度。

2. 从 10 个 CV 梯度开始。根据您在筛选过程中测定的值, 从结合目标蛋白质所需的盐浓度开始, 下降到洗脱所需的最低盐浓度。
或者, 从 0% 至 50% 洗脱缓冲液梯度和 10 至 20 个 CV 梯度体积开始。

3. 为了节省时间, 请测定可保持分辨率并能大幅度减少分离时间的最高流速。检查特定填料的推荐流速。

4. 测定在保持分辨率的同时可以应用的最大上样量。一般来说, 在梯度洗脱的情况下, 上样层析柱总结合载量的 20% 至 30% 可获得理想分辨率。如果分辨率适宜或使用步级洗脱, 通常可以增加上样量。



为了减少分离时间和缓冲液消耗, 可以在确立优化的分离条件后转移到步级洗脱。使用步级洗脱时, 通常可以增加上样量。

样品性质和配基选择

当测定 HIC 填料的选择性时, 配基的类型和目标蛋白质的性质是非常重要的参数。这意味着您需要通过筛选实验, 最好使用目标蛋白质, 根据经验确定合适的配基。即使您假设某些蛋白质具有非常相似的特性, 但在 HIC 分离中, 它们在相同实验条件下的相互作用也可能迥然不同, 如图 2.4 中三种单克隆抗体的行为所示。

层析柱:

样品:

样品制备:

起始缓冲液:

洗脱缓冲液:

梯度:

流速:

HiTrap™ Phenyl HP, 1 mL

1) 单克隆抗体 anti-lac cl 507, 8.8 mg/mL, 100 μL
2) 单克隆抗体 anti-trn cl 739, 1.0 mg/mL, 500 μL
3) 单克隆抗体 anti-TSH cl 79, 6.7 mg/mL, 100 μL
(所有三种单克隆抗体都是纯的, 由瑞典乌普萨拉的 Pharmacia Diagnostics AB 公司友情赠送)

用起始缓冲液进行 1:1 (v/v) 稀释

50 mM NaH₂PO₄, 1.0 M (NH₄)₂SO₄, pH 7.0

50 mM NaH₂PO₄, pH 7.0

15 CV 中的 0% 至 100% 洗脱缓冲液

室温下 1.0 mL/min (156 cm/h)

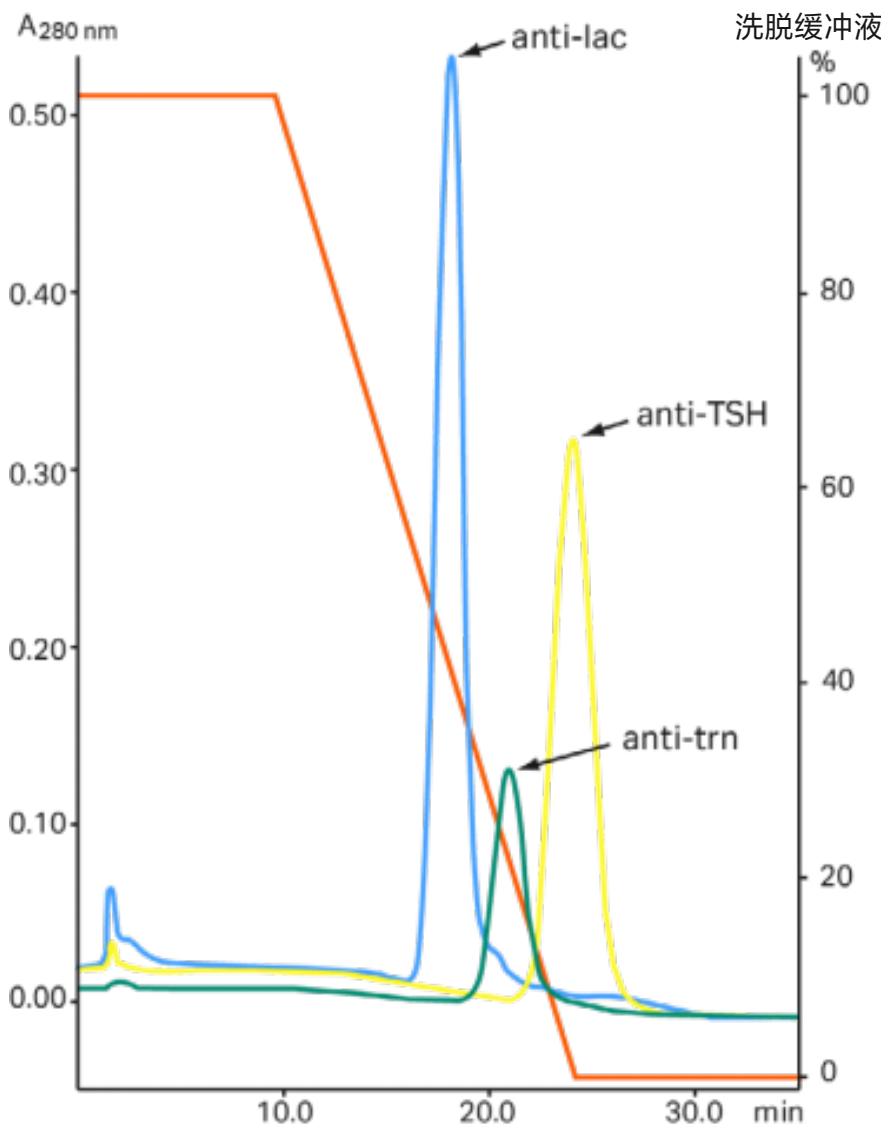


图 2.4. 三种单克隆抗体在使用苯基配基的相同运行条件下具有不同的相互作用。合适的配基必须凭经验确定。

盐选择和缓冲液制备

盐

在 HIC 中, 结合过程比洗脱过程更具选择性, 因此必须优化起始缓冲液的条件。正确的盐和盐浓度是影响载量和最终选择性的最重要参数。目标是优化条件, 以达到结合目标蛋白质所需的选择性, 并确保大多数杂质通过层析柱。

第 1 章解释了不同盐对疏水相互作用的影响。实际上, 钠、钾或铵硫酸盐可有效促进 HIC 中配基-蛋白质的相互作用, 并对蛋白质结构有稳定的影响。因此, 常用的盐是 (NH₄)₂SO₄、Na₂SO₄、NaCl、KCl 和 CH₃COONH₄。图 2.5 显示了不同盐如何影响选择性的示例。在该例中, 我们在起始缓冲液中使用 1.7 M 硫酸铵获得了四种标准蛋白质的理想分辨率。

与填料选择一样, 在选择用于 HIC 分离的盐时需要反复试验, 因为每种盐促进疏水相互作用的能力不同。随着盐浓度的增加, 结合蛋白质的量将几乎线性增加到特定盐浓度, 并在更高浓度下继续呈指数增加。

- 👉 在给定浓度下, 与其他盐类相比, 硫酸铵通常表现出良好的分辨率, 可以在最高达 2 M 的浓度下使用。
- 👉 使用氯化钠时, 通常需要最高达 3 M 的浓度。
- 👉 硫酸钠是一种很好的盐析剂, 但是蛋白质溶解度问题使得它不能在高浓度下使用。
- 👉 当 pH 值高于 8.0 时, 我们不建议使用硫酸铵。

层析柱:	HiTrap™ Butyl FF, 1 mL
样品:	1 mg/mL 细胞色素 C, 1 mg/mL 溶菌酶, 1 mg/mL α-糜蛋白酶原, 3 mg 核糖核酸酶 A
上样量:	1 mL 起始缓冲液中 6 mg
起始缓冲液:	(A) 0.1 M 磷酸钠, 1.7 M 硫酸铵, pH 7.0 (B) 0.1 M 磷酸钠, 1 M 硫酸钠, pH 7.0 (C) 0.1 M 磷酸钠, 3 M 氯化钠, pH 7.0
洗脱缓冲液:	0.1 M 磷酸钠, pH 7.0
流速:	0.5 mL/min, 75 cm/h
梯度:	10 CV 中的 0% 至 100% 洗脱缓冲液
系统:	AKTA™ 层析系统
检测:	280 nm

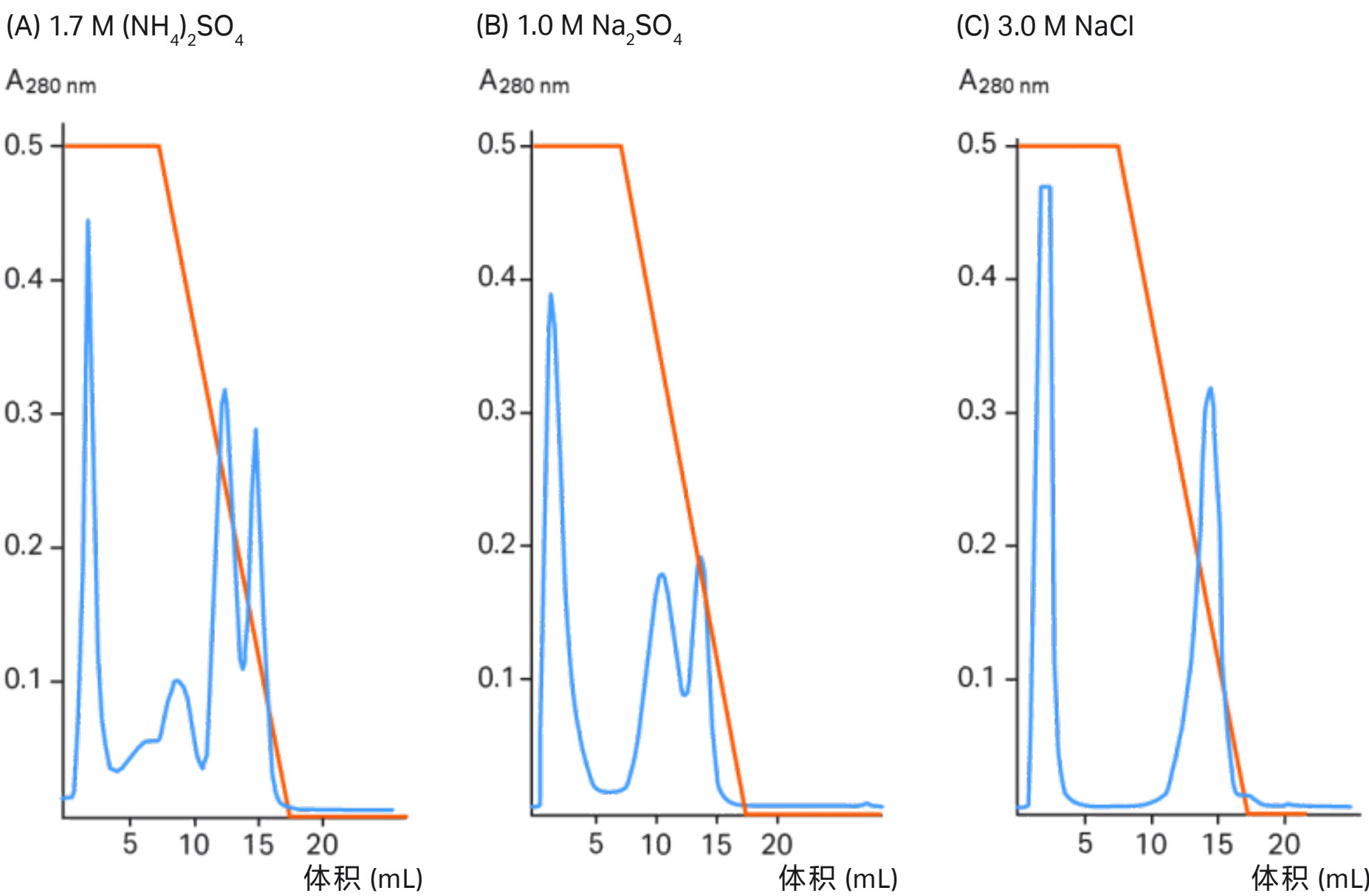


图 2.5. 不同的盐会影响选择性: 洗脱按照洗脱体积递增顺序进行: 细胞色素 C、溶菌酶、核糖核酸酶 A、α-糜蛋白酶原。

盐浓度

图 2.6 显示了盐浓度对选择性和分辨率的影响。在该例中, 目标蛋白质是最后洗脱的峰。填料的选择性适宜, 因为蛋白质在梯度内洗脱, 并与污染物很好地分离。

在 (A) 中, 目标蛋白质在锐区洗脱, 但在梯度的后期进行。降低初始盐浓度 (B) 可获得相似的分辨率, 但应确保在早期运行中结合的污染物 (盐浓度较高) 在初始清洗步骤中洗脱。只有目标蛋白被结合, 降低了污染物与目标蛋白质共洗脱的风险, 并增加了层析柱对目标蛋白质的载量。在甚至更低的初始盐浓度 (C) 下运行时, 显示出对目标蛋白质的良好选择性, 但效率不佳。在样品上样过程中, 样品结合不够牢固, 导致洗脱过程中明显的峰展宽。

- 

如果目标分子洗脱得太晚或根本不洗脱, 并且无法切换到不同的填料, 请尝试用低于 50% 的盐结合。
- 

一些蛋白质会在高盐水平下开始沉淀。您可能需要降低起始缓冲液中的盐浓度, 以防止运行过程中出现沉淀。以较小数量重复上样也有助于避免因沉淀而导致得率损失。

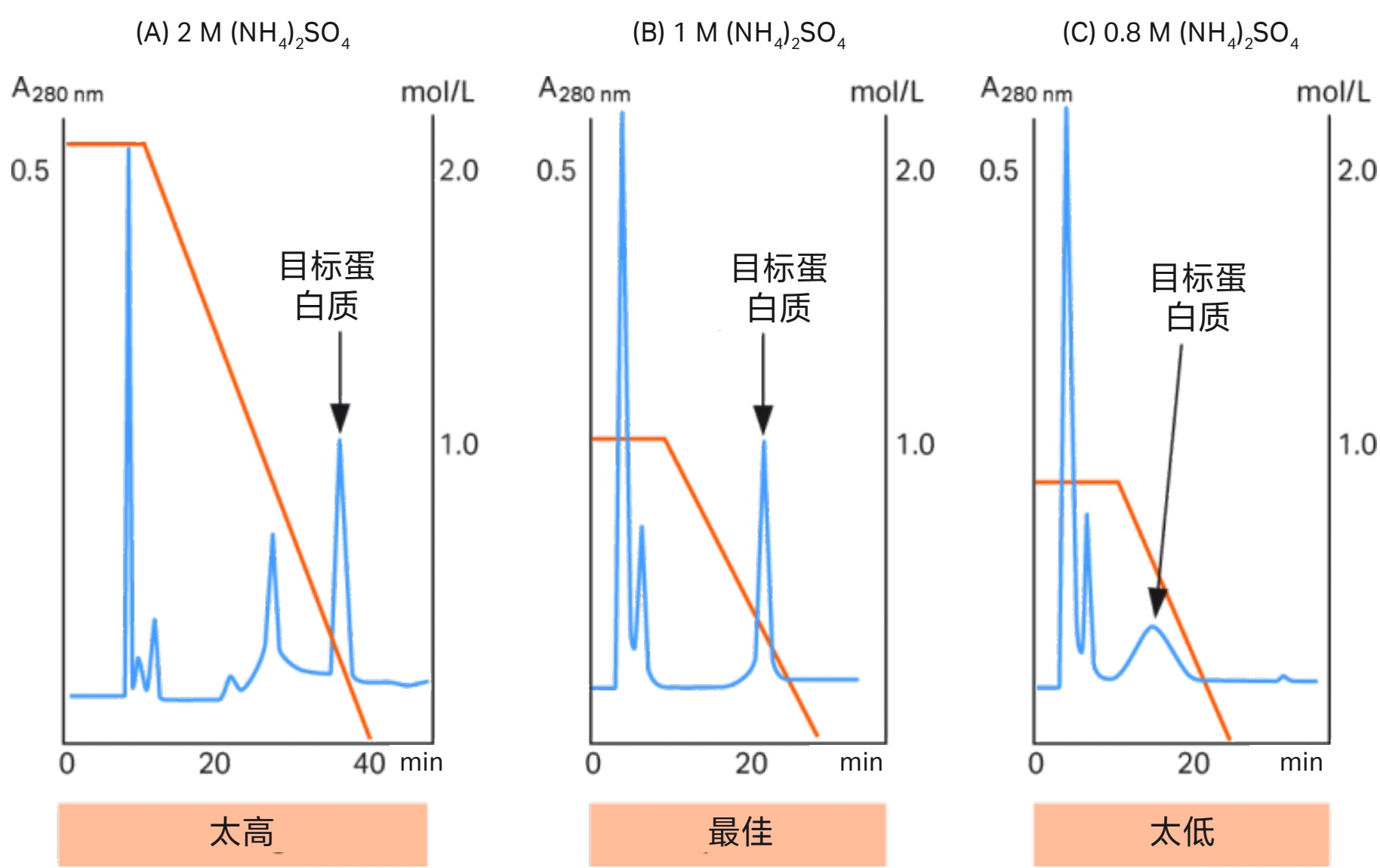


图 2.6. 起始缓冲液中的盐浓度会影响选择性和分辨率。

缓冲液离子和 pH 值

缓冲液离子的选择对于疏水相互作用并不重要。常见的是, 可以使用磷酸盐缓冲液。

所选择的 pH 值必须与蛋白质稳定性和活性相适应, 并且应该检查每种应用的理想 pH 值条件。然而, 在 pH 5.0 至 8.5 之间, pH 值对 HIC 分离的最终选择性和分辨率影响较小。pH 值的增加削弱了疏水相互作用, 在 pH 值高于 8.5 或低于 5.0 时, 蛋白质保留变化更剧烈。

-  检查分离过程中所用 pH 值和盐浓度的稳定性, 尤其是当恢复生物活性是首要任务时。避免 pH 值或其他条件的极端变化, 否则会导致失活甚至沉淀。
-  使用的缓冲液浓度 (通常为 20 至 50 mM) 应足以在样品上样和盐浓度变化期间保持缓冲能力 pH 值。
-  如果计划冻干产品, 请将纯化的蛋白质转移到挥发性缓冲液中 (表 2.1)。
-  在相同温度下制备缓冲液, 以确保正确的 pH 值。
-  过滤缓冲液, 以及包含所有盐和添加剂后的样品。使用高质量的水和化学品。对于粒径大于 75 μm 的填料, 使用 1 μm 过滤器; 对于 40 μm 颗粒, 使用 0.45 μm 过滤器; 对于 15 μm 以下颗粒, 或者当需要无菌或超净样品时, 使用 0.22 μm 过滤器。为了避免在已装填的层析柱中形成气泡, 并确保结果的可重现性, 在准备运行时, 请将层析柱和缓冲液保持在相同温度。

对于疏水性未知的样品, 请尝试以下方法:

起始缓冲液: 1.5 M 硫酸铵, 50 mM 磷酸钠, pH 7.0

洗脱缓冲液: 50 mM 磷酸钠, pH 7.0

表 2.1. 合适的挥发性缓冲液系统

ph	缓冲液系统	用于缓冲的 pK _a 值 ¹
3.3 至 4.3	甲酸	3.75
3.3 至 4.3; 4.8 至 5.8	甲酸/吡啶	3.75; 5.25
3.3 至 4.3; 8.8 至 9.8	甲酸/氨	3.75; 9.25
3.3 至 4.3; 9.3 至 10.3	甲酸/三甲胺	3.75; 9.81
4.3 至 5.8	乙酸/吡啶	4.75; 5.25
4.3 至 5.3; 7.2 至 8.2	乙酸/N-乙基吗啉	4.75; 7.72
4.3 至 5.3; 8.8 至 9.8	乙酸/氨	4.75; 9.25
4.3 至 5.3; 9.3 至 10.3	乙酸/三甲胺	4.75; 9.81
5.9 至 6.9; 8.8 至 9.8	碳酸氢盐/氨	6.35; 9.25

¹参考: 化学和物理手册, 第 83 版, CRC, 2002–2003。

缓冲液添加剂

您可以使用添加剂来提高选择性和分辨率，例如，当蛋白质与 HIC 填料结合过强时。然而，如果您使用高浓度蛋白质，将存在使目标蛋白质失活和/或变性的风险。添加剂可以通过改善蛋白质溶解度、改变蛋白质构象和促进结合蛋白质洗脱来影响分离。水溶性乙醇、去垢剂和离液盐（有限使用）是 HIC 分离中最广泛使用的添加剂。您可以在表 2.2 中找到典型添加剂列表。

 运行含添加剂的空白洗脱梯度，包括检查添加剂对洗脱曲线的影响。也就是说，在不上样的情况下执行一次运行。

层析柱和填料制备

用 5 至 10 个 CV 的起始缓冲液平衡层析柱，或者直到紫外基线和电导率稳定。

使用预装填的层析柱以确保良好的性能和可重现的结果。均匀装填的层析柱可确保样品通过层析柱时组分峰展宽不会过大，从而帮助获得良好的分辨率。

 使用前，让缓冲液、填料和预装填的层析柱达到相同的温度。如果快速改变温度，例如从冷室中取出已装填的层析柱，然后在室温下使用缓冲液，会在装填时产生气泡，影响分离。

 在使用任何 HIC 填料之前，务必洗去保存液和/或防腐剂。在用起始缓冲液平衡之前，先用 10 个 CV 的无盐洗脱缓冲液清洗层析柱，以避免保存液中的乙醇导致盐沉淀的风险。

有关层析柱装填的详细信息，请参见附录 2。装填柱床所需的体积取决于要净化的样品量和填料的结合载量。用超过所需结合载量五倍的填料（总蛋白应相当于结合载量的 20%）装填层析柱，柱床高度最大达 20 cm。

 通过测定柱效和峰对称性，定期检查层析柱性能（请参见附录 2）。

表 2.2. 用于改善 HIC 分离的添加剂

添加剂类型	典型添加剂	影响
醇类	最高 10% 乙醇	改变缓冲液极性。降低水的表面张力，减弱相互作用，引起解离。
	最高 30% 异丙醇	
	最高 10% 甘油	非极性区域会与蛋白质竞争疏水配基，导致解离。
	20 至 80 v/v % 乙二醇	
离液盐	MgCl ₂	降低溶液中的疏水效应，减弱相互作用，引起解离。
	CaCl ₂	
	KI	也会影响蛋白质的构象。
	NaCNS	Ca ²⁺ 增加了钙结合蛋白质纯化过程中的稳定性；Mg ²⁺ 会降低稳定性。
	最高 8 M 尿素	

样品制备

正确制备样品和缓冲液对于实现理想分离和保持层析柱性能至关重要。在样品上柱之前,可以采取一些简单步骤来澄清样品,这将有助于避免堵塞风险,减少对严格清洗程序的需求,保持层析柱的性能,并避免反压增加。附录 1 更详细概述了样品制备技术。

在 HIC 中,初始结合条件也会影响分离的最终选择性。在开始任何分离之前,建立样品的盐稳定窗口。例如,向粗样品中加入越来越多的盐,以确定沉淀发生时的浓度。为避免堵塞,确保样品上柱时低于盐沉淀浓度。关于在沉淀实验中使用硫酸铵的指南,请参见附录 1。

如可能,测试目标蛋白质的生物活性以确定浓度范围(请记住,在测定活性之前,可能需要降低高盐浓度)。建立盐稳定窗口后,从可以保持生物活性而不引起沉淀问题的最高盐浓度开始。应该保持样品的盐含量和 pH 值与起始缓冲液相同,以确保理想结合条件。

HIC 几乎不需要样品制备工作。结合主要是由于高盐条件而发生的,并且该技术对 pH 条件相当不敏感。在将样品上样到 HIC 层析柱之前,不需要置换样品缓冲液;只要确保有足够的盐,如果需要,直接调节 pH 值。添加固体盐会导致局部高盐积聚和沉淀,为了避免这种风险,应从高浓度储备溶液中添加盐。



确保样品清澈,没有颗粒物,尤其是如果使用粒径为 40 μm 或更小的填料时。要过滤小体积样品,可以使用醋酸纤维素、PVDF 或再生纤维素制成的注射器吸头过滤器。例如,用于 AKTA™ 系统的 Protein Prep 针式滤器。加入盐和其他添加剂后过滤样品。



确保样品与缓冲液、层析柱和层析设备的温度相同。



使用缓冲液置换(请参见附录 1 中的缓冲液置换)去除盐酸胍和尿素等离液剂,因为它们会抑制疏水相互作用。



如果样品在起始缓冲液中所需的盐浓度下开始沉淀,在上样前,应降低盐浓度并将样品分成更小的等份,但保持起始缓冲液的浓度。



样品中的脂质和其他疏水物质会与填料相互作用,从而在运行期间和后续运行中降低结合载量。使用疏水性稍低的填料(例如 Capto™ Butyl-S)作为“预柱”是在主要分离之前去除这些污染物的一种方法。

样品浓度和粘度

粘度会随温度变化, 在盐浓度很高时会增加。样品的溶解度或粘度会限制可以上柱的量。样品粘度高会导致不规则流型, 从而导致峰加宽、扭曲, 以及反压问题。关键参数是相对于洗脱液粘度的样品粘度。

 稀释粘性样品。如果不能使用稀释, 请尝试使用较低的盐浓度或较大粒径的填料。如果核酸污染物导致粘度增高, 请参见附录 9, 了解其去除建议。

 样品通常不应超过 50 mg/mL 蛋白质, 但这可能会因样品类型和层析填料而异。

样品上样和清洗

将样品调节至选定的盐浓度 (如有必要, 调节 pH 值)。过滤, 并上样到层析柱。

用 5 至 10 个 CV 的起始缓冲液清洗, 或直到紫外基线和电导率稳定, 这表示所有未结合的物质都已通过层析柱进行清洗。

为了高效结合, 应将样品保持在与起始缓冲液相同的盐浓度。由于样品在层析柱顶部附近结合, 因此, 如果上样条件正确, 可以在不影响分离的情况下使用相对较大的样品体积。

 使用层析系统、蠕动泵或注射器将样品直接上柱。设备的选择取决于样品体积、大小、层析柱类型、HIC 填料类型以及洗脱过程中对梯度准确度的要求。

上样量

上样量 (质量) 比样品体积更重要。可以上柱的样品量取决于填料的结合载量和所需分辨率。结合载量由填料、蛋白质性质、结合条件、分子大小和形状、基架孔径决定, 在较小程度上受流速、温度和 pH 值影响。

峰的宽度与存在的物质的量直接相关, 这使得上样量成为分辨率的主要影响因素。为了获得良好的分辨率, 应使与填料结合的蛋白质的总量低于已装填的层析柱的总结合载量。

 为了获得梯度洗脱的理想分辨率, 可以使用最高达 30% 的层析柱总结合载量。如果分辨率适宜或使用步级洗脱, 可以增加上样量。

例如, 可以通过降低流速或优化起始条件来增加载量, 从而有利于目标蛋白质的结合并大幅度地减少污染物结合。

载量会随着流速增大而减小, 因此需要在最大动态结合载量 (DBC) 和快速分离之间找到平衡, 尤其是对于大量样品。

直径或长度非常大的分子的载量也会减小, 例如, 分子量大于 Mr 400,000 的蛋白质复合物、不对称蛋白质和 DNA。这些分子不能穿透基架孔隙, 这使得它们的相互作用主要限制在基架表面的疏水基团上。由于某些基质中孔隙大小的确切分布会有所不同, 分子的表现大小也会随缓冲液条件的不同而变化, 因此分子能或不能穿透基质孔隙并没有明显的分子量分界点。

样品体积

只要样品和起始缓冲液的含盐量能确保足够的结合条件, HIC 的结合技术便与样品体积无关。可以将大量稀释溶液 (例如细胞培养上清液中的组分) 直接上样到 HIC 填料, 无需预先浓缩。

温度

温度扮演的角色很复杂。在实践中, 这意味着在恒温下工作可以提高可重现性, 并且可能无法在冷室条件下重现室温下产生的分离, 反之亦然。

图 2.7 展示了将样品、起始缓冲液和洗脱缓冲液、层析柱以及层析设备置于同一温度的重要性。除样品温度 (23°C 或 4°C) 外, 我们在室温 (23°C) 下的相同条件下进行了这两种分离。在所有组分处于相同温度的情况下, 我们结合目标蛋白质, 并在梯度中间将其洗脱。样品在 4°C 时, 目标蛋白质在流通液中洗脱。

- 在大多数情况下, 提高温度会增强疏水相互作用。这意味着在较低温度 (通常低于 10°C) 下工作时, 可以大幅度地减少样品组分间疏水相互作用引起的聚集。为了提高溶解度, 可以尝试降低温度, 而不是添加去垢剂。
- 确保样品、层析柱、起始缓冲液和洗脱缓冲液的温度相同。请注意, 温度也会影响样品和缓冲液的粘度。

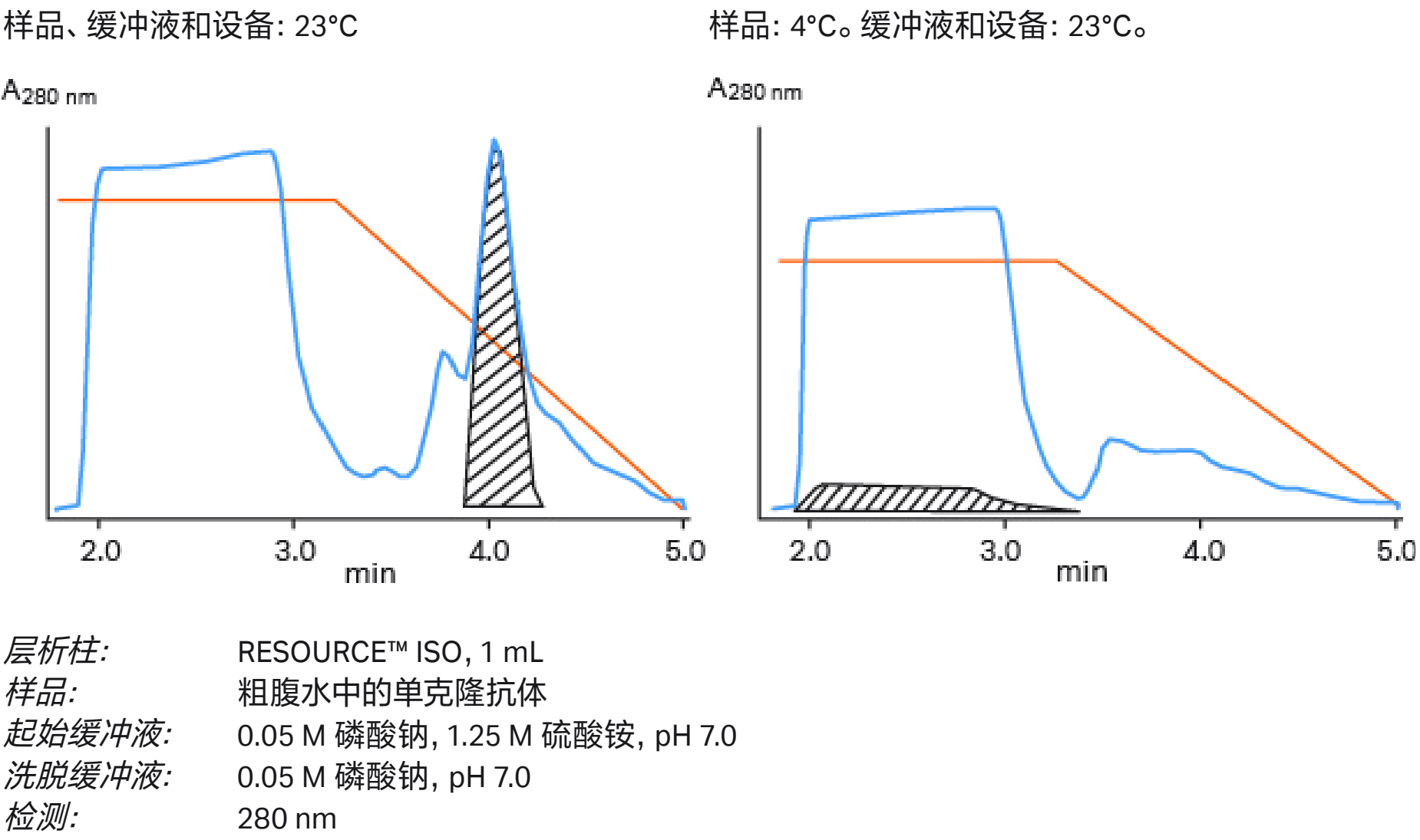


图 2.7. 温度对 HIC 分离的影响。

洗脱

研究人员使用根据分离目的选择的线性或步级洗脱, 在盐浓度受控降低的情况下洗脱结合的蛋白质:

- 1. 线性梯度洗脱
 - a. 高分辨率分离或分析
 - b. 确定步级洗脱条件
 - c. 以更快的速度优化梯度洗脱, 同时保持所需的分辨率
- 2. 步级洗脱
 - a. 加快分离时间, 减少缓冲液消耗
 - b. 组分分离

线性梯度洗脱

目的: 高分辨率分离、填料筛选、理想盐条件筛选

使用 10 至 20 个 CV 的梯度体积开始洗脱。增加洗脱缓冲液的比例, 直到盐浓度达到最低, 即不含盐的缓冲液 (100% B)。

通常可以使用线性盐梯度进行洗脱, 如图 2.8 所示。当从未知样品开始时, 请始终使用线性梯度 (当尽可能多的组分结合到层析柱上并以不同方式洗脱以查看总蛋白质图谱时)。降低正在使用的缓冲液的盐含量会削弱疏水相互作用, 结合的物质开始洗脱。洗脱缓冲液通常是与起始缓冲液相同的缓冲液, 并且 pH 值也相同, 但没有高盐组分。

我们建议在方法开发过程中使用线性梯度洗脱。使用合适的层析系统, 可以轻松制备可重现的线性盐梯度。之后, 可以将结果用作优化分离的基础。

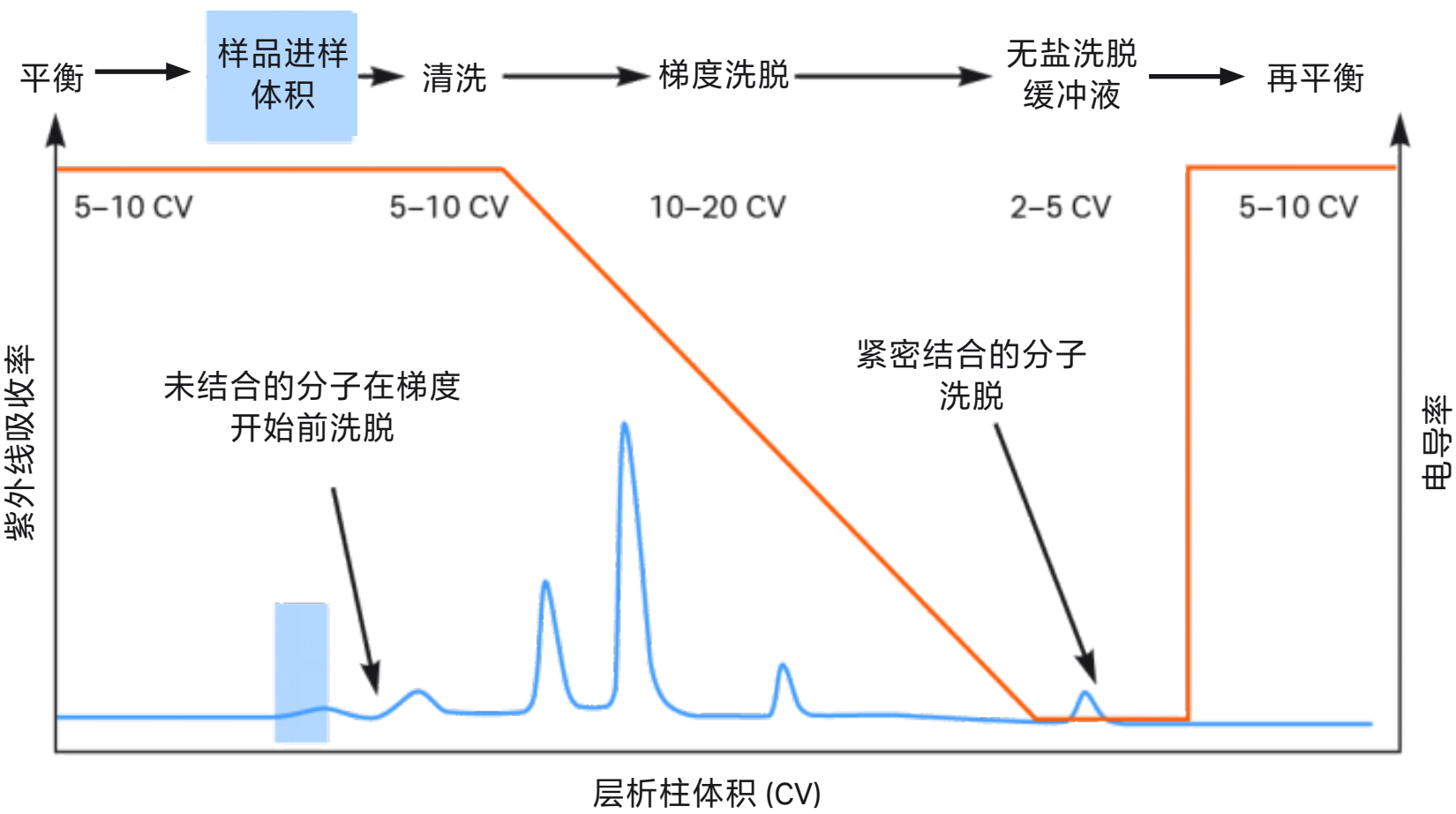


图 2.8. 使用线性梯度洗脱的典型 HIC 分离。紫外线 (蛋白质) 和电导率 (盐) 曲线显示了蛋白质的洗脱、峰以及洗脱过程中盐浓度的变化。

梯度洗脱的变化可以通过几种方式改变疏水性蛋白质在填料上的保留:

- 长而浅的梯度使峰之间的分离最大化，但是分离时间会更长，并且会有更大的峰展宽。
- 短而陡的梯度分离速度更快，峰更尖锐，但峰之间的洗脱距离更近。
- 梯度中较晚洗脱的峰往往比较早洗脱的峰稍宽。

选择最陡的梯度以获得可接受的分辨率。图 2.9 显示了梯度斜率变化的影响。

 如果减少梯度洗脱体积, 可能需要成比例地减少上样量以保持相同的分辨率。如果增加上样量 (在层析柱的总结合载量范围内), 可能需要增加梯度体积以保持分辨率。

可以使用专门设计的设备轻松形成梯度, 例如 ÄKTA™ 层析系统, 它可以自动控制上柱溶液的混合。或者, 一些系统采用单独的泵分别用于起始缓冲液和洗脱缓冲液, 或者使用单个泵与开关阀组合来混合缓冲液。混合器和层析柱顶部之间的最短流路将帮助准确形成梯度。

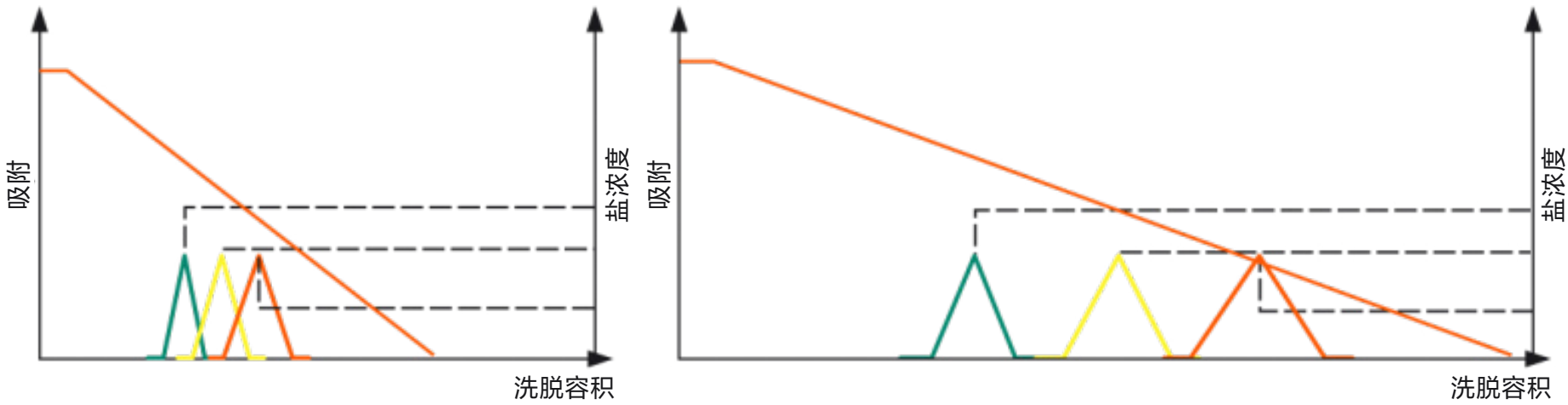


图 2.9. 示意层析图显示了梯度斜率降低后的影响。

步级洗脱

用最多 5 个 CV 的洗脱缓冲液, 以低于起始缓冲液的盐浓度洗脱结合的蛋白质。重复上述步骤, 降低每一步的盐含量, 直到洗脱出目标蛋白质。

如图 2.10 所示, 可以通过依次添加盐浓度递减的洗脱缓冲液来执行步级洗脱:

- 第 1 步: 优化盐浓度和洗脱缓冲液的体积, 以洗脱所有与填料结合强度低于目标蛋白质的化合物。注: 盐浓度和缓冲液体积应足够大, 以洗脱污染较弱的结合物质, 但应保持盐浓度足够低, 以便将感兴趣的峰共洗脱。
- 第 2 步: 降低盐浓度, 直到目标蛋白质洗脱。
- 注: 应该保持足够低的盐浓度, 以便在不过度稀释的情况下洗脱目标蛋白质, 但同时也要保证足够高的盐浓度, 以防止强结合污染物共洗脱。
- 第 3 步: 进一步降低盐浓度以洗脱所有残留的污染物。此步也可以用水。
- 第 4 步: 在起始缓冲液中再平衡层析柱, 为下一次运行做准备。

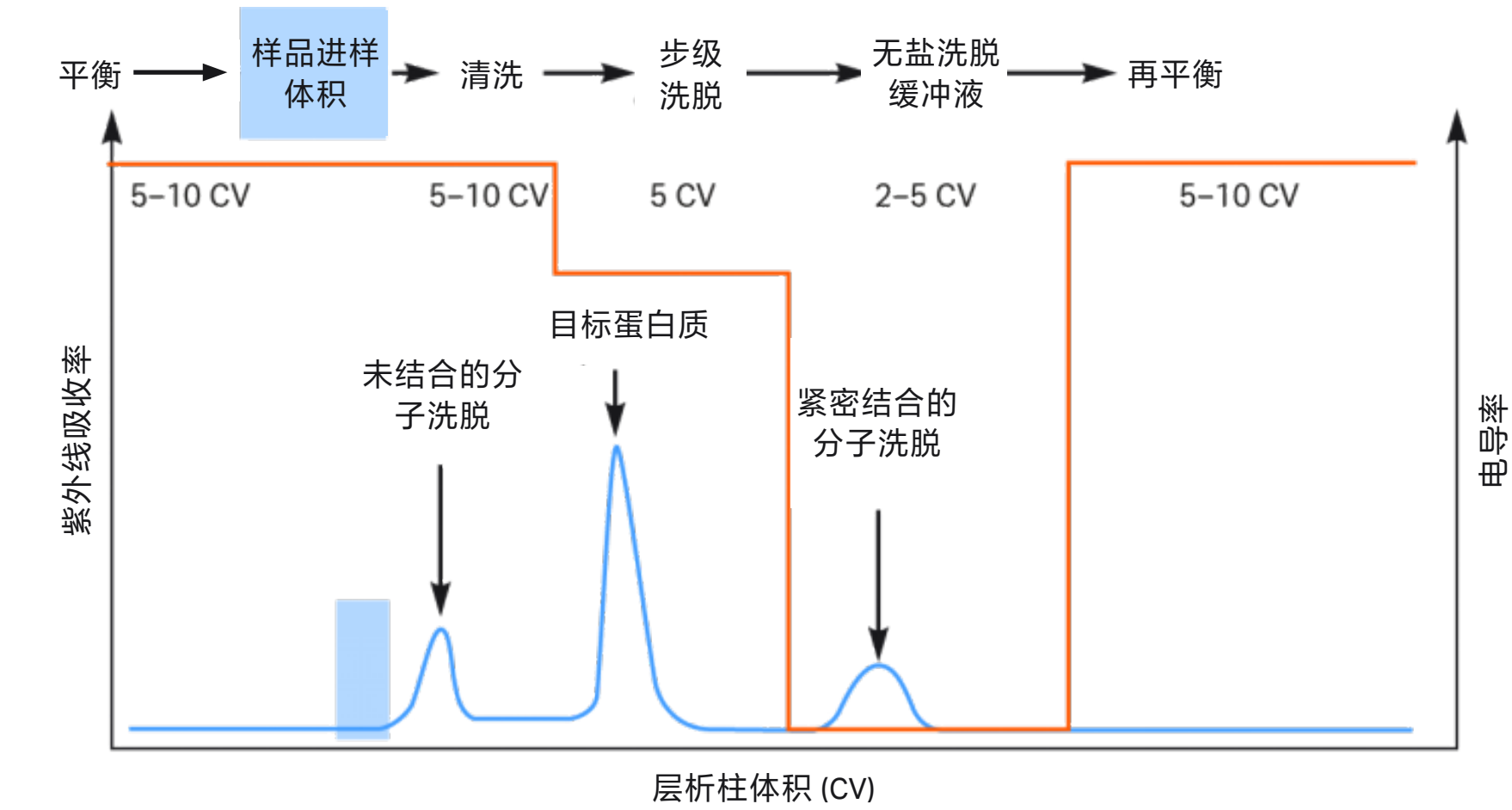


图 2.10. 使用步级洗脱的典型 HIC 分离。紫外线 (蛋白质) 和电导率(盐)曲线显示了蛋白质的洗脱、峰以及洗脱过程中盐浓度的变化。

步级洗脱的目的: 加快分离时间, 减少缓冲液消耗

使用梯度洗脱优化 HIC 分离后, 改为步级洗脱可以减少分离所需的 CV 总数。这可以加快分离时间, 减少缓冲液消耗, 同时帮助获得所需的纯度。科研工作者经常使用这样的步级洗脱进行常规的大规模分离。

步级洗脱的目的: 组分分离

在组分分离中, 您可以在一个步级洗脱中分离目标蛋白质和污染物。由于其疏水性, 可以将蛋白质和污染物结合到层析柱上, 浓缩它们, 并快速分离它们。

与正常步级洗脱一样, 应选择在样品上样过程中能大幅度结合目标蛋白质 (或已知污染物) 的条件。可以在清洗液中收集目标组分, 或者以浓缩形式洗脱。在这两种情况下, 只需要更换一次缓冲液。

 步级洗脱有利于小规模应用。如果要保持缓冲液的洗脱强度足够高, 以避免与更强结合的污染物共洗脱, 则可以更浓缩的形式洗脱目标蛋白质。

 在样品上样过程中, 使用盐浓度经过优化的步级洗脱 (大幅度地减少污染物的结合) 通常会显著提高最终产品的纯度。

如果没有梯度制备设备, 步级洗脱在技术上是一种简单的替代方法。但是, 在设计步骤和解释结果时, 应该谨慎。通过盐条件急剧变化洗脱出来的物质会靠近在一起洗脱, 从而产生包含多种成分的假峰。由于它们通常含有一种以上的组分, 所以峰往往具有尖锐的前延和明显拖尾。由于这种拖尾现象, 如果过早改变盐浓度, 就会出现假峰。

 我们建议在开发新方法时使用线性盐梯度。表征目标蛋白质的层析行为后, 使用步级洗脱来提高目标峰洗脱区域的分辨率会更容易。

流速

可以根据分离阶段改变最高流速。例如，低流速会为结合或洗脱留出时间，而高流速则可以节省平衡、清洗和再平衡的时间。可使用的流速主要受填料刚性和设备压力规格的限制。

我们推荐了每种 HIC 填料的流速 (请参见第 3 章)。在分离过程中, 以最高流速为目标, 在该流速下, 可以保持分辨率并大幅度地减少分离时间。例如, 如果在低流速下峰分离良好, 则增加流速以节省时间。或者, 如果峰解析度良好, 则可以上样更多的样品并获得更大的载量, 而不会显著降低分辨率。图 2.11 显示了增加流速后如何影响 HIC 层析柱分辨率的示例。

可以用 mL/min 等简单线性术语来测量流速, 但是当放大或比较不同尺寸层析柱之间的结果时, 使用线性流速 cm/h 会很有用 (请参见附录 4)。就流速的影响而言, 可以在不同尺寸的层析柱上比较相同线性流速下获得的结果。

- 不要超过填料或预装填层析柱的最高推荐流速。
- 当在 4°C 下运行时, 更高的流速和粘性缓冲液会增加操作压力, 缓冲液粘度也会增加。请检查已装填的层析柱的最大操作压力, 并相应设置层析系统的压力上限。

流速控制

精确、可重现的流速控制对于确保良好的分辨率和可重现性至关重要。

- 在层析系统中使用泵 (非蠕动泵), 以充分利用 Capto™ 和 Capto™ ImpRes 等填料的刚性和优异的流动性。
- 始终将缓冲液泵入层析柱, 而不是用下面的泵通过层析柱抽取缓冲液。这降低了抽吸可能导致的气泡形成风险。
- 如果用在正常实验室条件下装填的层析柱, 进行分离时, 使用的流速应始终低于层析柱装填流速。这有助于在不增加压力和收缩柱床的情况下上样。有关层析柱装填信息, 请参见附录 2。

层析柱:	RESOURCE™ PHE, 1 mL
样品:	肌红蛋白、核糖核酸酶、溶菌酶和糜蛋白酶原的混合物
上样量:	0.38 mg
起始缓冲液:	2.0 M 硫酸铵, 100 mM 磷酸钾, pH 7.0
洗脱缓冲液:	100 mM 磷酸钾, pH 7.0
流速:	(A) 1.6 mL/min (300 cm/h) (B) 4.8 mL/min (900 cm/h) (C) 9.6 mL/min (1800 cm/h)
梯度:	20% 至 100% B, 20 CV

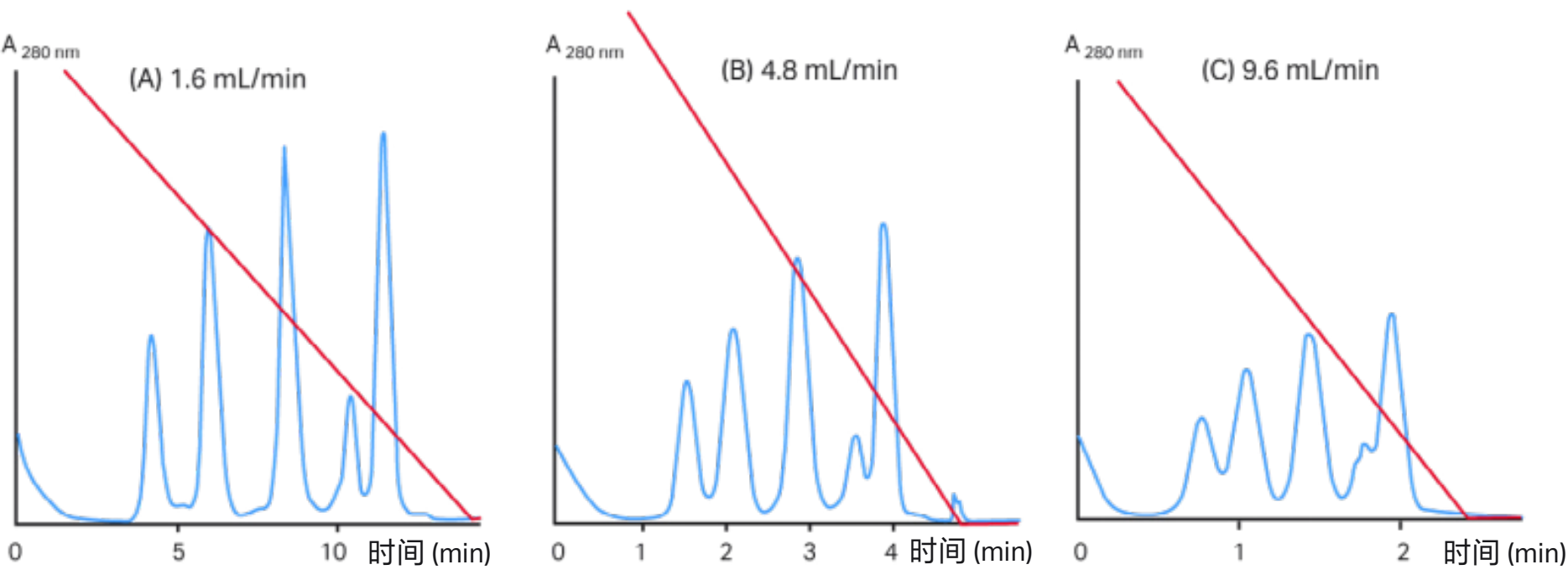


图 2.11. 在 RESOURCE™ PHE 层析柱上分离模型蛋白质混合物时, 增加流速后对分辨率的影响。

清洗和再平衡

用 2 至 5 个 CV 的无盐洗脱缓冲液清洗, 洗脱任何残留的疏水结合物质。

通过用不含盐的缓冲溶液清洗 HIC 填料, 可以有效洗脱大多数结合的蛋白质。在每次运行结束时, 应包括无盐清洗步骤, 去除仍然结合在填料上的任何分子。密切关注紫外线吸收率, 以便根据需要缩短或延长清洗步骤。



有时疏水相互作用很强, 以至于可能需要使用更严苛的条件洗掉所有结合的物质, 例如, 0.5 至 1.0 M 氢氧化钠、70% 乙醇或 30% 异丙醇。在用含有高盐的起始缓冲液再平衡层析柱之前, 需要按照这些清洗步骤, 用水或不含盐的缓冲液进行清洗。

用 5 至 10 个 CV 的起始缓冲液再平衡, 或直到电导率达到所需值。

清洗后, 再平衡步骤将为下一次分离准备层析柱。只要有可能, 就应监测电导率, 了解何时达到起始条件。然后, 可以根据需要缩短或延长再平衡步骤。



如果观察到层析柱顶部有色带、上部柱头和柱床面之间有空隙、分辨率下降或反压显著增加, 可能需要清洗填料。我们在第 3 章中提供了每种 HIC 填料的一般清洁程序, 并概述了去除严重污染的程序 (请参见附录 9)。在任何情况下, 预防胜于治疗, 因此我们建议定期清洁填料。

分析结果和后续步骤

分析第一次分离的结果将有助于您了解是否可以改善条件以提高得率、获得更高纯度、加速分离或增加一次运行中可以处理的样品量。

使用盐梯度洗脱的样品会包含一系列盐浓度。如果分析测定对盐浓度变化敏感, 请确保在分析前稀释或脱盐。我们在附录 7 中概述了常见的分析。

工艺放大

对于快速分离, 在小型层析柱上重复分离几次并收集目标组分比放大到更大层析柱更容易。但是, 如果例行处理大量样品, 可能需要使用更大的层析柱。表 2.3 显示了工艺放大通用指南, 图 2.12 显示了 Cytiva 提供的层析柱和其他格式。

当放大 HIC 分离时, 请遵循以下要点, 以确保小规模和大规模分离的周期时间相同。

1. 小规模优化分离。

2. 保持柱床高度、样品浓度和样品体积与填料体积之比。

3. 通过增加层析柱的直径来增加层析柱的体积。

4. 以与较小层析柱上使用的相同流速 (请参见附录 4)运行分离, 且梯度体积与层析柱体积之比也相同。

- 只要有可能, 就应针对计划大规模使用的填料上开发分离方法。
- 如要进行生产规模的分离, 请注意本手册中提到的所有 HIC 填料 (Capto™、Capto™ ImpRes、Sepharose™ High Performance、Sepharose™ Fast Flow 和 SOURCE™) 都能满足工业规模的通量和在位清洗 (CIP) 需求。
- 有关层析柱选择和层析柱装填的详细信息, 请参见附录 2。

设备选择

有关为 HIC 选择系统的指南, 请参见附录 3。

- 使用 HIC 后, 务必尽可能彻底冲洗层析设备, 包括阀门和管道。高盐浓度会干扰分离、损坏设备并影响缓冲液的流动。

表 2.3. 工艺放大指南

维护	增加
柱床高度	层析柱体积 (层析柱直径)
流速 (cm/h)	体积流速 (mL/min)
样品浓度	上样量
梯度洗脱体积 (用于梯度的层析柱体积)	

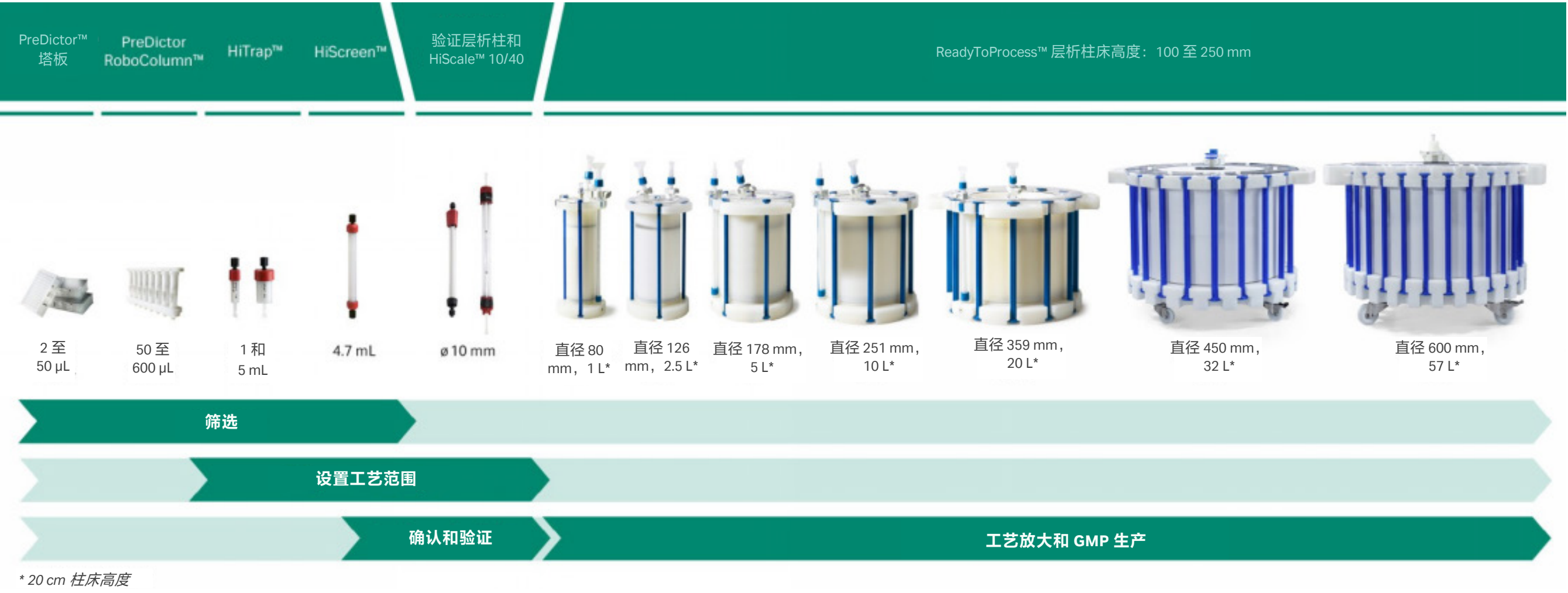


图 2.12. Cytiva 提供的各种层析柱基于您的生产需求。

维护 HIC 填料

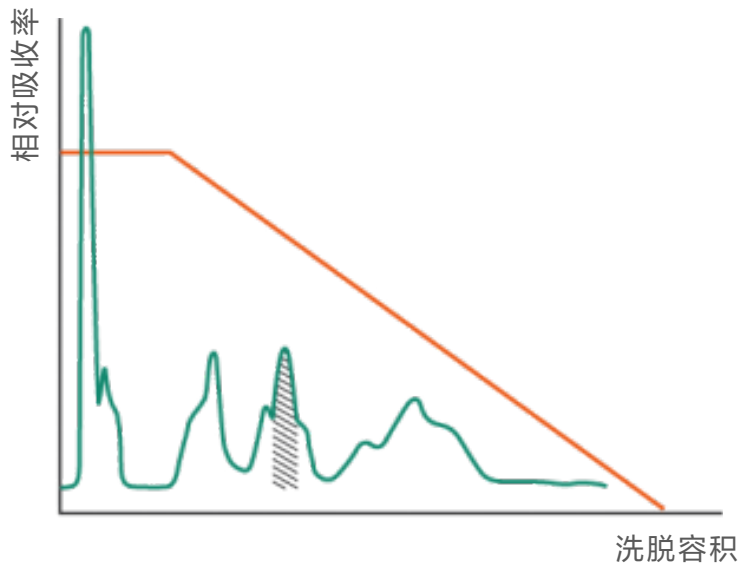
在每次分离之间用 5 至 10 个 CV 的蒸馏水清洗, 可足以保持填料处于良好状态。然而, 使用层析柱一段时间后, 可能会导致蛋白质沉淀或其他污染物堆积。

要了解是否需要清洗层析柱, 请查看层析柱顶部是否有色带、上部柱头和柱床面之间是否有空隙、分辨率是否下降或反压是否显著增加。我们提供了每种 HIC 填料的一般清洁程序 (请参见第 3 章), 以及建议用于去除严重污染的程序, 请参见附录 9。

请记住, 预防胜于治疗, 因此我们始终建议定期清洁填料。有关样品制备的更多详细信息, 请参见附录 1。

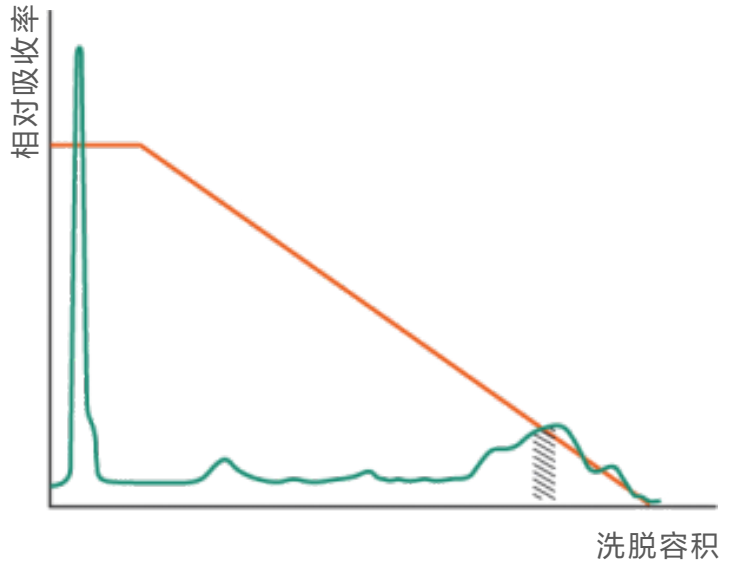
-  始终使用过滤后的缓冲液、样品和清洁溶液, 以减少额外的层析柱维护需求。
-  始终对缓冲液进行脱气, 并将缓冲液、层析柱和样品保持在相同温度下, 以避免层析柱中形成气泡, 并确保结果的可重现性。
-  如果在压力监测器上看到背压增加, 或者填料表面下移, 请在开始清洁程序之前, 检查层析柱是否导致了问题。从组分收集器开始, 一次断开一段管道, 并在断开每段管道后检查压力。在线滤器堵塞通常会导致背压增加。确保在每次运行的同一阶段检查背压, 因为在单次运行中或更换不同的缓冲液时, 背压值会有所不同。
-  将填料和已装填的层析柱储存在 20% 乙醇中, 以防止微生物滋生。

问题排查



所需 HIC 分离: 梯度洗脱可分离目标蛋白质。

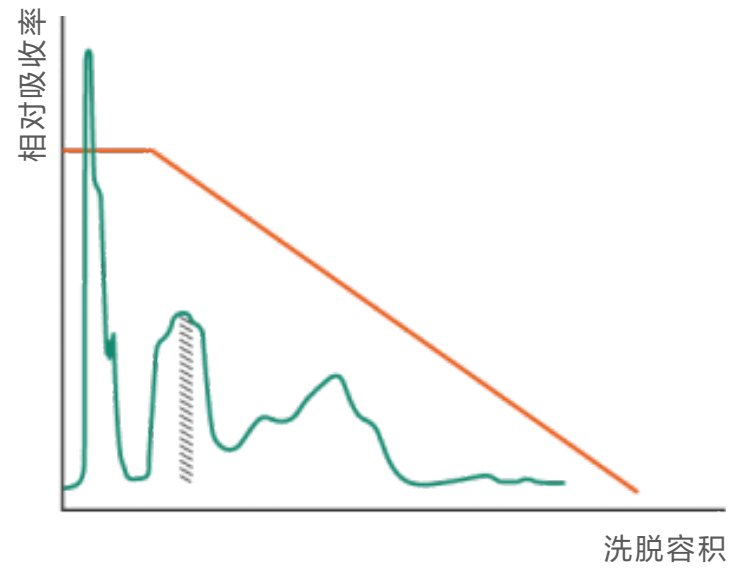
本节的其余部分将重点介绍如何在未能实现理想 HIC 分离时排除故障。



目标蛋白质在接近梯度末尾时洗脱: 分辨率差。

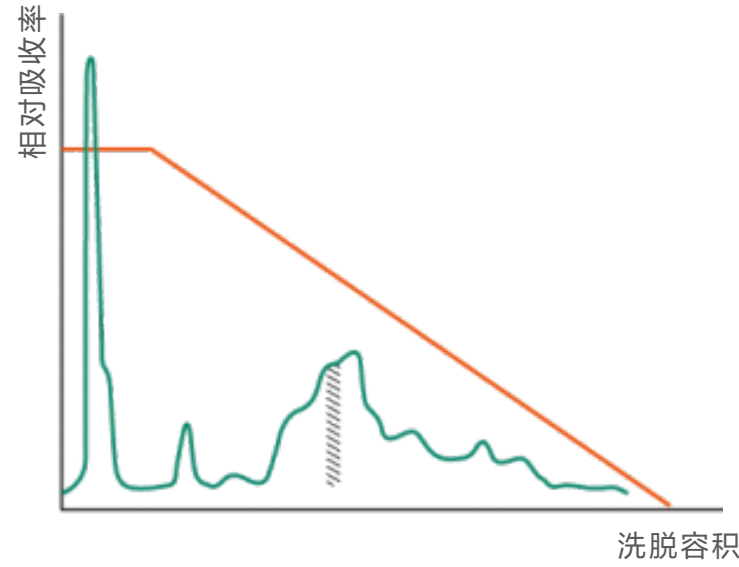
在起始缓冲液中用较低的盐浓度重复分离, 或使用具有较低盐析强度的盐 (请参见第 1 章的 Hofmeister 系列)。如果两者都不能提高选择性, 请尝试使用配基不同或配基取代度较低的填料。

初始盐浓度的降低削弱了结合, 导致蛋白质较早洗脱。但是由于污染物洗脱非常接近目标蛋白质, 这可能不会提高选择性。



目标蛋白在梯度早期洗脱: 分辨率差。

在起始缓冲液中用较高的盐浓度重复分离, 或使用具有较高盐析强度的盐 (请参见第 1 章的 Hofmeister 系列)。如果两者都不能提高选择性, 请尝试使用配基不同或配基取代度较高的填料。



目标蛋白质在梯度中间洗脱: 分辨率差。

优化目标蛋白质周围的梯度。例如, 可以使用分段梯度, 在目标蛋白周围设置较平缓的区域。此外, 考虑使用添加剂 (请参见第 2 章中的添加剂)。如果这不能提高分辨率, 请尝试使用离子交换等替代层析技术进行进一步纯化。

表 2.4. 处理 HIC 层析柱时有关各种情况的总体指导

情况	原因	补救措施
通过层析柱的流速减少或没有流速。	出口关闭, 或者泵不工作。 过滤器、端件、柱头或管道堵塞。 脂蛋白或蛋白质聚集体已经沉淀。 层析柱中的蛋白质沉淀。 样品太粘。 层析柱中有微生物滋生。	打开出口。检查泵是否有泄漏迹象。如果您使用蠕动泵, 还要检查管道。 如可能, 拆除并清洁堵塞的部件或予以更换。使用前, 始终过滤样品和缓冲液。 在样品制备中去除脂蛋白和聚集体, 或使用疏水性较低的清除层析柱 (请参见附录 1)。遵循附录 9 中的清洁程序。 降低起始缓冲液中的盐浓度。遵循清洁程序去除沉淀的蛋白质 (请参见附录 9)。 用缓冲液稀释。将蛋白质浓度保持在 50 mg/mL 以下。 遵循附录 9 中的清洁程序。始终过滤缓冲液。不使用时, 用 20% 乙醇储存以防止微生物滋生。
目标峰与其他主峰的分辨率很低。	后层析柱顶部混合空间大。 盐条件不正确。 洗脱条件不理想 (例如, 梯度太陡; 流速太高)。 层析柱装填不良。 层析柱中样品过载。 层析柱中蛋白质沉淀。	如有必要, 将顶部柱头调整到填料表面。减少所有柱后体积。 检查结合条件。制备新溶液。 通过使用较浅的梯度和降低流速来改变洗脱条件。 检查柱效 (请参见附录 2)。如果需要, 重新装填。使用预装填的层析柱。 减少上样量。 遵循清洁程序 (请参见附录 9)。降低缓冲液中的盐浓度, 或者以较低的盐浓度等分上样, 同时保持缓冲液中的盐浓度。
蛋白质未按预期结合或洗脱。	盐条件不正确。 蛋白质或脂类在层析柱或层析柱过滤器上沉淀。 样品在储存过程中发生了变化。蛋白质在洗脱缓冲液中可能不稳定或无活性。 层析柱平衡不完全。 蛋白质正形成聚集体, 并与填料紧密结合。 样品、缓冲液或温度条件与之前的运行不同。	检查所需的条件。制备新溶液。 清洁层析柱, 更换或清洁过滤器。检查样品的 pH 值和盐稳定性。 制备新鲜样品。确定蛋白质的稳定性。 重复或延长平衡时间, 直到电导率和 pH 值恒定。 使用较低的盐浓度。考虑使用添加剂来减少疏水相互作用(请参见第 2 章中的缓冲液添加剂)。 检查条件。
蛋白质洗脱晚于预期或根本不洗脱。	盐浓度过高。 疏水相互作用强。	降低洗脱缓冲液中的盐浓度。 使用疏水性较低或配基密度较低的填料。考虑使用添加剂来减少疏水相互作用 (请参见本章中的缓冲液添加剂)。
蛋白质洗脱早于预期 (在清洗阶段)。	样品和缓冲液的盐浓度过低。 层析柱平衡不完全。	增加样品和缓冲液中的盐。 重复或延长平衡步骤, 直到电导率恒定。

情况	原因	补救措施
层析图谱中存在前导峰或非常圆的峰。	层析柱内涡流效应。 层析柱中样品过载。 层析柱被污染。	用更稀的填料浆重新装填层析柱。检查层析柱装填情况(请参见附录 2)。 减少上样量并重复操作。 清洁层析柱。
峰有拖尾。	层析柱装填过松。	检查柱效 (请参见附录 2)。以较低流速重新装填。使用预装填的层析柱。
峰有前延。	压缩层析柱装填。	检查柱效 (请参见附录 2)。以较低流速重新装填。使用预装填的层析柱。
填料或微粒出现在洗脱液中。	压缩层析柱装填。 筛网端件松动或断裂。 层析柱在过高压力下运行。 填料在层析柱装填过程中受损。	检查柱效 (请参见附录 2)。以较低流速重新装填。使用预装填的层析柱。 拧紧或更换筛网端件。 勿超过填料或层析柱的建议操作压力。 平衡过程中勿使用磁力搅拌器。
活性回收率低, 但蛋白质回收率正常。	蛋白质在缓冲液中可能不稳定或无活性。 从辅因子或类似物中分离出酶。	确定蛋白质的 pH 值和盐稳定性 通过汇集各组分的等分试样和重复测定进行测试。
蛋白质得率低于预期。	蛋白质可能被蛋白酶降解。 样品制备过程中吸附到过滤器上。 样品沉淀。 蛋白质没有洗脱。	向样品和缓冲液中加入蛋白酶抑制剂以防止蛋白水解消化。将样品通过填料, 例如 Benzamidine 4 Fast Flow (高取代), 以去除胰蛋白酶样丝氨酸蛋白酶。 使用另一种类型的过滤器。 检查盐条件并进行调节以提高样品溶解度。 考虑使用添加剂来减少疏水相互作用(请参见本章中的缓冲液添加剂)。使用疏水性较低的填料。
峰太小。	样品在选定波长下吸收很差。 在层析步骤之前和之后使用了不同的测定条件。 峰展宽过大。	如果合适, 检查监视器上的吸收率范围。如果符合要求, 使用不同的波长(例如, 214 nm 而非 280 nm)。 对所有测定使用相同测定条件。 检查层析柱装填。必要时重新装填。
回收率的样品多于预期。	蛋白质与其他物质共洗脱。	优化条件以提高分辨率。运行前后检查用于测定的缓冲液条件。检查填料选择。检查蛋白质纯度。
恢复的活性高于上柱活性。	在层析步骤之前和之后使用了不同的测定条件。 在分离过程中去除抑制剂。	对所有测定使用相同测定条件。 在测量活性之前对原始样品进行脱盐处理, 因为细胞裂解物和提取物通常含有会影响活性的低分子量物质。

情况	原因	补救措施
在一次运行或连续运行期间, 背压增加。	柱床被压缩。 样品太粘。 样品过滤不当。 微生物滋生。 样品混浊。 蛋白质在层析柱过滤器中和/或在柱床顶部沉淀。 盐浓度增加时脂蛋白沉淀。	重新装填或更换层析柱。检查样品制备情况。 用缓冲液稀释。将蛋白质浓度保持在 50 mg/mL 以下。 清洁层析柱, 过滤样品, 然后重复操作。 遵循清洁程序 (请参见附录 9)。始终过滤缓冲液。用 20% 乙醇储存以防止微生物滋生。 改进样品制备 (请参见附录 1)。 使用推荐的方法清洁。清洁或更换过滤器或使用新的层析柱。降低起始缓冲液的盐浓度。 通过添加 10% 硫酸葡聚糖 (最终浓度为 0.2%) 和 1 M 氯化钙 (最终浓度为 0.5 M), 在层析之前去除脂蛋白。
柱床中存在气泡。	缓冲液未正确脱气。 层析柱在低温下装填或储存, 然后升温。	彻底脱气缓冲液。 使脱气后的缓冲液通过层析柱, 去除小气泡。如果使用经冰箱或冷藏室储存后的缓冲液, 要特别小心。不要让层析柱因阳光或加热系统而升温。重新装填层析柱 (请参见附录 2)。
柱床出现裂纹。	层析柱中有大量空气泄漏。	检查所有连接有无泄漏。重新装填层析柱 (请参见附录 2)。
溶剂前沿出现负峰。	折射率效应。	将样品置换到起始缓冲液中。
意外峰存在。	缓冲液杂质。	通过预柱清洁缓冲液。使用高质量试剂。
空白洗脱梯度上出现峰。	先前样品洗脱不完全。	清洗层析柱。
层析图中存在尖峰。	紫外监测流通池中有气泡。 缓冲液杂质。	始终使用经过脱气的缓冲液。 使用高质量试剂。

03

疏水相互作用层析 填料

历史上, 科研工作者已经使用几种不同类型的物质作为基架来共价连接配基, 以形成 HIC 填料。第 1 章介绍了基架特性如何决定层析性能, 例如柱效、载量和回收率, 以及化学、物理稳定性和流动性。

Capto™ 填料基于坚硬的高流动性琼脂糖基架, 具有优化的孔隙结构, 可提供良好的压力和流动性。这种填料旨在用于工艺开发和大规模制造, 但也用于研究实验室。它们的高流速可提高生产率和大批量加工能力。

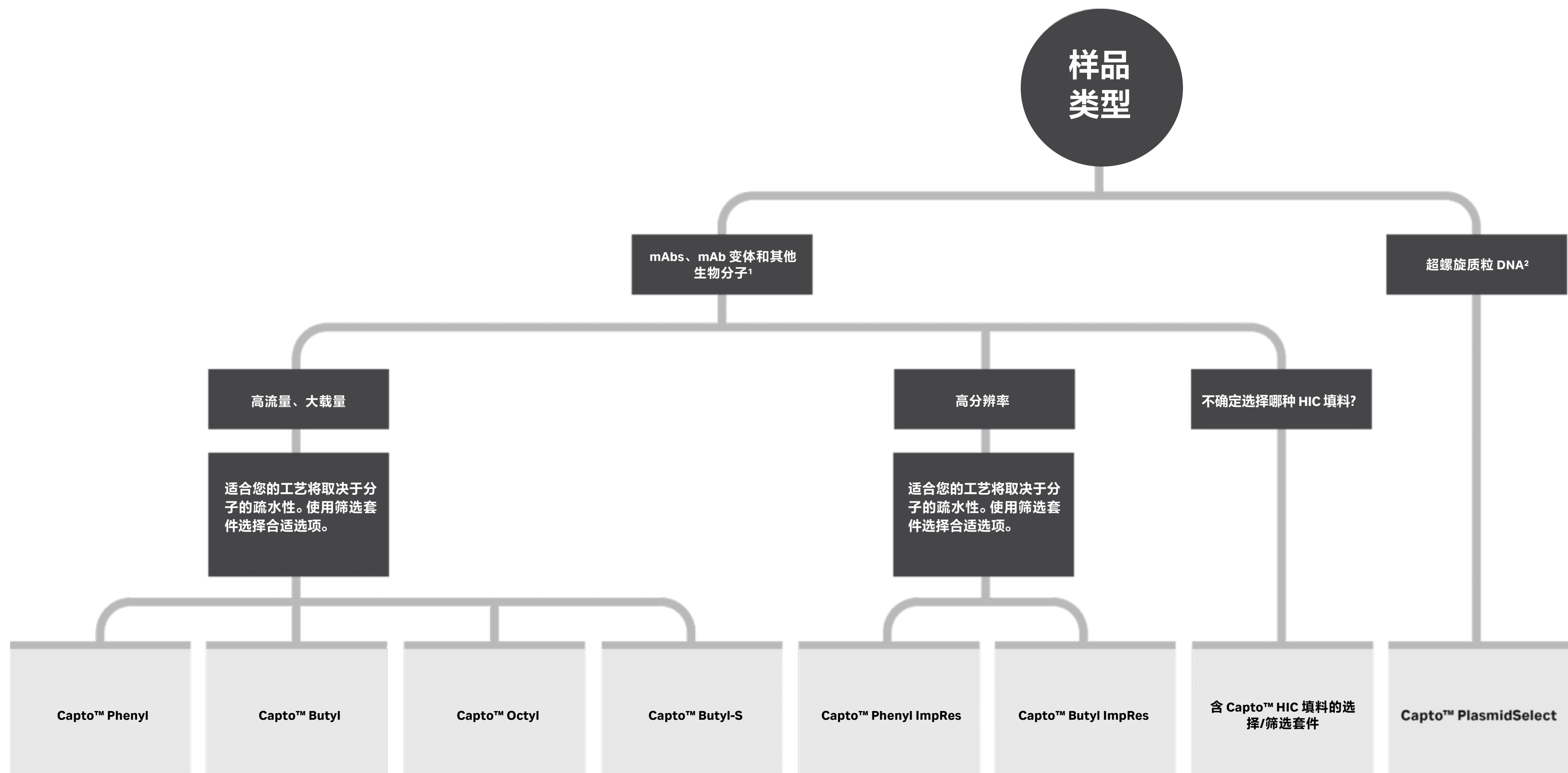
本章介绍了市售填料以及使用建议、纯化示例、分离和清洁方案, 以及实现出色性能的技巧和提示。图 3.1 显示了目前适用于 HIC 的填料和预装填层析柱的选择指南。本章将指导您加快分离速度并提高性能。

Capto™ 填料: 具有高分辨率的高流速填料

Capto™ HIC 填料实现了高生产率的纯化步骤, 其中配基与化学改性的高流动性琼脂糖基架偶联。高流动性琼脂糖基架提供了颗粒硬度而不损害孔径。这可以快速传质, 在高流速下具有高动态结合载量, 因此该填料适用于工艺规模的应用。

可以使用 Capto™ Phenyl (高取代)、Capto™ Octyl、Capto™ Butyl 和 Capto™ Butyl-S 进行生物分子的捕获和中度纯化。Capto™ Phenyl ImpRes 和 Capto™ Butyl ImpRes 是专为中度纯化和精纯而设计的高分辨率填料。

与 Sepharose™ Fast Flow 和 Sepharose™ High Performance 相比, Capto™ 和 Capto™ ImpRes 分别具有更好的压流特性, 这是因为基架的机械稳定性得以提高 (图 3.2)。



¹ 例如, 寡核苷酸、肽、其他重组蛋白质、蛋白质复合物。

² 亲疏芳香吸附。

图 3.1. Capto™ HIC 填料选择指南。

填料特性

Capto™ HIC 填料是满足大规模生物制药生产需求的现代填料。其结合了大载量、窄规格范围、高流速和低背压优势, 从而缩短了工艺周期并提高了生产率。

Capto™ ImpRes HIC 层析填料扩展了既有 Capto™ 平台, 将高分辨率填料纳入其中。Capto™ 填料的高流动性与较小粒径相结合, 提供了良好的分辨率以及出色的压流特性。科研工作者和工艺开发者可以在更高流速和柱床高度下运行它们, 从而增强工艺设计的灵活性。

表 3.1. Capto™ HIC 填料的特性

填料	官能团	pH 稳定性	粒径, d _{50v} (µm) ‡
Capto™ Phenyl (高取代)	苯基	操作*: 3 至 13 在位清洗†: 2 至 14	75
Capto™ Butyl	丁基	操作*: 3 至 13 在位清洗†: 2 至 14	75
Capto™ Butyl-S	丁基-S	操作*: 3 至 13 在位清洗†: 2 至 14	75
Capto™ Octyl	辛基	操作*: 3 至 13 在位清洗†: 2 至 14	75
Capto™ Phenyl ImpRes	苯基	操作*: 3 至 13 在位清洗†: 2 至 14	40
Capto™ Butyl ImpRes	丁基	操作*: 3 至 13 在位清洗†: 2 至 14	40
Capto™ PlasmidSelect	2-巯基吡啶	操作*: 3 至 13 在位清洗†: 2 至 14	40

*填料可以在不明显改变功能的情况下运行的 pH 值范围。所有范围均根据 Cytiva 的经验和知识估算得出。

†填料可以进行在位清洗 (CIP) 或消毒而功能不会发生显著变化的 pH 值范围。

‡累积体积分布的中值粒径。

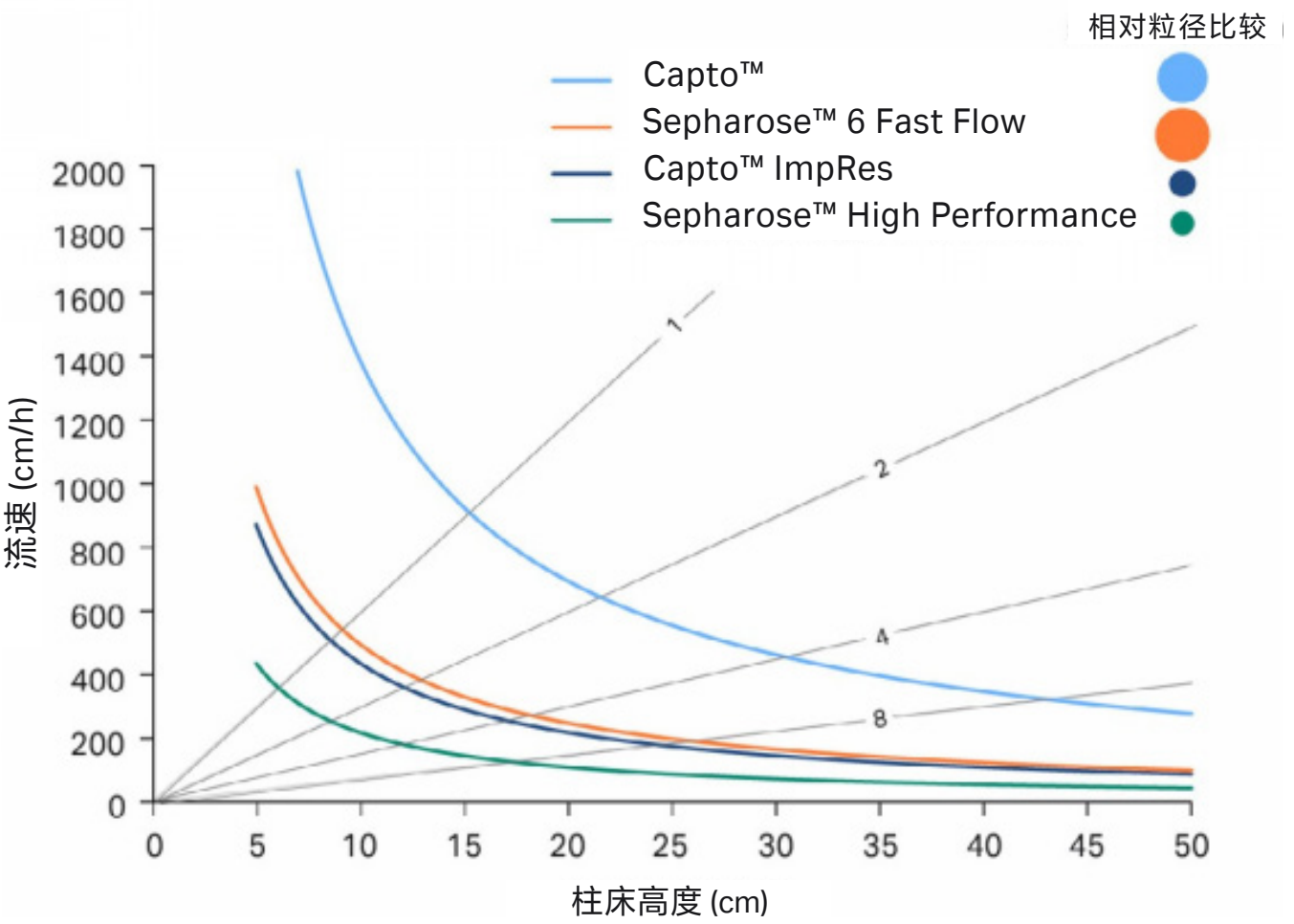


图 3.2. Capto™ 与 Sepharose™ Fast Flow 以及 Capto™ ImpRes 与 Sepharose™ High Performance 的操作窗口 (曲线下方区域)。数据对应于 20°C 时的工艺直径层析柱, 粘度相当于水的粘度。灰色等值线显示层析柱中的保留时间, 以分钟为单位。Capto™ 和 Capto™ ImpRes HIC 填料是性能出色的现代填料, 可作为 Sepharose™ Fast Flow 和 Sepharose™ High Performance 的替代品。

纯化选项

Capto™ HIC 填料可预装填在 HiTrap™ 和 HiScreen™ 层析柱中, 以及层析填料实验室包中。表 3.2 显示了用于 HIC 的不同 Capto™ 填料。有些填料还可用于 PreDictor™ 过滤板、PreDictor™ RoboColumn™ 和 ReadyToProcess™ 层析柱。

 使用预装填的 HiTrap™ 层析柱 (1 mL 或 5 mL) 进行填料选择、组分分离和小规模纯化。

注: HIC 填料的结合载量取决于目标蛋白质和污染物的性质、填料的选择性以及结合条件。在填料筛选和方法开发过程中, 您应该根据经验确定载量。

 使用 PreDictor™ Capto™ HIC 筛选套件, 该套件由预装填有六种不同 Capto™ HIC 填料的 4 × 96 孔板组成, 用于高通量工艺开发。使用 PreDictor™ 孔板生成的数据与来自层析柱的数据高度相关, 使该孔板成为初步筛选工艺条件的理想工具。

 在工艺放大之前, 使用预装填的 HiScreen™ 层析柱 (4.7 mL, 10 cm 柱床高度) 进行方法开发和优化。

 对于层析柱装填: 从实验室到生产规模, 您可以将 Capto™ 填料与现代的层析设备配合使用。由于 Capto™ 填料的硬度较高, 因此装填程序与 Sepharose™ 填料的装填程序略有不同。有关装填实验室规模层析柱的更多详细信息, 请查看有关您正在使用的填料或层析柱的说明。

表 3.2. Capto™ HIC 填料和预装填层析柱的技术特性

产品	推荐操作流速 ¹	最大操作流速 ¹	最大操作压力 (MPa/psi) 1 MPa = 10 bar
HiTrap™ Capto™ Butyl, 1 mL	1 mL/min	4 mL/min	0.3/43
HiTrap™ Capto™ Butyl, 5 mL	5 mL/min	20 mL/min	0.3/43
HiTrap Capto™ Phenyl (高取代), 1 mL	1 mL/min	4 mL/min	0.3/43
HiTrap Capto™ Phenyl (高取代), 5 mL	5 mL/min	20 mL/min	0.3/43
HiTrap Capto™ Octyl, 1 mL	1 mL/min	4 mL/min	0.3/43
HiTrap Capto™ Octyl, 5 mL	5 mL/min	20 mL/min	0.3/43
HiTrap Capto™ Phenyl ImpRes, 1 mL	1 mL/min	4 mL/min	0.3/43
HiTrap Capto™ Phenyl ImpRes, 5 mL	5 mL/min	20 mL/min	0.3/43
HiTrap Capto™ Butyl ImpRes, 1 mL	1 mL/min	4 mL/min	0.3/43
HiTrap Capto™ Butyl ImpRes, 5 mL	5 mL/min	20 mL/min	0.3/43
HiTrap Capto™ PlasmidSelect, 1 mL	1 mL/min	4 mL/min	0.3/43
HiTrap Capto™ PlasmidSelect, 5 mL	5 mL/min	20 mL/min	0.3/43
HiScreen™ Capto™ Butyl	2.7 mL/min	4.7 mL/min	0.3/43
HiScreen™ Capto™ Phenyl (高取代)	2.7 mL/min	4.7 mL/min	0.3/43
HiScreen™ Capto™ Octyl	2.7 mL/min	4.7 mL/min	0.3/43
HiScreen™ Capto™ Butyl ImpRes	1.2 mL/min	1.7 mL/min	0.3/43
HiScreen™ Capto™ Phenyl ImpRes	1.2 mL/min	1.7 mL/min	0.3/43
HiScreen™ Capto™ PlasmidSelect	1.2 mL/min	2.3 mL/min	0.3/43

¹在 25°C 时, 使用粘度与水相同的缓冲液。

表 3.3. 实验室规模下适用于装填 Capto™ 填料的空层析柱列表

层析柱	最大操作压力			内径 (mm)	柱床体积 (mL)	柱床高度 (mm)*
	bar	psi	MPa			
Tricorn™ 5/20	100	1450	10	5	0.0 至 0.5	0 至 26
Tricorn™ 5/50	100	1450	10	5	0.2 至 1.1	8 至 56
Tricorn™ 5/100	100	1450	10	5	1.2 至 2.1	58 至 106
Tricorn™ 5/150	100	1450	10	5	2.1 至 3.1	108 至 156
Tricorn™ 5/200	100	1450	10	5	3.1 至 4.1	158 至 206
Tricorn 10/20	50	725	5	10	0.0 至 2.1	0 至 26
Tricorn™ 10/50	50	725	5	10	0.0 至 4.4	0 至 56
Tricorn™ 10/100	50	725	5	10	3.6 至 8.4	46 至 106
Tricorn™ 10/150	50	725	5	10	7.6 至 12.3	96 至 156
Tricorn™ 10/200	50	725	5	10	11.5 至 16.2	146 至 206
Tricorn™ 10/300	50	725	5	10	19.4 至 24.1	246 至 306
HiScale™ 10/40	20	290	2	10	8 至 31	100 至 400
HiScale™ 16/20	20	290	2	16	0 至 40	0 至 200
HiScale™ 16/40	20	290	2	16	16 至 80	80 至 400
HiScale™ 26/20	20	290	2	26	0 至 106	0 至 200
HiScale™ 26/40	20	290	2	26	69 至 212	130 至 400
HiScale™ 50/20	20	290	2	50	0 至 393	0 至 200
HiScale™ 50/40	20	290	2	50	274 至 785	140 至 400

层析柱	最大操作压力			内径 (mm)	柱床体积 (mL)	柱床高度 (mm)*
	bar	psi	MPa			
XK 16/40	5	72.5	0.5	16	16 至 70	80 至 350
XK 26/20	5	72.5	0.5	26	0 至 66	0 至 125
XK 26/40	5	72.5	0.5	26	45 至 186	85 至 350
XK 50/20	3	43.5	0.3	50	0 至 274	0 至 140
XK 50/30	3	43.5	0.3	50	0 至 559	0 至 280

*最小值对应于用柱头进行的装填。

用于装填 Capto™ 层析填料的空层析柱如表 3.3 所示。AxiChrom™、BPG 和 Chromaflow™ 层析柱可用于装填中试和生产规模的 Capto™ 填料。

纯化示例

使用 Capto™ PlasmidSelect 进行质粒纯化

为了满足基因治疗和 DNA 疫苗应用的新需求, 对纯化质粒 DNA 的需求量日益增加。

Capto™ PlasmidSelect 是一种亲硫芳香族吸附层析填料, 具有选择性, 可将超螺旋共价闭环形式的质粒 DNA 与开环形式的质粒 DNA 分离开来。该填料设计用于将超螺旋 DNA 纯化到高质量, 用于基因治疗和 DNA 疫苗应用。该填料基于刚性基架, 为质粒生产提供了出色的压流特性。它构成了通用工艺的基础, 用于纯化超螺旋共价闭合环状质粒 DNA, 适用于批量以及临床级应用。

该填料还可用于快速分析复合物溶液中质粒 DNA 的数量和质量。

图 3.3 显示了使用 Capto™ PlasmidSelect 从含质粒的进料流中纯化质粒 DNA。

层析柱:	HiScreen™ PlasmidSelect
样品:	含质粒的进料流
上样量:	3 mg 质粒/mL 填料
平衡:	5 个 CV 的 100 mM 缓血酸胺, 2 M 硫酸铵, 10 mM EDTA, pH 7.5, 流速 100 cm/h
洗脱:	10 个 CV 的 100 mM 缓血酸胺, 1.7 M 硫酸铵, 10 mM EDTA, pH 7.5 + 0.3 M NaCl, 流速 80 cm/h
清洗:	5 个 CV 的 100 mM 缓血酸胺, 2 M 硫酸铵, 10 mM EDTA, pH 7.5, 流速 100 cm/h
系统:	ÄKTA avant™ 150
在位清洗:	3 个 CV 的 100 mM 缓血酸胺, 10 mM EDTA, 流速 100 cm/h
检测:	254 nm

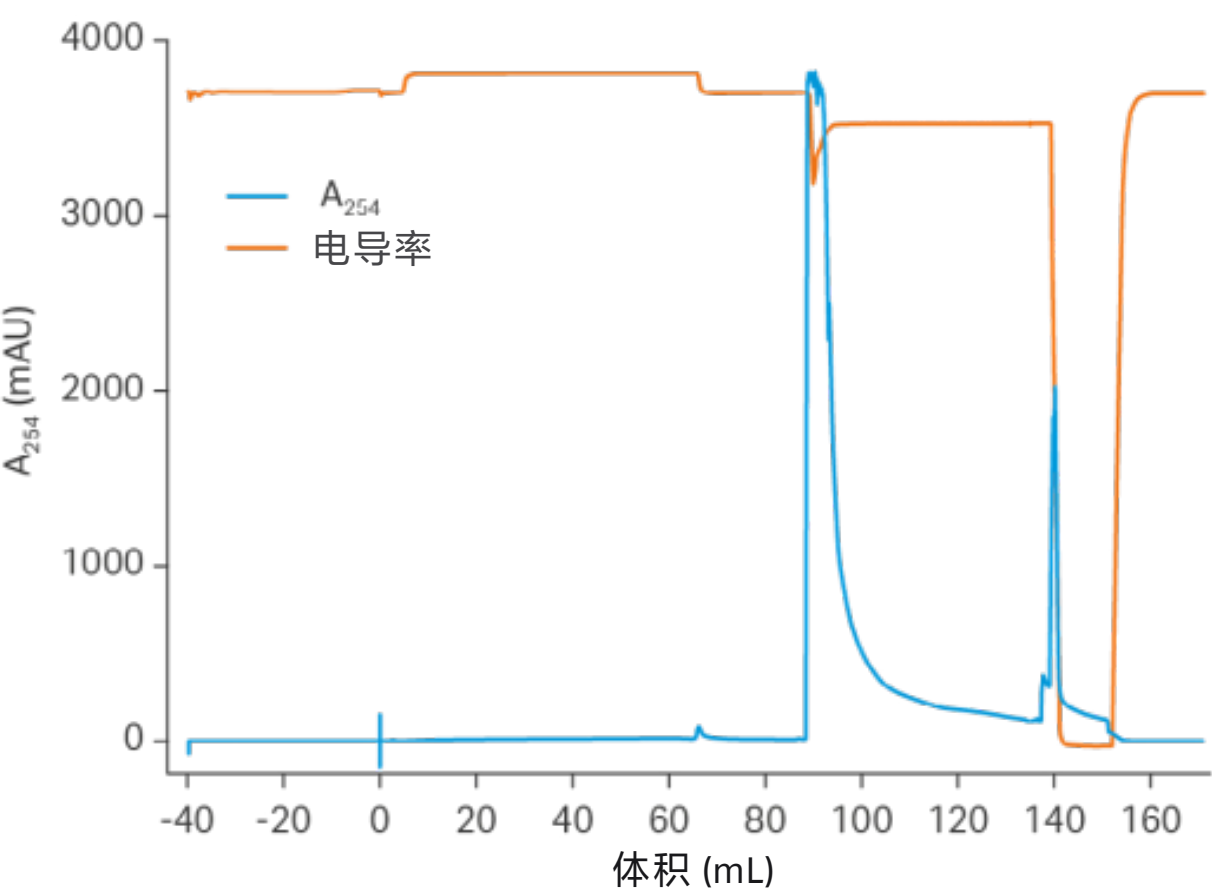


图 3.3. 使用 Capto™ PlasmidSelect 纯化质粒 DNA。

mAb 精纯

我们比较了使用 Capto™ Butyl ImpRes 及其相应前身 Butyl Sepharose™ High Performance 填料的聚集体去除结果 (图 3.4)。在降低聚集体含量方面, Capto™ Butyl ImpRes 具有相似的效果, 并有可能使用更高的柱床高度和更高的流速 (图 3.5)。

表 3.4. 聚集体去除方法概述

	梯度洗脱	步级洗脱
流速	0.25 mL/min (75 cm/h)	0.65 mL/min (200 cm/h)
柱床高度 (cm)	5	20
缓冲液	A: 含 1 M 硫酸铵的 25 mM 柠檬酸盐, pH 5.0 B: 超纯去离子水	A: 25 mM 柠檬酸盐, 850 mM 硫酸铵, pH 5.0 B: 25 mM 柠檬酸盐, pH 5.0
UNICORN™ 方法	平衡, 85% A 和 15% B, 2 CV	使用缓冲液平衡, 0% B, 2 CV
	上样量, 66% 的 Qb10 ¹	上样量, 65% 的 QQb10 ¹
	层析柱清洗, 15% B, 5 CV	层析柱清洗, 0% B, 2 CV
	梯度洗脱, 15% B 至 100% B, 10 CV	步级洗脱, 50% B, 5 CV
	剥离, 100% B, 5 CV	剥离, 100% B, 5 CV
	再平衡, 15% B, 5 CV	再平衡, A 缓冲液, 3 CV
在位清洗 ²	0.1 M NaOH, 0.5 mL/min, 1 CV	

¹ Q_{b10} = 在前沿分析 (置换层析) 中 10% 穿透时的动态结合载量。

² 在位清洗或消毒, 功能无明显变化。

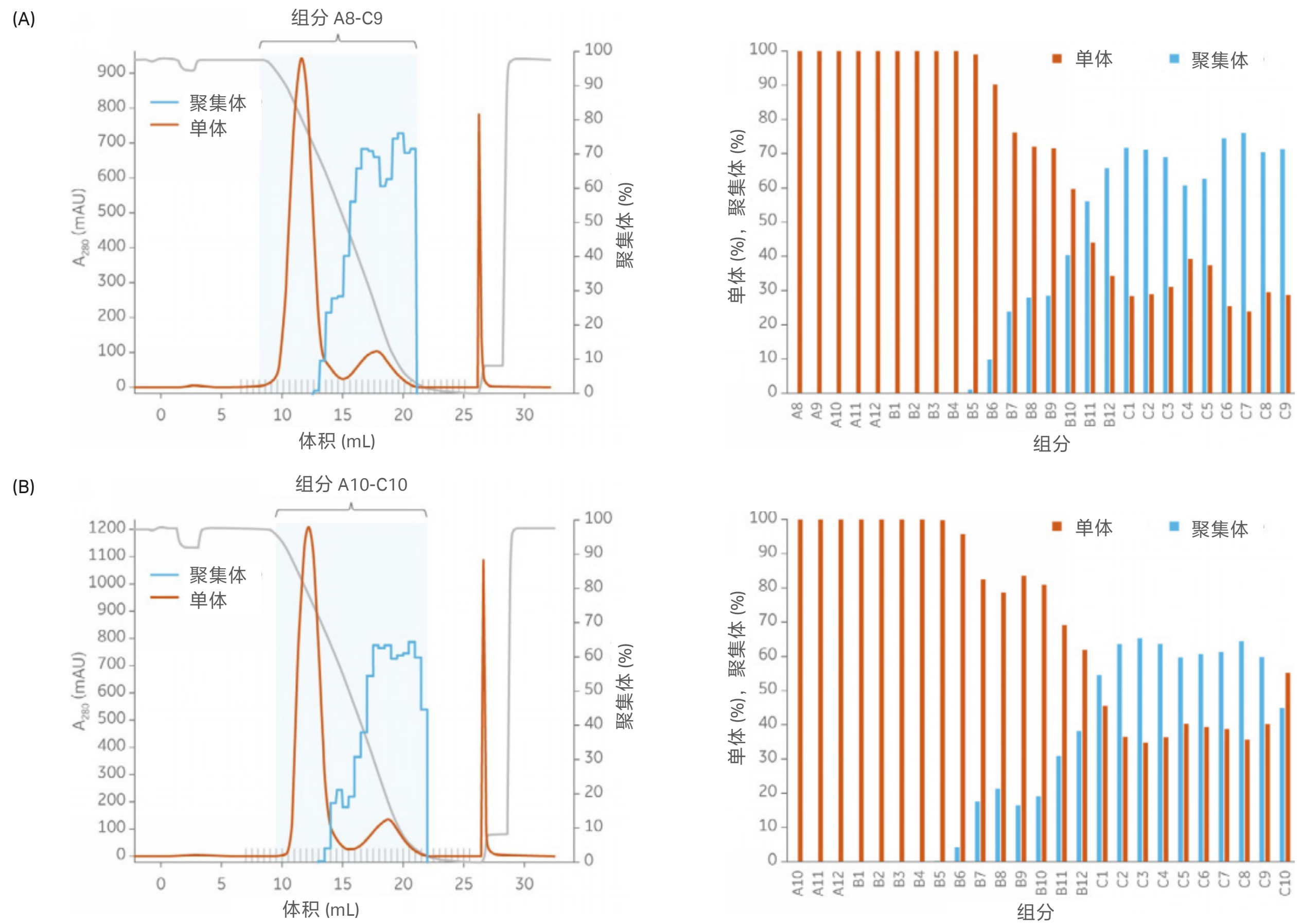


图 3.4. 在 1 mL 层析柱 (10 cm 柱床高度) 中, 在上样 66% Qb10、流速为 75 cm/h 时, (A) Capto™ Butyl ImpRes、(B) Butyl Sepharose™ High Performance 填料都有效降低了聚集体含量, 并显示出相似的洗脱曲线。

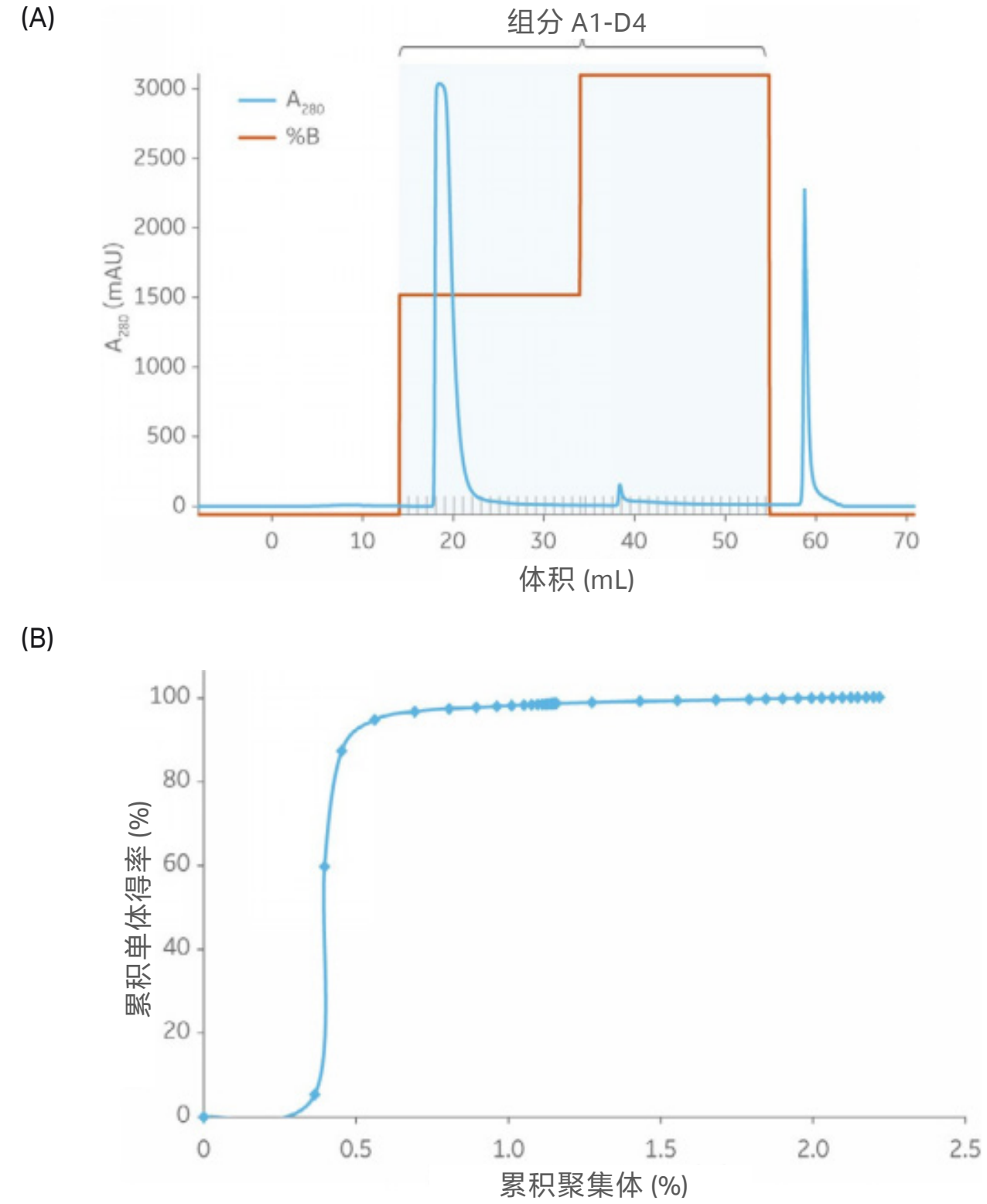


图 3.5. (A) 对于 mAb 和聚集体混合物, 在上样 65% Qb10 时, Capto™ Butyl Impres 产生的结果表明, 随着流速 (200 cm/h) 和柱床高度 (20 cm) 增加, 单体得率增加。从左到右, 峰代表单体、聚集体和在位清洗。针对聚集体分析标记的组分。(B) 使用 Capto™ Butyl ImpRes 和含有 10.3% 聚集体的 mAb 样品, 在 20 cm 柱床高度和 200 cm/h 流速下, 累积单体得率与累积聚集体含量的关系。在该 HIC 纯化步骤后, 在 98% 单体得率下, 聚集体含量低于 1%。

当使用梯度洗脱时, Capto™ Butyl ImpRes 和 Butyl Sepharose™ High Performance 填料显示出相似的聚集体去除能力 (图 3.4)。使用 Capto™ Butyl ImpRes 代替 Butyl Sepharose™ High Performance 进行步级洗脱可提高生产率, 因为可以使用更高的柱床高度和流速, 同时保持单体纯度和良好的得率 (图 3.5)。

化学稳定性

对于日常使用, Capto™ 填料在常见的水性缓冲液、1 M NaOH、变性剂 (8 M 尿素、6 M 盐酸胍)、70% 乙醇、1 M 乙酸以及非离子去垢剂等添加剂中保持稳定。

储存

对于层析柱储存, 先用 5 个 CV 的蒸馏水清洗, 然后用 5 个 CV 的 20% 乙醇清洗。储存在 4°C 至 30°C 的环境中, 不要冷冻。将层析柱密封好, 以防干燥。

SOURCE™ 填料

-  如果无法在较大粒径的填料中找到合适的选择性, 请使用 SOURCE™ 填料进行精纯。
-  在 ÄKTA™ 系统和 HPLC 等仪器上运行 SOURCE™ 层析柱。有关选择纯化设备的指南, 请参见附录 3。

SOURCE™ 填料基于由单分散刚性聚苯乙烯二乙烯基苯制成的亲水性基架, 并被疏水性配基异丙基或苯基取代 (图 3.6)。这些填料表现出较高的化学和物理稳定性。较小的粒径可快速结合和解离以促进高分辨率, 同时, 颗粒的均匀性和稳定性确保了低背压下的高流速。

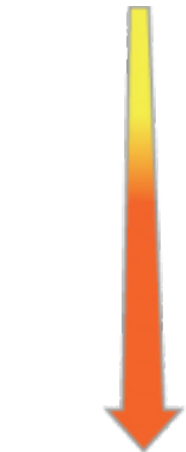
SOURCE™ 填料可以使用的高流速更可能受到设备的限制, 而不是填料的物理性质。

您可以轻松地将分离方法从预装填的 RESOURCE™ 层析柱扩展到 FineLINE™ 层析柱等大型层析柱。

配基

异丙基 (ISO) | $\text{—O—CH—(CH}_3)_2$

苯基 (PHE) | $\text{—O—C}_6\text{H}_5$



增强配基疏水性

图 3.6. 配基通过不带电、化学稳定的 O-醚键与单分散 SOURCE™ 填料颗粒偶联。

填料特性

该填料的成分具有一定刚性且单分散, 含有聚苯乙烯和二乙烯基苯颗粒 (15 μm), 并且具有优化的孔径分布。基架与两种疏水配基之一 (异丙基或苯基) 偶联。

表 3.5. SOURCE™ HIC 填料的特性

产品	基架	pH 稳定性	粒径 (d50V)*
SOURCE™ 15ISO, SOURCE™ 15PHE	聚苯乙烯/二乙烯基颗粒	操作*: 2 至 12 在位清洗†: 1 至 14	15 μm

* 填料可以在不明显改变功能的情况下运行的 pH 值范围。所有范围均根据 Cytiva 的经验和知识估算得出。

† 填料可以进行在位清洗或消毒而功能不会发生显著变化的 pH 值范围。

‡ 中值粒径, 单分散粒径分布。

纯化选项



图 3.7. 基于 SOURCE™ 基架的 HIC 填料以预装填的层析柱和填料包形式提供。

SOURCE™ 填料以填料包和预装填在 RESOURCE™ 层析柱中的形式提供 (图 3.7 和表 3.6)。图 3.8 显示了使用 HIC 用 SOURCE™ 填料对小鼠 mAb 进行纯化筛选的示例。

表 3.6. SOURCE™ 填料和预装填的层析柱

产品	配基*	推荐操作流速†	最大操作流速†	最大操作压力‡ (MPa/psi) 1 MPa = 10 bar
RESOURCE™ PHE, 1 mL 层析柱	苯基	0.8 至 4.8 mL/min	10 mL/min	1.5/220
SOURCE™ 15PHE 4.6/100 PE, 1.7 mL 层析柱	苯基	0.5 至 2.5 mL/min	5 mL/min	4/580
SOURCE™ 15PHE 填料	苯基	150 至 900 cm/h	1800 cm/h	0.5/72
RESOURCE™ ISO, 1 mL 层析柱	异丙基	0.8 至 4.8 mL/min	10 mL/min	1.5/220
SOURCE™ 15ISO 填料	异丙基	150 至 900 cm/h	1800 cm/h	0.5/72

* SOURCE™ 基架的性质使得无法像比较基于 Sepharose™ 填料的产品那样定义配基密度。

† 请参见附录 4, 将流速 (cm/h) 转换为体积流速 (L/min), 反之亦然。请注意, 最终工作流速还取决于多种因素, 例如层析柱尺寸、柱床高度、样品特性和上样条件、您使用的设备以及设备可承受的背压。

‡ 最大操作背压是指填料开始压缩的压力。

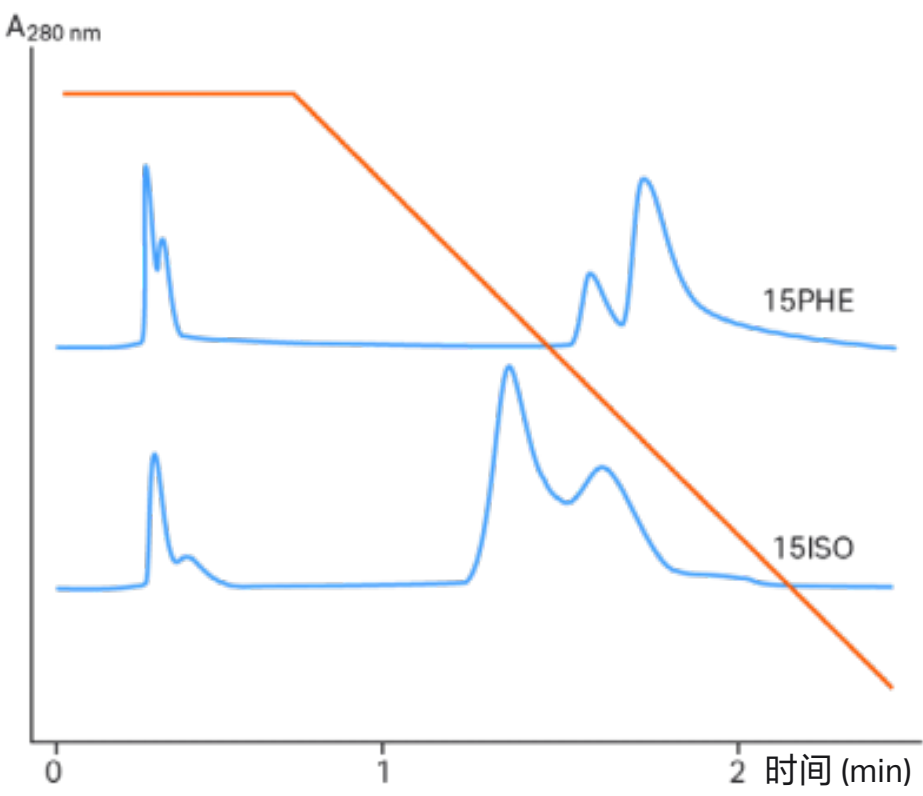


图 3.8. 抗体纯化用 HIC 填料的筛选。

层析柱: SOURCE™ 15ISO 和 SOURCE™ 15PHE (1 mL 预装填)

样品: 磷酸盐缓冲盐水中纯化的单克隆小鼠 IgM 抗体

上样量: 20 µL

起始缓冲液: 2.0 M 硫酸铵, pH 7.0, 100mM 磷酸钠, pH 7.0

洗脱缓冲液: 100 mM 磷酸钠, pH7.0

流速: 5 mL/min

梯度: 20% 至 100% 洗脱缓冲液, 10 CV

检测: 280 nm

- 

注: HIC 填料的结合载量取决于目标蛋白质和污染物的性质、填料的选择性以及结合条件。在填料筛选和方法开发过程中, 您应该根据经验确定载量。
- 

使用预装填的 RESOURCE™ 层析柱进行快速填料选择、方法筛选、组分分离或样品浓缩。
- 

使用 SOURCE™ 15PHE 4.6/100 PE 层析柱时, 可通过增加层析柱长度来提高分辨率。可能需要进一步优化。使用优化的条件作为工艺放大的第一步。

Tricorn™ 层析柱中 SOURCE™ 填料的装填体积如表 3.7 所示。

表 3.7. SOURCE™ 填料的装填体积和柱床高度

空玻璃层析柱内径/长度 (mm)	体积 (mL)	柱床高度 (cm)
Tricorn™ 5/150	至多 3	至多 15
Tricorn™ 5/200	至多 4	至多 20
Tricorn™ 10/100	至多 8	至多 10
Tricorn™ 10/150	至多 12	至多 15
Tricorn™ 10/200	至多 16	至多 20

选择 FineLINE™ 这样的生产层析柱用于更大体积。

纯化示例

方法优化

图 3.9 显示了优化重组蛋白酪氨酸磷酸酶的中度纯化步骤时的运行示例。在最初的捕获步骤中, 我们使用 Q Sepharose™ XL 上的离子交换层析对蛋白质进行了部分纯化。我们分离出活性组分, 将其上样到 SOURCE™ 15PHE 4.6/100 PE 层析柱, 通过 HIC 进行中度纯化。结果表明, 增加样品上样过程中使用的硫酸铵浓度和增加用于洗脱的梯度体积对分辨率的影响最大。

请注意, 在首次运行后, 我们添加了甘油以减少酪氨酸磷酸酶的强结合, 并更好地促进洗脱 (请参见第 2 章表 2.2 中 HIC 分离期间使用的添加剂)。

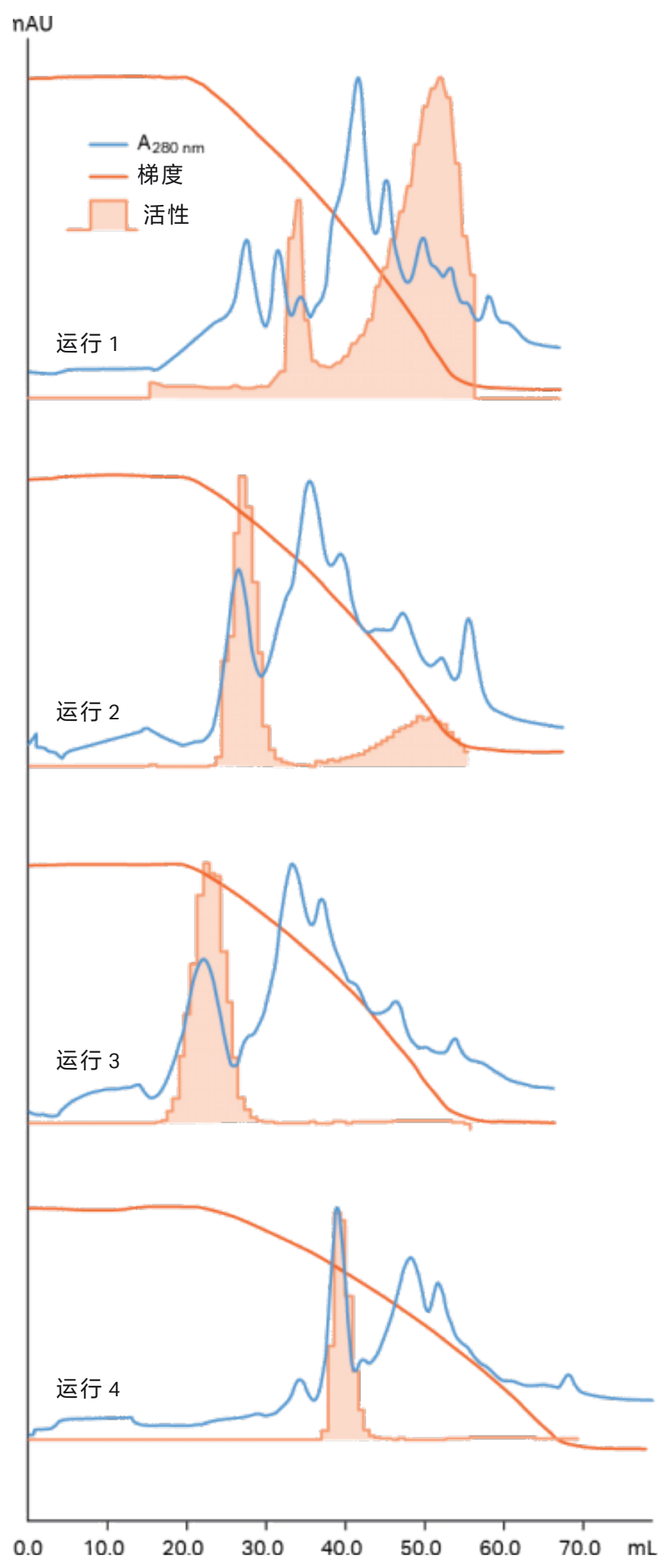


图 3.9. 重组蛋白中度纯化的优化步骤。

- 纯化方案:

起始物料:

捕获:

中度纯化:

精纯:
- CIPP
稀释的大肠杆菌上清液
Q Sepharose™ XL 填料
SOURCE™ 15PHE 层析柱
Superdex™ 75 层析柱
- 层析柱:

样品:
- SOURCE™ 15PHE 4.6/100 PE
重组蛋白酪氨酸磷酸酶, 在 HiTrap™ Q XL 5 mL 上部分纯化
- 上样量:

起始缓冲液 (运行 1):

洗脱缓冲液 (运行 1):

起始缓冲液 (运行 2):

洗脱缓冲液 (运行 2):

起始缓冲液 (运行 3):

洗脱缓冲液 (运行 3):

起始缓冲液 (运行 4):

洗脱缓冲液 (运行 4):

流速:
- 10 mL
25 mM Tris, 1 mM EDTA, 2 mM DTT, pH 7.5
1.5 M (NH₄)₂SO₄, 25 mM Tris, 1 mM EDTA, 2 mM DT T, pH 7.5
1.5 M (NH₄)₂SO₄, 50 mM Tris, 1 mM EDTA, 2 mM DT T, pH 7.5
50 mM Tris, 1 mM EDTA, 2 mM DT T, 10% 甘油, pH 7.5
1.5 M (NH₄)₂SO₄, 20 mM MES, 1 mM EDTA, 2 mM DT T, pH 6.5
20 mM MES, 1 mM EDTA, 2 mM DT T, 10% 甘油, pH 6.5
2 M (NH₄)₂SO₄, 20 mM MES, 1 mM EDTA, 2 mM DT T, pH 6.5
20 mM MES, 1 mM EDTA, 2 mM DT T, 10% 甘油, pH 6.5
a) 1.5 mL/min(运行 1)
b) 1.0 mL/min(运行 2、3、4)
- 梯度:
- 20 个 CV 中 0% 至 100% 洗脱缓冲液 (运行 1、2、3)
27 个 CV 中 0% 至 100% 洗脱缓冲液(运行 4)
- 检测:

活性测量:
- 280 nm
405 nm 下的硝基苯磷酸酯 (pNPP) 活性测定。

工艺放大

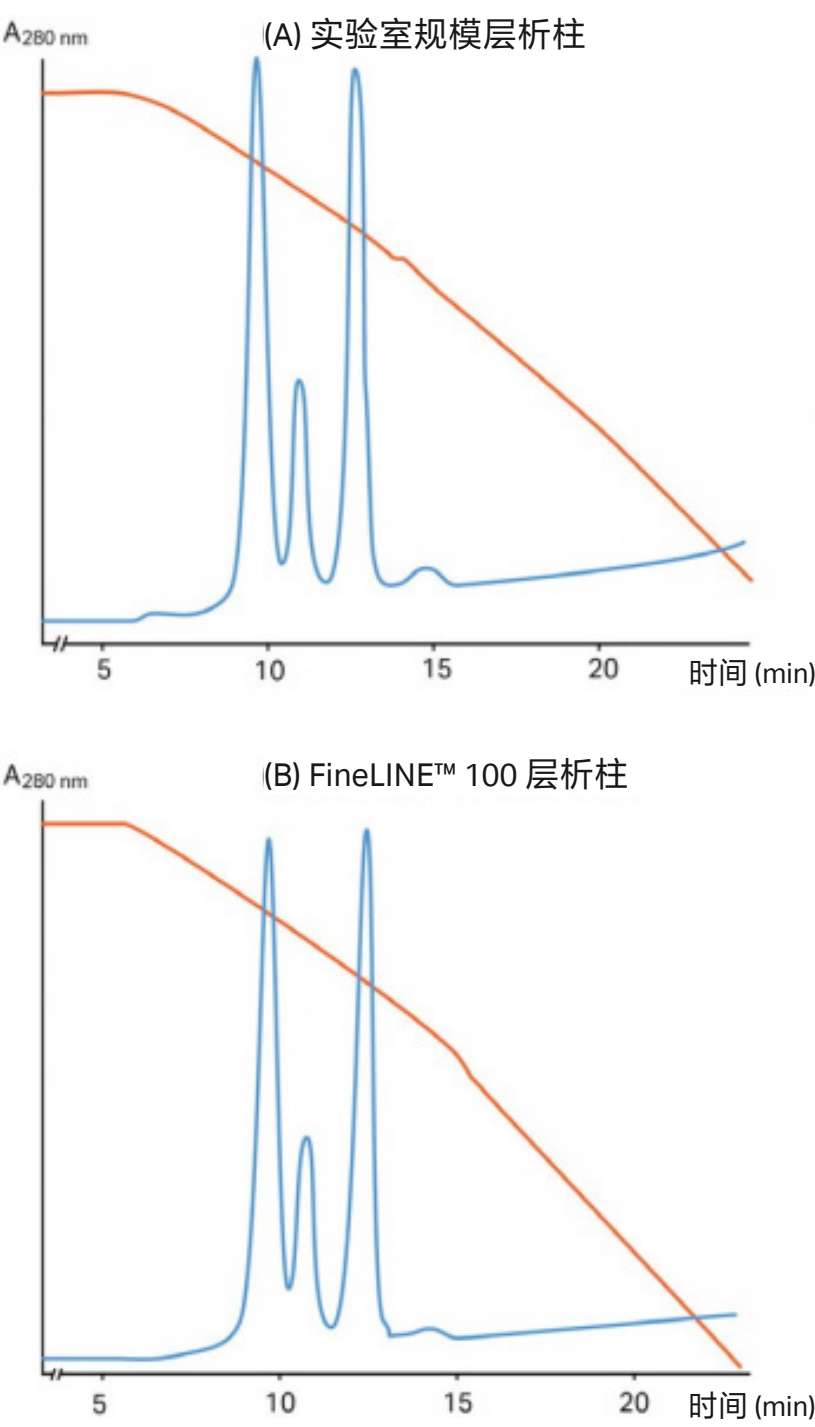


图 3.10. 在 SOURCE™ 15ISO 上放大时, 结果可重现。模型蛋白质混合物的分离显示, 从实验室规模的层析柱 (A) 到 FineLINE™ 100 生产规模的层析柱 (B) 放大了 180 倍。

层析柱: (A) SOURCE™ 15ISO 7.5 × 50 mm (2.2 mL)
样品: (B) FineLINE™ 100, 100 × 50 mm (400 mL)
上样量: 乳清蛋白, 糜蛋白酶原
起始缓冲液: 0.3 mg/mL 填料
100 mM 磷酸钾,
2.0 M 硫酸铵, pH 7.0
洗脱缓冲液: 100 mM 磷酸钾, pH 7.0
流速: (A) 2.2 mL/min (300 cm/h)
(B) 385 mL/min (300 cm/h)
梯度: 20% 至 100% 洗脱缓冲液, 20 CV
检测: 280 nm
系统: ÄKTA™ 层析系统

精纯

图 3.11 显示了使用 SOURCE™ 15PHE 作为大规模纯化重组蛋白 rExotoxin A (PE553D) 的最终精纯步骤, 该蛋白在铜绿假单胞菌的周质中表达。在样品上样前, 我们向部分纯化的蛋白质中加入硫酸铵 (1.0 M)。我们使用 15 个柱体积 (CV) 的 1.0 至 0.55 M 硫酸铵线性梯度, 洗脱结合的外毒素 A。该步骤去除了剩余的污染蛋白质, 如反相层析上的单峰所示 (图 3.12)。

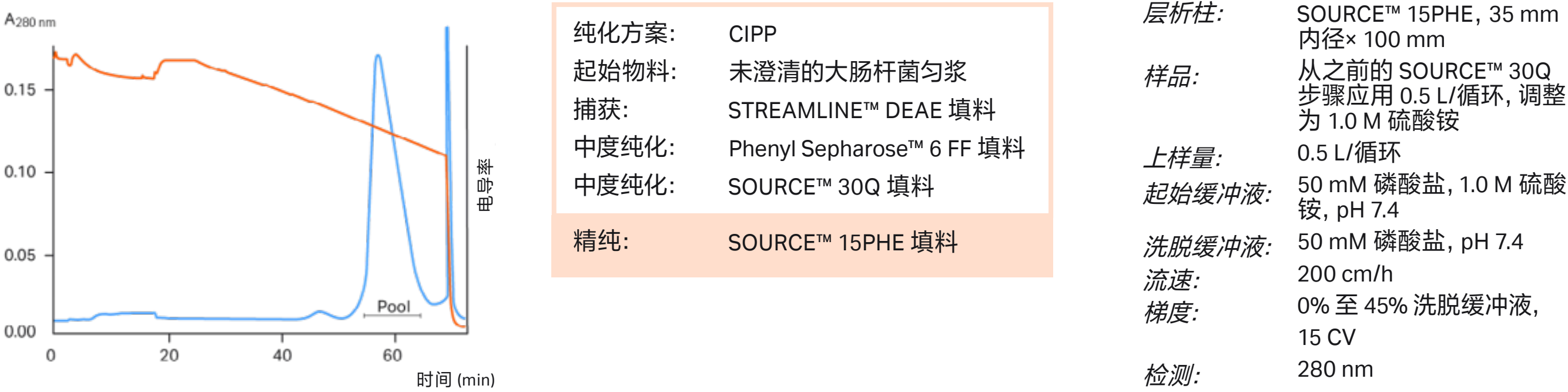


图 3.11. SOURCE™ 15PHE 被用作重组蛋白 rExotoxin A (PE553D) 大规模纯化的最后精纯步骤。

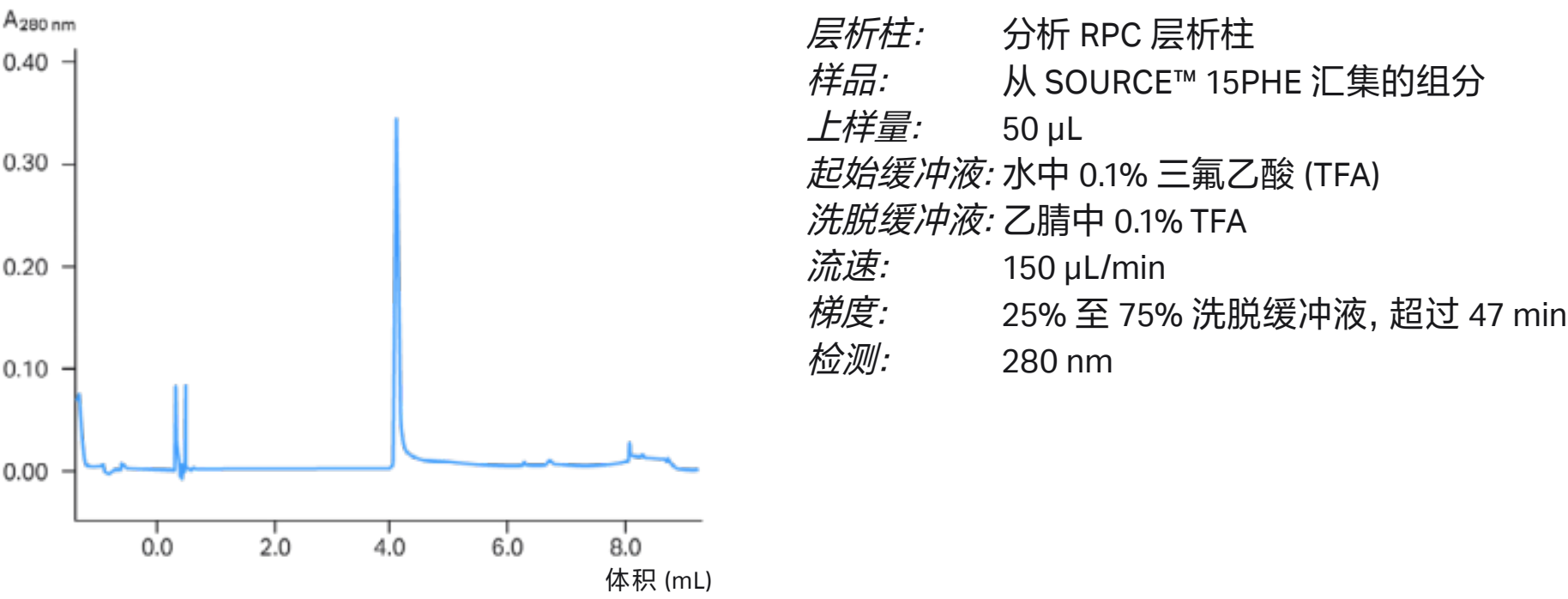


图 3.12. 层析分析证实了 SOURCE™ 15PHE 上精纯步骤后的纯度。

进行分离

有关选择缓冲液、盐浓度和 pH 值以及优化方法的指南, 请参见第 2 章。

您可以基于这些说明优化分离。

- 

为了优化分离并避免层析柱性能下降, 正确制备样品和缓冲液至关重要。样品必须完全溶解, 并且不含任何可能干扰分离的颗粒或物质。有关样品制备的建议和意见, 请参见第 2 章和附录 1。
- 

过滤缓冲液以及添加所有盐和添加剂后的样品。使用高质量的水和化学品。使用 0.22 µm 过滤器过滤溶液。为了避免在已装填的层析柱中形成气泡, 并确保结果的可重现性, 在准备运行时, 请将层析柱和缓冲液保持在相同温度。
- 

为避免沉淀问题, 请检查样品组分的盐稳定窗口。避免在接近目标蛋白质稳定性极限的浓度下工作。对于疏水性未知的样品, 请尝试以下方法:

起始缓冲液: 1.5 M 硫酸铵, 50 mM 磷酸盐缓冲液, pH 7.0

洗脱缓冲液: 50 mM 磷酸盐缓冲液, pH 7.0



注: 由于您选择的起始缓冲液的粘度、样品特性、上样要求和您使用的设备, 您可能需要降低流速。

首次使用或长期储存后首次使用

1. 去除所有乙醇。为此, 用 5 个 CV 的蒸馏水或洗脱缓冲液清洗。

流速: 2 mL/min, SOURCE™ 15PHE 4.6/100 PE

4 mL/min, RESOURCE™ 1 mL

200 cm/h, 适用于装填在较大层析柱中的 SOURCE™
2. 使用与第一步相同的流速, 用 5 个 CV 的起始缓冲液清洗。
3. 执行空白洗脱 (即在不进行任何上样的情况下执行一次运行) 以检查电导率曲线。

通过梯度洗脱进行分离

- 流速: 2 mL/min, SOURCE 15PHE 4.6/100 PE

4 mL/min, RESOURCE™ 1 mL

200 cm/h, 适用于装填在较大层析柱中的 SOURCE™
- 在整个分离过程中收集组分。
1. 用 5 至 10 个 CV 的起始缓冲液平衡层析柱, 或者直到紫外基线和电导率稳定。

2. 将样品调节至选定的盐浓度(如有必要, 调节 pH 值)。过滤, 并上样到层析柱。

3. 用 5 至 10 个 CV 的起始缓冲液清洗, 或直到紫外基线和电导率稳定, 以使所有未结合的物质都已通过层析柱进行清洗。

4. 使用 10 至 20 个 CV 的梯度体积开始洗脱, 逐渐增加洗脱缓冲液的比例, 直到盐浓度达到最低(即不含盐的缓冲液)。

5. 用 2 至 5 个 CV 的无盐洗脱缓冲液清洗, 洗脱任何残留的疏水结合物质。

6. 用 5 至 10 个 CV 的起始缓冲液再平衡, 或直到电导率达到所需值。

通过步级洗脱进行分离

流速: 2 mL/min, SOURCE 15PHE 4.6/100 PE
4 mL/min, RESOURCE™ 1 mL
200 cm/h, 适用于装填在较大层析柱中的 SOURCE™

在整个分离过程中收集组分。

- 1. 用 5 至 10 个 CV 的起始缓冲液平衡层析柱, 或者直到基线、洗脱液 pH 值和电导率稳定。
- 2. 将样品调节至选定的盐浓度 (如有必要, 调节 pH 值)。过滤, 并上样到层析柱。
- 3. 用 5 至 10 个 CV 的起始缓冲液清洗, 或直到紫外基线和电导率稳定, 以使所有未结合的物质都已通过层析柱进行清洗。
- 4. 用 5 个 CV 的洗脱缓冲液洗脱, 并按您选择的浓度加盐。
- 5. 在较低盐浓度下重复步骤 4, 直到洗脱出目标蛋白质。
- 6. 用 2 至 5 个 CV 的无盐洗脱缓冲液清洗, 洗脱任何残留的疏水结合物质。
- 7. 用 5 至 10 个 CV 的起始缓冲液再平衡, 或直到电导率达到所需值。



在无盐清洗和再平衡步骤中, 可以使用更高的流速来节省时间, 但不要超过填料的最高推荐流速。



通过测定柱效和峰对称性, 定期检查层析柱性能。有关更多详细信息, 请参见附录 2。



切勿将层析柱或设备置于高盐溶液中。

清洁

正确制备样品和缓冲液, 并在每次分离结束时使用不含盐的缓冲液, 这样可以使大多数层析柱保持良好状态。然而, 性能下降、流速缓慢、背压增加或完全堵塞都是需要使用更严格的程序来清洁填料的迹象。



在清洁过程中, 尽可能反转流向, 这样污染物就不会通过整个层析柱。由于层析柱的设计, 我们不建议您反转 RESOURCE™ 层析柱的流向。每个清洁步骤所需的 CV 数量和时间可以根据污染程度而变化。如果清洁程序不能恢复层析柱的性能, 请在尝试其他清洁方法之前更换顶部过滤器 (如可能)。更换过滤器时要小心, 因为它会影响层析柱装填并干扰性能。

要去除沉淀蛋白质等常见污染物, 请使用以下程序:

流速: 0.2 mL/min, SOURCE™ 15PHE 4.6/100 PE

1 mL/min, RESOURCE™ 1 mL

40 cm/h, 接触时间为 1 至 2 h, 适用于装填在较大层析柱中的 SOURCE™。
请注意, 由于层析柱的条件或样品、缓冲液或保存液的粘度, 可能需要降低流速。

- 1. 用至少 4 个 CV 的 1 M NaOH 清洗。
- 2. 用至少 3 个 CV 的水清洗, 或直到洗脱液 pH 为中性。
- 3a. 要开始新的分离, 用至少 3 个 CV 的起始缓冲液再平衡, 或者直到达到正确的洗脱液 pH 值。
- 3b. 储存时, 用至少 5 个 CV 的保存液清洗。储存层析柱前, 让紫外基线稳定下来。

要去除脂质、脂蛋白和非常疏水的蛋白质, 请参见附录 1。

化学稳定性

对于日常使用, 基于 SOURCE™ 填料的 HIC 填料在常见水性缓冲液、1 M HCl、2 M NaOH、20% 乙醇、100% 异丙醇、变性剂 (6 M 盐酸胍)、1 M 乙酸、30% 异丙醇、30% 乙腈以及最高达 2% 的 SDS 中均保持稳定。

储存

对于层析柱储存, 先用 5 个 CV 的蒸馏水清洗, 然后用 5 个 CV 的 20% 乙醇清洗。将乙醇和水的混合物彻底脱气, 并以低流速上样, 以避免对层析柱过度加压。确保将层析柱密封好, 以防干燥。在 4°C 至 30°C 下, 将层析柱和未使用的填料储存在 20% 乙醇中。不要冷冻。



为避免形成气泡, 请确保在使用前, 层析柱、缓冲液和设备处于相同的温度。

Sepharose™ High Performance 填料

Sepharose™ High Performance 填料是一种传统基架, 用于许多应用中。为了开发新的工艺或蛋白质纯化方法, 我们目前推荐使用一种基于 Capto™ ImpRes 基架的 Cytiva 新填料 (请参见表 3.1)。

Sepharose™ High Performance 填料基于由 6% 琼脂糖制成的颗粒基架 (平均大小为 34 μm), 并高度交联以保持化学和物理稳定性。即使在上样量和流速均较高的情况下, 小粒径也可以实现快速结合和解离。结合正确的选择性, 可以实现高分辨率分离。尽管盐浓度发生变化, 粒径和柱床体积也能保持稳定, 从而在高流速下保持快速分离。配基通过化学稳定的 O- 醚键偶联 (图 3.13)。基于 Sepharose™ 的填料的不同选择性特征如图 3.14 所示。



可以使用 Sepharose™ High Performance 进行组分分离、样品浓缩或捕获步骤。但是, 应将这些分离限制在相当干净的样品上, 以避免堵塞层析柱过滤器的风险, 34 μm 粒子需要更精细的层析柱过滤器。

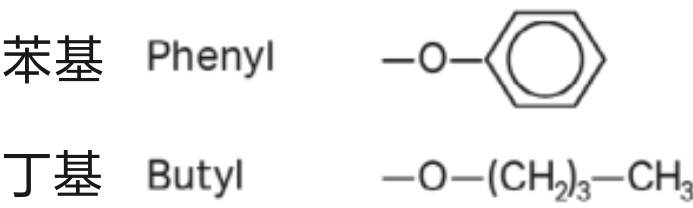


图 3.13. 配基通过不带电、化学稳定的 O- 醚键与 Sepharose™ High Performance 基架偶联。

填料特性

Sepharose™ High Performance 基于高度交联的 6% 琼脂糖, 形成球形颗粒 (平均大小为 34 μm), 并通过不带电、化学稳定的 O- 醚键被 s 配基取代 (表 3.8)。表 3.9 显示了目前基于 Sepharose™ High Performance 填料的可用产品。

表 3.8. 苯基和丁基 Sepharose™ High Performance 填料的特性

产品	基架	pH 稳定性	粒径 (d _{50v}) ‡
Phenyl Sepharose™ High Performance	6% 交联琼脂糖, 球形颗粒	操作*: 3 至 12 在位清洗†: 3 至 13	34 μm
Butyl Sepharose™ High Performance	6% 交联琼脂糖, 球形颗粒	操作*: 3 至 12 在位清洗†: 2 至 14	34 μm

*填料可以在不明显改变功能的情况下运行的 pH 值范围。

† 填料可以进行在位清洗或消毒而功能不会发生显著变化的 pH 值范围。

‡ 累积体积分布的中值粒径。

纯化选项

表 3.9. 基于 Sepharose™ High Performance 填料的 HIC 产品

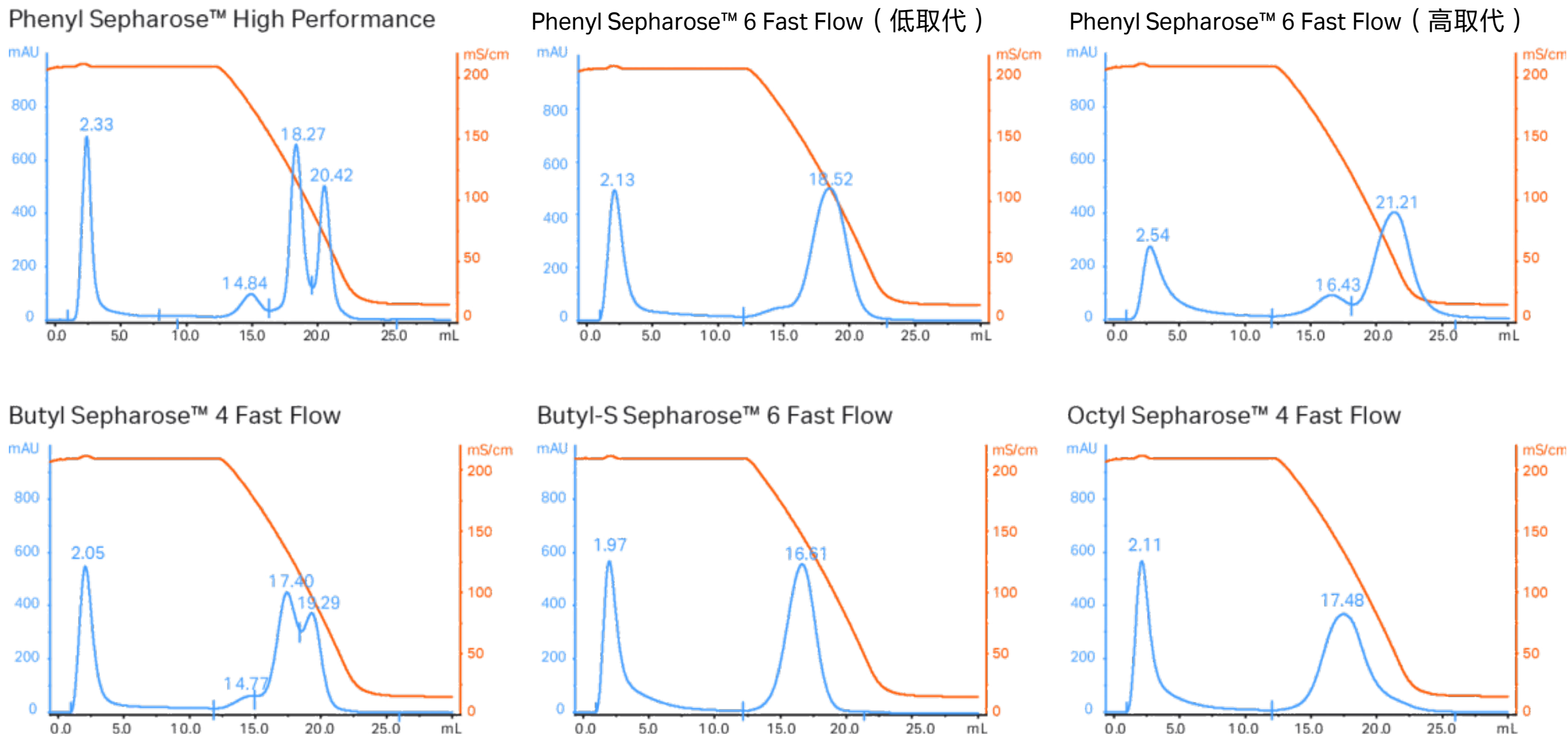
产品	推荐工作流速 (mL/min) *	最大操作流速 (mL/min)	最大操作压力 † (MPa/psi) 1 MPa=10 bar
HiTrap™ Phenyl HP, 1 mL	最高达 1 mL/min	4 mL/min	0.3/43
HiTrap™ Phenyl HP, 5 mL	最高达 5 mL/min	20 mL/min	0.3/43
HiPrep™ Phenyl HP 16/10, 20 mL	最高达 5 mL/min	5 mL/min	0.3/43
Phenyl Sepharose™ High Performance	30 至 150 cm/h	150 cm/h	0.5/72
HiTrap™ Butyl HP, 1 mL	最高达 1 mL/min	4 mL/min	0.3/43
HiTrap™ Butyl HP, 5 mL	最高达 5 mL/min	20 mL/min	0.3/43
Butyl Sepharose™ High Performance	30 至 150 cm/h	150 cm/h	0.5/72

* 这些建议适用于在室温下在水性缓冲液中进行的分离。请参见附录 4, 将流速 (cm/h) 转换为体积流速 (L/min), 反之亦然。请注意, 最终工作流速还取决于多种因素, 例如层析柱尺寸、柱床高度、样品特性和上样条件、您使用的设备以及设备可承受的背压。

† 最大操作压力是指填料开始压缩的压力。

HIC 填料的结合载量在很大程度上取决于目标蛋白质和污染物的性质、填料的选择性以及结合条件。在填料筛选和方法开发过程中, 需要根据经验确定载量。

各种 HIC 填料的不同选择性特征的比较如图 3.14 所示。选择在最低盐浓度下具有理想选择性、分辨率和上样载量的填料。



层析柱: HiTrap™ HIC 选择套件
样品: 细胞色素 C、核糖核酸酶 A、溶菌酶、α-胰凝乳蛋白酶原, 6 mg 蛋白质/mL, (1:3:1:1) 溶于起始缓冲液中
样品体积: 1 mL
上样量: 6 mg 蛋白质/mL 填料
起始缓冲液: 1.7 M (NH₄)₂SO₄, 0.1 M Na₂HPO₄, pH 7.0
洗脱缓冲液: 0.1 M Na₂HPO₄, pH 7.0
流速: 1.0 mL/min (150 cm/h)
梯度: 10 CV 中的 0% 至 100% 洗脱缓冲液

图 3.14. 基于 Sepharose™ 的填料的不同选择性特征的比较。



使用预装填的 HiTrap™ 层析柱 (1 mL 或 5 mL) 进行方法筛选、组分分离、小规模纯化、样品浓缩或净化。如果需要增加载量, 请使用预装填的层析柱 HiPrep™ 16/10 Phenyl HP (20 mL)。



Phenyl Sepharose™ High Performance 填料和 Capto™ Phenyl ImpRes 通常具有相似的疏水性。Capto™ Phenyl ImpRes 可能在较高流速下提供类似的分辨率。



Butyl Sepharose™ High Performance 填料中的丁基配基提供了 Phenyl Sepharose™ High Performance 填料的替代选择性。

纯化示例

填料筛选: 开发单克隆抗体纯化

白蛋白和转铁蛋白是单克隆抗体制备中常见的污染物。但是, 由于大多数单克隆抗体比这些污染物更疏水, 因此当污染物通过层析柱时, 您可以使用 HIC 来结合抗体。

图 3.15 显示了使用 HiTrap™ HIC 选择套件中的层析柱进行筛选的示例, 以选择能够为纯化单克隆 IgG 提供理想选择性和分辨率的 HIC 填料。Phenyl Sepharose™ High Performance 填料产生了含有 IgG 的高分辨率峰。该峰不一定是纯 IgG, 但它可以代表一系列与 IgG 具有相似疏水性的成分。

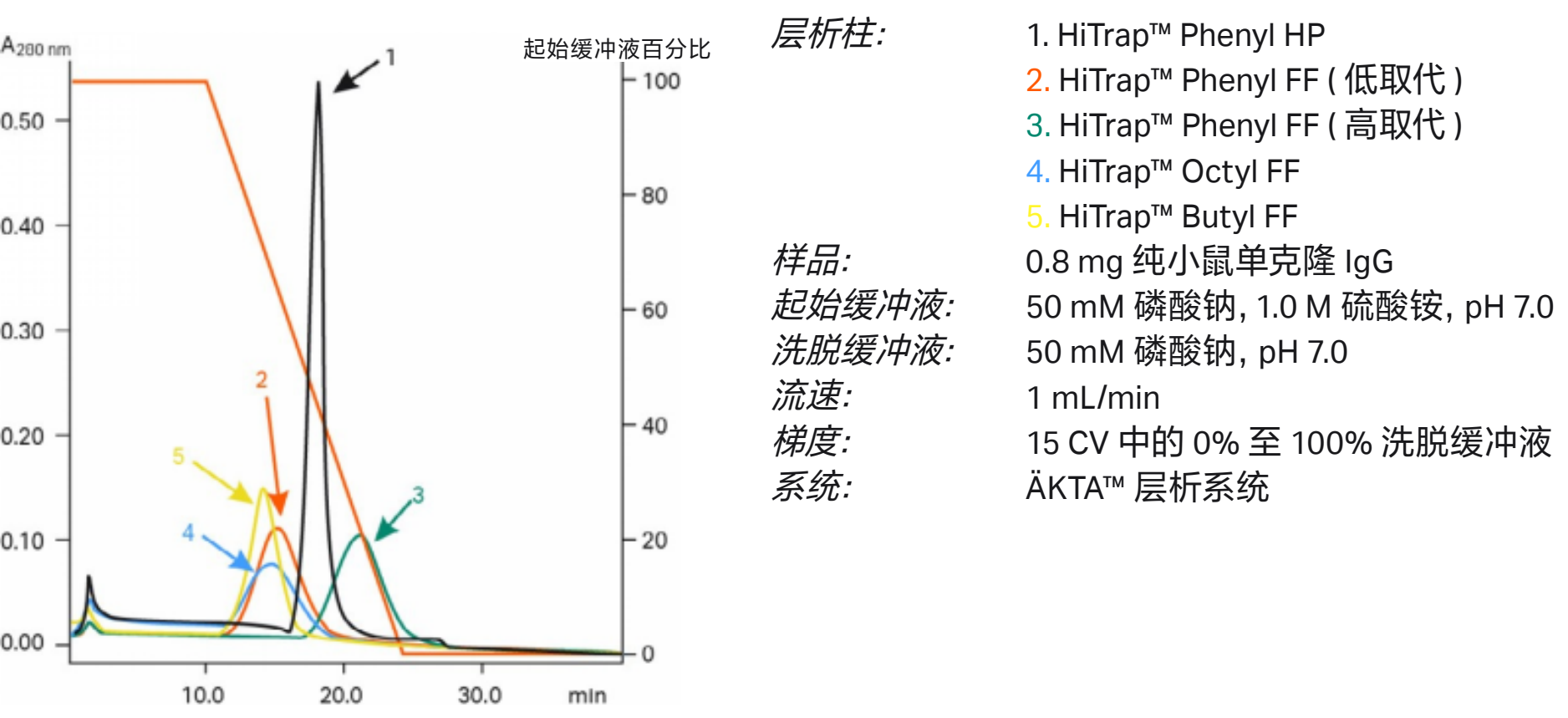


图 3.15. 针对单克隆抗体纯化的填料筛选。

捕获: 单克隆抗体纯化

图 3.16 显示了在捕获步骤中使用的高选择性的示例。在该纯化中, 我们的目标是产生一种纯度足以用于体外诊断的单克隆抗体。杂交瘤细胞培养物中产生的小鼠 IgG1 抗 IgE 与 Phenyl Sepharose™ High Performance 填料结合非常紧密, 大多数胎牛血清蛋白流穿层析柱。捕获步骤产生了 > 95% 的纯度, 消除了对中间步骤的需求。通过将样品浓缩成小体积, 它可以直接转移到精纯步骤。

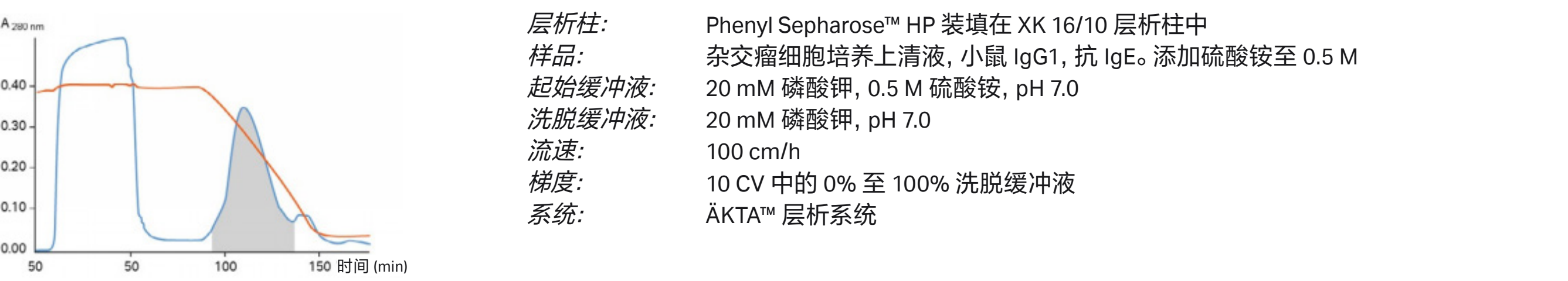


图 3.16. 杂交瘤细胞培养物中单克隆抗体的浓缩和纯化。

中度纯化: 重组 HIV 逆转录酶

在本例中, 大肠杆菌裂解物经过硫酸铵沉淀 (请参见附录 1), 然后使用离子交换层析进行捕获 (图 3.17)。添加硫酸铵后, 我们使用 HIC 进行浓缩, 并在使用另一种离子交换填料进行最终精纯步骤之前, 使用梯度洗脱进一步纯化样品。

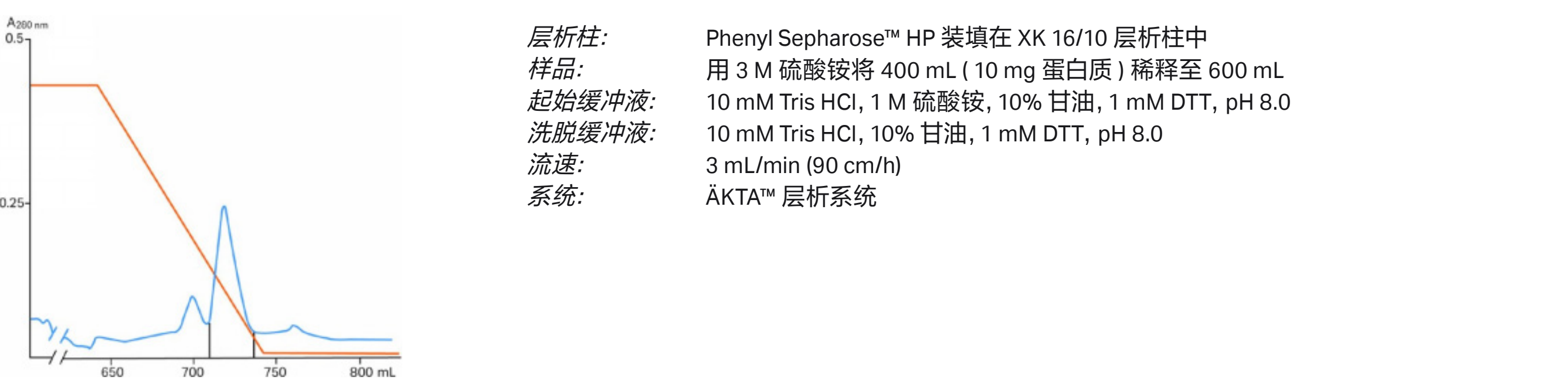


图 3.17. 使用 Phenyl Sepharose™ HP 在 XK 16/10 层析柱中浓缩和纯化 HIV 逆转录酶。

进行分离

有关选择填料、缓冲液、盐和 pH 条件以及优化方法的指南, 请参见第 2 章。

您可以基于这些说明优化分离:

-  为了优化分离并避免层析柱性能下降, 正确制备样品和缓冲液至关重要。样品必须完全溶解, 并且不含任何可能干扰分离的颗粒或物质。有关样品制备的建议和意见, 请参见第 2 章和附录 1。
-  过滤缓冲液以及添加所有盐和添加剂后的样品。使用高质量的水和化学品。使用 0.45 µm 或 0.22 µm 过滤器过滤溶液。为了避免在已装填的层析柱中形成气泡, 并确保结果的可重现性, 在准备运行时, 请将层析柱和缓冲液保持在相同温度。
-  为避免沉淀问题, 请检查样品组分的盐稳定窗口。避免在接近目标蛋白质稳定性极限的浓度下工作。对于疏水性未知的样品, 请尝试以下方法:

起始缓冲液: 1.5 M 硫酸铵, 50 mM 磷酸盐缓冲液, pH 7.0
洗脱缓冲液: 50 mM 磷酸盐缓冲液, pH 7.0

-  注: 由于您选择的起始缓冲液的粘度、样品特性、上样要求和您使用的设备, 您可能需要降低流速。

首次使用或长期储存后首次使用

1. 去除所有乙醇。为此, 用 5 个 CV 的蒸馏水或洗脱缓冲液清洗。

流速: 1 mL/min, HiTrap™ 1 mL
5 mL/min, HiTrap™ 5 mL
0.8 mL/min, HiPrep™ 16/10, 20 mL
25 cm/h, 适用于装填在较大层析柱中的 Sepharose™ High Performance
2. 使用 5 个 CV 的起始缓冲液清洗。

流速: 1 mL/min, HiTrap™ 1 mL
5 mL/min, HiTrap™ 5 mL
3 mL/min, HiPrep™ 16/10, 20 mL
50 cm/h, 适用于装填在较大层析柱中的 Sepharose™ High Performance
3. 执行空白洗脱以检查电导率。

通过梯度洗脱进行分离

流速: 1 mL/min, HiTrap™ 1 mL
5 mL/min, HiTrap™ 5 mL
3 mL/min, HiPrep™ 16/10, 20 mL
50 至 100 cm/h, 适用于装填在较大层析柱中的 Sepharose™ High Performance

在整个分离过程中收集组分。

1. 用 5 至 10 个 CV 的起始缓冲液平衡层析柱, 或者直到紫外基线和电导率稳定。
2. 将样品调节至选定的盐浓度 (如有必要, 调节 pH 值)。过滤, 并上样到层析柱。
3. 用 5 至 10 个 CV 的起始缓冲液清洗, 或者直到紫外基线和电导率稳定。这确保所有未结合的物质都通过层析柱。
4. 使用 10 至 20 个 CV 的梯度体积开始洗脱, 增加洗脱缓冲液的比例, 直到盐浓度达到最低, 即不含盐的缓冲液。
5. 用 2 至 5 个 CV 的无盐洗脱缓冲液清洗, 洗脱残留的疏水结合物质。
6. 用 5 至 10 个 CV 的起始缓冲液再平衡, 或直到电导率达到所需值。

通过步级洗脱进行分离

流速: 1 mL/min, HiTrap™ 1 mL
5 mL/min, HiTrap™ 5 mL
3 mL/min, HiPrep™ 16/10, 20 mL
50 至 100 cm/h, 适用于装填在较大层析柱中的 Sepharose™ High Performance

在整个分离过程中收集组分。

1. 用 5 至 10 个 CV 的起始缓冲液平衡层析柱, 或者直到基线、洗脱液 pH 值和电导率稳定。
2. 将样品调节至选定的盐浓度 (如有必要, 调节 pH 值)。过滤, 并上样到层析柱。
3. 用 5 至 10 个 CV 的起始缓冲液清洗, 或直到紫外基线和电导率稳定, 以使所有未结合的物质都已通过层析柱进行清洗。
4. 用 5 个 CV 的洗脱缓冲液洗脱, 并按您选择的浓度加盐。
5. 在较低盐浓度下重复步骤 4, 直到洗脱出目标蛋白质。
6. 用 2 至 5 个 CV 的无盐洗脱缓冲液清洗, 洗脱任何残留的疏水结合物质。
7. 再平衡。



在无盐清洗和再平衡步骤中, 可以使用更高的流速来节省时间, 但不要超过填料的最高推荐流速。



通过测定柱效和峰对称性, 定期检查层析柱性能。有关更多详细信息, 请参见附录 2。



切勿将层析柱或设备置于高盐溶液中。

清洁

正确制备样品和缓冲液, 并在每次分离结束时使用不含盐的缓冲液, 这样可以使大多数层析柱保持良好状态。然而, 性能下降、流速缓慢、背压增加或完全堵塞都是需要使用更严格的程序来清洁填料的迹象。

 在清洁过程中, 尽可能反转流向, 这样污染物就不会通过整个层析柱。每个清洁步骤所需的 CV 数量和时间可以根据污染程度而变化。如果清洁程序不能恢复层析柱的性能, 请在尝试其他清洁方法之前更换顶部过滤器 (如可能)。更换过滤器时要小心, 因为它会影响层析柱装填并干扰性能。

要去除沉淀蛋白质等常见污染物, 请使用以下程序:

流速: 1 mL/min, HiTrap™ 1 mL
5 mL/min, HiTrap™ 5 mL
3 mL/min, HiPrep™ 16/10, 20 mL
40 cm/h, 接触时间为 1 至 2 h, 适用于装填在较大层析柱中的 Sepharose™ High Performance

注: 由于层析柱的条件和样品、缓冲液或保存液的粘度, 可能需要降低流速。

1. 用最多 4 个 CV 的 1 M NaOH 清洗。
2. 用至少 3 个 CV 的水清洗, 或直到洗脱液 pH 为中性。
 - 3a.要开始新的分离: 用至少 3 个 CV 的起始缓冲液再平衡, 或者直到达到正确的洗脱液 pH 值。
 - 3b.储存时, 用至少 5 个 CV 的保存液清洗。储存层析柱前, 让紫外基线稳定下来。

要去除脂质、脂蛋白和非常疏水的蛋白质, 请参见附录 1。

化学稳定性

对于日常使用, Sepharose™ High Performance 在常见的水性缓冲液、1 M NaOH、变性剂 (8 M 尿素、6 M 盐酸胍)、70% 乙醇、1 M 乙酸、30% 异丙醇、30% 乙腈和最高达 2% 的 SDS 中保持稳定。

储存

对于层析柱储存, 先用 5 个 CV 的蒸馏水清洗, 然后用 5 个 CV 的 20% 乙醇清洗。将乙醇和水的混合物彻底脱气, 并以低流速上样, 以避免对层析柱过度加压。将层析柱密封好, 以防干燥。尽可能使用制造商提供的储存和运输设备。在 4°C 至 30°C 下, 将层析柱和未使用的填料储存在 20% 乙醇中。不要冷冻。

 为避免形成气泡, 请确保在使用前, 层析柱、缓冲液和设备处于相同的温度。

Sepharose™ Fast Flow 填料

Sepharose™ Fast Flow 填料基于传统基架, 仍然用于许多应用中。

为了开发新的工艺或蛋白质纯化方法, 我们目前推荐使用一种基于 Capto™ 基架的 Cytiva 新填料。

Sepharose™ Fast Flow 填料基于由 4% 或 6% 琼脂糖制成的颗粒基架 (平均大小为 90 μm), 并高度交联以保持化学和物理稳定性。基架被通过化学稳定的 O- 醚或 S- 醚键偶联的疏水配基 (苯基、丁基或辛基) 取代 (图 3.18)。苯基配基的两种不同取代度提供了进一步优化结合载量和洗脱条件的机会。尽管盐浓度发生变化, 粒径和柱床体积也能保持稳定, 从而在高流速下保持快速分离。您可以轻松地将方法从小型 HiTrap™ 层析柱扩展到 AxiChrom™ 或 Chromaflow™ 层析柱等大型层析柱。Sepharose™ Fast Flow 填料的性能得到了很好的证明, 并且有许多从实验室顺利转移到中试规模和生产的例子。

配基

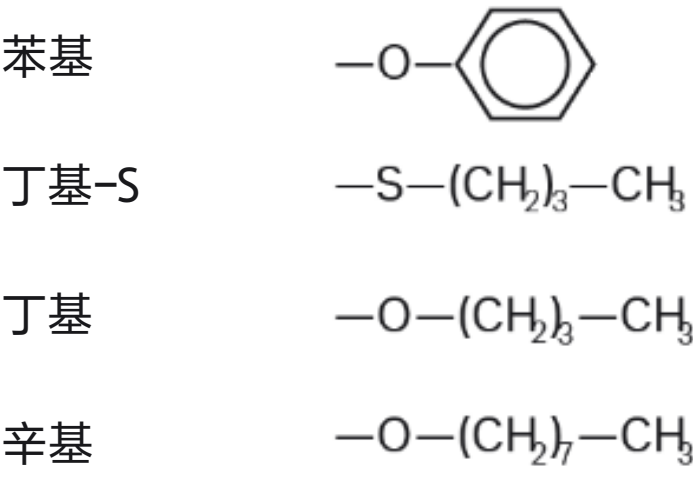


图 3.18. 配基通过不带电、化学稳定的 O- 醚或 S- 醚键与 Sepharose™ 基架偶联。

填料特性

Sepharose™ 6 Fast Flow 填料基于交联的 6% 琼脂糖形成球形颗粒(d50V 为 90 μm), 通过不带电、化学稳定的 O- 醚或 S- 醚键与苯基或丁基配基偶联。可以从两级苯基配基取代度中选择。

Sepharose™ 4 Fast Flow 填料基于交联的 4% 琼脂糖形成球形颗粒(d50V 为 90 μm), 通过不带电、化学稳定的 O- 醚键与丁基或辛基配基偶联。

表 3.10. HIC 用 Sepharose™ Fast Flow 填料的特性

产品	基架	pH 稳定性*	最大操作背压† (MPa/psi) 1 MPa = 10 bar
Phenyl Sepharose™ 6 Fast Flow (高取代)	6% 交联琼脂糖, 球形颗粒	操作*: 3 至 13	90 μm
Phenyl Sepharose™ 6 Fast Flow (低取代)	6% 交联琼脂糖, 球形颗粒	操作*: 3 至 13	90 μm
Butyl-S Sepharose™ 6 Fast Flow	6% 交联琼脂糖, 球形颗粒	操作*: 3 至 13	90 μm
Butyl Sepharose™ 4 Fast Flow	4% 交联琼脂糖, 球形颗粒	操作*: 3 至 13	90 μm
Octyl Sepharose™ 4 Fast Flow	4% 交联琼脂糖, 球形颗粒	操作*: 3 至 13	90 μm

* 填料可以在不明显改变功能的情况下运行的 pH 值范围。所有范围均根据 Cytiva 的经验和知识估算得出。

† 最大操作背压是指填料开始压缩的压力。

纯化选择



图 3.19. 大多数基于 Sepharose™ 6 Fast Flow 或 Sepharose™ 4 Fast Flow 的 HIC 填料以预装填在 HiTrap™ 或 HiPrep™ 层析柱中和填料包的形式提供。

表 3.11. 基于 Sepharose™ Fast Flow 填料的 HIC 产品

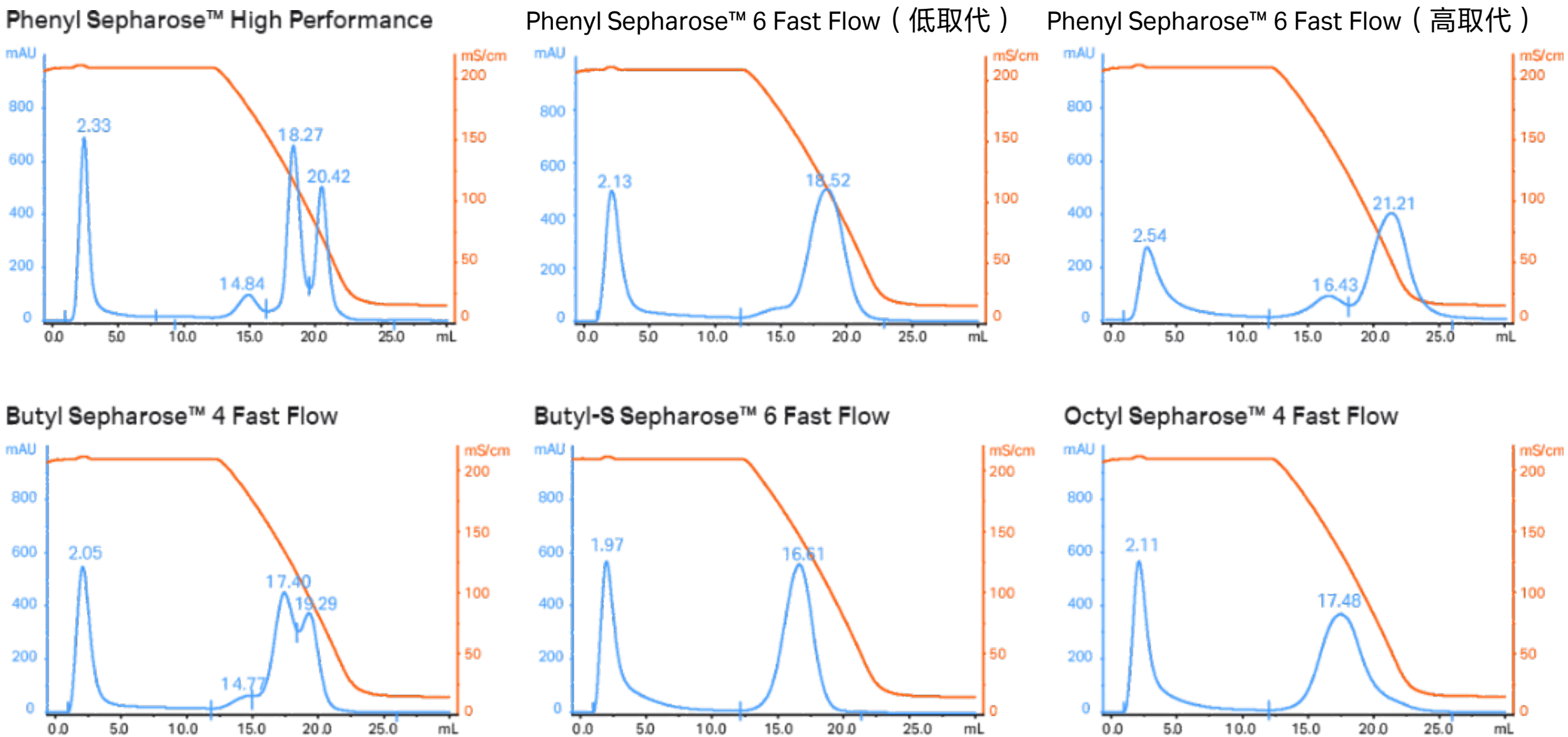
产品	推荐工作流速*	最高流速*	最大操作背压† (MPa/ psi) 1 MPa = 10 bar
HiTrap™ Phenyl FF (高取代), 1 mL	最高达 1 mL/min	4 mL/min	0.3/43
HiTrap™ Phenyl FF (高取代), 5 mL	最高达 5 mL/min	20 mL/min	0.3/43
HiPrep™ 16/10 Phenyl FF (高取代), 20 mL	2 至 10 mL/min	10 mL/min	0.15/22
Phenyl Sepharose™ 6 Fast Flow (高取代)	50 至 400 cm/h	750 cm/h	0.3/43
HiTrap™ Phenyl FF (低取代), 1 mL	最高达 1 mL/min	4 mL/min	0.3/43
HiTrap™ Phenyl FF (低取代), 5 mL	最高达 5 mL/min	20 mL/min	0.3/43
Phenyl Sepharose™ 6 Fast Flow (低取代)	50 至 400 cm/h	750 cm/h	0.3/43
HiTrap™ Butyl FF, 1 mL	最高达 1 mL/min	4 mL/min	0.3/43
HiTrap™ Butyl FF, 5 mL	最高达 5 mL/min	20 mL/min	0.3/43
HiPrep™ 16/10 Butyl FF, 20 mL	2 至 10 mL/min	10 mL/min	0.15/22
HiTrap™ Butyl-S FF, 1 mL	最高达 1 mL/min	4 mL/min	0.3/43
HiTrap™ Butyl-S FF, 5 mL	最高达 5 mL/min	20 mL/min	0.3/43
Butyl Sepharose™ 4 Fast Flow	50 至 300 cm/h	400 cm/h	0.1/14
Butyl-S Sepharose™ 6 FF	50 至 400 cm/h	750 cm/h	0.3/43
HiTrap™ Octyl FF, 1 mL	最高达 1 mL/min	4 mL/min	0.3/43
HiTrap™ Octyl FF, 5 mL	最高达 5 mL/min	20 mL/min	0.3/43
HiPrep™ 16/10 Octyl FF, 20 mL	2 至 10 mL/min	10 mL/min	0.15/22
Octyl Sepharose™ 4 Fast Flow	50 至 300 cm/h	400 cm/h	0.1/14

* 这些建议适用于在室温下在水性缓冲液中进行的分离。请参见附录 4, 将流速 (cm/h) 转换为体积流速 (L/min), 反之亦然。请注意, 最终工作流速还取决于多种因素, 例如层析柱尺寸、柱床高度、样品特性和上样条件、使用的设备以及设备可承受的背压。

† 最大操作背压是指填料开始压缩的压力。

 HIC 填料的结合载量在很大程度上取决于目标蛋白质和污染物的性质、填料的选择性以及结合条件。在填料筛选和方法开发过程中, 需要根据经验确定载量。

 目标蛋白质在具有不同疏水特性的填料上进行不同的分离 (图 3.20)。选择在最低盐浓度下具有理想选择性、分辨率和上样载量的填料。



样品: 细胞色素 C、核糖核酸酶 A、溶菌酶、α-胰凝乳蛋白酶原, 6 mg 蛋白质/mL, (1:3:1:1) 溶于起始缓冲液中
样品体积: 1 mL
上样量: 6 mg 蛋白质/mL 填料
流速: 1.0 mL/min (150 cm/h)
起始缓冲液: 1.7 M (NH₄)₂SO₄, 0.1 M Na₂HPO₄, pH 7.0
洗脱缓冲液: 0.1 M Na₂HPO₄, pH 7.0
梯度: 10 CV 中的 0% 至 100% 洗脱缓冲液
系统: ÄKTA™ 层析系统

图 3.20. 基于各种 Sepharose™ 的 HIC 填料的不同选择性特征的比较。

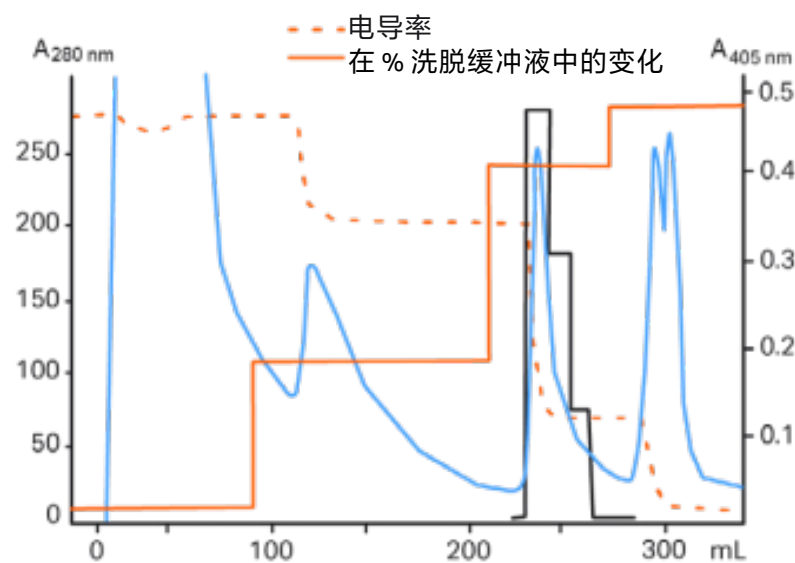
纯化示例

填料筛选

请参见本章中的“填料筛选: 开发单克隆抗体纯化”(图 3.15)。

捕获: 酶纯化

图 3.21 显示了从大肠杆菌匀浆中部分纯化酶、碱性磷酸酶时采用的捕获步骤。我们选择了一些条件, 以确保目标蛋白质与层析柱结合, 而大部分污染物则被直接洗出。我们浓缩了酶, 完成了有效的纯化步骤。



层析柱: HiPrep™ 16/10 Phenyl FF (高取代)
样品: 经离心、过滤和脱盐的大肠杆菌匀浆
上样量: 30 mL
起始缓冲液: 100 mM 磷酸盐, 0.7 M 硫酸铵, pH 7.0
洗脱缓冲液: 100 mM 磷酸盐, pH 7.0
步级洗脱: 样品上样。
用 5 个 CV 的 37% 洗脱缓冲液清洗
洗脱: 80% 洗脱缓冲液, 3 CV
清洗: 100% 洗脱缓冲液
流速: 5 mL/min (150 cm/h)
检测: 280 nm
系统: ÄKTA™ 层析系统

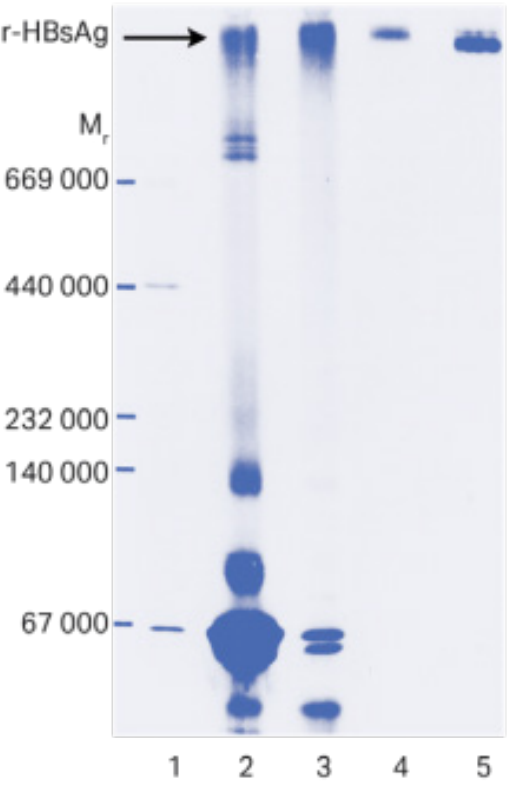
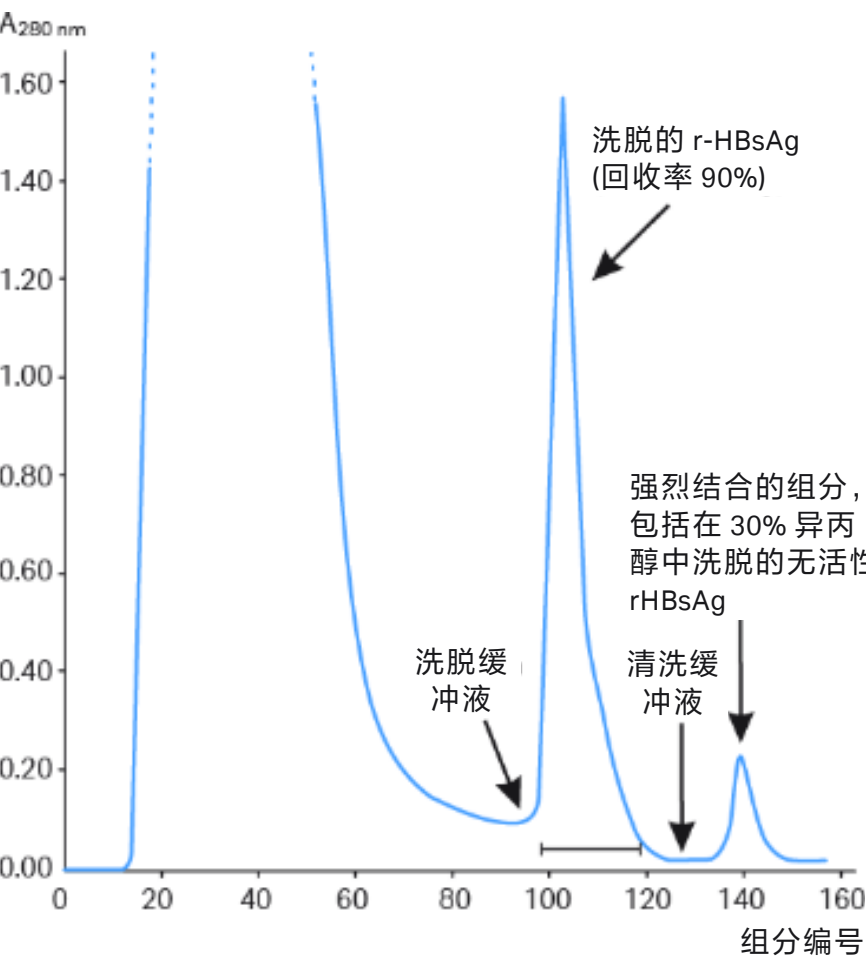
图 3.21. 在 Phenyl Sepharose™ Fast Flow (高取代) 填料上纯化碱性磷酸酶。黑线代表酶的活动性。

捕获: 来自 CHO 细胞的重组乙型肝炎病毒表面抗原 (r-HBsAg)

乙型肝炎病毒 (HBV) 是一种传染性病原体, 可导致急性和慢性肝炎、肝硬化和原发性肝细胞癌。世界卫生组织估计, 2019 年有 2.96 亿人患有慢性乙型肝炎感染, 每年新增 150 万例感染。

对于未感染人群, 科研工作者可以利用重组技术产生重组乙型肝炎表面抗原 (r-HBsAg), 大规模生产有效疫苗。图 3.22 显示了从 CHO 细胞培养上清液中大规模纯化 r-HBsAg。由于这种蛋白质极其疏水, 因此可与大多数 HIC 填料紧密结合。然而, Butyl-S Sepharose™ Fast Flow 的温和疏水性实现了成功纯化, 在捕获步骤中去除了 90% 以上的杂质。

层析柱:	Butyl-S Sepharose™ 6 Fast Flow 装填在 XK 50/20 中, 130 mL
样品:	浓缩 CCS (含约 12 mg rHBsAg), 0.6 M 硫酸铵, pH 7.0
上样量:	300 mL
起始缓冲液:	20 mM 磷酸钠, 0.6 M 硫酸铵, pH 7.0
洗脱缓冲液:	10 mM 磷酸钠, pH 7.0
清洗缓冲液:	洗脱缓冲液中 30% 异丙醇
流速:	2 L/h (100 cm/h)
系统:	ÄKTA™ 层析系统



泳道 1 HMW 天然参考蛋白质
泳道 2 细胞培养上清液
泳道 3 从 HIC 捕获步骤汇集的 r-HBsAg 组分
泳道 4 来自 HIC 捕获步骤的 r-HBsAg 组分
泳道 5 参考 r-HBsAg (从商业来源获得并用作疫苗)

图 3.22. rHBsAg 的大规模纯化。通过 HIC 捕获步骤去除了超过 90% 的杂质 (泳道 3)。电泳分析 (非变性条件下 4% 至 30% 的梯度 PAGE)显示了在 HIC 捕获步骤后纯度如何增加。r-HBsAg 的粒径为 22 nm, 这正是条带出现在凝胶顶部的原因。

中度纯化: Fab 片段

图 3.23 显示了用于 Fab 片段中度纯化的优化洗脱方案, 该方案由第 2 章图 2.3 中的填料筛选发展而来。我们优化了 20 mL 层析柱的条件, 直到我们可以使用步级洗脱来最大化通量并充分利用 HIC 的浓缩效果。然后将该步骤放大到 200 mL 层析柱。

层析柱:	Phenyl Sepharose™ 6 Fast Flow (高取代) 装填在 XK 16/20 (10 cm 柱床高度) 中, 20 mL	层析柱:	Phenyl Sepharose™ 6 Fast Flow (高取代) 装填在 XK 50/20 中, 200 mL
样品:	来自 STREAMLINE™ SP 的 Fab 组分, 80 mL	样品:	来自 STREAMLINE™ SP 的 Fab 组分, 800 mL
起始缓冲液:	1 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 50 mM NaAc, pH 5.0	起始缓冲液:	1 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 50 mM NaAc, pH 5.0
洗脱缓冲液:	50 mM NaAc, pH 5.0	洗脱缓冲液:	50 mM NaAc, pH 5.0
流速:	5 mL/min	流速:	平衡: 100 mL/min 上样和洗脱: 50 mL/min
梯度:	到 50% 洗脱缓冲液的步级梯度	梯度:	到 50% 洗脱缓冲液的步级梯度
系统:	ÄKTA™ 层析系统	系统:	ÄKTA™ 层析系统
检测:	280 nm	检测:	280 nm

纯化方案:	CIPP
起始物料:	大肠杆菌裂解物
捕获:	STREAMLINE SP
中度纯化:	Phenyl Sepharoserm 6 Fast Flow (高取代)
精纯:	SOURCE™ 15S

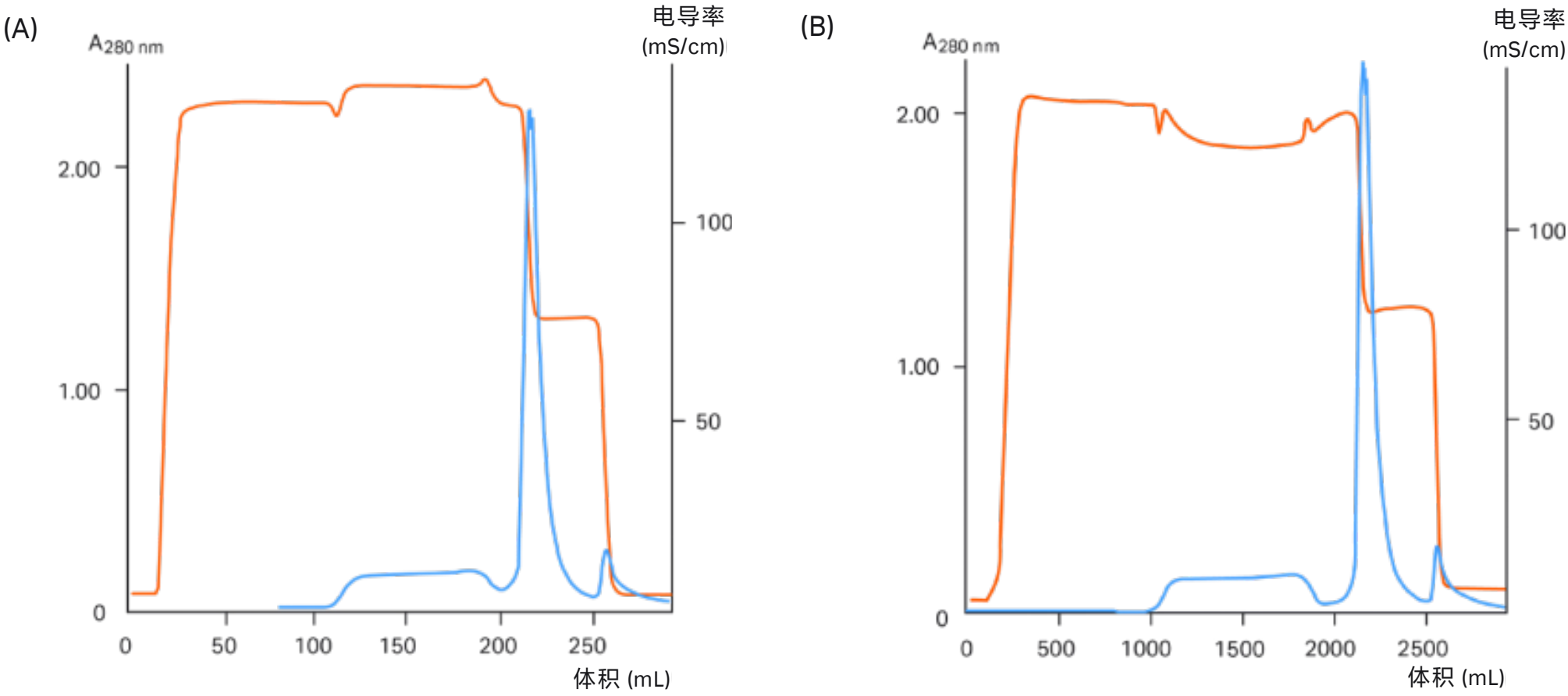


图 3.23. Phenyl Sepharose™ 6 Fast Flow (高取代) 填料上 Fab 片段的 (A) 中度纯化和 (B) 工艺放大。

中度纯化: 重组蛋白膜联蛋白 V

图 3.24 显示了在大肠杆菌中表达的重组蛋白膜联蛋白 V 的纯化过程中, 用作中间步骤的 Butyl Sepharose™ 4 Fast Flow。

层析柱:	Butyl Sepharose™ 4 Fast Flow 装填在 XK 16/20 层析柱中
样品:	在大肠杆菌中表达的部分纯化膜联蛋白 V, 5 mL
起始缓冲液:	20 mM 磷酸钠, 1 M 硫酸铵, pH 7.0
洗脱缓冲液:	20 mM 磷酸钠, pH 7.0
流速:	100 cm/h
梯度:	0% 至 50% 洗脱缓冲液, 20 CV
检测:	280 nm
系统:	ÄKTA™ 层析系统

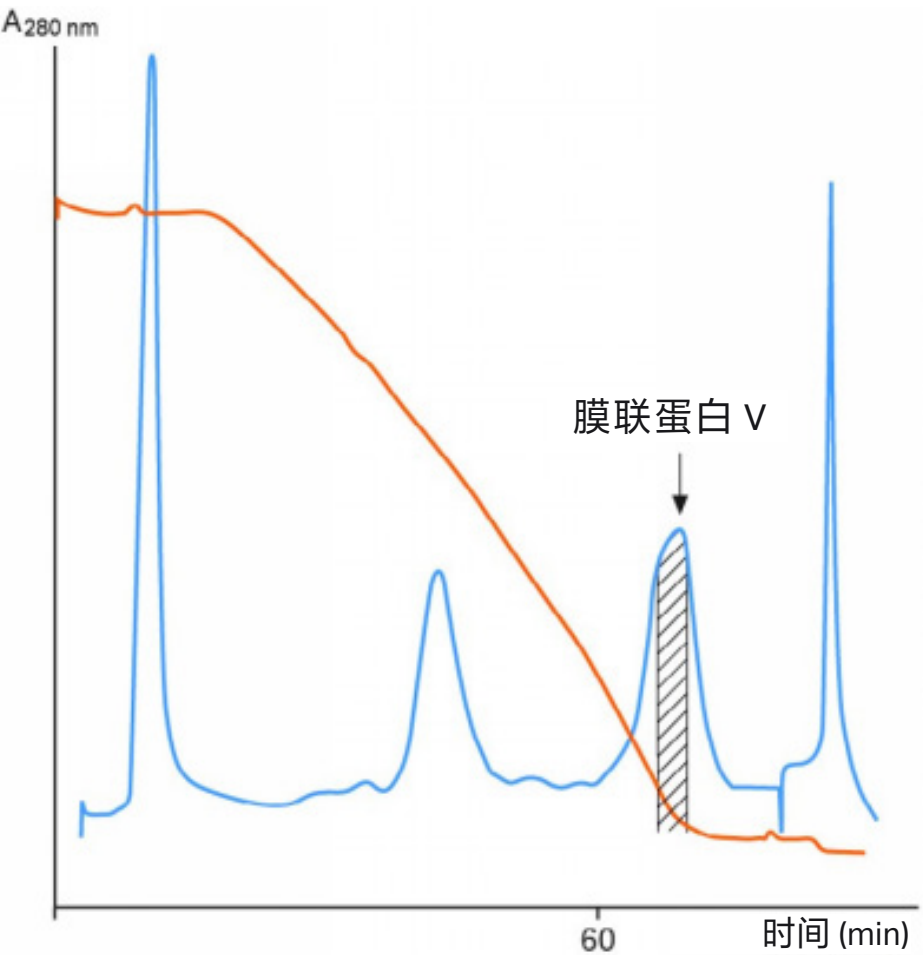


图 3.24. 重组蛋白中度纯化。

进行分离

有关选择填料、缓冲液、盐浓度和 pH 值以及优化方法的指南, 请参见第 2 章。

您可以基于这些说明优化分离。

-  为了优化分离并避免层析柱性能下降, 正确制备样品和缓冲液至关重要。样品必须完全溶解, 并且不含任何可能干扰分离的颗粒或物质。有关样品制备的建议和意见, 请参见第 2 章和附录 1。
-  过滤缓冲液以及添加所有盐和添加剂后的样品。使用高质量的水和化学品。使用 1 µm 或更小的过滤器过滤溶液。为了避免在已装填的层析柱中形成气泡, 并确保结果的可重现性, 在准备运行时, 请将层析柱和缓冲液保持在相同温度。
-  为避免沉淀问题, 请检查样品组分的盐稳定窗口。避免在接近目标蛋白质稳定性极限的浓度下工作。对于疏水性未知的样品, 请尝试以下方法:

起始缓冲液: 1.5 M 硫酸铵, 50 mM 磷酸盐缓冲液, pH 7.0
洗脱缓冲液: 50 mM 磷酸盐缓冲液, pH 7.0

-  注: 由于您选择的起始缓冲液的粘度、样品特性、上样要求和您使用的设备, 您可能需要降低流速。

首次使用或长期储存后首次使用

- 1. 去除所有乙醇。为此, 用 5 个 CV 的蒸馏水或洗脱缓冲液清洗。
流速: 1 mL/min, HiTrap™ 1 mL
5 mL/min, HiTrap™ 5 mL
2 mL/min, HiPrep™ 16/10, 20 mL
50 cm/h, 适用于装填在较大层析柱中的 Sepharose™ Fast Flow
 - 2. 使用 5 个 CV 的起始缓冲液清洗。
流速: 1 mL/min, HiTrap™ 1 mL
5 mL/min, HiTrap™ 5 mL
5 mL/min, HiPrep™ 16/10, 20 mL
最大 150 cm/h, 适用于装填在较大层析柱中的 Sepharose™ Fast Flow
- 执行空白洗脱以检查电导率曲线。

通过梯度洗脱进行分离

- 流速: 1 mL/min, HiTrap™ 1 mL
5 mL/min, HiTrap™ 5 mL 和 HiPrep™ 16/10, 20 mL
最大 150 cm/h, 适用于装填在较大层析柱中的 Sepharose™ Fast Flow
- 在整个分离过程中收集组分。
1. 用 5 至 10 个 CV 的起始缓冲液平衡层析柱, 或者直到紫外基线和电导率稳定。
 2. 将样品调节至选定的盐浓度 (如有必要, 调节 pH 值)。过滤, 并上样到层析柱。
 3. 用 5 至 10 个 CV 的起始缓冲液清洗, 或直到紫外基线和电导率稳定, 以使所有未结合的物质都已通过层析柱进行清洗。
 4. 使用 10 至 20 个 CV 的梯度体积开始洗脱, 逐渐增加洗脱缓冲液的比例, 直到盐浓度达到最低(即不含盐的缓冲液)。
 5. 用 2 至 5 个 CV 的无盐洗脱缓冲液清洗, 洗脱任何残留的疏水结合物质。
 6. 用 5 至 10 个 CV 的起始缓冲液再平衡, 或直到电导率达到所需值。

通过步级洗脱进行分离

- 流速: 1 mL/min, HiTrap™ 1 mL
5 mL/min, HiTrap™ 5 mL 和 HiPrep™ 16/10, 20 mL
最大 150 cm/h, 适用于装填在较大层析柱中的 Sepharose™ Fast Flow
- 在整个分离过程中收集组分。
1. 用 5 至 10 个 CV 的起始缓冲液平衡层析柱, 或者直到基线、洗脱液 pH 值和电导率稳定。
 2. 将样品调节至选定的盐浓度 (如有必要, 调节 pH 值)。过滤, 并上样到层析柱。
 3. 用 5 至 10 个 CV 的起始缓冲液清洗, 或直到紫外基线和电导率稳定, 以使所有未结合的物质都已通过层析柱进行清洗。
 4. 用 5 个 CV 的洗脱缓冲液洗脱, 并按您选择的浓度加盐。
 5. 在较低盐浓度下重复步骤 4, 直到洗脱出目标蛋白质。
 6. 用 2 至 5 个 CV 的无盐洗脱缓冲液清洗, 洗脱任何残留的疏水结合物质。
 7. 用 5 至 10 个 CV 的起始缓冲液再平衡, 或直到电导率达到所需值。



在无盐清洗和再平衡步骤中, 可以使用更高的流速来节省时间, 但不要超过填料的最大推荐流速。



通过测定柱效和峰对称性, 定期检查层析柱性能。有关更多详细信息, 请参见附录 2。



切勿将层析柱或设备置于高盐溶液中。

清洁

正确制备样品和缓冲液, 并在每次分离结束时使用不含盐的缓冲液, 这样可以使大多数层析柱保持良好状态。然而, 性能下降、流速缓慢、背压增加或完全堵塞都是需要使用更严格的程序来清洁填料的迹象。

 在清洁过程中, 尽可能反转流向, 这样污染物就不会通过整个层析柱。每个清洁步骤所需的 CV 数量和时间可以根据污染程度而变化。如果清洁程序不能恢复层析柱的性能, 请在尝试其他清洁方法之前更换顶部过滤器 (如可能)。更换过滤器时要小心, 因为它会影响层析柱装填并干扰性能。

要去除沉淀蛋白质等常见污染物, 请使用以下程序:

流速: 1 mL/min, HiTrap™ 1 mL
 5 mL/min, HiTrap™ 5 mL
 5 mL/min, HiPrep™ 16/10, 20 mL
 40 cm/h, 接触时间为 1 至 2 h, 适用于装填在较大层析柱中的 Sepharose™ Fast Flow

注: 由于层析柱的条件和样品、缓冲液或保存液的粘度, 可能需要降低流速。

1. 用最多 4 个 CV 的 1 M NaOH 清洗。
2. 用至少 3 个 CV 的水清洗, 或直到洗脱液 pH 为中性。
 - 3a.要开始新的分离, 用至少 3 个 CV 的起始缓冲液再平衡, 或者直到达到正确的洗脱液 pH 值。
 - 3b.储存时, 用至少 5 个 CV 的保存液清洗。储存层析柱前, 让紫外基线稳定下来。

要去除脂质、脂蛋白和非常疏水的蛋白质, 请参见附录 1。

化学稳定性

对于日常使用, 基于 Sepharose™ 6 Fast Flow 或 Sepharose™ 4 Fast Flow 的 HIC 填料在常见的水性缓冲液、1 M NaOH、70% 乙醇、30% 异丙醇、变性剂 (6 M 盐酸胍)、1 M 乙酸、30% 异丙醇、30% 乙腈以及最高达 2% 的 SDS 中均保持稳定。

储存

对于层析柱储存, 先用 5 个 CV 的蒸馏水清洗, 然后用 5 个 CV 的 20% 乙醇清洗。将乙醇和水的混合物彻底脱气, 并以低流速上样, 以避免对层析柱过度加压。将层析柱密封好, 以防干燥。尽可能使用制造商提供的储存和运输设备。在 4°C 至 30°C 下, 将层析柱和未使用的填料储存在 20% 乙醇中。不要冷冻。

 为避免形成气泡, 请确保在使用前, 层析柱、缓冲液和设备处于相同温度。

04

纯化策略 (CIPP) 中的 HIC

为了确保高效、可重现的纯化以达到所需纯度, 可以使用捕获、中度纯化和精纯 (CIPP) 的纯化策略开发一个多步骤工艺, 如图 4.1 所示。

CIPP 既用于制药行业, 也用于研究实验室, 以确保更快的方法开发、更短的产品纯化时间和良好的经济效益。本章简要概述了这种方法, 可推荐用于任何多步蛋白质纯化。蛋白质纯化策略手册提供了规划有效且高效的蛋白质纯化策略的指南。任何纯化的首要步骤都是正确制备样品; 这在附录 1 和第 2 章中有更详细的介绍。

疏水相互作用层析 (HIC) 根据目标蛋白质的疏水性提供选择性, 可以作为根据特异性、电荷或大小进行分离的其他层析技术的有益补充。根据特定应用的需求, HIC 可用于捕获、中度纯化或精纯步骤。样品需要处于高盐浓度才能促进疏水相互作用, 这使得 HIC 非常适合用于样品通过硫酸铵沉淀粗纯后的捕获步骤, 或者离子交换分离后的中间步骤。在这两种情况下, 部分纯化的样品已处于高盐溶液中, 只需添加更多的盐即可完成制备, 从而节省了时间。由于使用 HIC 时样品可以浓缩和洗脱, 因此组分也可以直接转移到 SEC。

可以将 HIC 与步级洗脱组合用于快速捕获步骤, 或使用梯度洗脱在精纯步骤中获得最高分辨率。

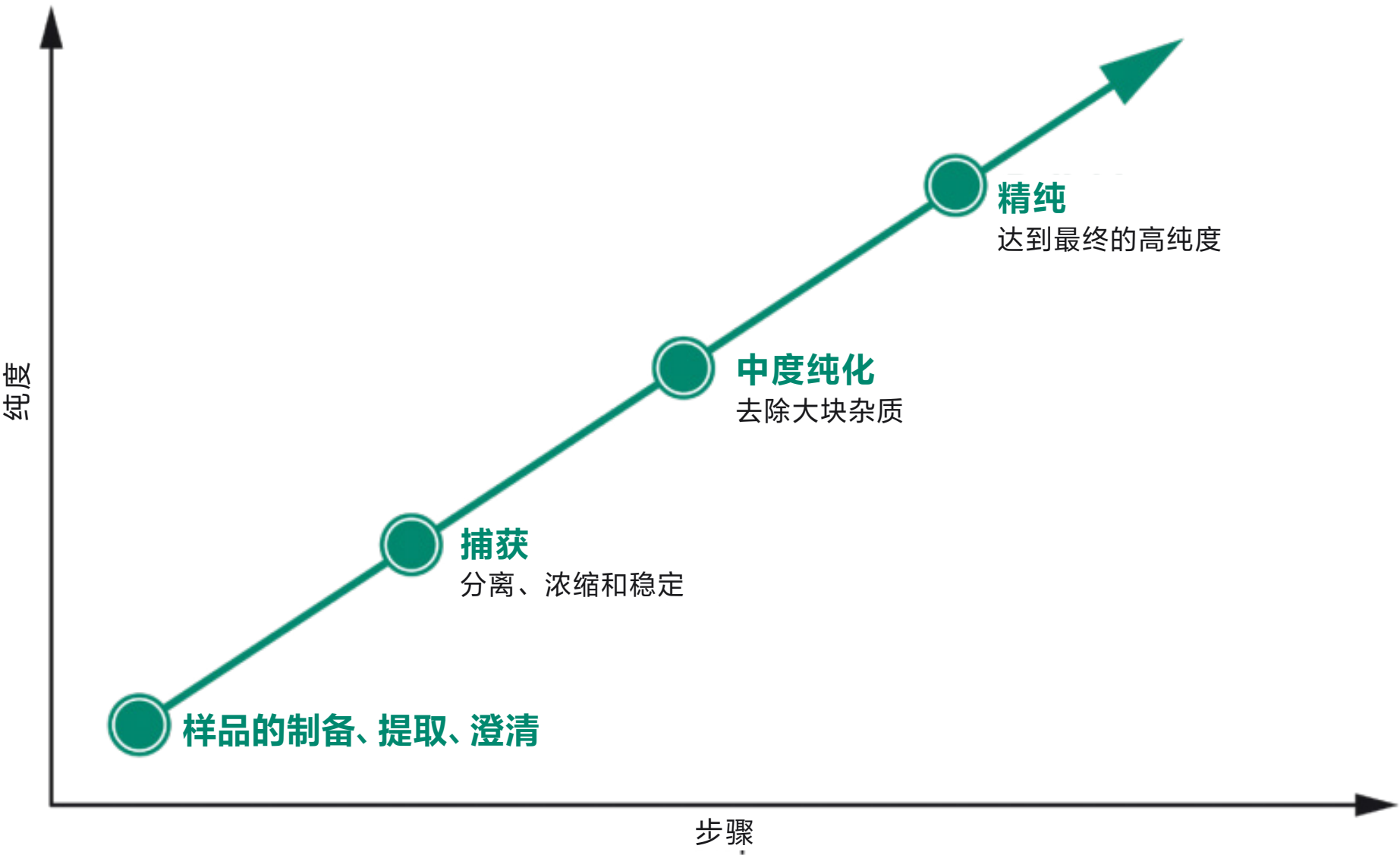


图 4.1. 蛋白质纯化策略。

应用 CIPP

想象一下纯化的三个阶段: 捕获、中度纯化和精纯。

 为纯化工艺中的每一步指定具体目标。

与特定步骤相关的纯化问题在很大程度上取决于起始物料的性质。因此, 纯化步骤的目的将根据其在工艺中的位置而变化。

在捕获阶段, 目标是分离、浓缩和稳定目标产物。应对产物进行浓缩, 然后转移到可保持产物效力或活性的环境中。

在*中度纯化*阶段, 目标是去除大部分大块杂质, 例如其他蛋白质和核酸、内毒素和病毒。

在精纯阶段, 大部分杂质已被去除。目标是通过去除任何残留的痕量杂质或密切相关物质来达到*最终纯度*。

 用于捕获、*中度纯化*和精纯步骤的纯化技术的理想选择和组合对于高效纯化至关重要。

纯化技术选择与组合

如表 4.1 所示, 在纯化蛋白质时, 根据特定特性的差异使用纯化技术对物质进行分离。

表 4.1. 层析技术的类型及其特性

技术	特性
疏水相互作用层析 (HIC)	疏水性
反相层析 (RPC)	疏水性
离子交换层析 (IEX)	电荷
尺寸排阻层析 (SEC)。也称为凝胶过滤	分子大小
亲和层析 (AC)	生物识别 (配基特异性)
多模式层析 (MM)	几种蛋白质特性的组合

在多步骤方法中, 要取得成功, 需要考虑的因素有速度、回收率、分辨率或载量。每种技术都有其特点, 并适合实现这四个性能参数中的任何一个。

在所示简单模型中, **载量**是指纯化过程中结合的目标蛋白质的量。在某些情况下, 上样量将受到体积 (例如在尺寸排阻层析中) 或大量污染物而非目标蛋白质的量限制。

在纯化之初, **速度**最为重要, 因为必须尽快去除污染物 (例如蛋白酶)。

随着纯化的进行, **回收率**变得越来越重要, 因为纯化产品的价值增加了。样品中的破坏过程和层析柱上的不利条件都会影响回收率。

分辨率通过技术的选择性、层析基架在产生窄峰方面的效率来实现。一般来说, 当杂质和目标蛋白质可能具有非常相似的性质时, 在纯化的最后阶段, 分辨率是最难实现的。

 应选择一种技术来满足纯化步骤的目标。

 根据技术的主要优势和每个步骤开始或结束时的样品条件, 选择纯化技术的合理组合。

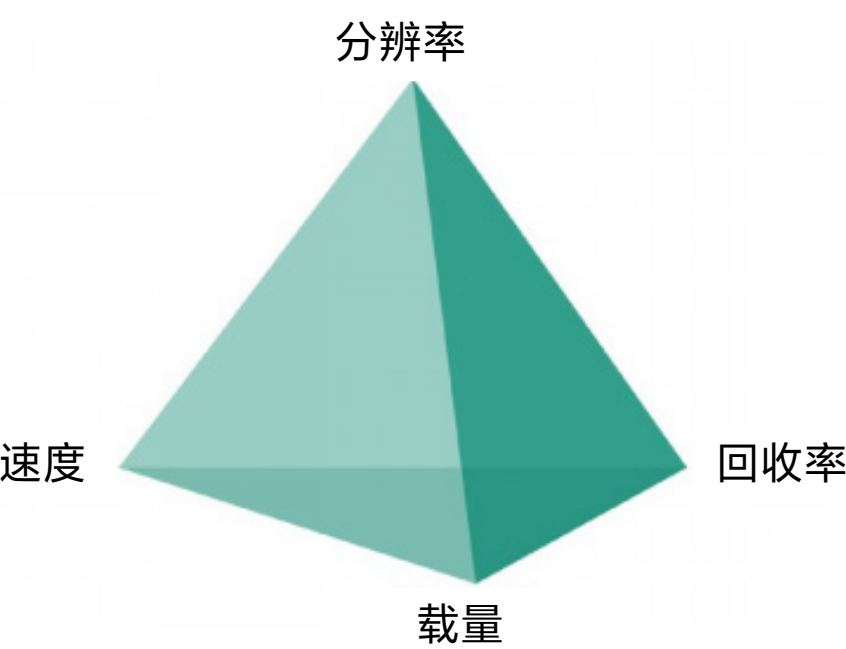


图 4.2. 每种技术都提供了分辨率、载量、速度和回收率之间的平衡。

表 4.2 列出了每种纯化技术在 CIPP 各阶段的适用性指南。

表 4.2. 纯化技术对 CIPP 的适用性

典型特征			纯化阶段			条件	
方法	分辨率	载量	捕获	中度纯化	精纯	样品起始条件	样品结束条件
AC	+++ 或 ++	+++ 或 ++	+++	++	+	各种结合条件	特定洗脱条件
IMAC	+++	++	+++	++	+	低浓度咪唑, pH > 7.0	高浓度咪唑, 500 mM 氯化钠, pH > 7.0
SEC	++	+	+		+++	大多数条件可以接受, 样品体积有限	可以进行缓冲液置换, 稀释样品
IEX	+++	+++	+++	+++	+++	低离子强度。pH 值取决于蛋白质和 IEX 类型	高离子强度或 pH 值改变
HIC	+++	++	++	+++	+++	高离子强度, 需要添加盐	低离子强度
RPC	+++	++		+	++	可能需要离子对试剂和有机改性剂	有机溶剂 (有丧失生物活性的风险)
MMC	+++	++	++	+++	+++	各种结合条件	高离子强度和/或 pH 值改变

通过结合各种技术, 大幅度地减少纯化步骤之间的样品处理, 从而避免对样品预处理的需求。应在适合下一个层析柱起始条件的条件下, 从第一个层析柱中洗脱产品 (请参见表 4.2)。

硫酸铵经常用于样品澄清和浓缩 (请参见附录 1), 它会将样品置于高盐环境中。因此, HIC 成为捕获步骤的理想选择, 因为它只有在高盐环境中才能增强与填料的结合。从 HIC 层析柱洗脱后, 盐浓度和总样品体积将显著减少。使用脱盐层析柱稀释精细分离的样品或快速置换缓冲液, 为下一个 IEX 或 AC 步骤做准备。

尺寸排阻层析 (SEC) 是一种不受缓冲液条件影响的非吸附层析技术, 但体积载量有限。SEC 非常适合在任何浓缩技术 (IEX、HIC、AC) 之后使用, 因为目标蛋白质将以减少的体积洗脱, 并且缓冲液中的组分不会影响 SEC 工艺。

最终策略的选择始终取决于具体的样品性质和所需的纯化水平。基础研究技术的合理组合如图 4.3 所示。

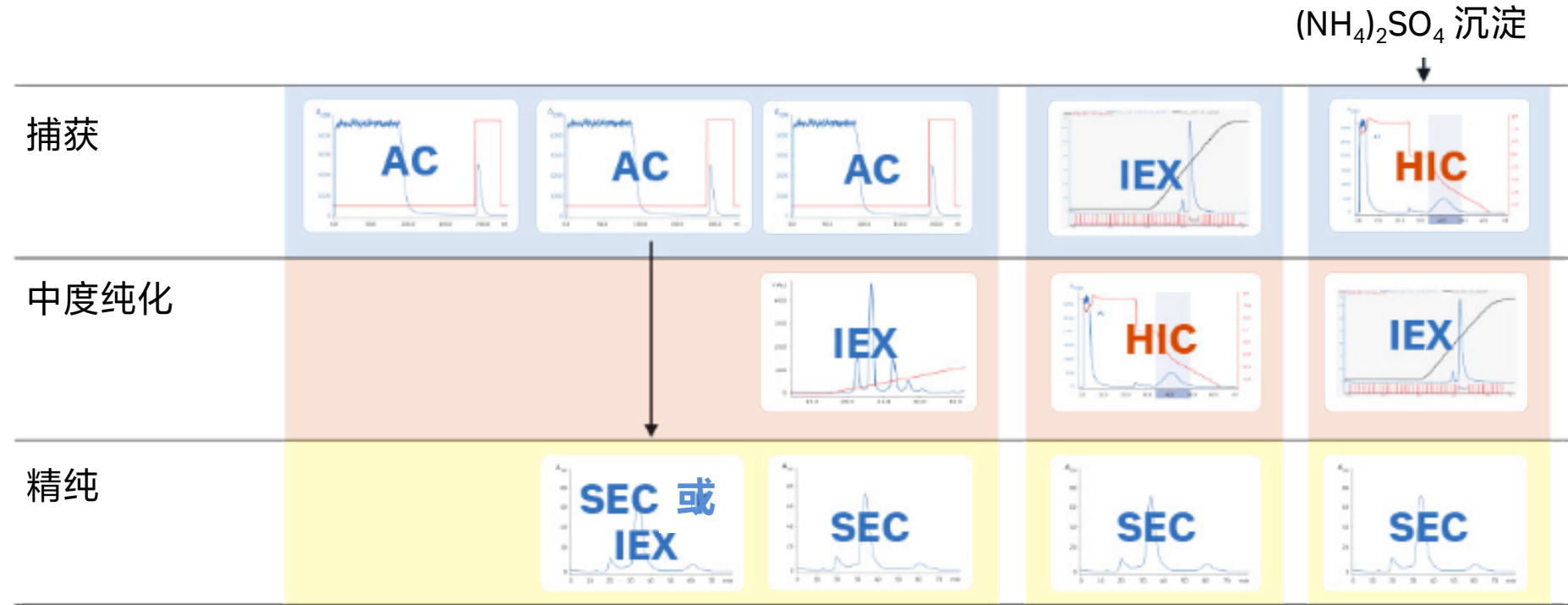


图 4.3. 层析技术的典型组合。



对于任何捕获步骤, 所选择的技术应能够与目标蛋白质最有效结合, 同时结合尽可能少的污染物, 即, 对目标蛋白质具有最高选择性和/或载量的技术。



应将各种技术和备用选择性组合起来, 纯化样品。例如, 在 IEX-HIC-SEC 策略中, 捕获步骤根据电荷差异进行选择 (IEX), 中度纯化步骤根据疏水性差异进行选择 (HIC), 最终精纯步骤根据尺寸差异进行选择 (SEC)。

如果对目标蛋白质一无所知, 则使用 IEX-HIC-SEC。这种技术组合可被视为一种标准方案。



考虑同时使用阴离子和阳离子交换层析在同一纯化策略中获得不同的选择性。

使用 HIC 用于捕获步骤

捕获步骤的目标是快速结合粗样品中的目标蛋白质, 并将它们与关键污染物 (例如蛋白酶和糖苷酶) 分离。将目标蛋白质浓缩后, 转移到能保持蛋白质效力/活性的环境中。通过仔细优化结合条件, 也可以去除其他关键污染物。

捕获步骤的重点是载量和速度。在第一步中, 也许可以在分辨率上做出妥协, 以使分离载量和/或速度最大化。

用于捕获步骤的 HIC 填料应该提供高速度和大载量。

1. 推荐: Capto™ 层析填料 (75 μm 粒径) - 出色的压力-流动性和良好的分辨率, 适用于流速最高达 700 cm/h 的大规模应用。
2. 对于既定工艺: Sepharose™ Fast Flow (90 μm 粒径) 层析填料 - 在流速最高达 300 cm/h 的条件下具有良好的分辨率。如果需要更高的生产率, 可以调整工艺以适应 Capto™ 层析填料。



所选择的起始条件应能将污染物的结合降至最低, 从而帮助最大化对目标蛋白质的结合载量。这将有助于快速、简单地步级洗脱浓缩的目标蛋白质。

重组人表皮生长因子 (h-EGF) 的纯化

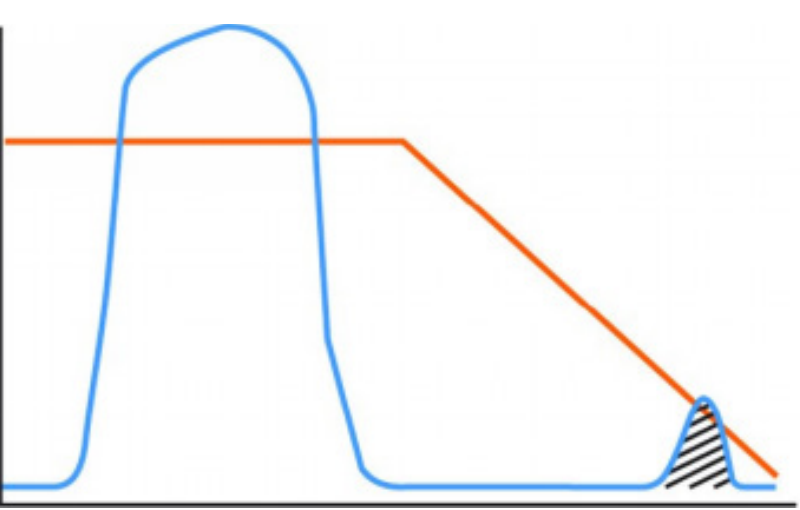
这种纯化方法使用 HIC-IEX-SEC 经典的三步纯化工艺，纯化由酿酒酵母表达为胞外产物的人表皮生长因子 (h-EGF)。

该策略的开发如下：在四种不同的 HIC 填料上，针对捕获步骤进行初始填料筛选实验 (图 4.5)。选择 Phenyl Sepharose™ 6 Fast Flow (高取代) 层析填料，因为它对 EGF 具有高选择性，并且结合载量高，而背压低。

纯化方案:	CIPP
起始物料:	细胞培养上清液
捕获:	Phenyl Sepharose [™] 6 Fast Flow (高取代)
中度纯化:	Q Sepharose [™] High Performance
精纯:	Superdex [™] 75 prep grade

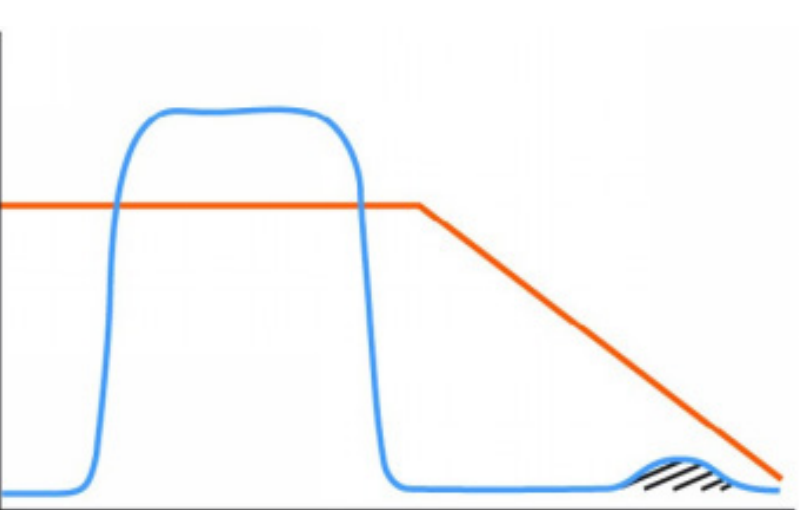
图 4.4. 经典 HIC-IEX-SEC 纯化策略。

用于 EGF 纯化的填料特性



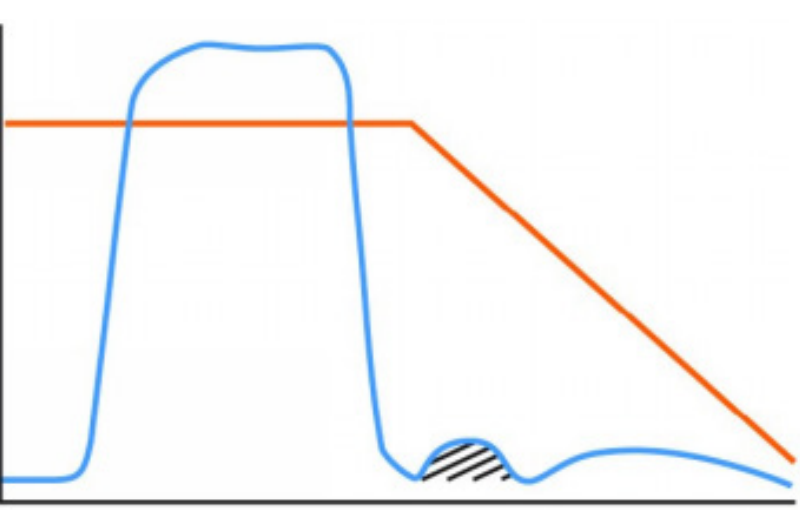
Phenyl Sepharose™ High Performance

- 高选择性
- 高结合载量
- 背压高于 Fast Flow 填料



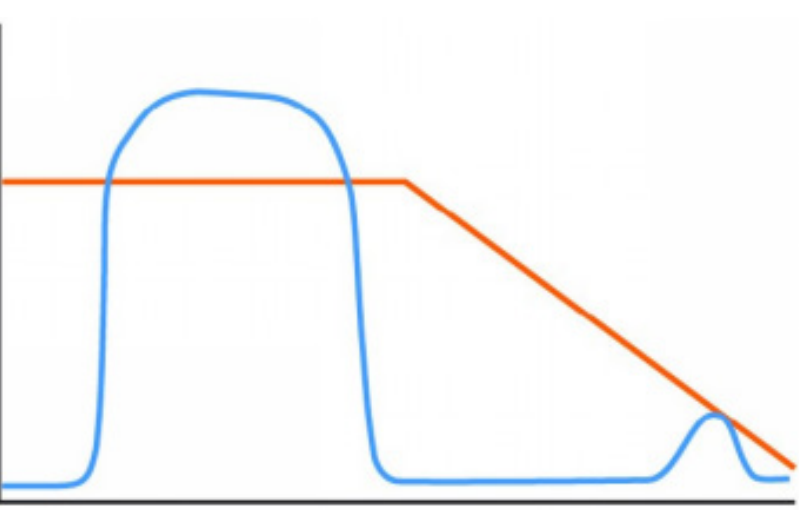
Phenyl Sepharose™ 6 Fast Flow (高取代)

- 高选择性
- 高结合载量
- 低背压



Phenyl Sepharose™ 6 Fast Flow (低取代)

- EGF 经过结合缓冲液清洗
- 对 EGF 的选择性低



Butyl Sepharose™ 4 Fast Flow

- 无法用低盐缓冲液洗脱
- 结合过于紧密

图 4.5. 填料筛选。

如图 4.6 所示, 在装填有 Phenyl Sepharose™ 6 Fast Flow (高取代) 层析填料的 XK 层析柱上, 使用步级洗脱进行开发工作, 然后使用 BPG 300/500 层析柱放大到生产规模。

选择高分辨率阴离子交换剂 Q Sepharose™ High Performance 层析填料进行中度纯化, 以在第二步中达到高纯度 (> 96%)。

选择 Superdex™ 75 prep grade 层析柱上的 SEC 进行最终精纯, 以便从 EGF 产物中分离出聚合物和不需要的缓冲液盐, 从而获得高的最终纯度。

起始物料是由美国埃默里维尔 Chiron-Cetus Corp. 公司提供的澄清细胞培养上清液。起始物料中 EGF 的浓度为 0.018 mg/mL, 总蛋白质含量为 63 mg/mL。经 RPC 测定, 在该三步程序中, 产品纯度为 99%, 总得率为 73%。

层析柱: Phenyl Sepharose™ 6 Fast Flow (高取代)
装填在 XK/16/20 层析柱中, 10 cm 柱床高度, 20 mL
样品: 酵母上清液, 添加硫酸铵至 0.5 M
样品体积: 450 mL
上样量: 0.41 mg h-EGF/mL 填料
流速: 300 cm/h, 10 mL/min (上样)
60 cm/h, 2 mL/min(洗脱)
起始缓冲液: 20 mM 磷酸钠, pH 7.0
0.5 M 硫酸铵
洗脱缓冲液: 20 mM 磷酸钠, pH 7.0
纯化时间: 90 min

层析柱: Phenyl Sepharose™ 6 Fast Flow (高取代)
装填在 BPG 300/500 中, 10 cm 柱床高度, 3.5 L CV
样品: 酵母上清液, 添加硫酸铵至 0.5 M
样品体积: 80 L
上样量: 0.36 mg h-EGF/mL 填料
流速: 300 cm/h, 212 L/h (上样)
60 cm/h, 42 L/h(洗脱)
起始缓冲液: 20 mM 磷酸钠, pH 7.0
0.5 M 硫酸铵
洗脱缓冲液: 20 mM 磷酸钠, pH 7.0
纯化时间: 90 min

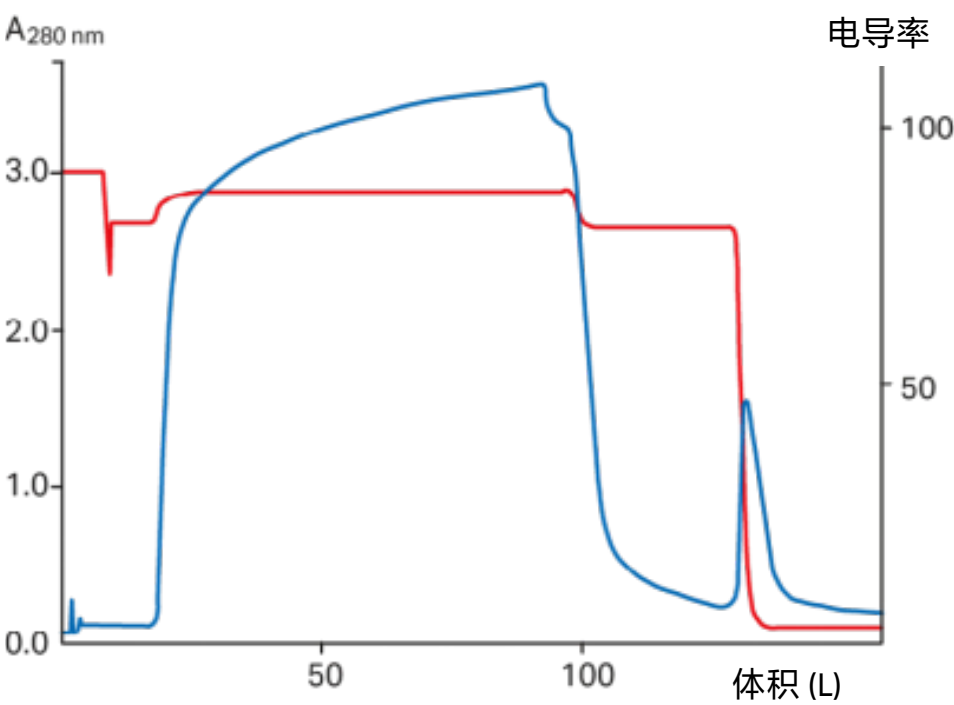
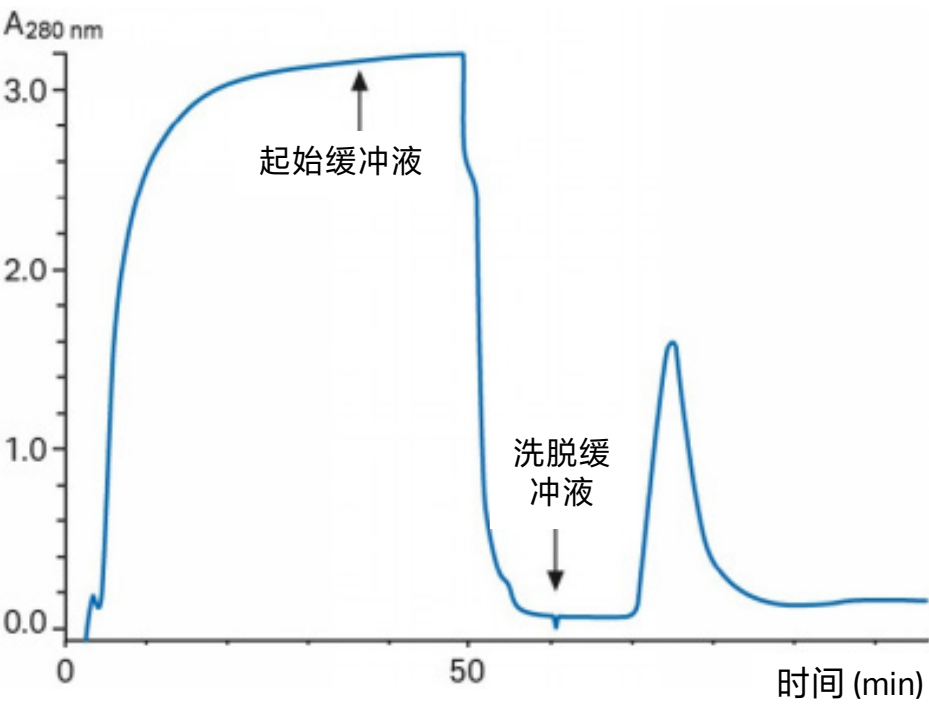


图 4.6. 捕获步骤的开发和工艺放大。

使用 HIC 进行中度纯化

中度纯化步骤的目标是去除大多数关键杂质, 例如蛋白质、核酸、内毒素和病毒。在典型的中度纯化步骤中, 速度不太重要, 因为样品体积已经减少, 并且在捕获过程中已经去除了有害的污染物。重点是载量和分辨率, 以保持生产率 (单位时间内每个层析柱处理的目标蛋白质数量), 并实现尽可能高的选择性 (纯度)。因此, 通常需要梯度洗脱。

使用具有选择性的技术, 它与捕获步骤中使用的技术互补。

用于中度纯化的填料应该提供大载量和高分辨率。进行如下选择:

1. 推荐用于新工艺: Capto™ ImpRes (40 μm 粒径) 层析填料 - 出色的压力-流动性, 分辨率高, 适用于流速最高达 600 cm/h 的大规模应用。
2. Sepharose™ High Performance (34 μm 粒径) 层析填料已在既定工艺中应用, 可在流速最高达 150 cm/h 的情况下获得高分辨率。如果需要更高的生产率, 可以调整工艺以适应 Capto™ ImpRes 层析填料。

Fab 片段的纯化

图 4.7 显示了使用经典方案 IEX-HIC-SEC 纯化抗 HIV-1 gp 120 包膜的 Fab 片段。该片段在大肠杆菌周质空间中表达, 分子量为 Mr 50,000, 等电点为 (pI) ~ 11。高 pI 使阳离子交换成为适合初始捕获步骤的离子交换步骤。Phenyl Sepharose™ 6 Fast Flow (高取代) 层析填料的大载量和良好分辨率非常适合中度纯化, 然后在 SEC 上执行精纯步骤。

纯化方案:	CIPP
起始物料:	大肠杆菌周质表达目标蛋白质
捕获:	SP Sepharose™ Fast Flow
中度纯化:	Phenyl Sepharoserm 6 Fast Flow (高取代)
精纯:	Superdex™ 75 prep grade

层析柱: Phenyl Sepharose™ 6 Fast Flow (高取代) 装填在 XK 16/10 中, 20 mL

样品体积: 50 mL, 从 SP Sepharose™ Fast Flow 中汇集

起始缓冲液: 1.0 M 硫酸铵, 30 mM 磷酸钠, pH 6.0

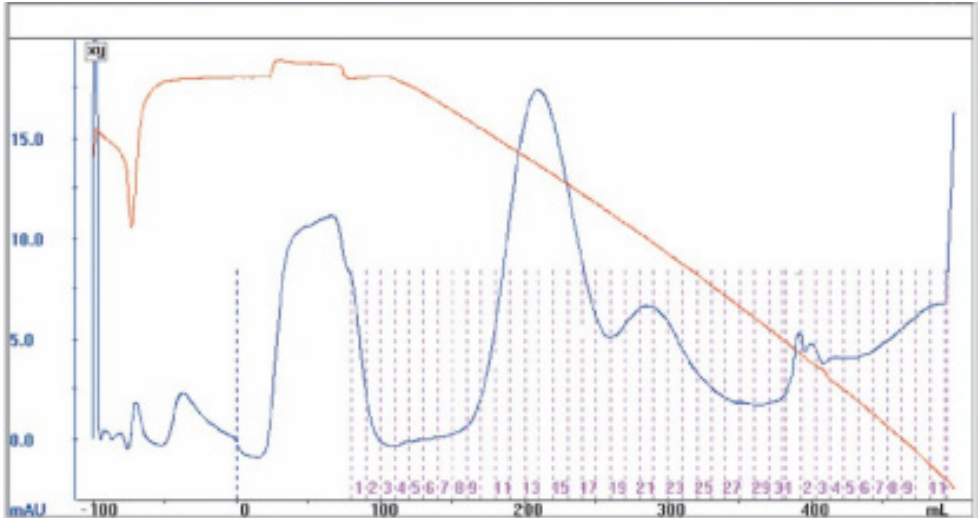
洗脱缓冲液: 30 mM 磷酸盐, pH 6.0

流速: 150 cm/h (5 mL/min)

梯度: 20 CV 中 0% 至 100% 洗脱缓冲液

系统: ÄKTA™ 层析系统

汇集的活性组分: 11-16



层析柱: SP Sepharose™ Fast Flow 装填在 XK 16/10 中, 20 mL

样品体积: 150 mL

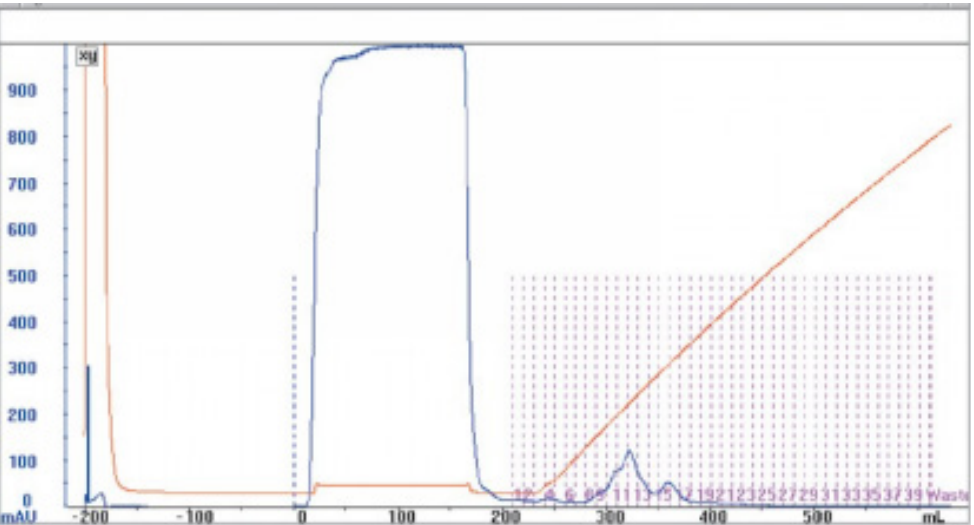
缓冲液: BufferPrep CIEC, pH 3 至 7.5, 在 20 个 CV 中运行

梯度: pH 4.5、0 至 1.0 M NaCl

流速: 150 cm/h (5 mL/min))

系统: ÄKTA™ 层析系统

汇集的活性组分: 10–14



层析柱: HiLoad™ 26/60 Superdex™ 75 prep grade, 320 mL

缓冲液: 150 mM NaCl, 20 mM 磷酸盐, pH 7.0

样品体积: 8 mL, 从 Phenyl Sepharose™ 6 Fast Flow 中汇集

流速: 50 cm/h (4.4 mL/min)

系统: ÄKTA™ 层析系统

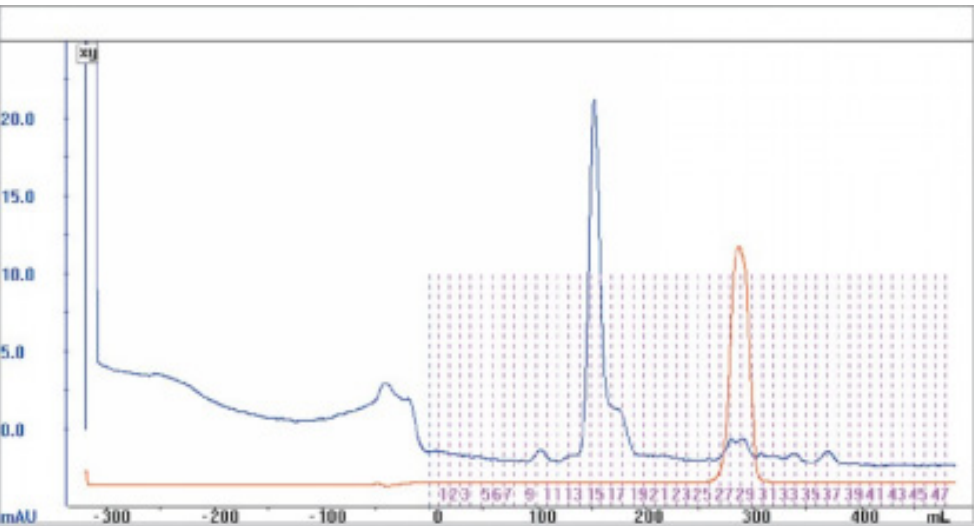


图 4.7. 抗 HIV-1 gp 120 包膜的 Fab 片段的纯化方案。

使用 HIC 用于精纯步骤

在纯化方案的精纯阶段, 除了痕量或密切相关物质 (例如目标蛋白质的结构变体、核酸、病毒或内毒素) 之外, 大多数杂质已被去除。分离目标是将这些变体和任何其他痕量污染物减少到应用可接受的水平。因此, 与主要使用快速、大载量步级洗脱的捕获步骤相反, 精纯步骤将专注于实现可能的最高分辨率。

用于精纯步骤的填料应该提供尽可能高的分辨率。进行如下选择:

1. Capto™ ImpRes (40 μm 粒径) 层析填料 - 出色的压力-流动性, 适用于流速最高达 600 cm/h 的大规模应用。

2. 如果其他填料不能提供所需的选择性, 则使用 SOURCE™ 15 (15 μm 平均粒径) 层析填料。

-  优化梯度洗脱以最大化选择性。使用小粒径的高效填料来提高分辨率。

 请注意, 如果使用 HIC 作为精纯步骤, 可能需要使用脱盐/缓冲液置换步骤去除过量的盐。

重组铜绿假单胞菌外毒素 A (PE553D) 的纯化

图 4.8 显示了一种四步纯化工艺, 其相继使用扩展柱床吸附 (EBA) 和 HIC-IEX-HIC, 用于纯化在大肠杆菌周质中表达的基因修饰重组铜绿假单胞菌外毒素 A (Mr 66,000)。该工艺所采用的策略产生了高度纯化的外毒素 A, 而耗时不到传统方法的一半。

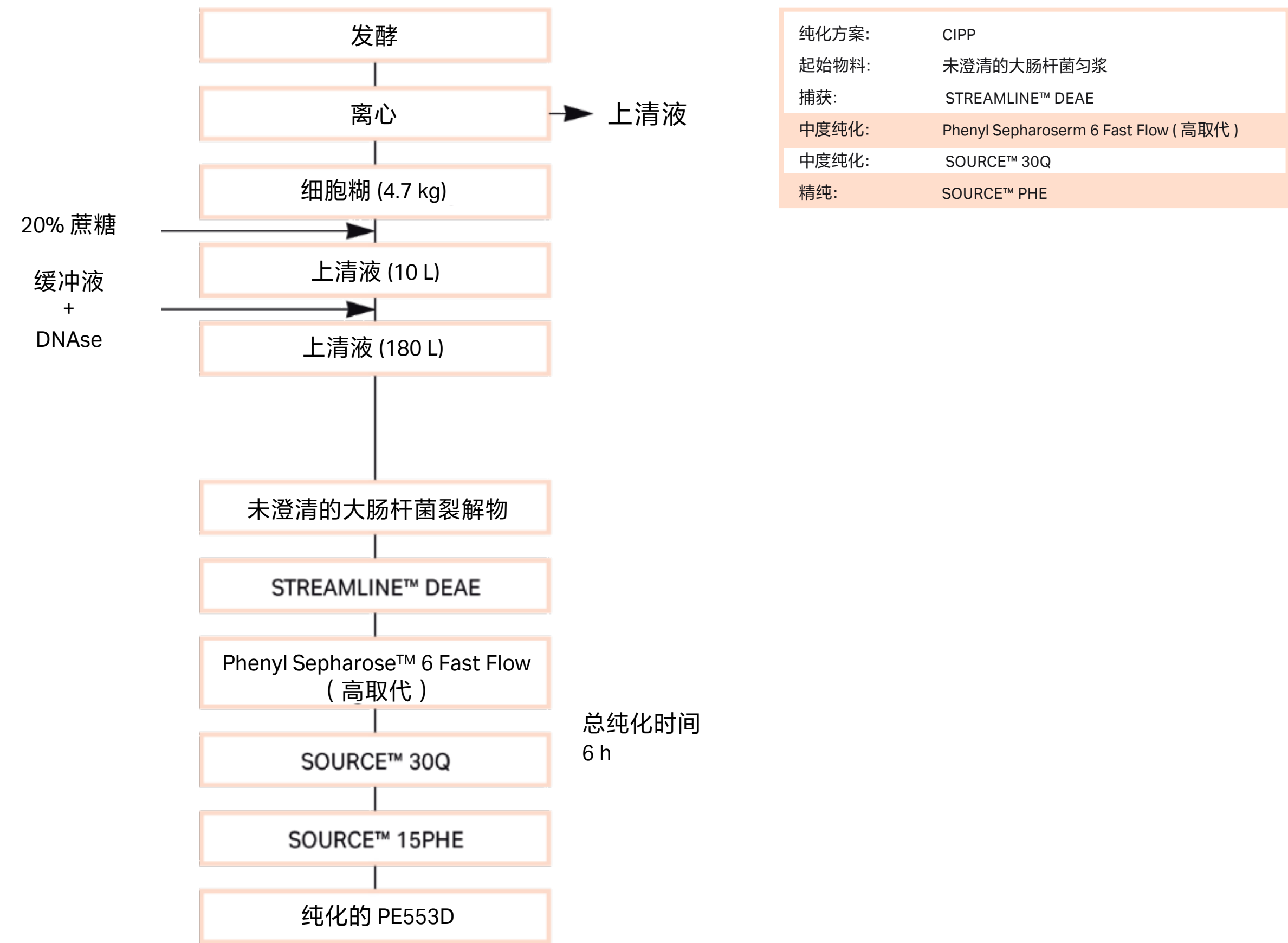


图 4.8. 四步纯化工艺。

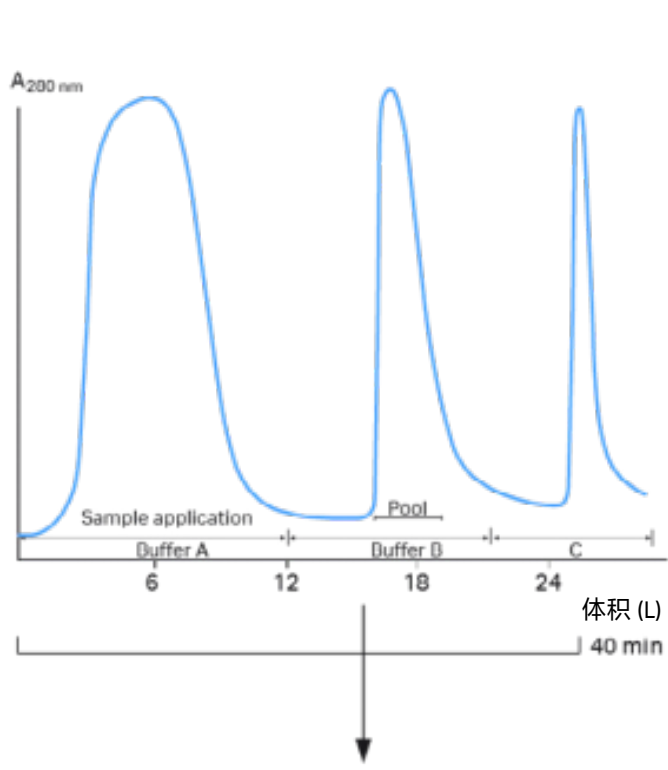
层析柱: Phenyl Sepharose™ 6 Fast Flow (高取代) 装填在 BPG 200/500 中 (内径200 mm, 150 mm 柱床高度), 4.7 L

样品: 4.5 L EBA 汇集物, 调节至 0.6 M 硫酸铵

起始缓冲液: 50 mM 磷酸盐, 0.7 M 硫酸铵, pH 7.4

洗脱缓冲液: 20 mM 磷酸盐, pH 7.0

流速: 120 cm/h



层析柱: SOURCE™ 30Q 装填在 FineLINE™ 100 中, 50 mm 柱床高度, 375 mL

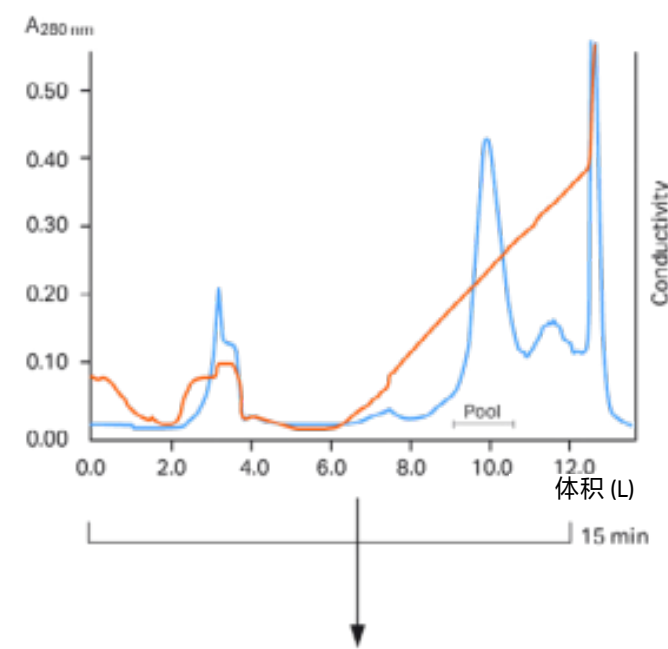
样品: 从 Phenyl Sepharose™ 6 Fast Flow 汇集的组分, 用蒸馏水稀释为 1:3, 上样 1.5 L/循环

起始缓冲液: 20 mM 磷酸盐, pH 7.4

洗脱缓冲液: 1.0 M 氯化钠, 20 mM 磷酸盐, pH 7.4

梯度: 0% 至 50% 洗脱缓冲液, 20 CV

流速: 600 cm/h



层析柱: SOURCE™ 30Q 装填在 FineLINE™ 100 中, 50 mm 柱床高度, 375 mL

样品: 从 Phenyl Sepharose™ 6 Fast Flow 汇集的组分, 用蒸馏水稀释为 1:3, 上样 1.5 L/循环

起始缓冲液: 20 mM 磷酸盐, pH 7.4

洗脱缓冲液: 1.0 M 氯化钠, 20 mM 磷酸盐, pH 7.4

梯度: 0% 至 50% 洗脱缓冲液, 20 CV

流速: 600 cm/h

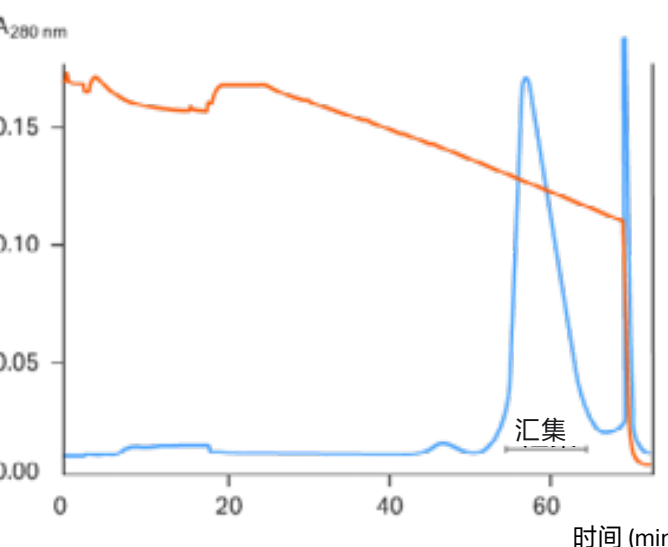
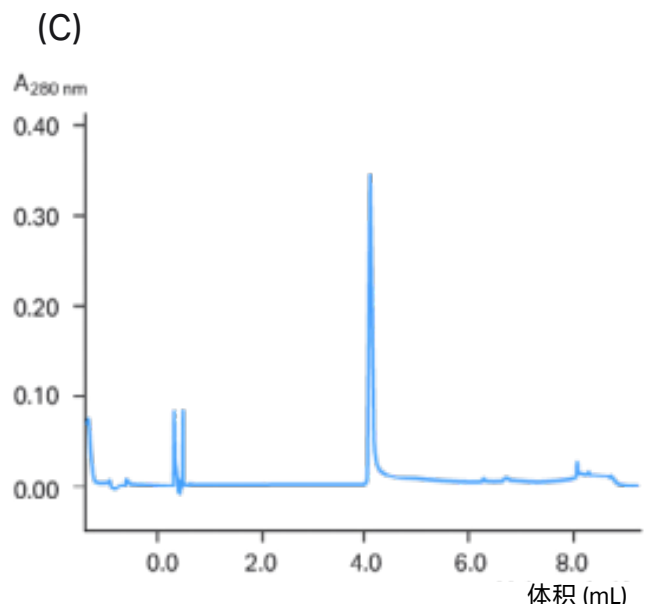
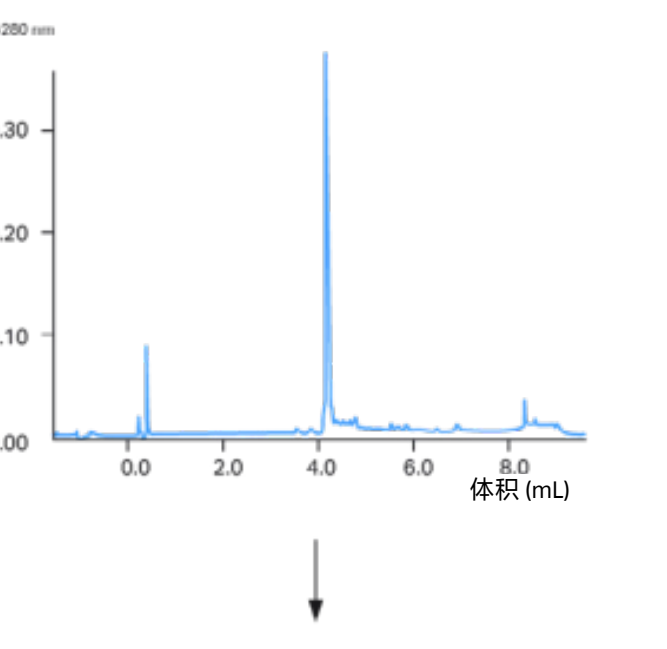
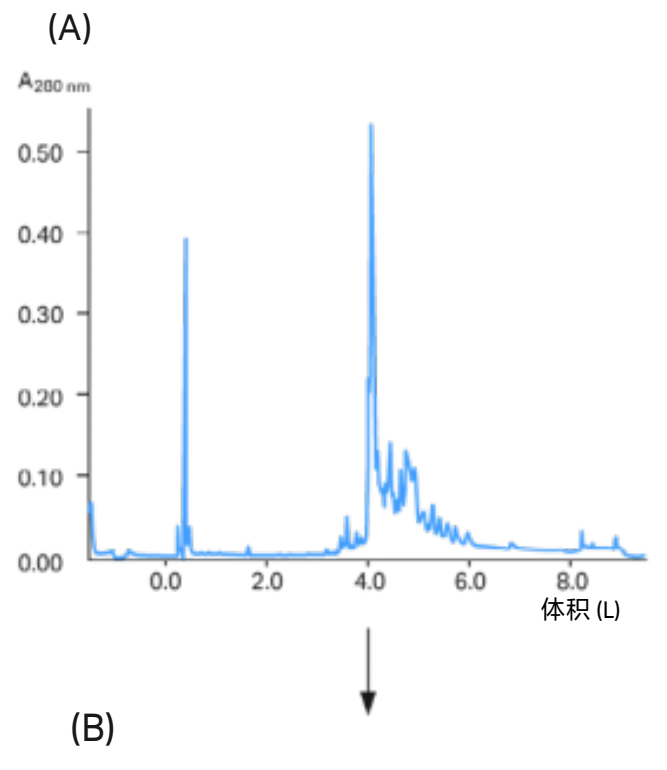


图 4.9. 外毒素 A 的纯化。



通过离子交换层析柱, 从未澄清的大肠杆菌匀浆中直接捕获外毒素 A。使用 Phenyl Sepharose™ 6 Fast Flow (高取代) 层析填料将收集的组分直接转移至中度纯化步骤, 以去除可能干扰后续步骤的大部分紫外吸收物质 (图 4.9A)。请注意, 使用的是 Sepharose™ 6 Fast Flow 基架, 而非 Sepharose™ High Performance, 因为这是大规模纯化, 需要快速步级洗脱, 而不是分辨率更高的梯度洗脱。第二次中度纯化使用阴离子交换剂SOURCE™30Q层析填料, 根据表面净电荷的不同, 可去除大部分残留污染物 (图 4.9B)。

将 HIC 再次用于精纯步骤, 这一次使用梯度洗脱, 以充分利用 SOURCE™ 15PHE 层析填料的较小粒径提供的高分辨率 (图 4.9C)。根据 SDS-PAGE 和 RPC 分析, 该工艺产生了纯蛋白质, 并且总回收率为 51%。

层析柱: 分析 RPC 层析柱

样品: A.从 Phenyl Sepharose™ 6 Fast Flow (高取代) 汇集
B.从 SOURCE™ 30Q 汇集
C.从 SOURCE™ 15PHE 汇集

上样量: 50 µL

起始缓冲液: 含 0.1% 三氟乙酸 (TFA) 水溶液

洗脱缓冲液: 含 0.1% TFA 的乙腈

梯度: 25% 至 75% B, 47 min 以上

流速: 150 µL/min

精纯步骤的替代技术

通常, 通过电荷、疏水性或亲和力进行分离的方法会在纯化策略的早期阶段使用, 因此高分辨率 SEC 是最终精纯步骤的理想选择。如图 4.10 所示, 产物可被纯化, 并一步转移到所需的缓冲液中, 还可以去除二聚体和聚集体。

SEC 也是最慢的层析技术, 层析柱的大小决定了上样体积。因此, 最合理的方法是, 在应用可减少样品体积的技术后使用 SEC, 以便使用更小的层析柱。用于精纯步骤的填料应该提供尽可能高的分辨率。

也可以考虑将 RPC 用于精纯步骤, 只要目标蛋白质可以承受运行条件即可。反相层析 (RPC) 根据疏水性分离蛋白质和肽。RPC 是一种高选择性 (高分辨率) 技术, 通常需要使用有机溶剂。当活性和三级结构的恢复不重要时, RPC 技术用于纯度检查分析。由于许多蛋白质会被有机溶剂变性, 因此通常不建议使用 RPC 来纯化蛋白质。然而, 在精纯阶段, 当大多数蛋白质杂质已被去除时, RPC 可能是一种不错的技术, 特别是对于通常不会被有机溶剂变性的小目标蛋白质而言。



CIPP 并不意味着总要有三个纯化步骤。例如, 捕获和中度纯化可以在单一步骤中实现, 中度纯化和精纯亦如此。类似地, 纯度要求可能很低, 以至于快速捕获步骤就足以获得预期结果。对于治疗性生物分子的纯化, 可能需要第四或第五个纯化步骤来满足最高纯度和安全性要求。所用步骤的数量始终取决于纯度要求和蛋白质的预期用途。

层析柱: Superdex™ 75 prep grade 装填在 XK 16/60 层析柱中

层析柱体积: 120 mL

样品: 部分纯化的 ZZ-brain IGF

样品: 1.0 mL

缓冲液: 0.3 M 醋酸铵, pH 6.0

流速: 0.5 mL/min (15 cm/h)

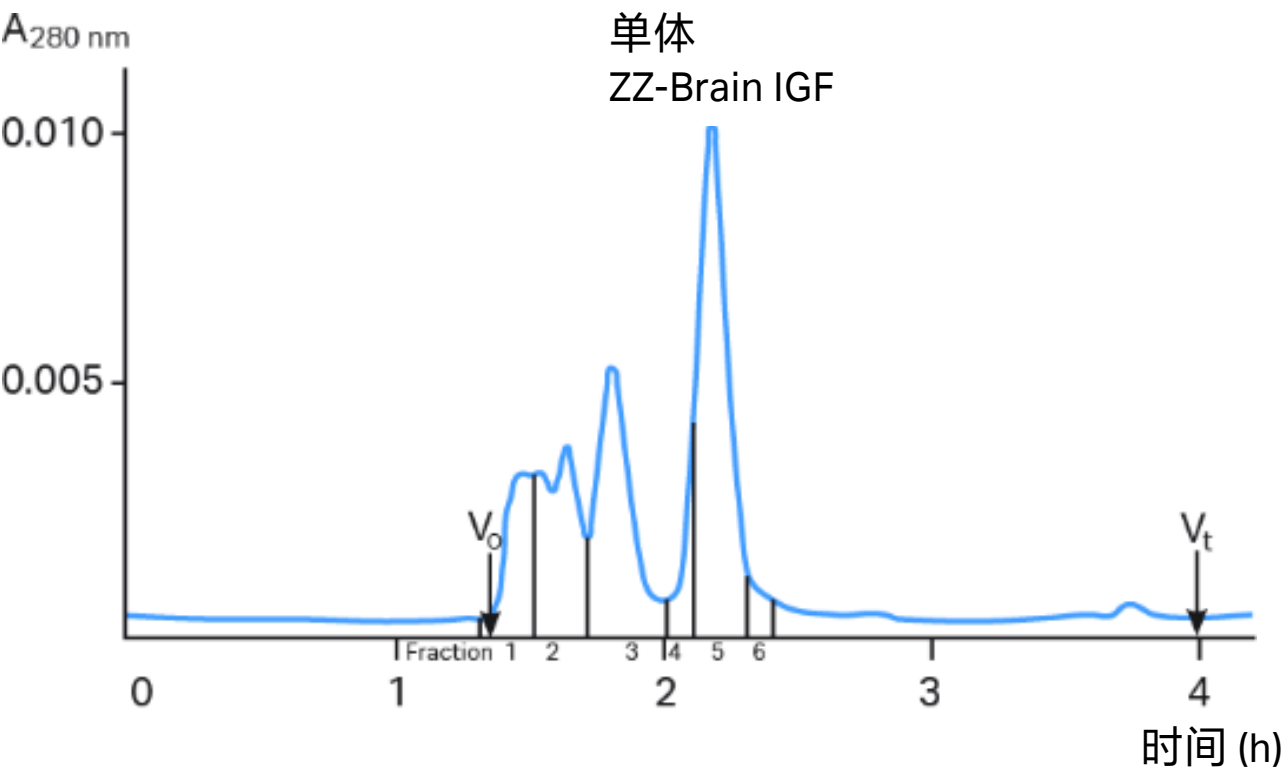


图 4.10. 最终精纯步骤: 在 Superdex 75™ prep grade 层析柱上分离单体、二聚体和多聚体。

05

大规模纯化

我们的 BioProcess™ 层析填料系列包括生物制药企业广泛使用的填料。我们为这些产品提供广泛支持, 包括经验证的制造方法、可靠的长期层析填料供应、安全处理和监管支持文件 (RSF), 以协助工艺验证和提交给监管机构。此外, Fast Trak™ 培训和教育团队为您提供生物工艺开发和制造所有关键方面的高级实践培训。BioProcess™ 层析填料具有高度的化学稳定性, 可用于高效清洁 / 消毒程序, 以及为各种大规模层析柱建立的经验证装填方法。

适用于 HIC 的 BioProcess™ 层析填料

适用于 HIC 的 BioProcess™ 填料专为工业工艺中的大规模纯化和应用而设计。表 5.1 中列出了用于新方法或工艺的 HIC 纯化用层析填料; 而表 5.2 列出了我们在既定工艺或方法中使用的传统填料, 供您参考。第 3 章的图 3.1 也会指导您如何选择填料。

大多数填料都以 HiTrap™ 和 HiScreen™ 形式提供, 用于在放大工艺之前开发高效、稳定的纯化参数。一些填料也可用于高通量工艺开发 (HTPD) 形式, 例如 PreDictor™ 96 孔板, 用于快速、简便地平行筛选运行条件。PreDictor™ RoboColumn™ 微型层析柱 (可与机器人工作站配合使用) 可用于测试各种参数, 例如样品消耗量少的 DBC。这些小规模形式在工艺开发的早期阶段为您节省时间和缓冲液, 并减少样品消耗。

以前, 基于 Sepharose™ Fast Flow 和 Sepharose™ High Performance 的 HIC 填料用于纯化工艺。如今, Capto™ 和 Capto™ ImpRes 填料是更合适的选择。组成这些填料的珠粒 (颗粒) 基于非常坚硬的高流速琼脂糖基架。具有优化孔结构的珠粒提供了出色的压力或流动性。其高流速使您能够提高生产率和开展大批量加工。

表 5.1. 用于新方法或工艺开发的 BioProcess™ HIC 层析填料

填料	粒径, d _{50v} (µm)*	推荐流速	使用
Capto™ Phenyl (高取代)	75	高	捕获
Capto™ Butyl	75	高	捕获
Capto™ Butyl-S	75	高	捕获
Capto™ Octyl	75	高	捕获
Capto™ Phenyl ImpRes	40	中	精纯
Capto™ Butyl ImpRes	40	中	精纯
Capto™ PlasmidSelect	40	中	精纯
SOURCE™ 15PHE	15†	高	精纯

* 累积体积分布的中值粒径。

† 中值粒径 (单分散粒径分布)。

表 5.2. 既有工艺或方法中使用的传统 BioProcess™ HIC 层析填料

填料	粒径, d _{50v} (µm) ¹	推荐流速	主要用途
Phenyl Sepharose™ 6 Fast Flow (低取代)	90	中	捕获
Phenyl Sepharose™ 6 Fast Flow (高取代)	90	中	捕获
Butyl Sepharose™ 4 Fast Flow	90	中	捕获
Butyl-S Sepharose™ 6 Fast Flow	90	中	捕获
Octyl Sepharose™ 4 Fast Flow	90	中	捕获
Phenyl Sepharose™ High Performance	34	低	精纯
Butyl Sepharose™ High Performance	34	低	精纯

¹ 累积体积分布的中值粒径。

捕获纯化

使用 Capto™ 或 Sepharose™ Fast Flow 进行常规捕获纯化。当 HIC 被用作捕获步骤时，目标是从粗样品中快速吸附目标蛋白质，并去除关键污染物，例如蛋白酶。图 5.1 显示了 Capto™ 与 Sepharose™ 层析填料的性能比较。Sepharose™ Fast Flow 填料配有广泛的疏水相互作用配基，仍广泛用于生物制药工艺。然而，对于现代工业应用，Capto™ 填料通常是理想的选择，因为其具有高刚性和高流速运行能力等优点，可在不影响性能的情况下提高通量。我们与生物制药企业合作开发了 Capto™ HIC 填料，专门用于提高重组蛋白加工的生产率。

图 5.1 比较了 Capto™ 填料和 Sepharose™ 6 Fast Flow 在典型大规模情况下的压流特性。Capto™ 的压流特性明显优于 Sepharose™ 6 Fast Flow，这是因为高流速琼脂糖基架具有出色的机械稳定性。

Capto™ 层析填料具有优异的传质性，可在广泛保留时间范围内提供良好的 DBC。提高流速时，DBC 会减小。然而，如图 5.2 所示，当上样流速提高三倍，即从 200cm/h 提高到 600 cm/h 时，仅导致载量减少 25%。

优化上游工艺以获得高滴度时，对改善下游生产率的需求就会增加。总的来说，减少 Capto™ HIC 填料大规模层析纯化的处理时间可以提高生产率，并改善最终的工艺经济性。

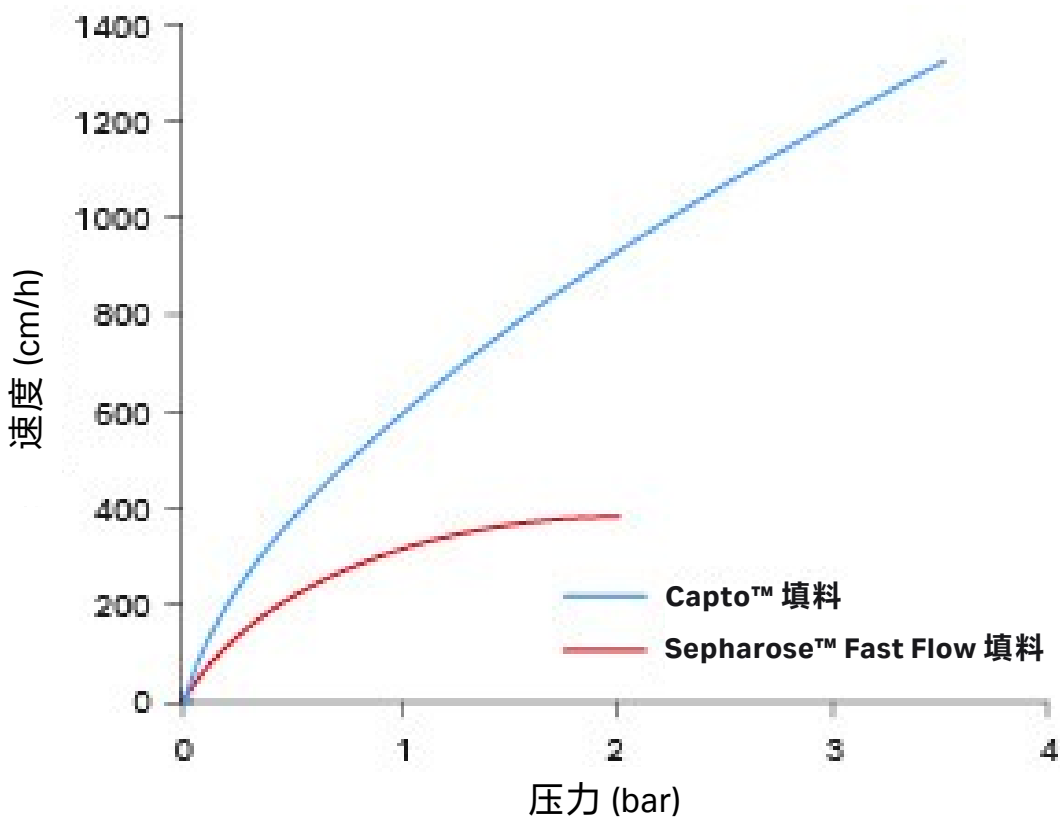


图 5.1. Capto™ 与 Sepharose 6 Fast Flow 层析填料的压力-流动性比较。运行条件: BPG 300 层析柱 (30 cm 内径), 水温 20°C 时沉降柱床高度 = 20 cm 的开放柱床。

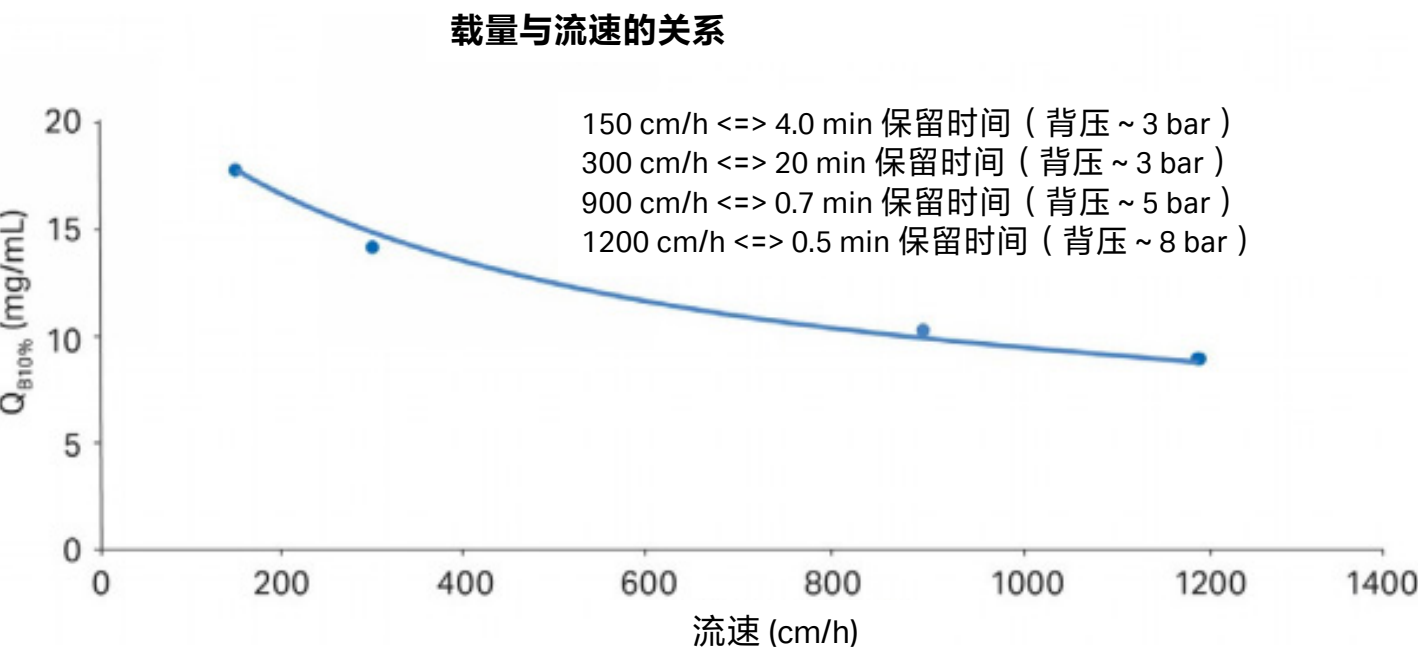


图 5.2. Capto™ Phenyl 层析填料的 DBC 受流速影响，随着上样流速的上升，其载量下降，生产率提高。Capto™ Phenyl 装填在 Tricorn™ 5/100 GL 层析柱中。结合缓冲液: 1.2 M 硫酸铵, 100 mM 磷酸二氢钠。洗脱缓冲液: 100 mM 磷酸二氢钠, 10% 乙二醇。

精纯纯化

使用平均粒径较小的层析填料 (例如 Capto™ ImpRes 填料) 进行精纯纯化。与通常使用快速、大载量步级洗脱的捕获纯化相反, 精纯纯化将重点关注实现高分辨率 (促成高纯度)。

Capto™ Phenyl ImpRes 和 Capto™ Butyl ImpRes 是为下游蛋白质纯化工艺的中间和精纯步骤开发的填料。这些填料扩展了既有 Capto™ 平台, 将高分辨率填料纳入其中。这些填料将 Capto™ 填料的高流动性与较小粒径相结合, 提供了出色的压力-流动性和分辨率。在更高流速和更大柱床高度下运行的能力增强了工艺设计的灵活性, 并可能有助于提高生产率。

图 5.3 显示了基于 Capto™ 的高分辨率填料与基于 Sepharose™ 的传统填料的压力-流动性比较。尽管填料的粒径相似, 但 Capto™ ImpRes 的压力-流动性显著提高, 因为其高流速基架具有更高的机械稳定性。

我们对 Capto™ ImpRes 填料进行了优化, 使用 Capto™ Phenyl Impres 和 Phenyl Sepharose™ High Performance, 获得了相似的溶菌酶保留时间。同样, Capto™ Butyl ImpRes 经过优化, 具有与 Butyl Sepharose™ High Performance 相似的 α- 糜蛋白酶原保留时间。图 5.4 所示的重叠色谱图显示了协调模型蛋白质保留时间的相似性, 而其他两种蛋白质保留时间的差异则表明选择性略有不同。

Capto™ ImpRes 填料具有良好的压力-流动性, 可高流速运行, 因此在放大时, 其性能优于 Sepharose™ High Performance 填料。如果较大粒径的填料无法提供所需的选择性, 您可以使用 SOURCE™ 15。

预装填型一次性解决方案 — 加快下游工艺

除了广泛的工业级层析柱 (例如, 用于蛋白质纯化的 AxiChrom™ 层析柱和散装填料) 之外, Cytiva 还提供大规模一次性 ReadyToProcess™ 层析柱: 预装填、预认证和预初始化工工艺层析柱, 配有一系列 BioProcess™ 填料, 包括 Capto™、Capto™ ImpRes、Sepharose™ Fast Flow 和 Sepharose™ High-Performance 产品系列。

ReadyToProcess™ 层析柱具有多种尺寸可选 (图 5.5), 专为 I 期和 II 期临床研究中的生物药物(例如蛋白质和抗体、疫苗、质粒和病毒)纯化而设计。根据操作规模, 您可以将层析柱用于生产以及临床前研究。ReadyToProcess™ 层析柱无需装填、鉴定和消毒即可用于纯化工艺, 为您节省大量时间。

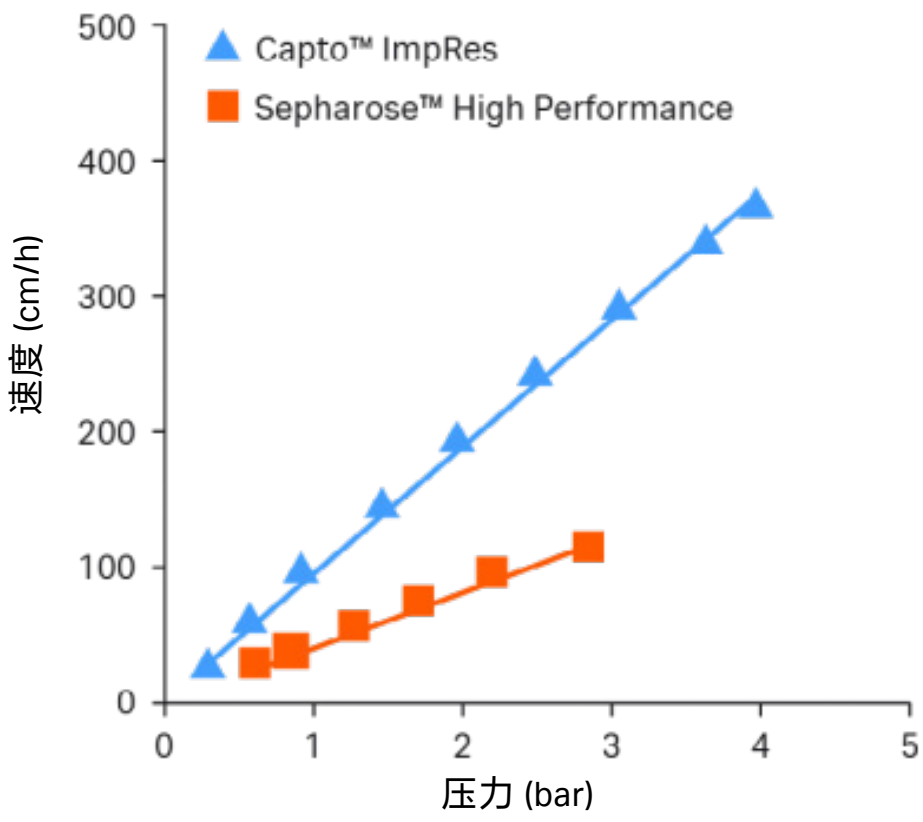


图 5.3. Capto™ ImpRes 与 Sepharose™ High Performance 填料的压力-流动性比较。运行条件: AxiChrom™ 300 层析柱, 水温 20°C 时的柱床高度: 20 cm。

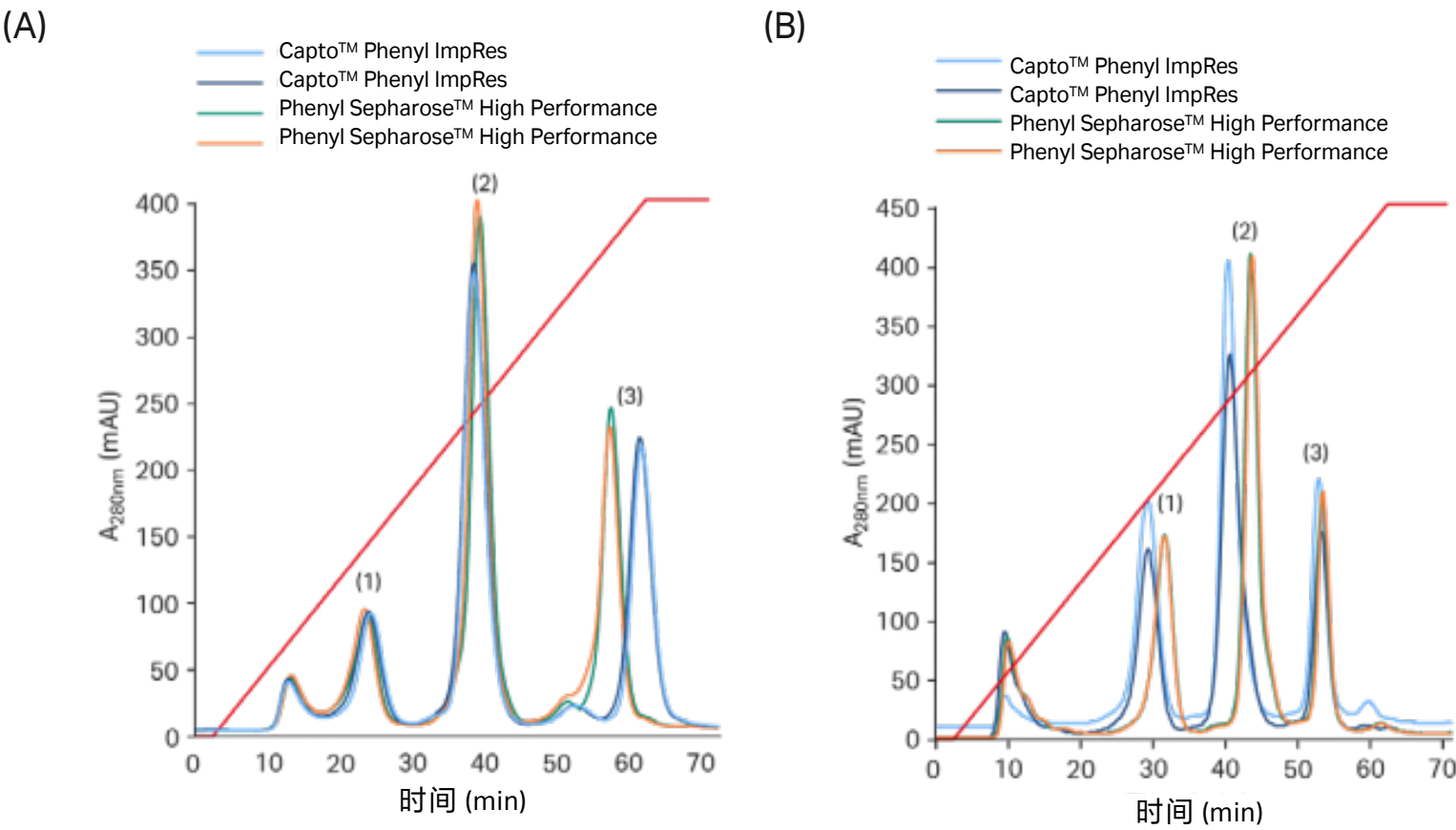


图 5.4. 使用三种模型蛋白质进行的选择性测试: 核糖核酸酶 A (1)、溶菌酶 (2)、和 α- 糜蛋白酶原 (3)。(A) Capto™ Phenyl ImpRes 与 Phenyl Sepharose™ High Performance 的比较 (B) Capto™ Butyl Impres 与 Butyl Sepharose™ High Performance 的比较。

工艺表征套装

随着分子多样性的增加和对更高生产率的追求，更深入地了解可变性来源和设定缓解策略的挑战也在增加。工艺表征套装(图 5.6)是一种加深工艺理解的工具。它适用于多种 Capto™ 和 Capto™ ImpRes HIC 填料。该套装由三瓶相同的层析填料组成。每个试剂瓶都有规定的配基密度水平(高、中、低)，这使您能够研究关键物质属性(CMA)对工艺结果的潜在影响。

定制设计培养基 (CDM)

当标准系列中没有合适的填料时，CDM 小组可根据您的特定工业工艺分离定制填料。CDM 小组与您的团队紧密合作，设计、制造、测试和交付满足您特定纯化需求的填料。

机理层析建模 — 实现更智能、更快速的工艺开发

机理模型使用计算机模拟来减少工艺开发过程中需要的实验次数。模拟基于层析中涉及的已知物理化学现象。

机理建模是对其他工艺开发方法的补充，例如高通量工艺开发 (HTPD) 和多元数据分析 (MVDA)。与 MVDA 不同，机理建模中也考虑物理化学效应，并允许解释模型参数值，从而增强对工艺的理解。

使用机理模型，工艺开发人员能够通过更少的实验来更好地理解整个工艺以及可能影响工艺的参数。这样一来，工艺开发能够变得更快、更科学且更可靠。

有关机理建模的更多信息，请访问 [cytiva.com/modeling](https://www.cytiva.com/modeling)



图 5.5. ReadyToProcess™ 层析柱可轻松连接至系统，并可在生产完成后弃置。



图 5.6. 工艺表征套装提供了更深入的工艺理解。

06

反相层析： 原理和方法

本章回顾了用于蛋白质、肽和寡核苷酸纯化和分析的反相层析 (RPC) 原理和方法。

在蛋白质、肽和核酸的高分辨率分离和分析方面，RPC 的重要性日益增加。该技术是肽图绘制或纯度分析等应用的良好选择，通常用于寡核苷酸和肽的最终精纯。

RPC 根据疏水性的不同来分离分子。理论上，HIC 和 RPC 是密切相关的技术，因为两者都基于生物分子表面上的疏水区和层析填料疏水表面之间的相互作用。然而，在实践中，这两项技术迥然不同。RPC 填料的表面通常比 HIC 填料的表面更疏水。这导致更强的相互作用，为了成功洗脱，必须使用非极性有机溶剂（例如乙腈或甲醇）进行反相。HIC 填料通过在极性更大、变性更小的环境中工作，提供了一种利用生物分子疏水性的替代方法。

 在 280 nm 或 254 nm 检测蛋白质，在 260 nm 检测寡核苷酸，在 215 nm 检测肽。

RPC 为分离条件提供了很大的灵活性。可以实现分辨率更高的分离，分离疏水性只有微小差异的组分。可以使用等度洗脱进行分离；然而，常见的是使用梯度洗脱来大幅度地缩短运行时间。

寡核苷酸通常用荧光素、Dye667 或 Dye550 进行标记。为了进行纯度分析，在高分辨率分离条件下将使用具有不同选择性的 RPC 填料，如图 6.1 所示。

为 RPC 也用于对样品的疏水组分进行脱盐和浓缩。离子盐流穿，而疏水组分结合 RPC 层析柱，有效地将它们浓缩在层析柱上，直到通过简单的步级洗脱将其去除。因此，RPC 用于样品制备以及需要高选择性的分离。因为能够脱盐和使用有机溶剂，使 RPC 成为通过质谱 (MS) 进行偶联的理想技术。

RPC 通常与其他层析技术相结合，以实现未知蛋白质和肽的鉴定和表征。对于蛋白质组学中的蛋白质鉴定和表征而言，在多维液相层析 (MDLC) 后使用质谱是一种快速、准确的解决方案，而 RPC 是该工艺中使用的关键技术之一。

在存在非极性溶剂的情况下，复合酶和多组分蛋白质比肽、寡核苷酸或高度稳定的交联蛋白质更容易失去活性。在存在有机溶剂的情况下，蛋白质或多肽与疏水表面的相互作用通常会导致一些三级结构的损失，经常会产生不同的构象状态，这些构象状态可能与 RPC 填料发生不同的相互作用。然而，通过将生物分子返回到有利于天然结构的条件下，可以将变性和随后的活性损失大幅度降低，正如 RPC 广泛用于大规模纯化重组和合成的蛋白质和肽（例如胰岛素和生长激素）所证明的那样。除非发生沉淀，否则当使用 RPC 纯化蛋白质或肽以用于一级结构测定时，变性不构成问题。

层析柱:	RESOURCE™ RPC 1 mL
样品:	来自 0.2 mmol 合成的 5'-Cy™5 标记的 20-mer
上样量:	大约 0.5 mg
缓冲液 A:	0.1 M 乙酸三乙基铵 (TEAA), 5% 乙腈
缓冲液 B:	0.1 M TEAA, 34% 乙腈
梯度:	10% 至 65% 洗脱液 B, 10 CV
流速:	1 mL/min

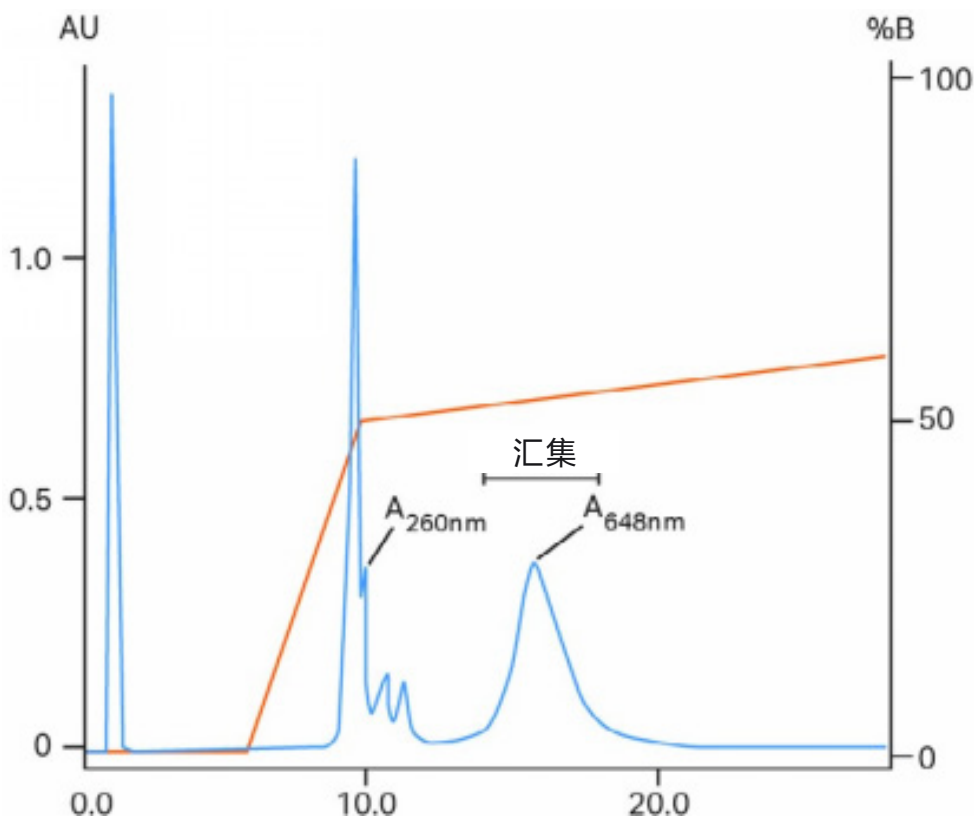


图 6.1. RPC 可用于从游离寡核苷酸中分离疏水的标记寡核苷酸。

术语

某些偶尔与 RPC 相关的术语反映了该技术的发展历史。术语“反相”源自“正相”层析 - “正相”技术利用亲水固定相和疏水流动相 (使用有机溶剂, 例如己烷或二氯甲烷)。在 RPC 中, 固定相是疏水的, 因此, 在流动相中使用水或有机溶剂, 即固定相比流动相更疏水。RPC 填料可被称为吸附剂, 而缓冲溶液可被称为流动相。

理论情况下的 RPC

通过 RPC 分离生物分子时, 依赖于缓冲液中的样品分子和填料之间的可逆疏水相互作用。初始条件主要是水性条件, 有利于样品分子周围高度有序的水结构。通常, 存在小百分比的有机改性剂 (3% 至 5%) 乙腈以获得“润湿”的表面。当样品与填料结合时, 暴露于缓冲液的疏水区域将被大幅度减少。

分离依赖于样品分子在缓冲液和填料表面之间的平衡。样品的分布取决于填料的性质、样品的疏水性以及缓冲液 (流动相) 的成分, 如图 6.2 所示。最初, 条件有利于极端平衡状态, 在这种状态下, 基本上 100% 的样品被结合。因为蛋白质和肽携带有可接近的亲水和疏水氨基酸混合物, 并且相当大, 所以与填料的相互作用具有多点连接的性质。

为了进行洗脱, 应增加有机溶剂的量, 使得条件变得更加疏水。当样品移动通过层析柱时, 结合和洗脱会接连发生。疏水性更强的样品移动通过层析柱的过程更慢。因此, 将按照疏水性递增顺序洗脱样品。

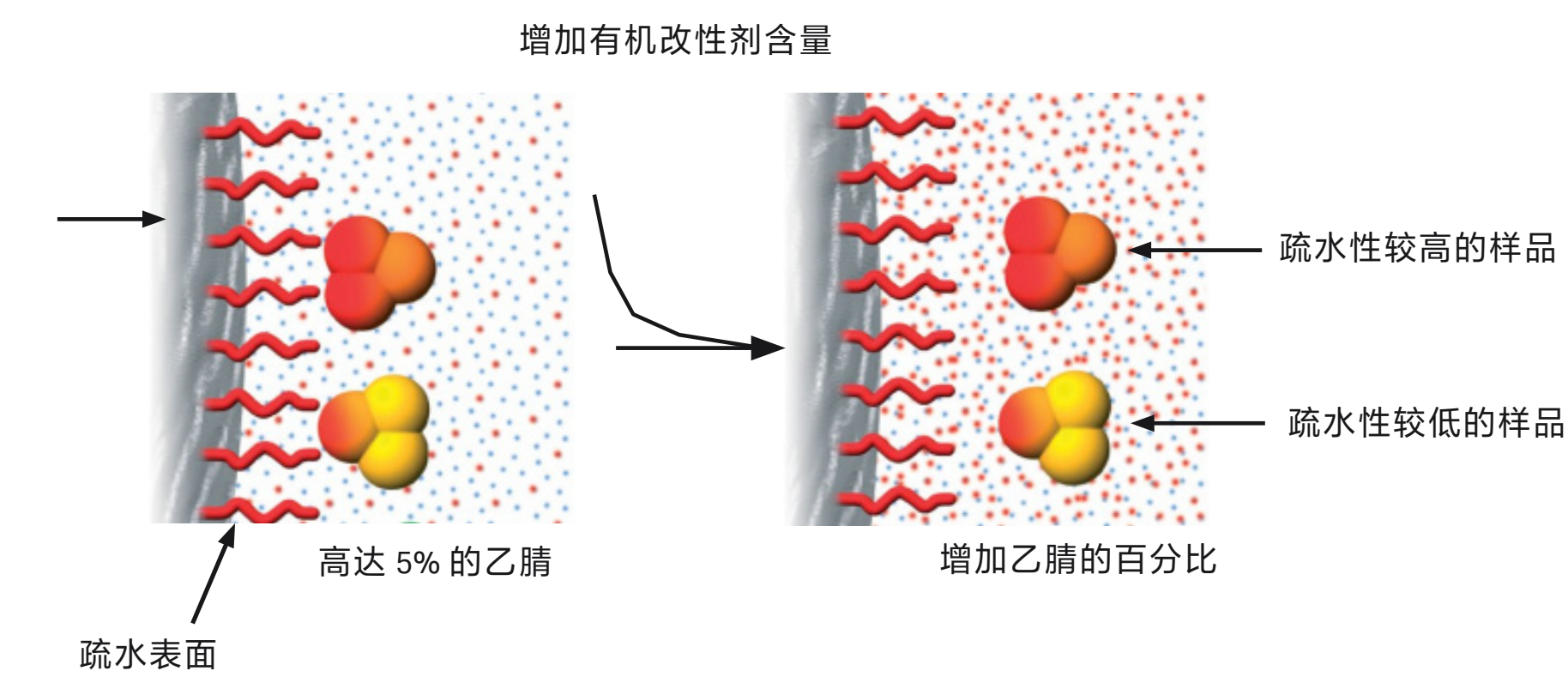


图 6.2. 蛋白质和肽在水性条件下与 RPC 填料结合, 并随着缓冲液变得更加疏水而洗脱。

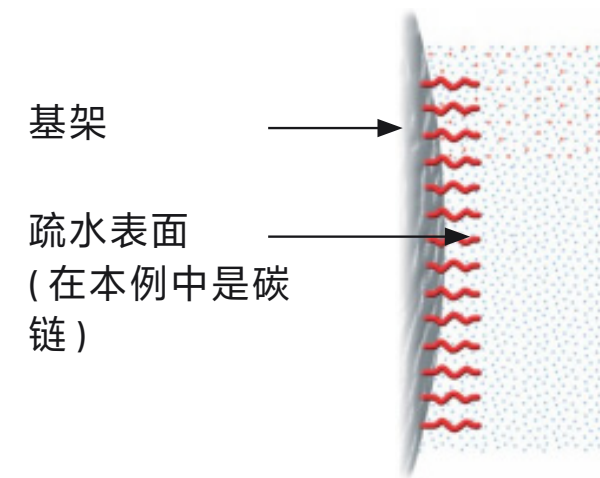
RPC 分离步骤

有两种主要类型的 RPC 填料, 一种基于二氧化硅微球 (被碳链的键合疏水相覆盖) 的亲水基架, 通常为正烷基或芳香烃, 另一种基于裸露的疏水聚合物基架。高度多孔的基架提供了较大的内表面积, 从而可以实现高结合载量。具有均匀粒径的基架可以在更高流速下使用。

与其他层析技术一样, 您必须将 RPC 填料装填到层析柱中才能形成装填柱床。然后用缓冲液平衡该柱床, 以填充基架孔, 以及颗粒之间的空间。RPC 可实现的性能, 尤其是分辨率, 在很大程度上受层析柱装填效率的影响。因此, 强烈建议使用预装填层析柱。

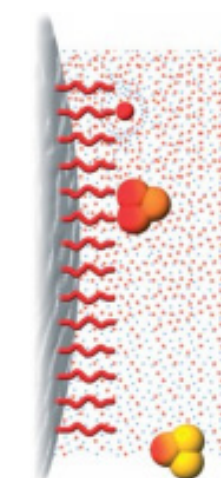
典型的生物样品中含有各种分子的复杂混合物, 这些分子具有各不相同的疏水性范围。大多数生物分子具有足够的疏水性, 存在低浓度有机改性剂时, 在水性条件下与 RPC 填料牢固结合, 并在非常窄的有机改性剂浓度窗口内洗脱。因此, 对于复杂生物样品的 RPC 分离而言, 梯度洗脱是最实用的方法之一。样品在结合过程中被浓缩。分离的关键阶段如图 6.3 所示。

样品在有利于结合的条件下上样, 通常使用含有离子对试剂的水溶液, 例如三氟乙酸 (TFA), 以增强疏水相互作用 (请参见本章中有关分离蛋白质和肽的典型洗脱液方案) 和低浓度有机改性剂, 例如 5% 乙腈。上样后, 当所有未结合的分子都通过时 (即紫外线信号回到基线), 将改变条件以洗脱结合的样品。洗脱将从增加有机改性剂 (例如乙腈) 的浓度开始。疏水性最弱的分子将首先洗脱。通过控制有机改性剂的增加, 分子被分别洗脱。疏水性最强的分子的结合能力最强, 会被最后洗脱。在洗脱结束时, 清洗步骤将去除大部分紧密结合的分子。然后在下一次运行前再平衡层析柱。



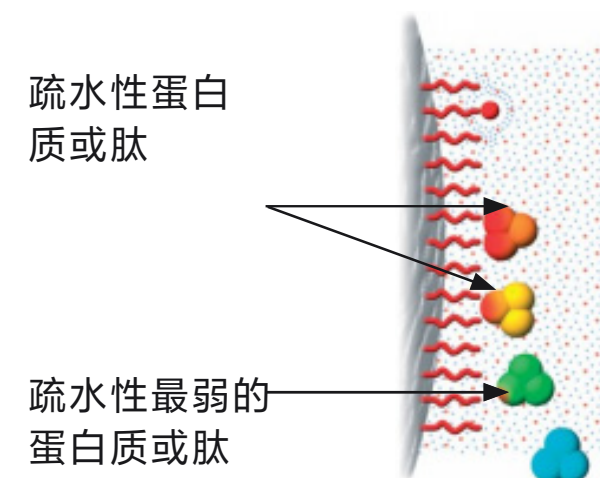
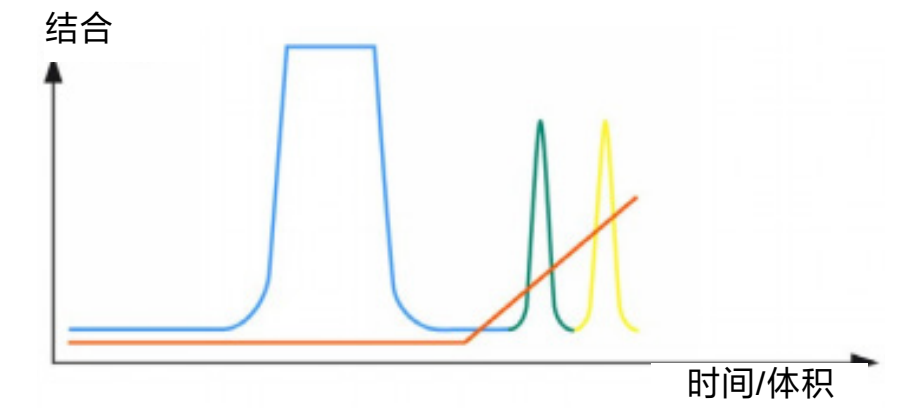
平衡

用起始缓冲液平衡的 RPC 填料。



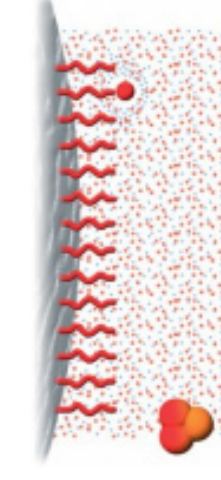
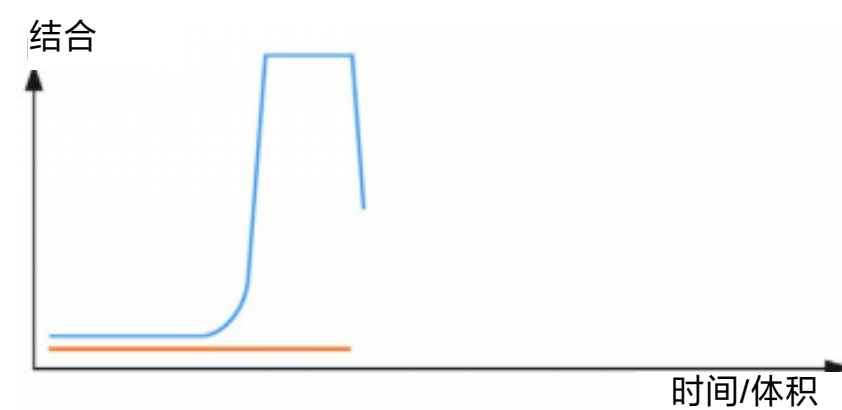
洗脱液 2

样品按照疏水性递增顺序洗脱。



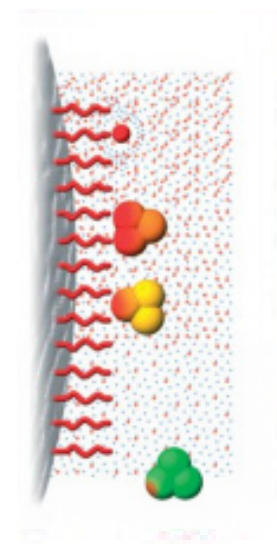
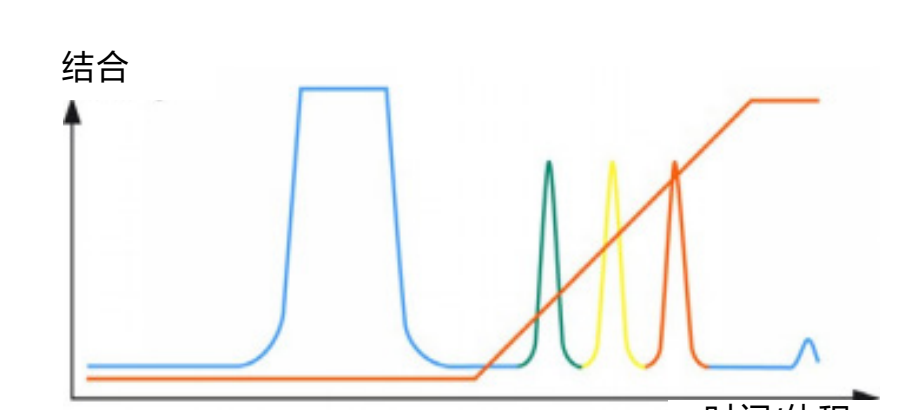
样品上样

疏水分子与疏水填料结合, 在层析柱上浓缩。疏水性不足的蛋白质或多肽会在样品上样过程中或上样后立即洗脱。



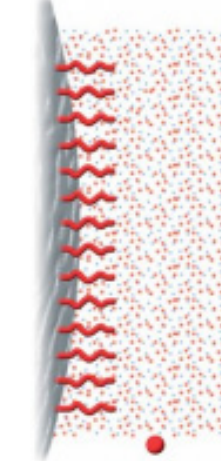
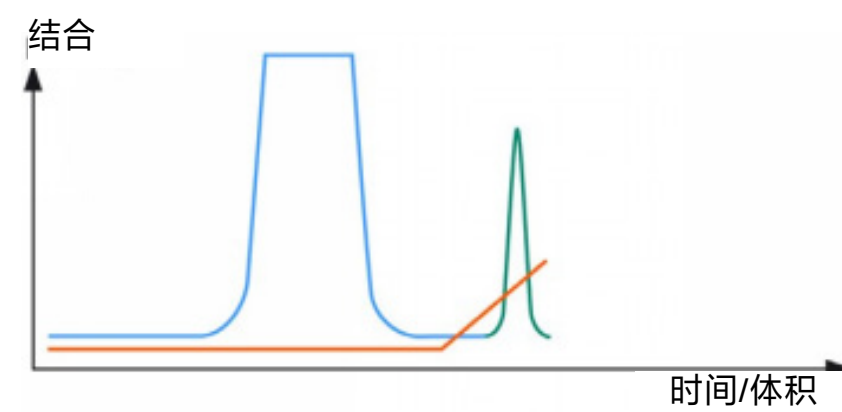
洗脱液 3

疏水性最强的分子的结合能力最强, 会被最后洗脱。



洗脱液 1

当紫外线信号回到基线时, 梯度洗脱将开始。随着有机改性剂百分比的增加, 疏水性最弱的分子首先开始洗脱。



清洗

在再平衡之前, 以高浓度有机改性剂进行的最终清洗将去除任何疏水性高的污染物。

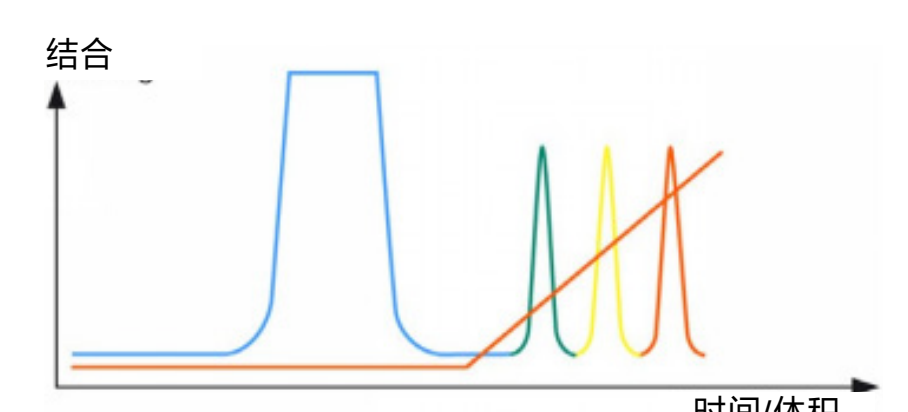


图 6.3. 使用梯度洗脱进行 RPC 分离的步骤。

RPC 填料的组分

可能影响最终分辨率和选择性的因素包括基架的化学组成、粒径、疏水配基的性质、配基表面密度 (如有)、化学加帽 (如使用) 和孔径。

聚合物基架

合成有机聚合物, 例如珠状聚苯乙烯, 提供了优异的化学稳定性, 特别是在强酸性或碱性条件下 (从 pH 1.0 至 pH 12.0)。这些稳定的基架在分离蛋白质或肽的复杂混合物时具有重要优势: 较宽的工作 pH 范围可更好地控制选择性 (请参见本章中的 pH 和离子对试剂); 更高的化学稳定性有助于生物样品处理后可能需要的任何清洁 (图 6.4)。此外, 高物理稳定性和均匀的颗粒有利于高流速, 特别是在清洁或再平衡步骤中, 从而提高通量和生产率, 并大幅度地降低背压。

表 6.1 显示了 Cytiva RPC 填料中使用的基架和配基。

表 6.1. 可从 Cytiva 获得的用于 RPC 填料的基架

产品	基架	配基	平均粒径 ¹	pH 稳定性, 操作 ²
SOURCE™ 15RPC	非极性 (疏水) 聚苯乙烯/二乙烯基苯, 高度球形, 单分散	基架表面	15 µm	1-12
SOURCE™ 30RPC	非极性 (疏水) 聚苯乙烯/二乙烯基苯, 高度球形, 单分散	基架表面	30 µm	1-12

¹单分散尺寸分布。
²填料可以在不明显改变功能的情况下运行的 pH 值范围。

-  使用 15 µm 填料进行实验室规模分离的中度纯化或精纯。
-  使用 15 µm 或 30 µm 填料进行大规模制备和工艺分离, 例如 SOURCE™ 15RPC 或 SOURCE™ 30RPC。这些填料在高流速下具有较低的压力要求, 并经过优化以确保高通量 (在规定时间内处理的样品量), 同时保持高性能。– SOURCE™ 30RPC 适用于工业工艺的精纯阶段。

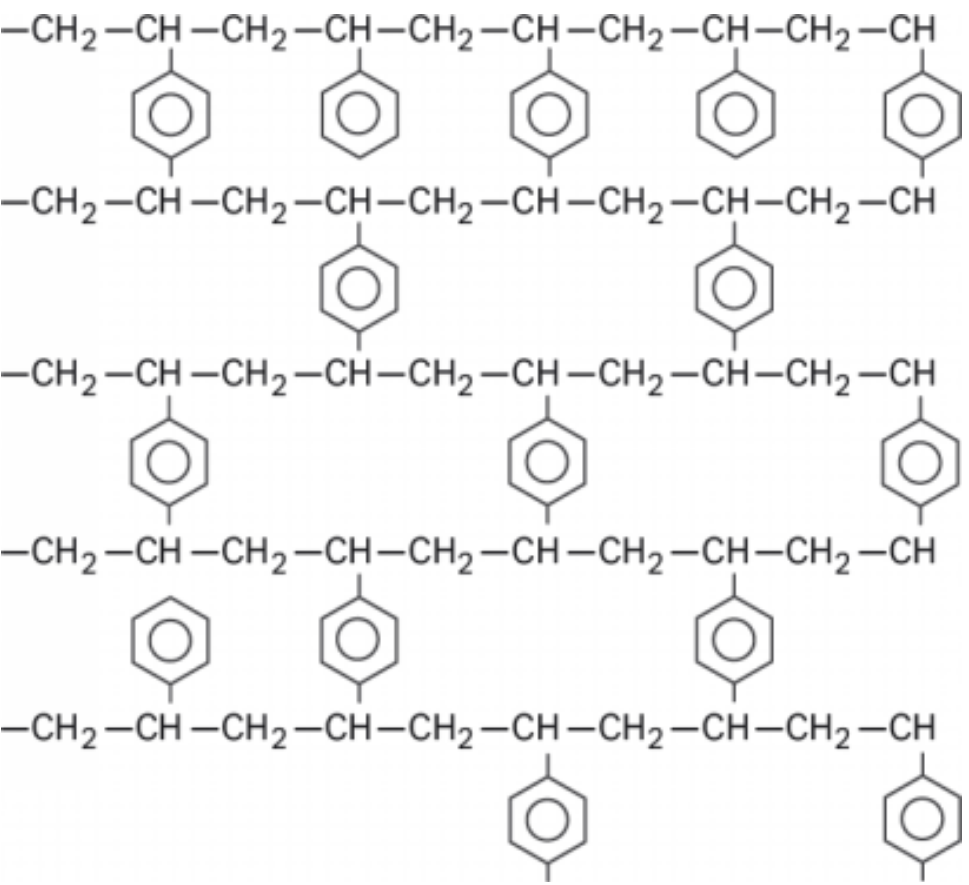


图 6.4. 聚苯乙烯基 RPC 填料的部分结构。

洗脱液

pH

理想 pH 值是最重要的参数之一。图 6.5 显示了在其他条件相同的情况下, 通过增加用于分离两种血管紧张素的 pH 值, 可以实现选择性的显著差异。

聚苯乙烯基填料分离可在 1.0 至 12.0 的宽 pH 范围内进行。由于蛋白质和肽的性质在不同 pH 值下会发生显著变化, 因此 pH 值的变化可以为含有 R-基团 (pKa 值在 3.1 至 12.0 范围内) 的样品分子提供新的选择性。改变 pH 值还可以改善对选择性的控制, 在某些情况下, 还可以改善生物活性的溶解度和得率。碱性肽通常在低 pH 值下从 RPC 层析柱洗脱时拖尾, 因此在 pH 8.0 以上可以获得更好的分辨率。此外, 更宽的工作 pH 范围有助于方法优化。

添加离子对试剂 (例如酸) 可以增加样品分子的疏水性, 从而增加保留时间, 并且在某些情况下, 提升最终的选择性。

层析柱: RESOURCE™ RPC 3 mL (内径 6.4 mm, 长度 100 mm)
样品: 血管紧张素 II 和血管紧张素 III
上样量: (0.25 mg/mL)
起始缓冲液: (A) 0.1% TFA 水溶液, pH 2.0
(B) 10 mM NaOH 水溶液
洗脱缓冲液: (A) 0.1% TFA, 60% 乙腈水溶液
(B) 10 mM NaOH, 60% 乙腈水溶液
流速: 2 mL/min
梯度: 10% 至 65% B, 10 min
系统: ÄKTA™ 层析系统
检测: 214 nm

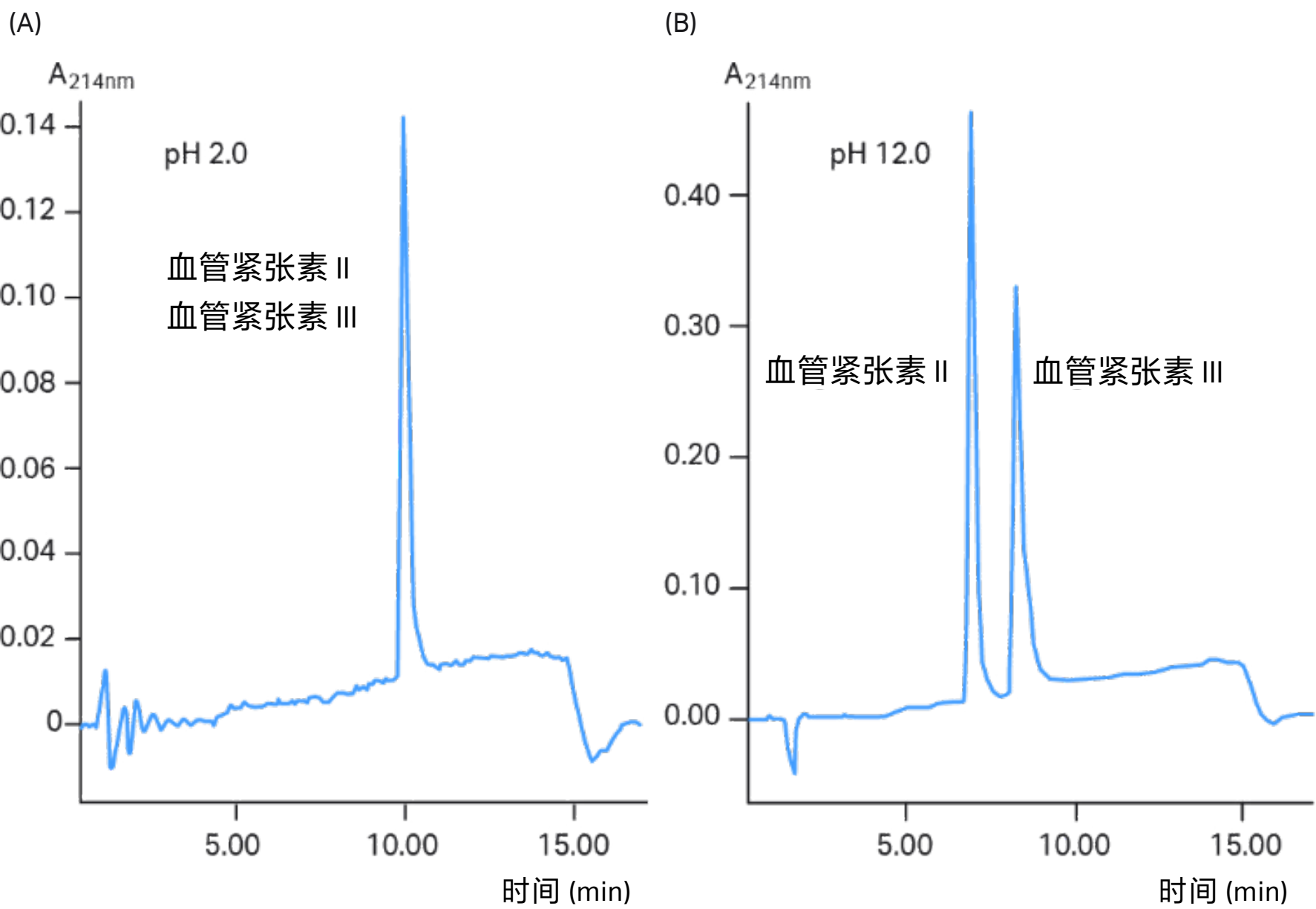


图 6.5. 选择性因 pH 值从 (A) pH 2.0 至 (B) pH 12.0 的变化而改变。

表 6.2 提供了用于保持所需 pH 值的化合物示例。

表 6.2. 用于保持 pH 值和/或作为离子对试剂的化合物示例

洗脱液	pH	离子对试剂	浓度	注释
盐酸	2.0	否	0.01 M	挥发性。
氢氧化钠	12.0	否	0.01 M	非挥发性。仅用于聚苯乙烯基培养基。
洗脱液组分也作为正电荷分子的离子对试剂, 例如蛋白质、肽和亲水性肽				
三氟乙酸 (TFA)	2.0 至 3.0	配对离子: CF ₃ COO ⁻	(通常为 0.1%)	酸性氨基酸侧链变得不解离。带有氨基基团的离子对。 低紫外线吸收率。挥发性。 注意: 保持在 0.3% 以下, 以保持稳定的基线。
乙酸铵	6.0 至 10.0 和 4.3 至 5.3	配对离子: CH ₃ COO ⁻	10 至 100 mM	挥发性。
磷酸	2.0 至 3.0	配对离子: H ₂ PO ₄ ⁻ 、HPO ₄ ²⁻ 、PO ₄ ³⁻	10 至 100 mM	疏水性弱于 TFA。 弱离子对性质。 非挥发性。用 NaOH 调节至选定的 pH 值。
洗脱液成分也作为负电荷分子的离子对试剂, 例如寡核苷酸				
乙胺 (TEA)	4.0 至 8.0	配对离子: NH ⁺ (C ₂ H ₅) ₃	10 至 100 mM	抑制负电荷。主要用于掩蔽带负电荷的硅烷醇基团。也可作为带负电荷的样品组分的离子对试剂。
氯化四甲铵	4.0 至 12.0	配对离子: ⁺ N(CH ₃) ₄	5 至 100 mM	
氯化四丁基铵	4.0 至 12.0	配对离子: ⁺ N(C ₄ H ₉) ₄	5 至 100 mM	

离子对试剂

要增加带电组分的疏水性，增强与填料的结合，从而改变保留时间，常用方法是在缓冲液中加入离子对试剂。这些试剂通过离子相互作用与带电基团结合，从而抑制它们对整体疏水性的影响（图 6.6）。由于大多数蛋白质和肽是微碱性的，离子对试剂通常是酸，例如三氟乙酸 (TFA)，而碱（例如三乙胺）用于负电荷分子。

在某些情况下，加入离子对试剂是与 RPC 填料结合的绝对要求。例如，离子对试剂（例如 TFA）对于确保亲水肽的结合是必不可少的。表 6.2 提供了作为离子对试剂的化合物示例。

离子对试剂的类型和浓度也会影响保留行为和随后的选择性，如图 6.7 所示。

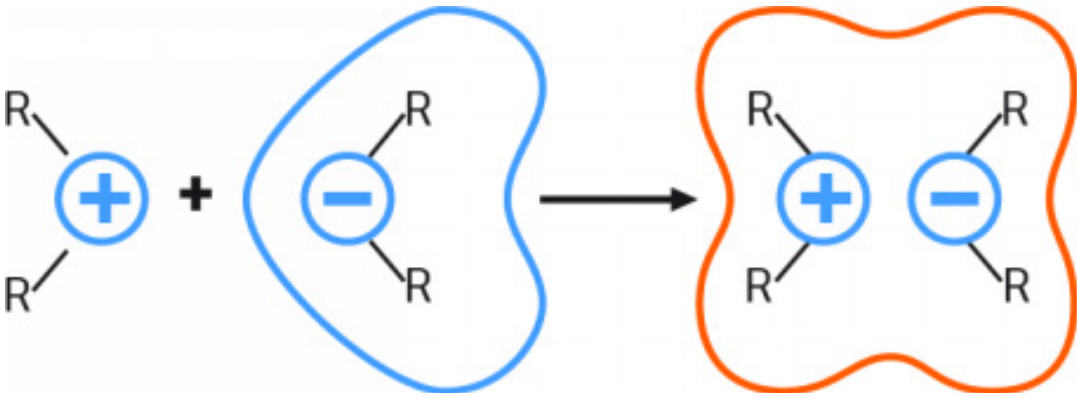


图 6.6. 离子对试剂改变净疏水性。

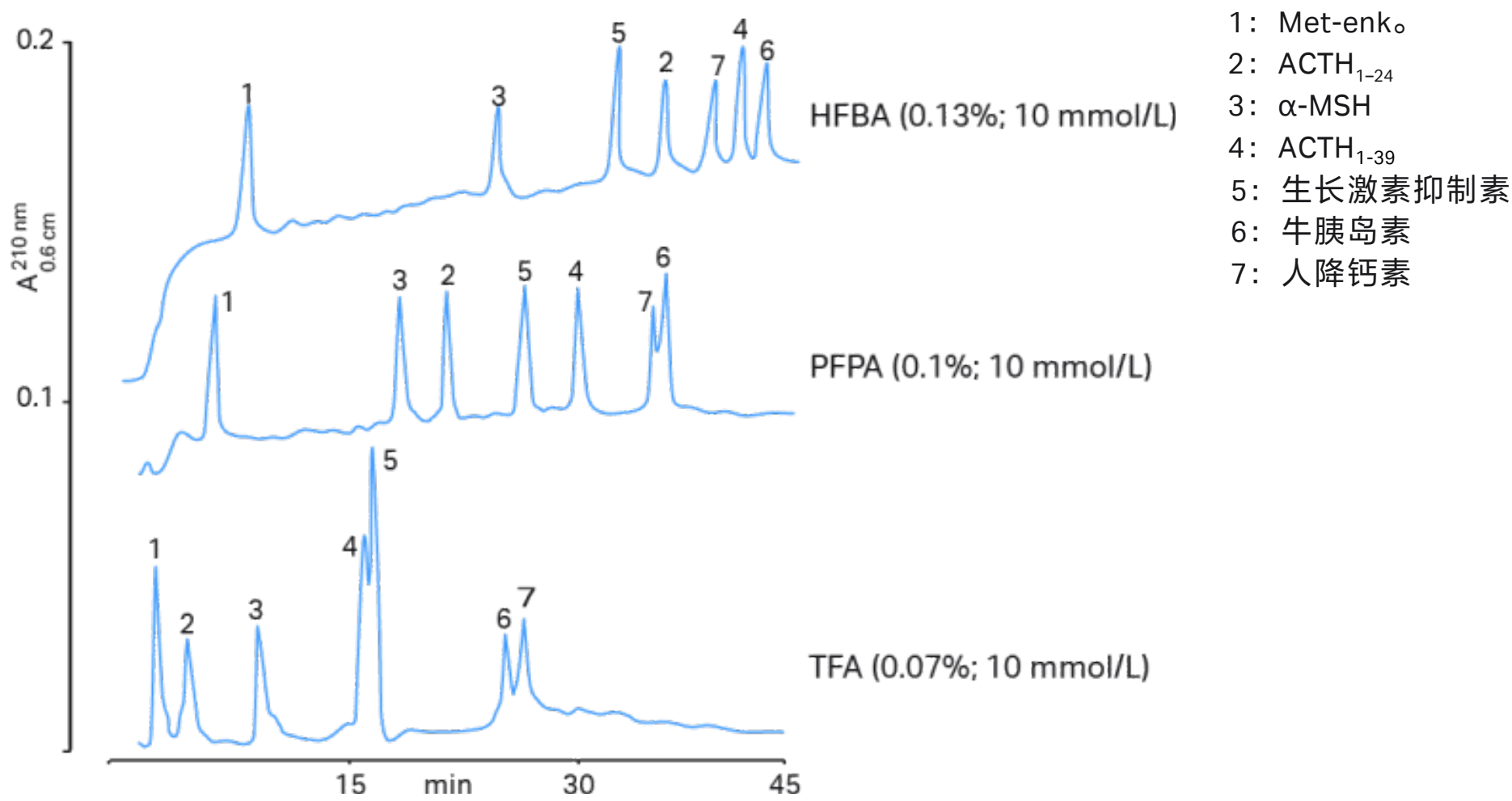


图 6.7. 离子对试剂显著影响选择性，甚至会影响洗脱顺序。

* 图片摘自 Bennett,H.P.J. 在肽和蛋白质的高效液相层析中，控制 pH 值和离子对试剂以最大化反相层析柱的性能: 分离分析和确认 (Mant , C. T. 和 Hodges, R. S. 等人)。CRC 出版社, Boca Raton, 第 319-326 页 (1991)。经许可使用。© 1991 CRC 出版社。

洗脱

有机改性剂

为了进行洗脱, 向洗脱液中加入有机改性剂以增加洗脱强度。有机改性剂必须可混溶于水并且具有紫外线透明性, 以便能够检测洗脱分子。沸点必须足够低, 以便洗脱后改性剂能够蒸发。表 6.3 列举了常用改性剂对蛋白质和肽分离的适用性。图 6.8 显示了有机改性剂在洗脱强度方面的差异。

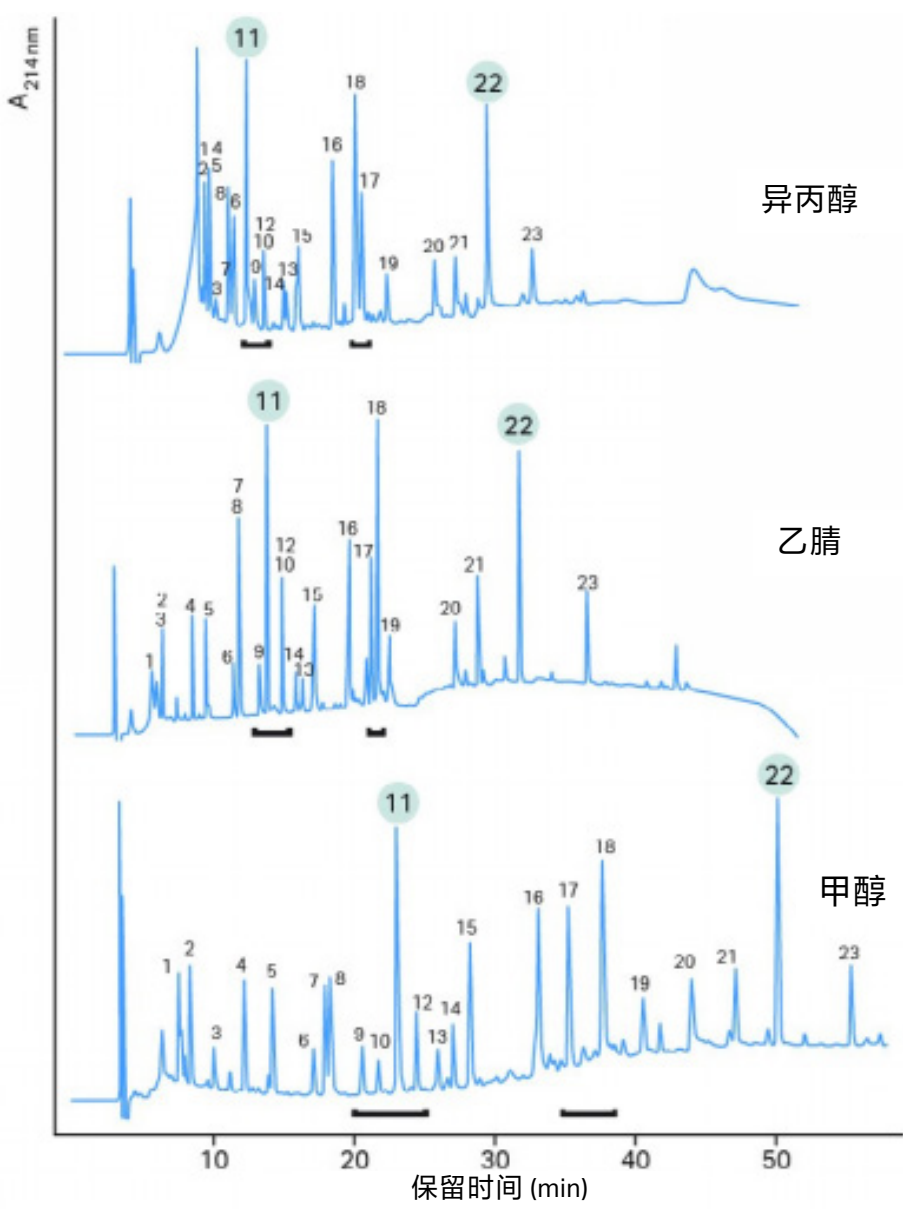


图 6.8. 分离蛋白质和多肽时, 有机改性剂的不同之处在于其洗脱强度, 而非其对选择性的影响。图片摘自 Aguilar, M.-I. 和 Hearn, M. T. W., 《肽和蛋白质的高分辨率反相高性能液相层析》。Meth.Enzymol.270, 第 3-26 页 (1996)。经许可使用。© 1996 Academic Press, Inc.

表 6.3. 常用的有机改性剂。乙腈是用于蛋白质和肽分离的理想的选择有机改性剂

有机改性剂	稳定性	沸点 (°C)	紫外线截止波 (nm)	粘度 (20°C 时的 cP)	注释
甲醇	有机小分子	65	210	中-低: 0.60	可能使蛋白质结构不稳定。
乙醇	有机小分子和肽	78	205	中-低: 1.20	可能使蛋白质结构不稳定。
异丙醇	蛋白质肽	82	210	高: 2.30	对蛋白质结构影响最小。
乙腈	有机小分子 蛋白质肽	82	190	低: 0.36	对蛋白质结构影响最大。 比酒精更强的变性剂。有毒。

洗脱类型

梯度洗脱最常用于蛋白质和多肽的制备和分析、高分辨率分离, 以大幅度地缩短分离时间。图 6.9 所示的紫外线吸收率和理论梯度曲线代表了样品组分的洗脱, 以及梯度洗脱期间洗脱液中有机改性剂浓度的增加 (%B)。

虽然 RPC 分离经常以流速 (mL/min 或 cm/h, 请参见附录 4) 和时间 (min) 来描述, 但将洗脱液体积表示为 CV 来描述分离曲线, 例如, 对于 1 mL 柱床体积的层析柱, 5 CV = 5 mL, 这很大促进了方法开发, 以及在工艺放大时将方法转移到不同尺寸的层析柱。

对于高分辨率分析, 使用宽梯度结合尽可能多的组分, 然后以不同方式洗脱它们, 以获得全面的曲线。

对于制备应用, 可以优化梯度洗脱条件, 将目标分子与所有污染物分离。

步级洗脱最常用于脱盐 (缓冲液置换)。在这种情况下, 您可以使用低分辨率分离将疏水组分与亲水污染物和盐分离。

在等度洗脱下, 仅使用一种洗脱液即可实现分离。等度洗脱主要用于有机小分子的高分辨率分析, 但偶尔也可用作优化分离的一部分, 例如, 在制备应用过程中, 污染物洗脱非常接近目标分子的区域, 大幅度地提高分辨率。

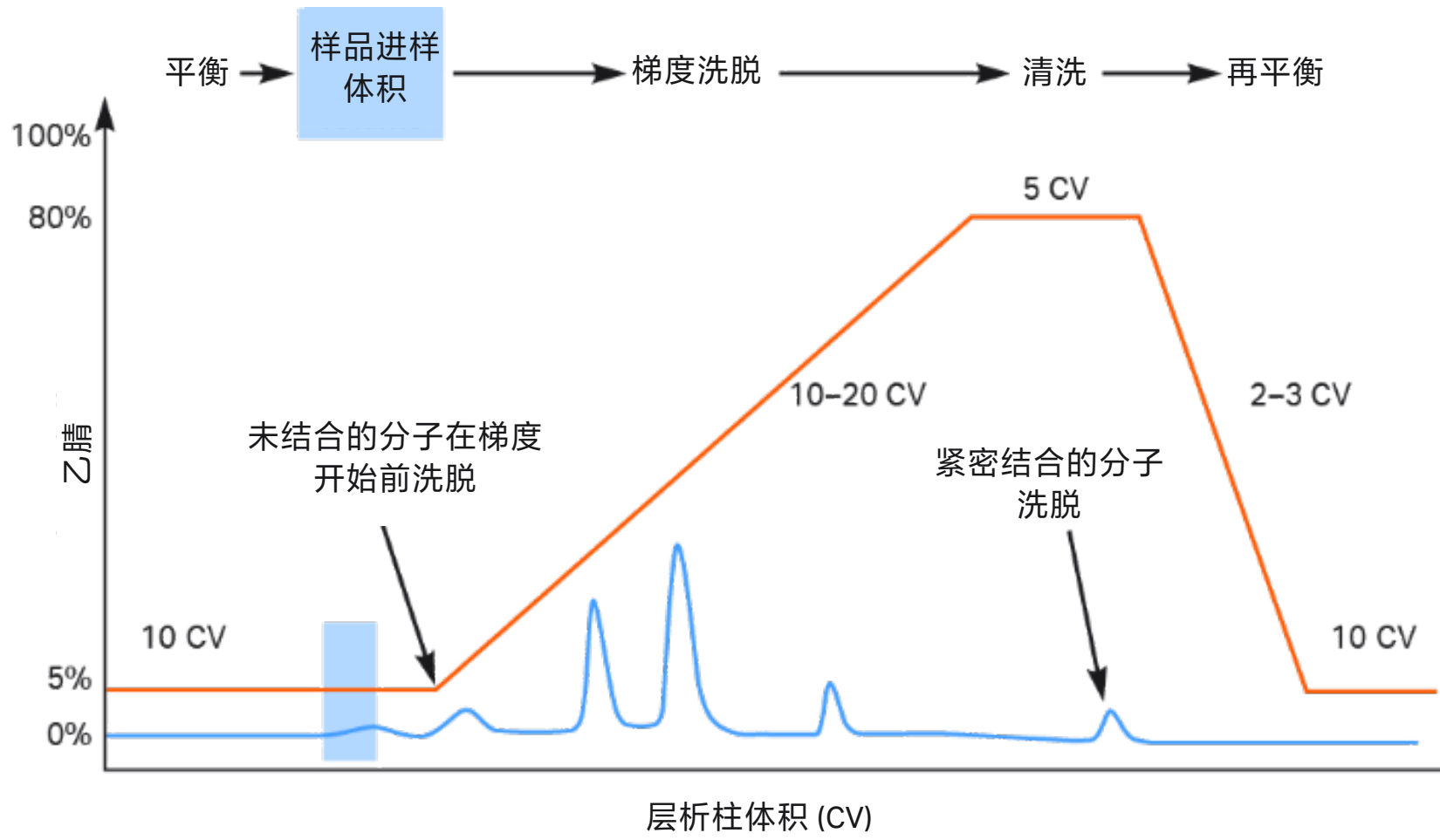


图 6.9. 使用梯度洗脱的典型高分辨率 RPC 分离。

等度洗脱也用于样品脱盐。RPC 脱盐主要用于层析分离前的样品制备, 例如, 在 IEX 分离前, 或在线或离线质谱分析前将盐去除。可以应用大量样品 (仅受填料结合载量的限制)。当包括盐在内的亲水分子通过时, 疏水分子会结合。然后使用少量疏水洗脱液 (通常包含乙腈) 洗脱结合的浓缩分子。然后可以通过蒸发去除这种挥发性溶剂, 并将残余物重新溶解在新的缓冲液中。尺寸排阻层析 (SEC) 也用于脱盐, 从高分子量生物分子中分离低分子量污染物和盐 (请参见附录 1)。然而, 尽管 SEC 是一种简单、温和的技术, 但其缺点是可上柱样品体积有限, 并且样品被稀释。图 6.10 显示了用于脱盐的 SEC 和 RPC 之间的理论比较。

结合载量

RPC填料的可用结合载量是其在规定静态条件下结合样品成组分能力的定量测量。如果规定的条件包括填料运行的流速, 则结合的量称为动态结合载量。孔隙度是决定结合载量的关键因素。大孔填料的整个疏水表面可用于结合样品组分, 但高分子量组分可能被排除在较小孔径的填料之外, 并且只有一小部分疏水表面将被使用。因此, 具有开孔结构的高孔隙率填料 (例如 SOURCE™ RPC 填料) 在分离蛋白质和肽等大分子时具有优势。孔必须足够大, 以允许所有目标分子自由进入, 从而实现高结合载量。载量值还受其他属性的影响, 例如样品组分的性质、结合过程中使用的洗脱液、温度、pH 值等。

本章后面的纯化选项中提供了每种填料的结合载量。但是, 这些值只能用作备选。上柱样品分子数量相关的理想选择性必须根据实际情况确定。

实际情况下的 RPC

本节详细介绍了 RPC 分离的实际应用, 以及提高分辨率和整体性能的提示和技巧。我们的建议主要针对在蛋白质和肽等生物分子的分离上。图 6.11 总结了典型 RPC 分离的步骤。

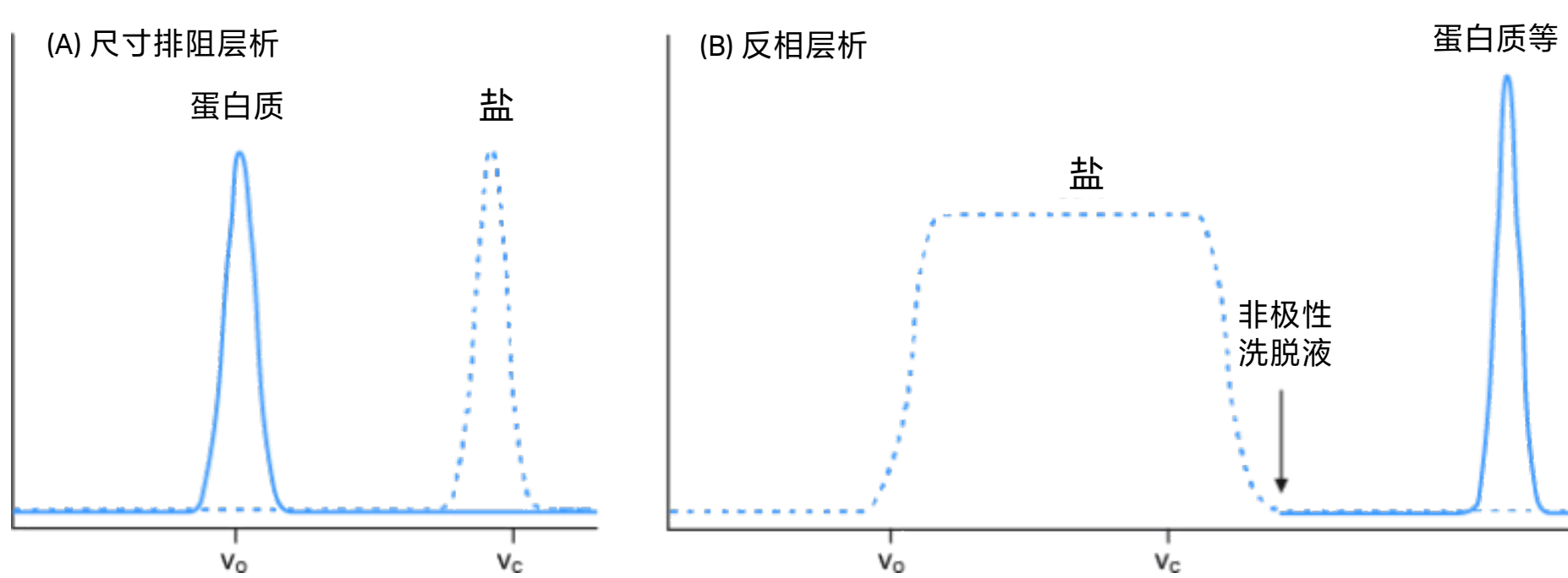


图 6.10. 在 RPC 上脱盐。

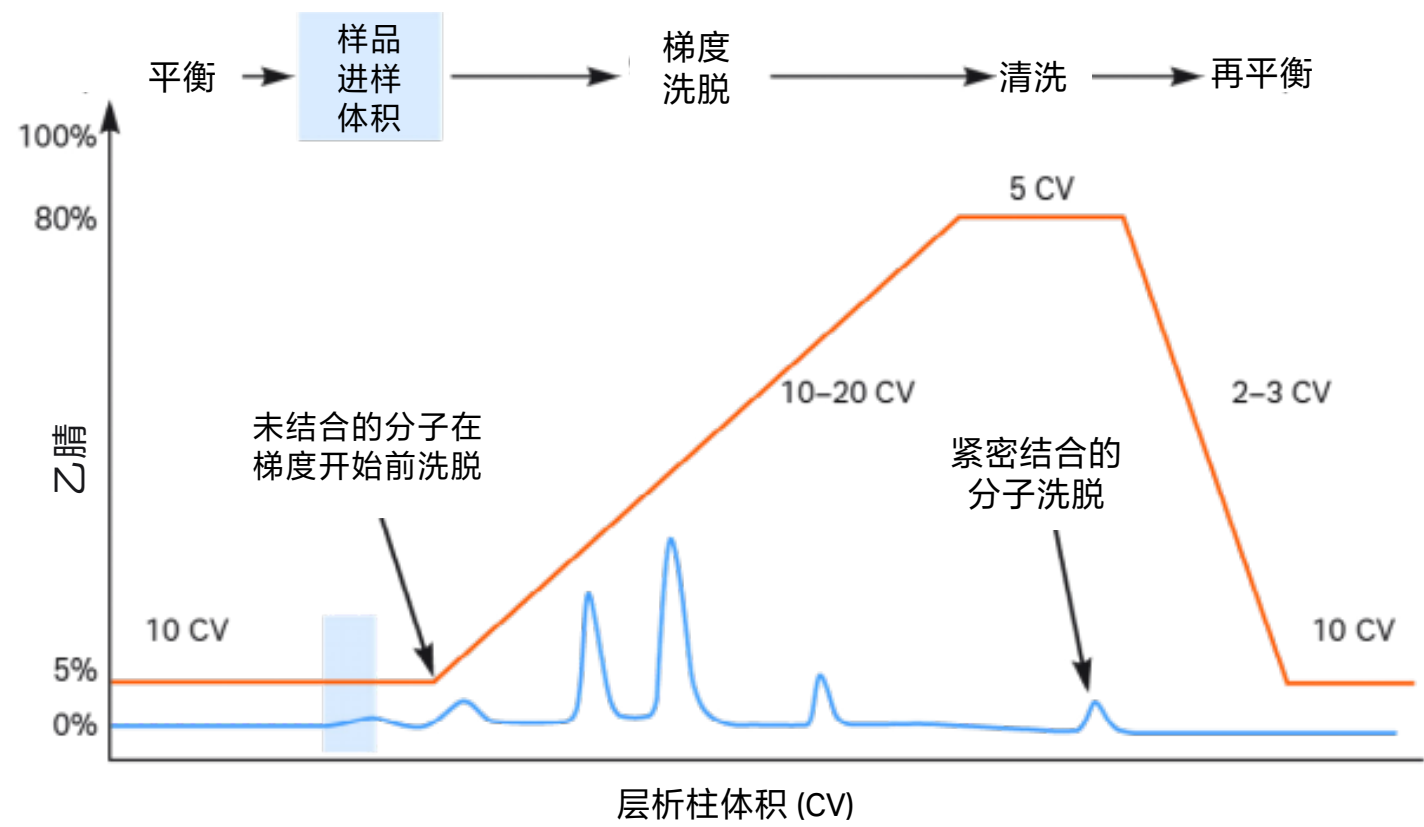


图 6.11. 使用梯度洗脱的典型 RPC 分离。

正如理论部分所讨论的那样, 成功的 RPC 分离受许多参数的影响, 并且总是需要优化以满足应用的需求。在选择和优化用于生物分子 RPC 分离的填料和条件时, 具体步骤按优先级顺序排列如下:

1. 选择在最简单的起始条件下提供理想分辨率的填料, 例如洗脱液中的 TFA 和乙腈。
2. 寻找能够提供良好分辨率的 pH 值。
3. 如有必要, 寻找合适的离子对试剂以提高选择性。
4. 优化梯度洗脱以最大化选择性 (梯度斜率仅影响峰间距离, 不会改变其洗脱顺序)。选择能够提供可接受结果的最陡梯度 (最低梯度体积)。
5. 寻找能够实现可接受分离的最高流速。

填料和层析柱选择

选择正确的 RPC 填料和层析柱尺寸对于成功分离至关重要, 应基于应用目标和样品组分的性质。

样品组分: 疏水性

必须根据经验选择与样品组分疏水性相关的 RPC 填料。与其他层析技术不同, 几乎不可能预测生物分子在 RPC 中的保留情况。影响肽保留的重要参数似乎是肽的氨基酸序列与任何二级结构 (例如 α - 螺旋和 β - 折叠) 的组合。蛋白质的情况因其三级结构而变得更加复杂。



当分离已知高度疏水的组分时, 选择疏水性较弱的填料, 以便于洗脱。与填料牢固结合的样品将更容易从疏水性较弱的填料上洗脱出。

分离目标

对于涉及多组分样品精细分离的应用, 例如肽图绘制, 需要很高的分辨率。制备型反相应用, 例如合成肽的纯化, 更关注通量, 可能会对分辨率与速度和载量进行权衡。然而, 如果用于最终精纯步骤, 分辨率将至关重要。

反相层析的分辨率取决于层析柱的效率和选择性。

分离规模

 使用 15 µm 或 30 µm 填料进行大规模制备和工艺分离, 例如 SOURCE™ 15RPC 或 SOURCE™ 30RPC。这些填料在高流速下具有较低的压力要求, 并经过优化以确保高通量 (在规定时间内处理的样品量), 同时保持高性能。- SOURCE™ 30 RPC 适用于工业工艺的精纯阶段。

请注意, 当改变粒径时, RPC 分离的性质可能会导致选择性的轻微变化。

层析柱长度

 处理大量样品时, 增加层析柱长度可以提高分辨率。

 更长的层析柱长度可以提高复杂肽混合物的分辨率, 例如, 从肽消化物中分离肽。

如果使用浅梯度的有机改性剂, 较长的层析柱长度可能会提高密切相关的肽或蛋白质的分辨率。

洗脱液的选择和制备

尽可能使用最高纯度的 HPLC 级溶剂、酸、碱、盐、离子对试剂和水。化学纯度非常重要, 因为污染物可能会产生多余的峰、鬼峰或污染最终产物。

所有组分必须对 220 nm 以下的紫外线透明, 并在分离期间所使用的低极性条件下可溶解。尽管蛋白质在 280 nm 处有吸收, 并且合成的寡核苷酸在 250 至 260 nm 处有吸收, 但在分离缺乏芳香族氨基酸残基 (例如 Trp 和 Tyr) 的短肽时, 必须在 220 nm 以下 (通常在 215 nm) 进行检测。之所以选择了表 6.2 和 6.3 中推荐的组分, 是因为它们能够提供理想分离以及低背景吸收率。

 应尽可能使用挥发性组分。它们可以通过蒸发, 与有机改性剂一起从洗脱的组分中去除。非挥发性盐或酸必须通过额外的脱盐步骤去除。

pH 值和离子对试剂

表 6.2 显示了设置洗脱缓冲液 pH 值时最常用的酸和碱, 并显示了它们作为离子对试剂的影响。由于蛋白质和肽的净电荷随 pH 值变化, 所以其净疏水性也随 pH 值变化。因此, 洗脱缓冲液 pH 值对洗脱顺序和最终选择性有重要影响。

 对于特性未知的样品, 从最常用的强酸开始, 强酸也可作为离子对试剂: 0.1% 三氟乙酸作为洗脱液 A (如果需要提高基线稳定性, 则降至 0.065%)。

按照表 6.2 中推荐的浓度添加离子对试剂, 以增强疏水组分与填料的结合。请注意, 其他离子对试剂不与 TFA 结合。

 对于具有已知特性的样品, 请参考表 6.2。

 离子对试剂的存在会影响紫外线吸收率, 并且随着有机改性剂浓度的变化, 可以看到这种变化。这可能导致梯度洗脱期间基线上升或下降。在进行分离之前, 始终运行空白梯度以确定任何添加剂的影响。如有必要, 调整浓度 (请参阅本章中的基线漂移: 平衡洗脱液)。请注意, 改变浓度可以改变样品组分的电离度, 并改变它们在分离过程中的行为。

有机改性剂

 对于特性未知的样品, 从最常用的有机改性剂乙腈开始。

由于截止波长低于 210 nm, 乙腈在这些低波长下的背景吸收率比其他普通溶剂低得多, 因此当有机改性剂的含量在分离过程中发生变化时, 可提供更好的基线稳定性, 并确保理想的检测灵敏度。

 可能需要添加离子对试剂 (请参见本章上文的 pH 值和离子对试剂)。

 当需要更强的洗脱性能或保持样品稳定性时, 使用异丙醇。请注意, 较高的粘度会导致较低的柱效和背压增加。

 如果洗脱曲线仍不理想, 请参考表 6.3, 查看其他有机改性剂。请注意, 改变有机改性剂会影响保留时间。蛋白质洗脱顺序的变化可能是变性的结果, 因为这显著改变了其疏水性。

分离蛋白质和肽的典型洗脱方案

本节介绍一些更常用的洗脱液方案。大多数方案在洗脱液 A 中含有 5% 或更少的有机改性剂, 在洗脱液 B 中含有 80% 或更少的有机改性剂。请注意, 浓度超过 80% 可能会影响 PEEK 管路, 这种管路通常在高性能层析系统中。要去除沉淀蛋白质等常见污染物, 请使用以下步骤:

基于聚合物的填料

由于基于聚合物的填料可以在更宽的 pH 值范围内使用, 而不用担心混合模式保留和是否需要抑制硅烷醇基团的离子相互作用, 因此可以使用更宽范围的洗脱液方案。

对于特性未知或已知需要酸性条件的样品

缓冲液 A: 0.065% TFA 溶于 2% 乙腈

缓冲液 B: 0.050% TFA 溶于 80% 乙腈

对于已知需要碱性条件的样品

缓冲液 A: 0.125% 铵溶液溶于2% 乙腈, pH 10

缓冲液 B: 80% 乙腈溶于缓冲液 A

其他系统

- 缓冲液 A: pH 2.1 0.1% 甲酸, 2% 乙腈
- pH 2.0 0.1% 乙酸, 2% 乙腈
- pH 2.0 0.1% TFA, 2% 乙腈
- pH 4.5 10 mM 乙酸钠, 2% 乙腈
- pH 7.0 10 mM 磷酸钾, 2% 乙腈
- pH 9.0 10 mM Tris-HCl, 2% 乙腈溶于缓冲液
- pH 12.0 10 mM NaOH, 2% 乙腈溶于缓冲液

缓冲液 B: 70% 乙腈溶于缓冲液 A

 虽然大多数洗脱液含有强酸和有机溶剂, 缓冲能力很小, 但在接近生理条件下工作时, 应保持足够的缓冲能力。

制备

1. 使用 0.22 μm 过滤器过滤添加了固体的洗脱液。这可以防止颗粒堵塞层析柱。
2. 分别测量有机溶剂和水溶液的体积, 然后混合 (这消除了直接混合有机相和水相时出现的体积变化)。
3. 通过超声浴 (< 15 min)、真空磁力搅拌 (< 5 min) 或氦气吹扫 (< 5 min) 对溶液进行脱气。这可防止洗脱过程中形成气泡。小心保持尽可能短的脱气时间, 以防止有机溶剂蒸发。
4. 加入挥发性离子对试剂。

-  使用新鲜制备的洗脱液。
-  始终使用连接在层析系统检测器后的限流器 (与适当压力范围兼容), 以防止检测器中积聚空气。
-  如果必须储存洗脱液, 容器必须密封, 以避免蒸发导致的成分变化, 最好保存在 4°C 温度下。由于存在微生物滋生风险, 不要将中性 pH 值的水溶液储存超过 2 至 3 天。为了降低气泡形成风险, 让冷溶液达到运行温度, 并在使用前脱气。
-  使用和处置在 RPC 中使用的强酸和有机溶剂时, 请遵循健康和安全法规。

层析柱和填料制备

RPC 层析柱应在首次使用、长期储存后或缓冲液条件发生显著变化时进行“调节”。用于调节层析柱的洗脱液应与后续分离中使用的相同。调节 RPC 层析柱的程序如下：

- 1. 用大约 3 个 CV 的缓冲液 B 以适合层析柱的低至中等流速清洗层析柱。
- 2. 以与步骤 1 相同的流速从 100% 缓冲液 B 到 100% 缓冲液 A 运行 2 到 3 个 CV 线性梯度。
- 3. 用 10 个 CV 的缓冲液 A 平衡层析柱。继续平衡, 直到所有监控信号稳定。

 如果更换了洗脱液, 请执行空白运行, 以检查可能因存在吸收紫外线的杂质而出现的伪影。返回 100% 缓冲液 A, 并在进样前平衡至稳定基线。

样品制备

样品制备至关重要, 尤其是对于高分辨率分离而言。澄清样品的简单步骤将避免堵塞风险, 减少对严格清洗程序的需求, 并避免层析柱性能下降和背压增加。为了有效结合, 将样品溶解在初始缓冲液或有机改性剂含量较低的溶液中。

 样品必须清澈, 不含颗粒物质。使用 SEC (附录 1) 或装填有较大颗粒的 RPC 层析柱对非常粗糙的样品进行脱盐处理, 以去除可能污染高分辨率 RPC 层析柱的污染物。

- 1. 将样品溶解在缓冲液 A 中。
- 2. 以 10,000 × g 离心样品 10 min, 或通过 0.22 或 0.45 μm 无菌过滤器过滤。如果缓冲液 A 中存在有机改性剂, 则使用耐溶剂过滤器。尽快上样到层析柱中, 以避免任何副反应, 例如氧化。

样品溶解度

在整个上样过程和分离过程中保持样品的溶解度非常重要, 以避免层析柱上出现沉淀。

 如果背压显著增加, 这可能是样品在层析柱上沉淀的迹象。重新检查样品在缓冲液 A 中的溶解度。缓冲液 A 中低百分比的有机改性剂 (例如 5% 乙腈) 有助于克服溶解度问题, 而不会干扰分离。

 如果当样品直接溶解在缓冲液 A 中时溶解度有问题, 请添加甲酸或乙酸 (0.1%) 以增加溶解度。保持样品体积小于层析柱体积, 以避免这些添加剂的任何干扰。如果使用大体积样品, 这些添加剂将被视为进样后在空隙体积中洗脱的额外峰。

 确保样品与溶液、层析柱和层析设备的温度相同。

 不要使层析柱过载, 因为这也会导致沉淀。

浓度和粘度

粘度随温度变化, 并随着有机改性剂百分比的增加而增加。样品和缓冲液 A 之间的成分差异将被视为进样后不久紫外线基线的干扰。

上样量

上样量 (质量) 比样品体积更重要, 因为 RPC 是一种结合技术。可以上柱的样品量取决于填料的结合载量和所需的分辨率程度。

上样量会影响分辨率, 因为峰宽与物质含量直接相关。为了获得理想分辨率, 结合的样品总量应小于已装填层析柱的总结合载量。

 在梯度洗脱的情况下, 上样层析柱总结合载量的 20% 至 25% 可获得理想分辨率。如果分辨率理想, 可以增加上样量。

载量可能会随着流速升高而降低, 因此必须在实现最大 DBC 和快速分离之间找到平衡, 尤其是在上样大体积样品时。

样品体积

作为一种吸附层析技术, RPC 与样品体积无关。您可以应用大量稀释的样品来浓缩和分离样品。

温度

在整个分离过程中, 将样品、洗脱液、层析柱和层析设备保持在相同恒温下, 以确保结果的可重现性。温度会影响样品和缓冲液的粘度, 并可能影响分辨率。升高或降低温度可以提高分辨率。分离低分子量样品时, 提高温度对提高分辨率最为有效。

梯度、等度或步级洗脱

对于高分辨率 RPC 分离, 可以使用逐步或连续梯度洗脱各组分。对于每次分离, 必须根据经验确定梯度形状和体积。梯度斜率被描述为每单位时间 (缓冲液 B[%]/min) 或每单位体积 (B [%]/mL) 的百分比缓冲液 B 的变化。

在任何梯度洗脱中, 缓冲液 A 中有机改性剂的浓度低于缓冲液 B 中的浓度, 并且无论有机改性剂百分比的绝对变化如何, 梯度总是从相对亲水的条件 (高含水量、低有机改性剂浓度) 向疏水条件 (较低含水量、较高有机改性剂浓度) 进行。

梯度可以在体积模式或时间模式下测量。请注意, 流量变化 (在恒定梯度斜率下) 对分离几乎没有影响, 但在恒定流量下, 梯度斜率有显著影响。

1. 从宽线性梯度开始, 以确定目标分子是否会结合和洗脱, 或者复杂混合物的组分分离程度如何。
2. 进样前运行空白梯度, 以检测来自层析柱或缓冲液中杂质/组分的任何基线干扰。在 10 至 20 个 CV 范围内, 从 5% 缓冲液 B 运行至 80% B。
3. 如果基线漂移太大, 调整缓冲液条件 (请参见本章中的“基线漂移: 平衡洗脱液”)。

 如有污染迹象, 请检查缓冲液组分和层析柱的清洁度 (请参见本章末尾“故障排除”一节中的“重影”)。

4. 当达到理想基线时, 重复运行, 此时进样。

优化

初始梯度运行后, 可以改变分离条件以提高选择性和分辨率。表 6.4 列出了可以改变的关键参数。

表 6.4. 优化过程中要考虑的参数

影响	参数
改变选择性	改变有机改性剂 (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	使用较浅的梯度 (即, 增加梯度体积或时间或使用分段梯度)。 对蛋白质分离非常有效, 因为保留时间对洗脱缓冲液的微小变化非常敏感。
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度阶梯的组合。梯度斜率的选择将取决于污染物在目标分子周围洗脱的紧密程度或峰的分离程度。

 短层析柱的浅梯度通常适合高分子量生物分子。

步级梯度 (即, 在不同百分比缓冲液 B 下的一系列等度洗脱) 对于诸如脱盐等应用很有用, 并且当进行工艺规模应用时, 可以获得预期分辨率。

流速

流速是分离小分子 (包括小肽和蛋白质消化物) 时的重要因素。在等度实验中, 使用理想流速也很重要, 可以将谱带展宽保持在最小程度。如果选择了合适的粒径, 梯度洗脱过程中的流速则不那么重要。

-  选择最高流速, 可在最短时间内获得最大分辨率。
-  以适当的流速将样品直接上样到层析柱上, 以确保理想结合时间。
-  使用能够产生精确梯度的层析系统。设备的选择在很大程度上取决于样品体积、层析柱尺寸和类型以及填料类型。在时间模式下对层析系统进行编程时, 请记住流速变化会影响梯度斜率, 从而影响分辨率。
-  降低流速可以减少背压, 但请记住, 这将延长运行时间, 分离可能需要重新优化。
-  对于大规模制备型 RPC, 上样过程中使用的流速非常重要, 因为这将影响 DBC (请参见本章中的“结合载量”)。
-  必须根据经验确定样品上样的理想流速。

清洗和再平衡

1. 用至少 5 个 CV 的 100% 缓冲液 B 清洗层析柱, 以去除任何结合的分子。
2. 应用从 100% 缓冲液 B 到 0% 缓冲液 A 的 2 至 3 个 CV 的递减梯度, 以避免成分的突然变化损坏层析柱。
3. 使用至少 10 个 CV 的缓冲液 A 再平衡层析柱。

 有时疏水相互作用会非常强烈, 以至于可能需要更苛刻的有机溶剂来洗脱所有结合的物质。由于通过 RPC 分离蛋白质是洗脱与变性和生物活性损失风险之间的平衡, 因此, 如果发生这种风险, HIC 应被视为更合适的技术。肽含有低度三级结构, 因此在有机溶剂中更稳定。

故障排除

重影

质量差的缓冲液组分会导致称为“重影”的现象。痕量有机杂质与填料结合, 在平衡和样品上样过程中浓缩。当洗脱开始时, 这些污染物在色谱图中显示为未知峰或“鬼”峰。鬼峰的大小通常取决于平衡时间和缓冲液中有机杂质的含量。

重影也可能是由之前运行中分子的不完全洗脱引起的。运行无样品的空白梯度作为检查手段, 特别是当后续运行需要高灵敏度检测时。

基线漂移: 平衡洗脱液

在典型的运行中, 随着缓冲液 B 比例的增加, 基线可能会以线性方式逐渐增加或减少。这种现象可能源于离子对试剂 (或强酸组分), 或有机改性剂在检测波长处有显著吸收。缓冲液组分引起的背景吸收率在层析柱平衡过程中予以校正。随着有机部分比例的增加, 吸收特性也随之改变。

 通过在缓冲液 A 和 B 中使用不同浓度的紫外吸收离子对试剂 (或缓冲液酸) 来补偿漂移的基线, 从而平衡与紫外吸收特性相关的“浓度”, 使基线保持直线。由于不同批次缓冲液组分的吸收特性存在差异, 并且不同运行条件之间存在其他差异, 因此给出具体建议并不实际。

下面的例子有助于说明这一原理: 对于从 TFA 水溶液到 TFA 乙腈溶液的梯度, 通常要求 TFA 乙腈溶液的浓度比 TFA 水溶液低 10% 到 30%。应根据经验确定吸收紫外线的组分的平衡浓度。两种洗脱液中离子对试剂的浓度差异一般不会大到对分离产生不利影响的程度。典型的例子是在缓冲液 A 中使用 0.065% TFA, 在缓冲液 B 中使用 0.05% TFA。表 6.5 提供了在使用 RPC 的各种条件下的故障排除。

表 6.5. 处理 RPC 时各种条件下的故障排除

情况	可能原因	补救措施
通过层析柱的流量减少或没有流量。	出口关闭或泵不工作。	打开出口。检查泵是否有泄漏迹象。
	过滤器、端件、管道或预柱堵塞。	如可能, 拆除、清洁或更换。使用前始终过滤样品和洗脱液。
通过层析柱的流量减少。在一次运行或连续运行期间, 背压增加。	层析柱中发生沉淀。	遵循清洁程序。调整洗脱液以保持样品溶解度。
	柱床被压缩。	更换层析柱。
在一次运行或连续运行期间, 背压增加。	上样的样品混浊。	调整洗脱液以提高样品溶解度, 例如, 增加有机改性剂或调整 pH 值。
在梯度洗脱过程中, 样品不洗脱。	pH 值引起沉淀。	调节 pH 值以避免沉淀。
	有机改性剂的最终浓度太低。	增加梯度或洗脱液 B 中有机改性剂的浓度。
	有机改性剂的洗脱能力太弱。	更换为疏水性较弱的 RPC 填料或改变有机改性剂。
样品在梯度洗脱开始前洗脱。	样品组分不够疏水。	添加或增加离子对试剂的浓度, 或使用洗脱能力较低的有机改性剂, 或更换为疏水性更强的 RPC 填料。
	pH 值不合适。	调节 pH 值以增强结合。
	杂质与层析柱结合。	清洁并再平衡层析柱。
	初始洗脱液中有机改性剂的浓度太高。	降低有机改性剂浓度。
	层析柱未正确平衡。	再平衡层析柱。
色谱图中存在前导峰或非常圆的峰。	层析柱过载。	减少上样量并重复。
	层析柱被污染。	使用推荐的程序清洁。
峰有拖尾。	层析柱装填不良。	重新装填或使用预装填的层析柱。
	样品在层析柱上沉淀。	清洁层析柱, 如可能, 更换顶部过滤器或预柱。
峰拖尾或有前沿。	层析柱装填受压缩。	检查柱效 (请参见附录 2)。 以较低流速重新装填。使用预装填的层析柱。
峰太小。	样品吸收光线。	如果合适, 检查监视器上的吸收率范围。如果符合要求, 使用不同的波长。检查缓冲液组分的紫外线截止波。
	在层析步骤之前和之后使用了不同的测定条件。	对所有测定使用相同测定条件。
	峰展宽过大	检查柱效 (请参见附录 2)。必要时重新装填。必要时更换层析柱。

情况	可能原因	补救措施
分辨率低于预期。	层析柱顶部或层析柱后的混合空间大。	如可能, 将填料表面加满。减少所有后 CV。
	洗脱条件非最佳 (例如, 梯度太陡; 流速太高)。	改变洗脱条件: 使用较浅或平台梯度, 降低流速。
	层析柱装填不良。	检查柱效 (请参见附录 2)。如可能, 重新装填。使用预装填的层析柱。
	层析柱过载。	清洁并再平衡层析柱。减少上样量。
	脂蛋白或蛋白质聚集体已经沉淀。	清洁并再平衡层析柱。调整洗脱缓冲液以保持溶解度。
	层析柱老化。	调整洗脱缓冲液以改善离子抑制。必要时更换层析柱。
	样品过滤不当。	清洁层析柱, 过滤样品, 然后重复操作。
	选择性差。	添加或调整离子对试剂。更换为另一种填料。
样品未按预期结合或洗脱。	样品尚未过滤。	制备新鲜样品。
	层析柱平衡不完全。	重复或延长平衡步骤, 直到基线稳定。
	脂蛋白或蛋白质聚集体已经沉淀。	清洁并再平衡层析柱。
	缓冲液条件不正确 (可能是由于蒸发)。	检查所需的条件。制备新鲜溶液。
填料/珠粒出现在缓冲液中。	层析柱在过高压力下运行。	勿超过填料或层析柱的建议操作压力。
活性恢复低, 但质量恢复正常。	样品可能在缓冲液中变性或无活性。	测定样品的 pH 值和有机溶剂稳定性。减少分离时间以限制暴露在有机条件下, 或改用较弱的有机改性剂, 或使用疏水性较弱的 RPC 填料。
	从辅因子或类似物中分离出酶。	通过汇集各组分的等分试样并重复测定来进行测试。
样品得率低于预期。	样品可能已被蛋白酶或核酸酶降解。	添加抑制剂或尽量缩短分离时间。
	样品制备过程中吸附到过滤器上。	使用另一种类型的过滤
	样品沉淀。	减少上样量或改变缓冲液条件。
	碱性样品组分通过离子相互作用与填料结合。	增加 pH 值或添加/调整离子对试剂浓度。
恢复的活性高于上柱活性。	在层析步骤之前和之后使用了不同的测定条件。	对所有测定使用相同测定条件。
	在分离过程中去除抑制剂。	

情况	可能原因	补救措施
柱床中存在气泡。	洗脱液未正确脱气	对洗脱液彻底脱气。
	在低温下装填或储存层析柱, 然后升温。	使脱气后的缓冲液通过层析柱, 去除小气泡。如果使用经冰箱或冷藏室储存后的洗脱液, 要特别小心。不要让层析柱因阳光或加热系统而升温。如可能, 重新装填层析柱。
负峰。	折射率效应。	确保样品溶解在初始缓冲液中。
色谱图中存在意外峰或尖峰。空白梯度上出现峰。	缓冲液中存在杂质。	使用高质量的 HPLC 级试剂
空白梯度上出现峰。	先前样品洗脱不完全。	根据推荐的方法清洗层析柱。
色谱图中存在尖峰。	UV 流通池中有气泡。	始终使用经过脱气的洗脱液。
		确保限流器具有合适的压力范围。用 100% 甲醇冲洗层析系统。
紫外线基线随着梯度上升。	缓冲液 A 和 B 对同一波长的吸收不同。	平衡洗脱缓冲液组分或使用不同波长。
	洗脱缓冲液中存在杂质。	使用高质量的 HPLC 级试剂。
基线噪音过大。	洗脱缓冲液中各组分吸收紫外线。	在不同波长下进行监测, 或者降低吸收紫外线的组分 (通常是离子对试剂) 的浓度, 或者如有吸收作用, 则更换有机改性剂。

SOURCE™ 层析填料: 快速分离, 高分辨率, 易于工艺放大

-  使用 SOURCE™ RPC 填料纯化和分析蛋白质、肽和寡核苷酸。
-  当分离必须在 pH 8.0 以上进行, 或者需要不同的选择性或更高的载量时, 使用 SOURCE™ RPC 作为硅胶基架的替代品。
-  将 SOURCE™ 30RPC 用于需要高流速和低背压的工业工艺精纯阶段。
-  在要求最高分辨率和快速分离 (流速最高达 1800 cm/h) 的实验室或大规模应用中, 将 SOURCE™ 15RPC 用于精纯步骤。

SOURCE™ 填料基于由单分散刚性聚苯乙烯/二乙烯基苯制成的基架 (图6.11)。这些填料表现出很高的化学和物理稳定性, 与硅基填料不同, 可在极端 pH 值下使用。一系列粒径 (30 或 15 µm) 使 SOURCE™ RPC 能够用于从大规模纯化到高分辨率分析等应用。SOURCE™ 颗粒的均匀性和稳定性确保了低背压下的高流速。这种高流速对于加速清洁和再平衡步骤非常有用。流速更可能受到可用设备和所用洗脱液而非填料物理性质的限制。

填料特性

表 6.6. SOURCE™ RPC 填料的特性

产品	常规使用的温度稳定性	pH 稳定性	平均粒径 ³
SOURCE™ 15RPC	4°C 至 40°C	操作1: 1 至 12	15 µm
		在位清洗2: 1 至 14	
SOURCE™ 30RPC	4°C 至 40°C	操作1: 1 至 12	30 µm
		在位清洗2: 1 至 14	

¹ 填料可以在不明显改变功能的情况下运行的pH 范围。

² 填料可以进行在位清洗或消毒而功能不会发生显著变化的 pH 值范围。

³ 中值粒径 (单分散粒径分布)。

所有范围均根据 Cytiva 的经验和知识估算得出。

从 RESOURCE™ 和 SOURCE™ 15RPC ST 4.6/100 (表 6.6) 等预装填层析柱到 FineLINE™ 等大型层析柱, 分离方法可以轻松放大。



图 6.11. SOURCE™ 15RPC 颗粒的扫描电子显微照片显示了均匀的尺寸分布。

纯化选项

表 6.7. 基于 SOURCE™ 基架的 RPC 填料以预装填的层析柱和填料实验室包形式提供。

产品	DBC/mL 填料*	推荐操作流速†	最大操作流速†	最大操作背压‡ (MPa/psi) 1 MPa = 10 bar
SOURCE™ 15RPC ST 4.6/100, 1.7 mL	~ 18 mg BSA ~ 14 mg 杆菌肽 ~ 45 mg 胰岛素	0.5 至 2.5 mL/min	5 mL/min	4/580
RESOURCE™ RPC, 1 mL	~ 18 mg BSA ~ 14 mg 杆菌肽 ~ 45 mg 胰岛素	1 至 5 mL/min	10 mL/min	4/580
RESOURCE™ RPC, 3 mL	~ 18 mg BSA ~ 14 mg 杆菌肽 ~ 45 mg 胰岛素	1 至 5 mL/min	10 mL/min	4/580
SOURCE™ 15RPC	~ 18 mg BSA ~ 14 mg 杆菌肽 ~ 45 mg 胰岛素	150 至 900 cm/h	1800 mL/min	
SOURCE™ 30RPC	~ 14 mg BSA ~ 23 mg 杆菌肽 ~ 72 mg 胰岛素	100 至 1000 cm/h	2000 mL/min	

* 通过前沿分析, 在 10% 穿透时测定 DBC。RPC 填料的 DBC 取决于几个参数, 包括目标分子的性质、填料的选择性和孔径、缓冲液条件和流速。此处提供的载量使用 0.1% TFA 在 300 cm/h 流速下测定。

† 请参见附录 4, 将流速 (cm/h) 转换为体积流速 (L/min), 反之亦然。所用的流速还取决于层析系统的压力规格、所用的洗脱液和柱床高度。

‡ 最大操作背压是指填料开始压缩的压力。

 在 RPC 中, 许多参数, 例如蛋白质的性质、流速和填料选择性, 在测定结合载量时起着重要作用。最终载量必须通过实验来测定。

 使用 RESOURCE™ RPC 1 mL 进行快速筛选和方法开发。转移到 RESOURCE™ RPC 3 mL 层析柱, 在 10 cm 柱床高度上获得更高的分辨率和进行方法开发。您可以根据表 6.8 所示条件在 Tricorn™ 层析柱中装填 SOURCE™ RPC 填料。

表 6.8. RPC 用 SOURCE™ 填料的装填体积和柱床高度

	体积	柱床高度
Tricorn™ 10/100	最大 8 mL	最大 10 cm
Tricorn™ 10/150	最大 12 mL	最大 15 cm
Tricorn™ 10/200	最大 16 mL	最大 20 cm

 选择 FineLINE™ 这样的生产层析柱用于更大体积。

纯化示例

高 pH 值下的纯化

图 6.12 显示了通过使用高 pH 条件 (pH 12.0) 成功纯化 β-促脂素片段 1 至 10 (Mr 950), 这仅可在基于聚合物的填料上实现。在 pH 2.0 时, 污染物在 β-促脂素峰中洗脱。

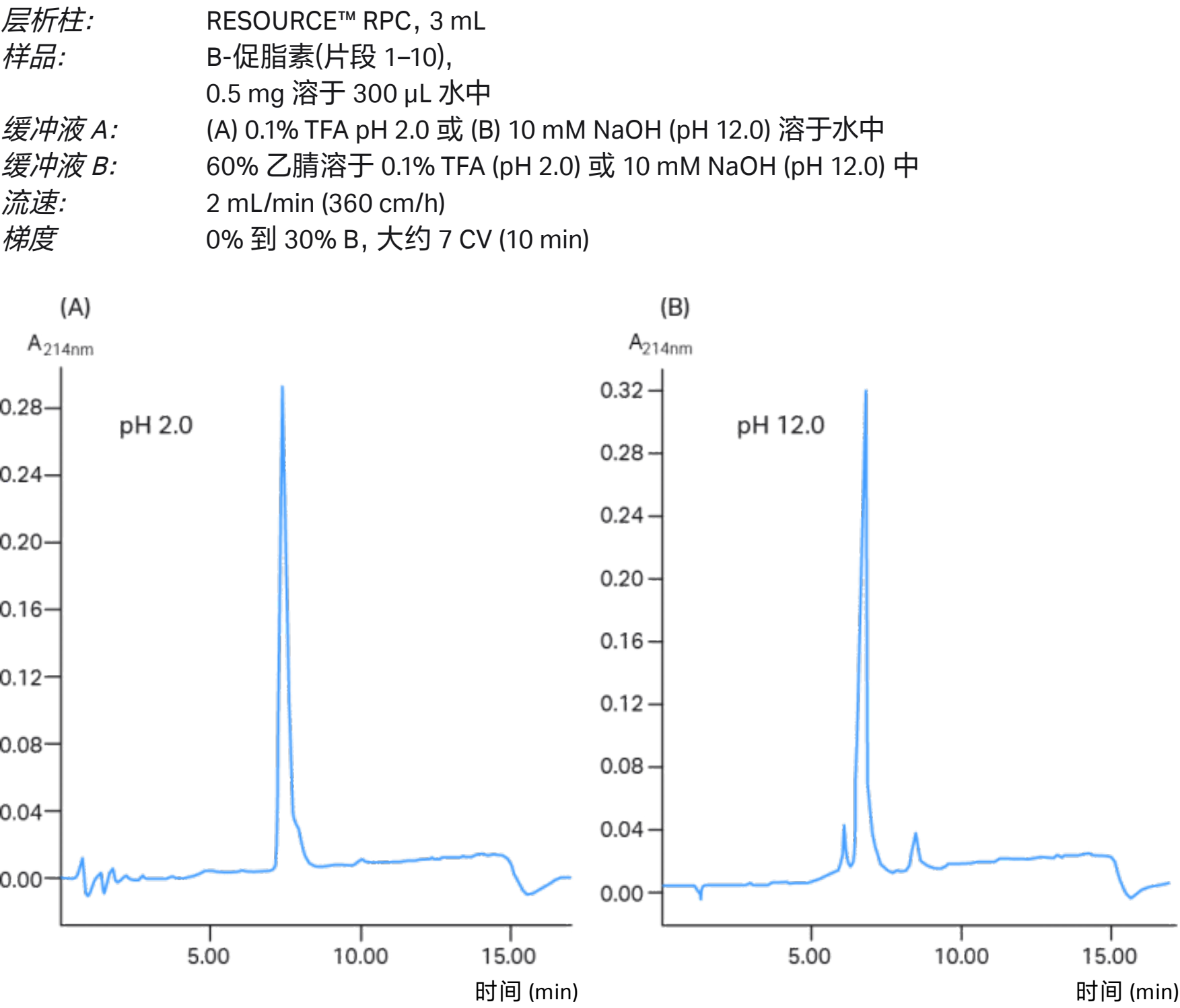


图 6.12. 在 (A) pH 2.0 和 (B) pH 12.0 时纯化促脂素片段。

精纯步骤和工艺放大

图 6.13 显示了在酵母中表达的重组人表皮生长因子 (EGF) 的高分辨率制备分离。通过在 Phenyl Sepharose™ 6 Fast Flow (高取代) 上进行初始疏水相互作用层析步骤, 然后在 Q Sepharose™ High Performance 上进行离子交换, 已经去除了大多数杂质。SOURCE™ 15RPC 上的最终精纯步骤在放大到中试规模层析柱之前, 在 RESOURCE™ 3mL 层析柱上进行了优化。

层析柱:	RESOURCE™ RPC, 3 mL	层析柱:	SOURCE™ 15RPC, 35 × 100 mm
样品:	从 Q Sepharose™ High Performance 上 分离汇集的 2.14 mL EGF	样品:	在经过 Q Sepharose™ High Performance 之后汇集的 62.5 mL EGF
上样量:	2 mL	上样量:	0.1 mg/mL 填料, 10 mg 总上样量
缓冲液 A:	0.05% TFA, 5% 乙腈	缓冲液 A:	0.05% TFA, 5% 乙腈
缓冲液 B:	0.05% TFA, 80% 乙腈	缓冲液 B:	0.05% TFA, 80% 乙腈
流速:	1.6 mL/min (300 cm/h)	流速:	50 mL/min (300 cm/h)
梯度:	0% 到 100% B, 40 CV	梯度:	0% 到 100% B, 40 CV
检测:	280 nm	检测:	280 nm

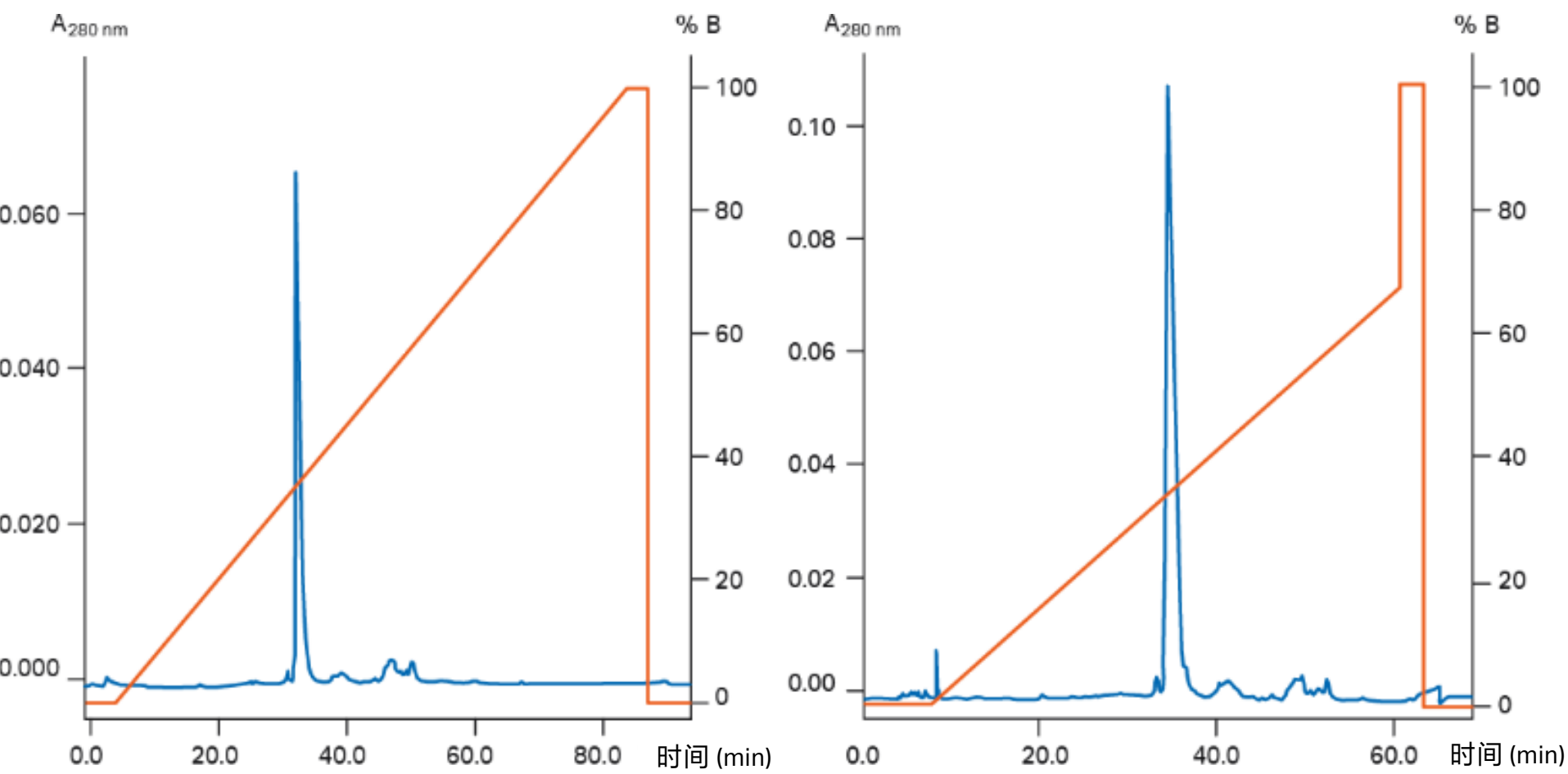


图 6.13. 重组蛋白质的制备分离。

工艺放大

图 6.14 显示了 SOURCE™ 30RPC 出色的可放大性。该填料易于装填, 并在工艺放大过程中保持其性能。在本例中, 从 24 mL 层析柱到 10 L FineLINE™ 层析柱, 模型蛋白质混合物的分离放大了 400 倍。

层析柱: SOURCE™ 30RPC, 10 × 300 mm 层析柱内径 (24 mL); 200 × 300 mm 层析柱内径 (10 L)
样品: 血管紧张素 II、核糖核酸酶 A 和胰岛素
上样量: 0.064 mg/mL 填料, 总上样量
缓冲液 A: 0.1% TFA, 0.05 M NaCl
缓冲液 B: 0.1% TFA, 60% 异丙醇
流速: 150 cm/h
梯度: 20% 至 70% B, 5 CV
检测: 280 nm

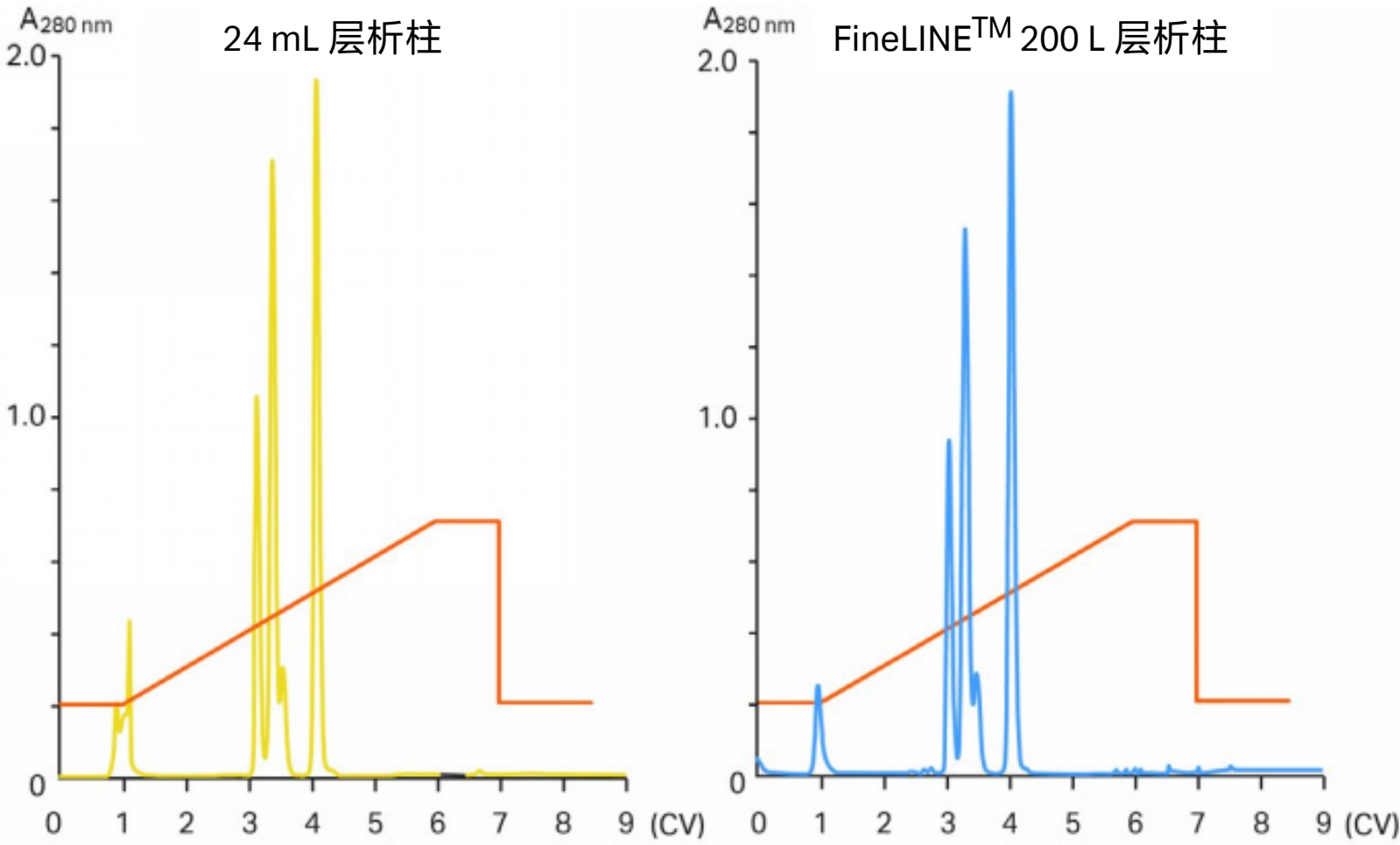


图 6.14. SOURCE™ 30RPC 填料从 24 mL 到 10 L 的可放大性。

执行分离

根据以下说明优化分离。

对于特性未知或已知需要酸性条件的样品

缓冲液 A: 0.1% TFA 溶于 2% 乙腈

缓冲液 B: 0.1% TFA 溶于 80% 乙腈

对于已知需要碱性条件的样品

缓冲液 A: 0.125% 铵溶液溶于 2% 乙腈, pH 10.0

缓冲液 B: 80% 乙腈溶于缓冲液 A

首次使用或长期储存后

1. 用至少 5 个 CV 的缓冲液 A 冲洗保存液
2. 用 5 个 CV 的梯度从 0% 到 100% 缓冲液 B 清洗层析柱 (或继续使用 100% 缓冲液 B, 直到紫外线信号稳定)。
3. 用 2 个 CV 的梯度从 100% 到 0% 缓冲液 B 清洗层析柱。

通过梯度洗脱进行分离

根据以下说明优化分离。

流速: 2 mL/min, (SOURCE™ 15RPC ST 4.6/100)
1 至 5 mL/min, (RESOURCE™ 1 mL)
1 至 5 mL/min, (RESOURCE™ 3 mL), 或者对于更大的层析柱, 200 cm/h (SOURCE™ 15RPC) 和 100 至 1000 cm/h, (SOURCE™ 30RPC)
在整个分离过程中收集组分。

1. 用至少 10 个 CV 的缓冲液 A 平衡层析柱, 直到紫外线信号稳定。
2. 将样品溶解在少量缓冲液 A 中。如有必要, 过滤或离心以去除颗粒物质。上样到层析柱中。
3. 当紫外线信号稳定时, 即当所有未结合的物质都已通过层析柱时, 使用 10 至 20 个 CV 的梯度从 0% 到 100% 缓冲液 B 执行洗脱。
4. 用至少 5 个 CV 的 100% 缓冲液 B 清洗层析柱 (或直到紫外线信号稳定), 以洗脱任何残留物质。
5. 用 2 至 3 个 CV 的梯度从 100% 到 0% 缓冲液 B 进行清洗。
6. 用 10 个 CV 的缓冲液 A 再平衡, 或直到紫外线信号稳定。



不要超过填料的最高推荐流速。



通过测定柱效和峰对称性, 定期检查层析柱性能。请参见附录 2。

清洁

样品和洗脱液的正确制备, 包括过滤、去除任何颗粒物质以及在 100% 缓冲液 B 中的最终清洗步骤, 应能保持大多数层析柱处于良好状态。然而, 性能降低、流量减少、背压增加或完全堵塞都表明填料需要使用更严格的清洁程序, 以去除紧密结合、沉淀或变性的物质。

 在清洁过程中, 尽可能反转流向, 这样污染物就无需通过整个层析柱。由于层析柱的设计, 我们不建议您反转 RESOURCE™ 层析柱的流向。每个清洁步骤所需的 CV 数量和接触时间可以根据污染程度而变化。如果清洁程序不能恢复层析柱的性能, 请在尝试其他清洁方法之前更换顶部过滤器。更换过滤器时要小心, 因为它会影响层析柱装填并影响性能。

接触时间、有机溶剂和 pH 值是成功清洁的重要参数, 可能需要根据污染物的性质制定不同的方案并组合使用。清洁方案示例如下:

缓冲液 A: 0.1% TFA

缓冲液 B: 0.1% TFA 溶于 80% 乙腈

注意: 乙腈不能用于生物工艺应用, 异丙醇是可接受的替代品。

流速: 0.5 mL/min, (SOURCE™ 15RPC ST 4.6/100)
1.0 mL/min, (RESOURCE™ 1 mL)
1.0 mL/min, (RESOURCE™ 3 mL), 或者对于更大的层析柱, 100 cm/h (SOURCE™ 15RPC) 和 100 cm/h, (SOURCE™ 30RPC)

1. 用至少 10 个 CV 的缓冲液 A 平衡层析柱, 直到紫外线信号稳定。

2. 用 20 至 30 个 CV 的梯度从 0% 到 100% 缓冲液 B 进行清洗。

3. 用至少 10 个 CV 的 100% 缓冲液 B 清洗层析柱。

4. 用 20 至 30 个 CV 的梯度从 100% 到 0% 缓冲液 B 进行清洗。

5. 用至少 10 个 CV 的缓冲液 A 清洗层析柱。

6. 如果与步骤 5 中使用的缓冲液不同, 则在用于分离的缓冲液 A 中以至少 10 个 CV 平衡层析柱。如果两种缓冲液明显不同, 则应使用 2 至 3 个 CV 梯度进行两种洗脱液之间的转移。



如果层析柱性能没有恢复, 将缓冲液 B 更换为溶于异丙醇溶液中的 0.1% TFA。请注意, 异丙醇会增加背压, 可能需要降低流速。



为了去除已知可溶于酸或碱的污染物, 可使用以下洗脱液, 遵循与上述相同的程序:

去除酸溶性污染物

缓冲液 A: 90% 醋酸

缓冲液 B: 80% 乙腈或 50% 异丙醇

去除碱溶性污染物

缓冲液 A: 0.5 M NaOH

缓冲液 B: 50% 乙腈或 50% 异丙醇



如果酸溶性或碱溶性污染物的去除方案都不成功, 则在 5 至 10 个 CV 的 6 M 盐酸胍中清洗层析柱。



SOURCE™ RPC 填料可使用腐蚀性化学试剂进行清洁, 因为聚苯乙烯基基架非常稳定。氢氧化钠是一种非常有效的清洁剂, 可以用数个 CV 的 0.5 至 1 M NaOH 对 SOURCE™ RPC 进行平衡, 用于清洁。使用 SOURCE™ 填料进行大规模分离的主要优势是能够使用如此强力的清洁剂。在生产规模上, 可以应用其他清洁方案来满足法规要求。

化学稳定性

对于日常使用, SOURCE™ RPC 填料可在以下溶液中保持稳定:

- 常用的水性缓冲液: 1 M HCl、1 M NaOH、1 M HCl/90% 甲醇、90% 乙酸、0.45 M NaOH 或 40% 异丙醇、6 M 盐酸胍、正丙醇、20% 乙醇、丙酮。
- pH 1.0 至 12.0 的水溶液, 包括三氟乙酸 (高达 0.3%)、五氟丙酸 (高达 0.3%)、七氟丁酸 (高达 0.3%)、高氯酸 (高达 0.3%)、甲酸 (高达 0.3%)、乙酸 (高达 60%)、乙酸铵 (10 至 50 mM)、磷酸 (10 至 50 mM)。
- 水混溶性有机溶剂, 包括甲醇、乙醇、乙腈、正丙醇、异丙醇。
- 离子对试剂, 例如三氟乙酸、磷酸三丁酯、磷酸三乙铵、四丁铵盐、硫酸己酯。



请注意, 乙醇、正丙醇和异丙醇会增加背压, 可能需要降低流速。



避免氧化剂以及 < pH 1.0 和 > pH 12.0 的溶液。

储存

SOURCE™ 15RPC 和 SOURCE™ 30RPC 层析柱:

用至少 10 个 CV 的蒸馏水清洗, 用至少 10 个 CV 的 20% 乙醇或 70% 乙腈平衡。请注意, 用于生物工艺应用的层析柱只能储存在 20% 乙醇中。

储存在 4 °C 至 30 °C 下。确保层析柱密封良好, 以免变干。在 4 °C 至 8 °C 下, 将未使用的填料储存在 20% 乙醇中。不要冷冻。

RPC 和 CIPP

RPC 可以为复杂混合物提供很高的分辨率, 用于分析目的, 当不必完全恢复活性和三级结构时, RPC 具有高分辨率纯化的潜力, 也是低分辨率脱盐步骤的有效选择。在纯化策略中, 当需要相似组分的高分辨率且大多数污染物已被去除时, RPC 适合作为精纯步骤。有关 CIPP (一种战略性纯化方法) 的详细信息, 请参见第 4 章。

使用 RPC 用于捕获步骤

RPC 是一种适合捕获合成肽和合成寡核苷酸的方法, 但不太适合捕获生物来源的肽和蛋白质, 因为脂质和其他高度疏水的组分会强烈结合, 降低目标分子的动态载量, 并且可能很难从层析柱中去除。在 75 μm 以上的较大粒径上, IEX 和 HIC 更合适。

使用 RPC 进行中度纯化

当分离相似组分的能力变得越来越重要时, 并且重点放在分辨和回收上, 以便将目标分子与大多数大块杂质 (如其他蛋白质、肽、核酸、内毒素和病毒) 分离时, RPC 可适用于中度纯化。

使用 RPC 用于精纯步骤

精纯步骤用于去除痕量污染物和杂质, 并以适合其预期用途的形式留下纯化的生物分子。其目标是在不到两个步骤的操作内实现 100% 纯度和高回收率。RPC 出色的分离能力使其成为处理轻微结构变体 (二聚体、寡聚体、聚集体、氧化氨基酸、蛋白酶切分子、脱氨基氨基酸残基) 和其他微观异质性的理想的选择方法。图 6.13 显示了将 RPC 用作精纯步骤的例子。

附录 1

样品制备

用于层析纯化的样品应该透明, 不含颗粒物质。在开始纯化之前, 通过简单的步骤来澄清样品, 可以避免堵塞层析柱, 减少对严格清洗程序的需求, 并延长层析填料的使用寿命。

样品提取程序以及缓冲液、添加剂和去垢剂的选择主要取决于材料的来源、目标分子的稳定性、将采用的层析技术以及产品的预期用途。这些主题在《蛋白质纯化策略手册》中有一般性论述, 更具体地说, 是根据《亲和层析手册》第 1 卷: 抗体和《亲和层析手册》第 2 卷: 标签蛋白中的靶分子, 可向 Cytiva 获得这两本手册。

样品稳定性

大多数情况下, 纯化后需要保留生物活性。当跟踪纯化进展时, 保留目标分子的活性也是一个优点, 因为目标分子的检测通常依赖于其生物活性。样品组分的变性通常会导致沉淀, 或非特异性吸附增强, 这两种情况都会损害层析柱的功能。因此, 在纯化过程中, 检查样品的稳定性极限并在这些极限内工作有许多优点。

蛋白质包含高度的三级结构, 通过范德华力、离子和疏水相互作用以及氢键结合在一起。任何能够使这些力不稳定的条件都可能导致变性和/或沉淀。相比之下, 肽含有较低程度的三级结构。其自然状态受二级结构支配, 并由氢键稳定。因此, 肽比蛋白质耐受更广泛的条件。这种天然结构的基本差异也体现在蛋白质不易重折叠, 而肽经常自发重折叠。



您可以在开始开发纯化方案之前进行稳定性测试。以下列表可用作此类测试的基础:

- 在 pH 2.0 和 pH 9.0 之间, 以一个 pH 单位为步长测试 pH 稳定性。
- 使用 0 至 2 M NaCl 和 0 至 2 M (NH₄)₂SO₄ 测试盐的稳定性, 以 0.5 M 为步长。
- 通过从 0% 增加到 50%, 每次增加 10%, 测试对乙腈和甲醇的稳定性。
- 从 4°C 到 40°C, 以 10°C 为步长测试温度稳定性。
- 通过将样品在室温下放置过夜来测试稳定性和蛋白水解活性的发生。离心每个样品, 并测量上清液中的活性和 280 nm 处的紫外线吸收率。

样品澄清

离心和过滤是样品澄清的标准实验室技术, 在处理小样品时经常使用。



我们建议您在层析纯化前立即离心和过滤任何样品。

离心

离心可去除脂类和颗粒物质, 例如细胞碎片。如果离心后样品仍然不透明, 使用滤纸或 5 µm 过滤器作为第一步, 使用下列过滤器之一作为第二步过滤器。

- 对于吸附在过滤器上的少量样品或蛋白质, 以 10 000 × g 离心 15 min。
- 对于细胞裂解物, 以 40000 至 50000 × g 离心 30 min。
- 离心后, 可通过玻璃棉过滤血清样品, 以去除任何残留的脂质。

过滤

过滤可去除颗粒物质。Whatman™ 注射器过滤器的蛋白质非特异性结合最少, 由醋酸纤维素 (CA)、再生纤维素 (RC) 或聚偏二氟乙烯 (PVDF) 组成 (表 A1.1)。

表 A1.1. 用于样品过滤的 Whatman™ 注射器过滤器

过滤器孔径 (µm)	最大样品体积 (ml)	Whatman™ 注射器过滤器*	薄膜
0.8	100	Puradisc™ FP	CA
0.45	1	Puradisc™ 4	PVDF
0.45	10	Puradisc™ 13	PVDF
0.45	100	Puradisc™ 25	PVDF
0.45	10	Protein Prep, 适用于 ÄKTA™ 系统 13/0.45 RC	RC
0.45	10	SPARTAN™ 13	RC
0.45	100	Protein Prep, 适用于 ÄKTA™ 系统 30/0.45 RC	RC
0.45	100	SPARTAN™ 30	RC
0.45	100	Puradisc™ FP	CA
0.2	1	Puradisc™ 4	PVDF
0.2	10	Puradisc™ 13	PVDF
0.2	100	Puradisc™ 25	PVDF
0.2	10	Protein Prep, 适用于 ÄKTA™ 系统 13/0.2 RC	RC
0.2	10	SPARTAN™ 13	RC
0.2	100	Protein Prep, 适用于 ÄKTA™ 系统 30/0.2 RC	RC
0.2	100	SPARTAN™ 30	RC
0.2	100	Puradisc™ FP 30	CA

* 数字表示注射器过滤器的直径 (mm)

对于层析前的样品制备, 您可以选择与层析填料粒径相对应的过滤器孔径 (表 A1.2)。

表 A1.2. 根据粒径选择过滤器孔径

过滤器的公称孔径 (µm)	层析填料的粒径 (µm)
1.0	75 及以上
0.45	40
0.22	低于 15 或需要额外清洁样品或无菌过滤时



检查测试运行中目标蛋白质的回收率。一些蛋白质可能会非特异性地吸附在过滤器表面。

脱盐

脱盐层析柱适用于任何样品体积, 在将样品转移到正确缓冲液条件下的同时, 可在一个步骤中快速去除低分子量污染物。仍然建议在脱盐前对样品进行离心和/或过滤。有关详细程序, 请参见本附录下文中的“缓冲液置换和脱盐”。

在实验室规模, 当样品在过滤或离心后相当干净时, 可以省略缓冲液置换和脱盐步骤。在 HIC 中, 您可以调整样品的盐浓度和 pH 值。

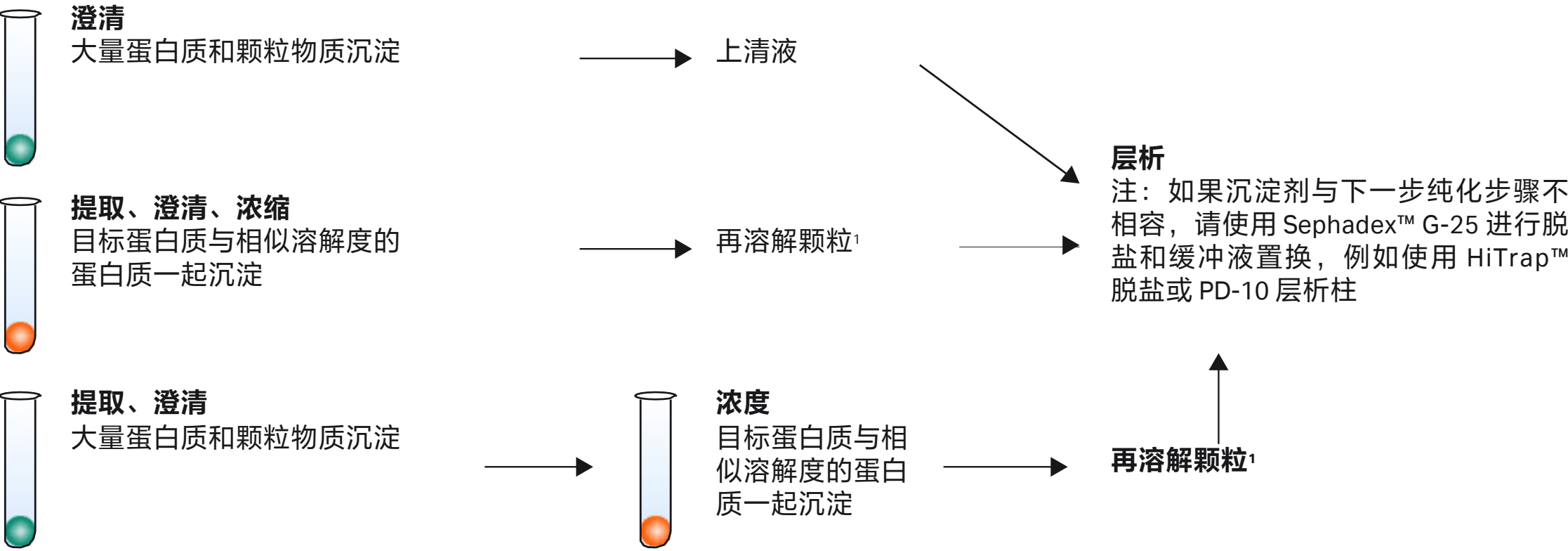
具体制样步骤

如果粗样品中含有脂质、脂蛋白或酚红等污染物, 这些污染物可能会在层析柱上积聚, 或者如果某些总杂质 (例如大量蛋白质) 应在任何层析步骤之前去除, 则可能需要特定的样品制备步骤。

分级沉淀

分级沉淀常用于实验室规模, 以去除少量样品中的大量杂质, 偶尔也用于小规模商业生产。沉淀技术通过差别溶解度原理分离组分。因为蛋白质种类的疏水性程度不同, 所以增加盐浓度会增强蛋白质之间的疏水性相互作用并导致沉淀。

如图 A1.1 所示, 分级沉淀可用于以三种不同方式去除总杂质。



¹ 请记住: 并非所有的蛋白质都容易再溶解, 得率可能降低

图 A.1.1. 利用沉淀的三种方式。

沉淀技术会受到温度、pH 值和样品浓度的影响。应该控制这些参数, 以确保结果的可重现性。

表 A1.3 中回顾了沉淀剂示例。其中更详细描述了使用硫酸铵的最常见沉淀方法。

表 A1.3. 沉淀剂示例

沉淀剂	典型使用条件	样品类型	注释
硫酸铵	如下所述。	> 1 mg/mL 蛋白质, 尤其是免疫球蛋白。	稳定蛋白质, 不变性; 上清液可以直接用于 HIC。有助于降低脂质。
硫酸葡聚糖	加入 0.04 mL 的 10% 硫酸葡聚糖和 1 mL 的 1 M CaCl /mL 样品, 混合 15 min, 以 10 000 × g 离心, 丢弃颗粒。	脂蛋白水平高的样品 (例如腹水)。	沉淀脂蛋白。 葡聚糖的替代品。
乙烯聚合物	加入 3% (w/v), 搅拌 4 h, 离心 17 000 × g, 丢弃颗粒。	脂蛋白水平高的样品 (例如腹水)。	不变性, 上清液直接用于 IEX 或 AC。可能很难完全去除。稳定蛋白质。
聚乙烯 (PEG, Mr > 4000)	最高 20% w/v	血浆蛋白。	
丙酮 (冷)	0°C 时最高 80% v/v。在微量离心机中全速离心后收集颗粒		可以不可逆地使蛋白质变性。适用于肽沉淀或电泳样品浓缩。
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		核酸沉淀。
辛酸	(X/15) g, 其中, X = 样品体积	抗体浓度应 > 1 mg/mL。	从血清或腹水中沉淀大量蛋白质, 将免疫球蛋白留在溶液中。

*详细信息摘自: *Scopes R.K.*, 《蛋白质纯化、原理和实践》, *Springer*, 1994; *J.C. Janson*, 《蛋白质纯化、原理、高分辨率方法 and 应用》, 第 3 版, *Wiley Inc*, 2011, 个人通信。

硫酸铵沉淀

-  有些蛋白质会被硫酸铵破坏。添加结晶硫酸铵时应小心：局部浓度过高会导致沉淀物被不需要的蛋白质污染。
-  对于常规的、可重现的纯化，应该避免使用硫酸铵沉淀，而使用层析。
-  蛋白质浓度低于 1 mg/mL 时，沉淀将无效。

沉淀所需的溶液：

饱和硫酸铵溶液(将 100 g 硫酸铵加入 100 mL 蒸馏水中，搅拌溶解)。

1 M Tris-HCl, pH 8.0。

用于第一个纯化步骤的缓冲液。

1. 过滤 (0.45 μm) 或离心样品 (10,000 × g, 4°C)。
 2. 向 10 份样品体积中加入 1 份 1 M Tris-HCl, pH 8.0, 以保持 pH 值。
 3. 轻轻搅拌。逐滴加入硫酸铵溶液。最大添加至 50% 饱和度*。搅拌 1 h。
 4. 以 10000 × g 离心 20 min。
 5. 去除上清液。通过重新悬浮在相同浓度的等体积硫酸铵溶液 (即不会再溶解沉淀的蛋白质或导致进一步沉淀的溶液) 中, 清洗颗粒两次。再次离心。
 6. 将颗粒溶解在少量缓冲液中, 用于下一步。
 7. 在使用 Sephadex™ G-25 进行澄清/缓冲液置换的步骤中, 使用脱盐层析柱去除硫酸铵 (请参见本附录下文中的“缓冲液置换和脱盐”) 。
- *可以调节饱和度百分比, 以沉淀目标分子或沉淀污染物。

达到给定饱和度所需的硫酸铵量随温度而变化。表 A1.4 显示了 20°C 时所需的数量。

表 A 1.4. 在 20°C 时, 达到给定饱和度需要一定量的硫酸铵

	要获得的最终饱和度百分比																
	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
起始饱和度百分比	20°C 时每升溶液中添加的硫酸铵量 (克)																
0	113	144	176	208	242	277	314	351	390	430	472	516	561	608	657	708	761
5	85	115	146	179	212	246	282	319	358	397	439	481	526	572	621	671	723
10	57	86	117	149	182	216	251	287	325	364	405	447	491	537	584	634	685
15	28	58	88	119	151	185	219	255	293	331	371	413	456	501	548	596	647
20	0	29	59	89	121	154	188	223	260	298	337	378	421	465	511	559	609
25		0	29	60	91	123	157	191	228	265	304	344	386	429	475	522	571
30			0	30	61	92	125	160	195	232	270	309	351	393	438	485	533
35				0	30	62	94	128	163	199	236	275	316	358	402	447	495
40					0	31	63	96	130	166	202	241	281	322	365	410	457
45						0	31	64	98	132	169	206	245	286	329	373	419
50							0	32	65	99	135	172	210	250	292	335	381
55								0	33	66	101	138	175	215	256	298	343
60									0	33	67	103	140	179	219	261	305
65										0	34	69	105	143	183	224	267
70											0	34	70	107	146	186	228
75												0	35	72	110	149	190
80													0	36	73	112	152
85														0	37	75	114
90															0	37	76
95																0	38

蛋白质沉淀的再溶解

许多蛋白质很容易在少量缓冲液中重新溶解, 用于下一个层析步骤。然而, 对于溶解度较差的蛋白质, 可能需要变性剂。具体条件将取决于具体的蛋白质。必须始终去除这些试剂, 以允许蛋白质完全再折叠, 并最大化质量和活性回收率。层析步骤通常在纯化过程中去除变性剂。表 A1.5 提供了常见变性剂的示例。

表 A1.5. 变性剂示例

变性剂	典型使用条件	去除/注释
尿素	2M 至 8 M	使用 Sephadex™ G-25 去除
盐酸胍	3M 至 6 M	使用 Sephadex™ G-25 去除

经许可重印, 摘自 *Scopes R.K., 《蛋白质纯化、原理和实践》, Springer, 1994; J.C. Janson 和 L. Rydén, 《蛋白质纯化、原理、高分辨率方法 and 应用》, 第 2 版, Wiley Inc, 1998; 以及其他来源。*

缓冲液置换和脱盐

文献中经常提到透析是一种去除盐或其他小分子并置换样品缓冲液成分的技术。然而，透析通常是一种非常慢的技术，需要大量的缓冲液。在处理过程中或由于蛋白水解分解或非特异性结合到透析膜上，存在丢失蛋白质样品的风险。一种简单快速的技术是使用装填有 Sephadex™ G-25 的脱盐层析柱，在分子量和低分子量物质之间进行组分分离。蛋白质从盐和其他小分子中分离出来。

在快速的单一步骤中，样品被脱盐，转移到新缓冲液中，低分子量物质被去除。

脱盐层析柱不仅用于去除低分子量污染物，例如盐，还用于不同层析步骤之前或之后的缓冲液置换，以及快速去除试剂以终止反应。

可以处理最高达脱盐层析柱总体积 30% 的样品体积。如果使用普通水性缓冲液，蛋白质浓度不超过 70 mg/mL，样品浓度不会影响分离。样品应该完全溶解。离心或过滤去除颗粒物质。

- 对于小体积样品，我们可以用层析纯化的起始缓冲液稀释样品，但仍必须去除细胞碎片和颗粒物质。
- 如果有必要避免 NaCl 的存在，可以使用挥发性缓冲液，例如 100 mM 乙酸铵或 100 mM 碳酸氢铵。

图 A1.2 显示了典型的缓冲液置换和脱盐分离。可以通过紫外线吸收和电导率的变化来监控该过程。

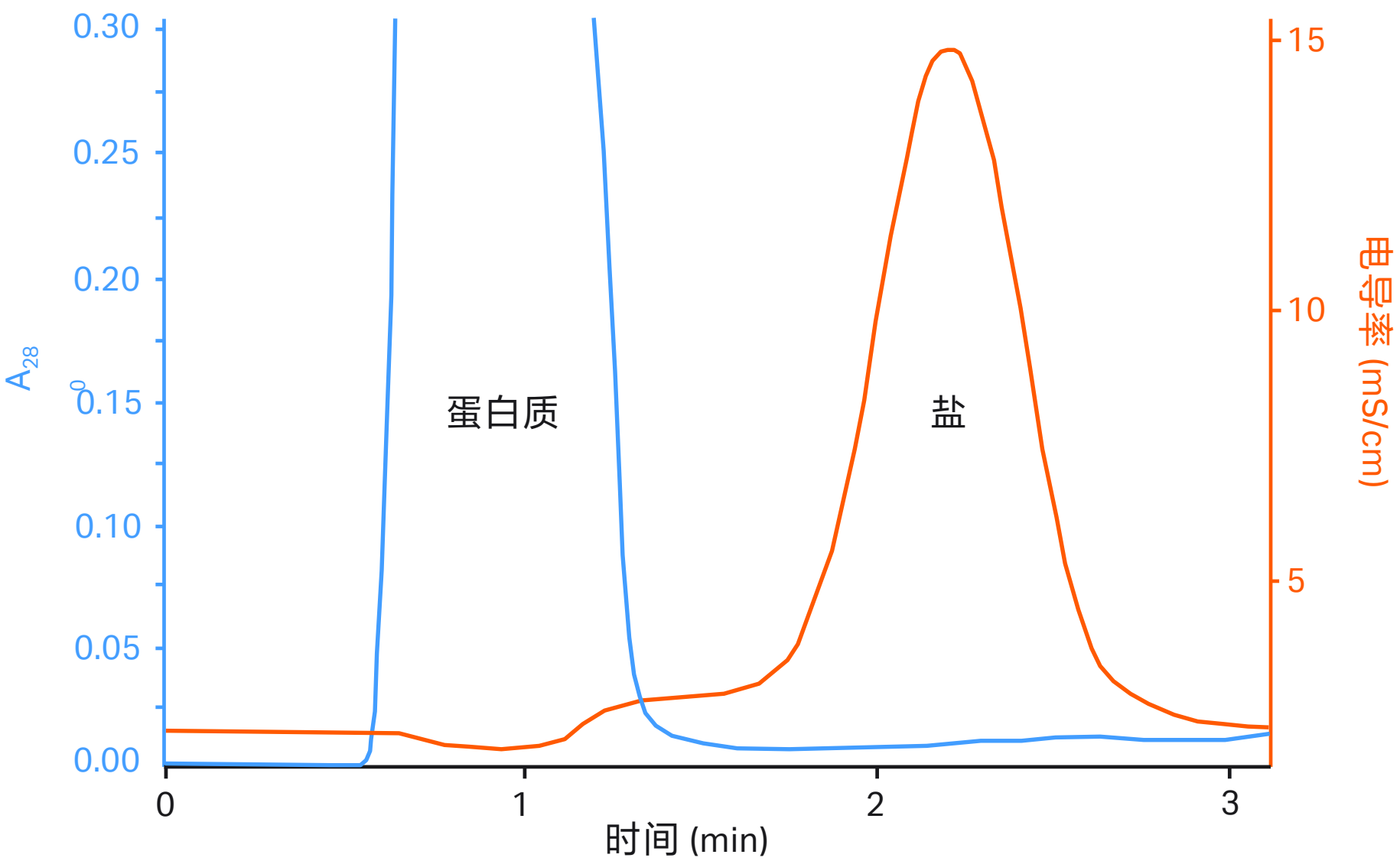


图 A.1.2. 在 HiPrep™ 26/10 Desalting 上进行小鼠血浆 (10 mL) 的缓冲液置换。

对于实验室规模的操作, 表 A1.6 显示了预装填即用型脱盐和缓冲液置换层析柱的选型指南。

表 A 1.6. 脱盐和缓冲液置换层析柱的选型指南

层析柱	样品体积 (mL)	样品洗脱体积 (mL)
PD™ MiniTrap™ G-25	0.2 至 0.5	0.1 至 0.5
PD™-10 (重力柱)	1.5 至 2.5 mL	2.5 至 3.5
HiTrap™ Desalting 5 mL	0.25 至 1.5	1.0 至 2.0
HiPrep™ 26/10 Desalting	2.5 至 15	7.5 至 20

要对更大样品体积进行脱盐处理:

- 您可以串联最多五根 HiTrap™ Desalting 5 mL 层析柱，以增加样品体积容量，例如，两根层析柱：样品体积 3 mL；五根层析柱：样品体积 7.5 mL。
- 您可以串联最多四根 HiPrep™ 26/10 Desalting 层析柱，以增加样品体积容量，例如，两根层析柱：样品体积 30 mL；四根层析柱：样品体积 60 mL。即使有四根串联层析柱，也可以在室温下在 20 到 30 min 内于含水缓冲液中处理完毕。

每根层析柱都附有说明。每个样品的脱盐和缓冲液置换时间不到 5 min, 大多数蛋白质的回收率超过 95%。

使用注射器通过 HiTrap™ Desalting 5 mL 手动脱盐

1. 用缓冲液填充注射器。拆下止动塞。为避免空气进入层析柱, 将层析柱“逐滴”连接到注射器 (通过提供的柱头)。
2. 移除层析柱出口处的折断端。
3. 用 25 mL 缓冲液以 5 mL/min 的速度清洗层析柱, 以完全去除 20% 乙醇 (作为储存缓冲液提供)。如果层析柱中有空气, 用经过脱气的缓冲液清洗, 直到空气消失。样品上样过程中意外引入层析柱的气泡不会影响分离。
4. 使用注射器 (2 至 5 mL) 以 1 至 10 mL/min 的流速上样。丢弃从层析柱上洗脱的液体。
5. 如果样品体积小于 1.5 mL, 则更换为缓冲液并继续进样, 直到总共洗脱出 1.5 mL。丢弃洗脱的液体。
6. 用从表 A1.7 中选择的适当体积洗脱蛋白质。收集指定体积的脱盐蛋白质。

注: 使用 HiTrap™ 5 mL 层析柱时, 5 mL/min 相当于大约 120 滴/分钟。简单的蠕动泵也可用于上样和缓冲液。

 推荐的最大样品体积为 1.5 mL。请参见表 A1.7, 了解减少上柱样品体积后的影响。

 简单的蠕动泵也可用于上样和缓冲液。

表 A 1.7. 使用注射器时推荐的样品和洗脱体积

上样量 (mL)	添加缓冲液 (mL)	洗脱和收集 (mL)	得率 (%)	剩余盐分 (%)	稀释系数
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

使用 ÄKTA start™ 蛋白质纯化系统进行简单脱盐

ÄKTA start™ 蛋白质纯化系统 (图 A1.3) 提供预定义快速启动和可编辑方法模板、实时运行控制和可视化, 以及一键操作, 使蛋白质纯化变得简单, 而且其体积小巧, 便于携带, 适合冷室操作。

遵循 Cytiva 的“使用 ÄKTA™ 脱盐”培训提示卡中的说明。

去除脂蛋白

脂蛋白和其他脂类物质会迅速堵塞层析柱, 建议在开始纯化前将其去除。建议使用分级沉淀中描述的沉淀剂, 例如硫酸葡聚糖和聚乙烯吡咯烷, 从腹水等样品中去除高水平的脂蛋白。

-  离心样品以避免目标分子与过滤器非特异性结合的风险。
-  血清等样品可以通过玻璃棉过滤, 以去除残留的脂质。

去除酚红

酚红经常在实验室规模级用作细胞培养中的 pH 值指示剂。尽管酚红不会直接干扰纯化, 但它可能会与某些纯化填料结合, 因此应尽早去除, 以避免污染风险。已知酚红在 pH 值大于 7.0 时会与阴离子交换填料结合。

-  使用脱盐层析柱同时去除酚红 (低分子量分子), 并将样品转移到正确的缓冲液条件下进行进一步纯化, 请参见本附录上文中的“缓冲液置换和脱盐”。

去除低分子量污染物

-  如果样品含有大量低分子量污染物, 应在第一次层析纯化步骤之前使用脱盐层析柱 (请参见本附录上文中的“缓冲液置换和脱盐”)。



图 A.1.3. ÄKTA start™ 是一款易于使用的层析系统, 是蛋白质自动脱盐的合适选择。

附录 2

层析柱装填和准备

Cytiva 的预装填层析柱将提供可重现的结果和良好的性能。

 使用预装填的小型层析柱进行填料筛选和方法优化, 以提高方法开发的效率, 例如 HiTrap™ Capto™ HIC 选择套件、PreDicator™ Capto™ HIC 筛选套件。

高效的层析柱装填对于良好分离至关重要, 尤其是在使用梯度洗脱时。装填不良的层析柱会导致流动不良和不均匀、峰展宽和分辨率损失。如果需要装填层析柱, 可以遵循以下适用于所有操作规模的指南:

- 使用结合技术时, 可以使用短而宽的层析柱 (通常为 5 至 15 cm 的柱床高度) 进行快速纯化, 即使是在低线性流速的情况下亦如此。
- 所需的填料量取决于填料的结合载量和样品量。填料的结合载量受样品的疏水性以及填料本身的影响, 必须凭经验确定。
- 一旦确定了分离参数, 通过增加层析柱的直径来增加层析柱的体积, 从而放大纯化规模。您可以避免增加层析柱的长度, 因为这会改变分离条件。

HIC 填料可以装填在 Cytiva 生产的 Tricorn™、XK 或 HiScale™ 层析柱中。SOURCE™ RPC 填料可以装填在 Cytiva 生产的 Tricorn™ 或 HR 层析柱中。[Tricorn™ 和 XK 层析柱的装填说明视频可在线获取](#)。图 A2.1 显示了装填层析柱时执行的一些步骤。

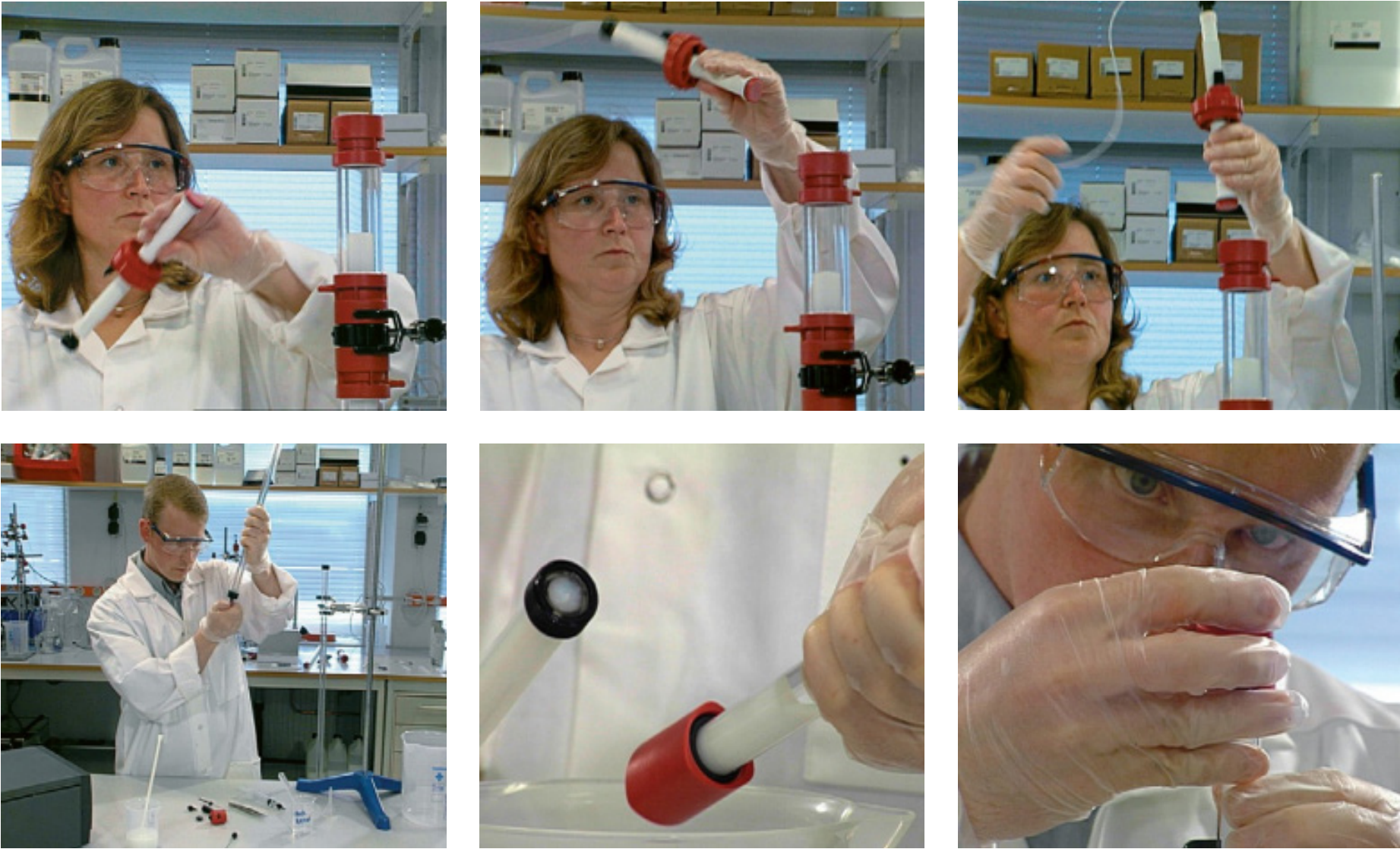


图 A.2.1. 正在进行的层析柱装填。

一般装填程序

- 1. 将所有物质平衡到将要进行分离的温度。
- 2. 通过使用推荐的缓冲液冲洗层析柱端部件来排除空气。确保筛网下没有空气。关闭层析柱出口, 在层析柱中留下 1 至 2 cm 的缓冲液。
- 3. 轻轻地重新悬浮填料。

请注意, Cytiva 提供的 HIC 填料为即用型。无需倾析可能堵塞层析柱的粉末。

 避免使用磁力搅拌器, 因为它们可能会损坏基架。

- 4. 根据所提供的建议, 估计所需的浆液 (再悬浮填料) 量。
- 5. 可以将所需体积的浆液倒入层析柱中。将玻璃棒靠在柱壁上向下倾倒, 这样可以大幅度地减少气泡产生。
- 6. 立即用缓冲液填充层析柱。
- 7. 安装柱顶部件并连接到泵上。
- 8. 打开层析柱出口, 将泵设置为预期流速。

 当浆料体积大于层析柱的总体积时, 连接第二根玻璃柱作为储液罐 (详情请参见“订购信息”)。这确保了浆料在装填过程中具有恒定直径, 大幅度地减少了湍流并改善了层析柱装填条件。

 如果无法获得推荐的流速, 可以使用泵能够输送的最高流速。

 不要超过填料或层析柱的最大操作压力。

- 9. 获得恒定柱床高度后, 维持至少三个柱体积的装填流速。在层析柱上标出柱床高度。

 在任何纯化过程中, 不得超过装填流速的 75%。

- 10. 停止泵并关闭层析柱出口。移去顶件, 小心地用缓冲液装填层析柱的其余部分, 在顶部形成一个向上的弯月面。
- 11. 将柱头以一定角度插入层析柱, 确保网下没有空气。
- 12. 将柱头慢慢滑下层析柱 (柱头出口应打开), 直到达到标记。将柱头锁定到位。
- 13. 将层析柱连接到泵上, 开始平衡。如有必要, 重新定位柱头。

 必须彻底清洗填料, 以去除保存液, 通常是 20% 乙醇。残留的乙醇可能会干扰后续程序。

 许多填料在用含有抗菌剂的无菌磷酸盐缓冲盐水平衡后, 可在 4°C 下储存长达 1 个月, 但请遵循产品随附的特定储存说明。

层析柱选择

Tricorn™、XK和HiScale™层析柱与现代填料可实现的高流速完全兼容, 并且有多种层析柱尺寸可供选择。在大多数情况下, 填料的结合载量和待纯化样品的量将决定所需的层析柱尺寸。

层析柱装填和效率

柱效表示为每米层析柱床的理论塔板数 (N) 或 H (相当于理论塔板的高度, HETP), 即柱高 (L) 除以塔板数。由于柱效与层析柱上可能出现的峰展宽有关, 因此可以通过下式计算:

$$N = 5.54 \times (V_R / W_h)^2$$

V_R = 从开始样品上样到最大峰的洗脱体积

W_h = 峰宽是指在峰高一半处记录的峰宽

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

H 由下式计算:

L = 装填柱床的高度

 V_R 和 W_h 的测量值可以用距离 (mm) 或体积 (mL) 来表示, 但必须采用相同的单位。

应通过注入丙酮定期检查层析柱性能, 以确定柱效 (N) 和峰对称性 (不对称系数 A_s)。由于 N 的观测值取决于实验因素, 例如流速和上样, 因此必须在相同条件下进行比较。在 HIC 中, 在等度条件下通过注入丙酮 (不与填料相互作用) 并测量洗脱峰来测量效率, 如图 A2.2 所示。

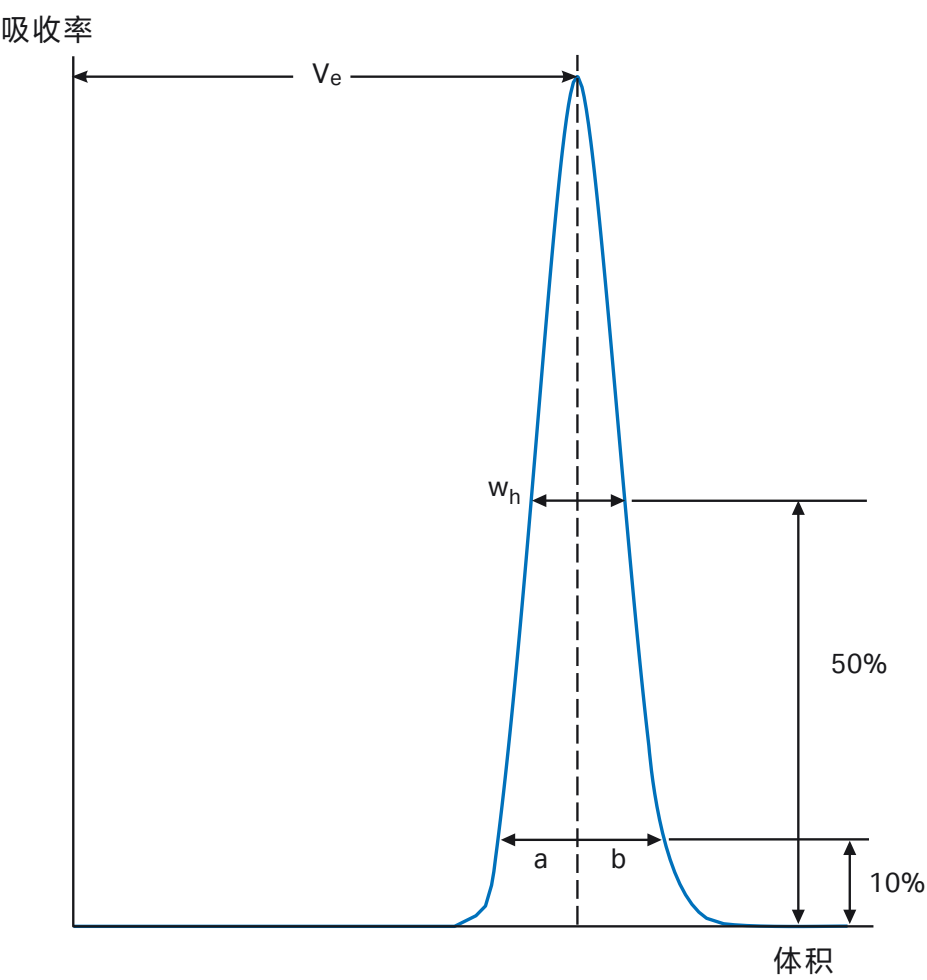


图 A.2.2. 层析柱性能效率的测量。

通常, 良好的 H 值约为所装填介质的平均粒径的两到三倍。

对于 90 μm 颗粒, 这意味着 H 值为 0.018 cm 至 0.027 cm。

不对称系数 (A_s) 表示为:

$$A_s = \frac{b}{a}$$

其中,

a = 峰高 10% 处的前半峰宽

b = 峰高 10% 处的后半峰宽

A_s 应尽可能接近 1。当用于 HIC 或 RPC 时, 短层析柱的合理 A_s 值为 0.80 至 1.80。

-  大面积的前倾通常表明是填料装填过紧, 大面积的拖尾通常表明是填料装填过松。
-  通过新装填的层析柱运行至少两倍层析柱体积的缓冲液, 以确保填料与起始缓冲液平衡。使用 pH 监测来检查洗脱液缓冲液的 pH 值。

附录 3

选择实验室规模 纯化设备

简单的 HIC, 例如通过梯度洗脱, 可以使用带有预装填 HiTrap™ 层析柱的注射器或蠕动泵进行。当可重现的结果很重要并且手动纯化变得耗时且低效时, 需要使用层析系统。当处理大体积样品或纯化许多不同样品时, 会出现这种情况。可自动监控纯化过程, 并通过线性梯度洗脱方法精确控制高分辨率分离。

表 A3.1 列出了当前可用系统的标准系统配置。请参见 [ÄKTA™ 实验室规模层析系统: 仪器管理手册](#)。

表 A 3.1. ÄKTA™ 层析系统类型及其配置

ÄKTA™ 实验室规模蛋白质纯化系统旨在纯化生物分子, 为研究和工艺开发提供速度和灵活性。ÄKTA™ 系统使用智能 UNICORN™ 系统控制软件, 从实验室操作台到工艺开发和全规模生物工艺生产, 简化并增强蛋白质纯化。世界各地的科研工作者都依赖 ÄKTA™ 系统、层析柱和填料来满足其蛋白质纯化需求。



	ÄKTA start™	ÄKTA go™	ÄKTA pure™	ÄKTA avant™
应用	从手动到自动蛋白质纯化的转变/蛋白质纯化教育	在常规纯化中轻松获得预期纯度 – 充分利用宝贵的工作台/冷室空间	提高研究灵活性 – 应对当前和未来的纯化挑战	提升工艺开发生产力 – 快速安全地开发纯化工艺
自动化和可重现蛋白质纯化, 包括梯度洗脱支持	•	•	•	•
支持亲和层析、离子交换层析、和多模式(混合模式)层析	•	•	•	•
支持尺寸排阻层析	能力有限	•	•	•
支持疏水相互作用层析		能力有限	•	•
符合法规要求的软件, 例如 GLP GMP		•	•	•
微量纯化			•	
自动化缓冲液制备, 包括 pH 值检测				•
工艺放大、工艺开发			可选	•
使用实验设计 (DoE) 进行方法开发和优化			可选	•
自动化填料或层析柱变量筛选			可选	•
自动化多步纯化			可选	可选
高级自动化, 包括外部设备			可选	可选
推荐流速 (mL/min)	0.5-5.0	0.01-25.0	0.001-25/0.01-150	0.001-25/0.01-150
最大操作压力 (MPa)	0.5	5	20/5	20/5

附录 4

从线性流速转换为 为体积流速

在比较不同尺寸层析柱的结果时, 将流速表示为线性流速 (cm/h) 将很方便。然而, 流速通常以体积流速 (mL/min) 来测量。要在流速和体积流速之间进行转换, 请使用以下公式之一。

从线性流速 (cm/h) 转换到体积流速 (mL/min)

体积流速 (mL/min) = $\frac{\text{线性流速 (cm/h)}}{60}$ × 层析柱横截面积 (cm²)

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

其中,
Y = 以 cm/h 为单位的流速
d = 以 cm 为单位的层析柱内径

示例:

当流速为 150 cm/h 时, XK 16/70 层析柱 (内径 1.6 cm) 的体积流速是多少?

Y = 流速 = 150 cm/h

d = 层析柱内径 = 1.6 cm

体积流速 = $\frac{150 \times \pi \times 1.6 \times 1.6}{60 \times 4}$ mL/min

= 5.03 mL/min

从体积流速 (mL/min) 转换到线性流速 (cm/h)

流速 (cm/h) = $\frac{\text{体积流速 (mL/min)} \times 60}{\text{层析柱横截面积 (cm²)}}$ mL/min

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

其中,
Z = 以 mL/min 为单位的体积流速
d = 以 cm 为单位的层析柱内径

示例:

当体积流速为 1 mL/min 时, Tricorn 5/50 层析柱 (内径 0.5 cm) 的线性流速是多少?

Z = 体积流速 = 1 mL/min

d = 层析柱内径 = 0.5 cm

流速 (cm/h) = $1 \times 60 \times \frac{4}{\pi \times 0.5 \times 0.5}$ cm/h = 305.6 cm/h

从体积流速 (mL/min) 转换到使用注射器

1 mL/min = 在 HiTrap™ 1 mL 层析柱上大约 30 滴/分钟

5 mL/min = 在 HiTrap™ 5 mL 层析柱上大约 120 滴/分钟

附录 5

转换数据：

蛋白质、层析柱压力

表 A 5.1. 转换数据: 蛋白质

质量 (g/mol)	1 μg	1 nmol	蛋白质	A ₂₈₀ , 适用于 1 mg/mL
10,000	100 pmol; 6 × 10 ¹³ 个分子	10 μg	IgG	1.35
50,000	20 pmol; 1.2 × 10 ¹³ 个分子	50 μg	IgM	1.20
100,000	10 pmol; 6.0 × 10 ¹² 个分子	100 μg	IgA	1.30
150,000	6.7 pmol; 4.0 × 10 ¹² 个分子	150 μg	蛋白质 A	0.17
			亲和素	1.50
			链霉亲和素	3.40
			牛血清白蛋白	0.70
1 kb 的 DNA	= 333 个氨基酸编码容量			
	= 37,000 g/mol			
270 bp DNA	= 10,000 g/mol			
1.35 kb DNA	= 50,000 g/mol			
2.70 kb DNA	= 100,000 g/mol			
氨基酸的平均分子量 = 120 g/mol。				

层析柱压力

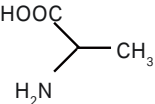
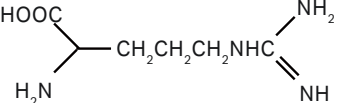
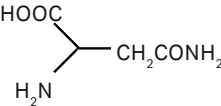
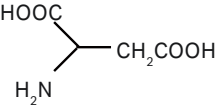
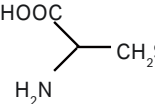
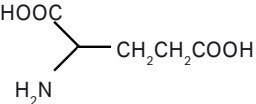
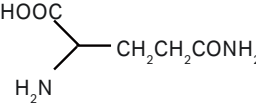
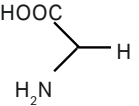
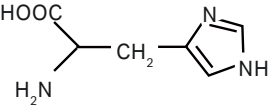
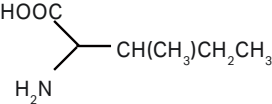
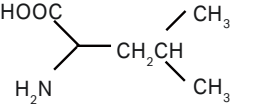
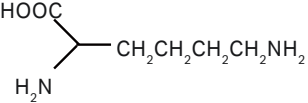
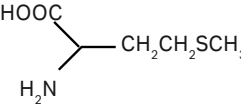
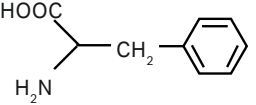
装填柱床上的最大压降是指在该压力之上层析柱内容物可能开始压缩的压力。

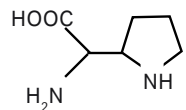
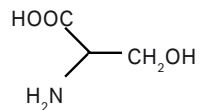
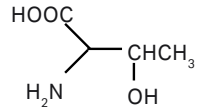
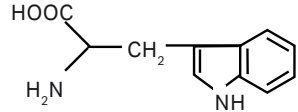
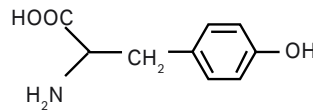
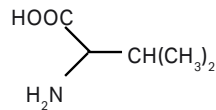
压力单位可以用兆帕 (MPa)、巴或磅每平方英寸 (psi) 来表示, 并可转换如下: 1 MPa = 10 bar = 145 psi

附录 6

氨基酸表

表 A6.1. 氨基酸列表

氨基酸	三字母代码	单字母代码	结构	化学分子式	M _r	中间单元残余 (-H ₂ O)		pH 6.0 至 7.0 时电荷	疏水性(非极性)	不带电荷(极性)	亲水性(极性)
						化学分子式	M _r				
丙氨酸	Ala	A		C ₃ H ₇ NO ₂	89.1	C ₃ H ₅ NO	71.1	中性	●		
精氨酸	Arg	R		C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	174.2	C ₆ H ₁₂ N ₄ O	156.2	碱性 (+ve)			●
天冬酰胺	Asn	N		C ₄ H ₈ N ₂ O ₃	132.1	C ₄ H ₆ N ₂ O ₂	114.1	中性		●	
天冬氨酸	Asp	D		C ₄ H ₇ NO ₄	133.1	C ₄ H ₅ NO ₃	115.1	酸性 (-ve)			●
半胱氨酸	Cys	C		C ₃ H ₇ NO ₂ S	121.2	C ₃ H ₅ NOS	103.2	中性		●	
谷氨酸	Glu	E		C ₅ H ₉ NO ₄	147.1	C ₅ H ₇ NO ₃	129.1	酸性 (-ve)			●
谷氨酰胺	Gln	Q		C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃	146.1	C ₅ H ₈ N ₂ O ₂	128.1	中性		●	
甘氨酸	Gly	G		C ₂ H ₅ NO ₂	75.1	C ₂ H ₃ NO	57.1	中性		●	
组氨酸	His	H		C ₆ H ₉ N ₃ O ₂	155.2	C ₆ H ₇ N ₃ O	137.2	碱性 (+ve)			●
异亮氨酸	Ile	I		C ₆ H ₁₃ NO ₂	131.2	C ₆ H ₁₁ NO	113.2	中性	●		
亮氨酸	Leu	L		C ₆ H ₁₃ NO ₂	131.2	C ₆ H ₁₁ NO	113.2	中性	●		
赖氨酸	Lys	K		C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂	146.2	C ₆ H ₁₂ N ₂ O	128.2	碱性 (+ve)			●
蛋氨酸	Met	M		C ₅ H ₁₁ NO ₂ S	149.2	C ₅ H ₉ NOS	131.2	中性	●		
苯基丙氨酸	Phe	F		C ₉ H ₁₁ NO ₂	165.2	C ₉ H ₉ NO	147.2	中性	●		

氨基酸	三字母代码	单字母代码	结构	化学分子式	M _r	中间单元残余 (-H ₂ O)		pH 6.0 至 7.0 时电荷	疏水性(非极性)	不带电荷(极性)	亲水性(极性)
						化学分子式	M _r				
脯氨酸	Pro	P		C ₅ H ₉ NO ₂	115.1	C ₅ H ₇ NO	97.1	中性	●		
丝氨酸	Ser	S		C ₃ H ₇ NO ₃	105.1	C ₃ H ₅ NO ₂	87.1	中性		●	
苏氨酸	Thr	T		C ₄ H ₉ NO ₃	119.1	C ₄ H ₇ NO ₂	101.1	中性		●	
色氨酸	Trp	W		C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	204.2	C ₁₁ H ₁₀ N ₂ O	186.2	中性	●		
酪氨酸	Tyr	Y		C ₉ H ₁₁ NO ₃	181.2	C ₉ H ₉ NO ₂	163.2	中性		●	
缬氨酸	Val	V		C ₅ H ₁₁ NO ₂	117.1	C ₅ H ₉ NO	99.1	中性	●		

附录 7

分析测定

分析测定对于跟踪纯化进展至关重要。其用于评估每个步骤在得率、生物活性、回收率方面的有效性,并在优化实验条件时提供帮助。对目标分子进行可靠测定的重要性怎么强调都不为过。

 在测试层析组分时, 确保用于纯化的缓冲液不会干扰测定。

总蛋白测定

Lowry 或 Bradford 测定是确定总蛋白含量的标准方法。Bradford 测定特别适用于可能干扰 Lowry 测定的高脂质含量样品。

SDS-PAGE 分析

SDS-PAGE 分析的一般步骤总结如下:

1. 通过与等体积的 2× SDS 上样缓冲液混合制备样品。
2. 短暂涡旋并在 90°C 至 100°C 下加热 5 min。
3. 将样品和 (可选) MW 标记物上样到 SDS-聚丙烯酰胺凝胶上。
4. 运行凝胶。
5. 用 Coomassie™ 蓝或银染色剂对凝胶进行染色。

纯度测定

纯度通常通过 SDS-PAGE 来估计。或者, 可以使用 SEC、等电聚焦、毛细管电泳、RPC 或质谱法。

 SDS-凝胶中丙烯酰胺的百分比应根据目标蛋白质的预期分子量进行选择 (请参见表 A7.1)。

表 A7.1. 聚丙烯酰胺凝胶的分离范围

溶解凝胶中的丙烯酰胺 (%)		分离大小范围 (M _r)
单一百分比:	5%	36,000 至 200,000
	7.5%	24,000 至 200,000
	10%	14,000 至 200,000
	12.5%	14,000 至 100,000
	15%	14,000 至 60,000*
梯度:	5% 至 15%	14,000 至 200,000
	5% 至 20%	10,000 至 200,000
	10% 至 20%	10,000 至 150,000

*较大的蛋白质不会明显进入凝胶

 有关电泳技术的信息和建议, 请参见 Cytiva 的 [2-D 电泳原理和方法手册](#)。

凝胶通常在电泳后染色, 使蛋白质条带可见, 例如通过 Coomassie™ 蓝或银染色。使蛋白质可见的另一种方法是, 在将样品上样到凝胶之前, 用荧光染料 (Amersham™ Cy™5 染料试剂) 对蛋白质进行预标记。通过这种方式, 可以在完成电泳后通过激光扫描仪或 CCD 照相机直接获得凝胶图像, 并且更快地获得结果。该工作流程概述如下。

使用 CyDye™ 荧光染料对蛋白质进行预标记

1. 通过使用 Amersham™ 蛋白质印迹 Cy™5 染料试剂进行预标记来制备样品。
2. 短暂涡旋并在 90°C 至 100°C 下加热 5 min。
3. 将样品和 (可选) MW 标记物上样到 SDS-聚丙烯酰胺凝胶上。
4. 运行凝胶并直接进行图像采集。

功能测定

免疫特异性相互作用使得许多用于评估目标分子活性浓度的替代测定系统得以发展。

- 当带有 Coomassie™ 蓝或银染色的 SDS-PAGE 的灵敏度不够时，使用蛋白质印迹分析。

1. 通过 SDS-PAGE 分离蛋白质样品。

2. 根据检测试剂的选择，将分离的蛋白质从凝胶转移到合适的膜上。对于使用 ECL™ start、ECL™、ECL Prime 或 ECL Select™ 蛋白质印迹检测试剂的化学发光检测，建议使用 Protran™ (NC) 或 Hybond™ P (PVDF) 膜。对于通过 ECL Plex™ 蛋白质印迹检测系统进行的荧光检测，建议使用 Protran™ Premium (NC) 或 Hybond™ LFP (PVDF) 膜。

3. 用适当的指定试剂显影薄膜。

电泳和蛋白质转移可以使用各种设备和试剂来完成。有关更多详细信息，请参考 Cytiva 的 2-D 电泳原理和方法手册。

- ELISA 被用作活性测定。
- 利用表面等离子体共振现象检测免疫特异性相互作用的功能测定。Biacore™ 表面等离子体共振系统可实现活性浓度的无标记测定、表位作图和反应动力学研究。

标签蛋白的检测和测定

SDS-PAGE、蛋白质印迹和 ELISA 也可用于检测和测定已经附着了特定标签的基因工程分子。在某些情况下，可以开发这样一种测定，它基于与标签本身相关的特性，例如，用于酶检测和 GST 标签蛋白的 GST 检测模块。关于 GST- 和 His 标签蛋白检测和定量的更多详细信息，请参见[亲和层析, 第 2 卷: 标签蛋白和 GST 基因融合系统手册](#)。

附录 8

储存

储存生物样品



为方便起见, 我们提供了总体建议。在遵循这些建议之前, 您应该考虑特定样品的属性及其预期用途。

建议

- 如果必要, 加入稳定剂。储存纯化的蛋白质时, 通常需要稳定剂。
- 血清、培养上清液和腹水应在 -20°C 或 -70°C 下小份冷冻保存。
- 避免可能降低生物活性的反复冷冻/解冻或冷冻干燥/再溶解。
- 避免接近稳定性极限的条件, 例如 pH 或盐浓度、还原剂或螯合剂。
- 在 4°C 的密闭容器中冷藏, 以大幅度地减少细菌滋生和蛋白酶活性。



叠氮化钠会干扰许多偶联方法和一些生物测定, 并可能对健康造成危害。您可以使用脱盐层析柱将其去除 (请参见附录 1 中的“脱盐和置换”部分)。

有关经纯化蛋白质的总体建议

- 以沉淀形式储存在高浓度硫酸铵中, 例如 4.0 M
- 在 50% 甘油中冷冻, 特别适合酶。
- 如果产品用于生物测定, 应避免使用防腐剂。如要进行体内实验, 则不应添加防腐剂。改为以小份冷冻保存样品。
- 采用无菌过滤器, 以延长储存时间。
- 添加稳定剂, 例如甘油 (5% 至 20%)、血清白蛋白 (10 mg/mL)、配基 (根据活性蛋白的浓度选择浓度), 以帮助维持生物活性。请记住, 任何添加剂都会降低蛋白质的纯度, 可能需要在后续阶段去除。
- 避免可能降低生物活性的反复冷冻/解冻或冷冻干燥/再溶解。



叠氮化钠会干扰许多偶联方法和一些生物测定。您可以使用脱盐层析柱将其去除 (请参见附录 1 中的“脱盐和置换”部分)。



冷冻蛋白是一组蛋白质, 包括一些 IgG 亚类的小鼠抗体, 不应将其储存在 4°C 下, 因为在此温度下会沉淀。在室温下保存, 并使用防腐剂。

附录 9

HIC 层析柱的清洗

正确制备样品和缓冲液,并在每次分离结束时使用无盐缓冲液或蒸馏水清洗,可以使大多数层析柱保持良好状态。然而,性能降低、流速缓慢、背压增加或完全堵塞都表明需要使用更严格的程序来清洁填料,以去除污染物。

 在清洁过程中,尽可能反转流向,这样污染物就不会通过整个层析柱。每个清洁步骤所需的层析柱体积和时间会根据污染程度而变化。如果去除常见污染物的清洗程序不能恢复层析柱的性能,请在尝试其他清洁方法之前更换顶部过滤器(如可能)。更换过滤器时要小心,因为它会影响层析柱装填并影响性能。

去除常见污染物

以下程序应该可以去除常见的污染物,例如沉淀的蛋白质。请注意,由于层析柱的条件以及样品、缓冲液或保存液的粘度,可能需要降低流速。

1. 用最多四个柱体积的 1 M NaOH 以推荐流速清洗。

2. 用至少 3 个 CV 的水清洗,或直到洗脱液 pH 为中性。

3a.要开始新的分离: 用至少 3 个 CV 的起始缓冲液再平衡,或者直到在推荐流速下达到正确的洗脱液 pH 值。

3b.对于储存: 用至少 3 个 CV 的保存液清洗。储存层析柱前,让紫外基线稳定下来。

去除脂质、脂蛋白和疏水蛋白

 可能需要有机溶剂或去垢剂来彻底清除这类污染物。务必在填料或层析柱随附说明书中查阅溶剂兼容性。

 在使用有机溶剂之前,用至少 4 个 CV 的蒸馏水清洗填料,以避免任何盐沉淀在层析柱上。当使用有机溶剂或溶液时,可能需要降低流速以避免层析柱超压。

备选方案 1

- 1. 用至少 2 个 CV 的水以推荐流速清洗。
- 2. 用至少 4 个 CV 的 70% 乙醇或 30% 异丙醇以推荐流速清洗。
- 3. 用至少 4 个 CV 的蒸馏水以与步骤 1 中相同的流速清洗。
- 4a. 要开始新的分离: 用至少 3 个 CV 的起始缓冲液再平衡, 或者直到在推荐流速下达到正确的洗脱液 pH 值。
- 4b. 对于储存: 用至少 5 个 CV 的保存液清洗。储存层析柱前, 让紫外基线稳定下来。

备选方案 2

- 1. 用最多两个柱体积的 0.05% 非离子去垢剂 (例如 Tween™-20) 以推荐流速溶于 1 M 乙酸溶液进行清洗。
 - 2. 用至少 5 个 CV 的 70% 乙醇清洗 (以去除垢剂)。
 - 3. 用至少 4 个 CV 的蒸馏水清洗 (流速与步骤 1 相同)。
 - 4a.要开始新的分离: 用至少 3 个 CV 的起始缓冲液再平衡, 或者直到在推荐流速下达到正确的洗脱液 pH 值。
 - 4b.对于储存: 用至少 5 个 CV 的保存液清洗。储存层析柱前, 让紫外基线稳定下来。
-  小心使用去垢剂, 因为它们可能会与填料结合, 从而降低后续运行中的结合载量。

Cytiva 手册

手册	代码编号
亲和层析 - 第 1 卷: 抗体	CY13981
亲和层析 - 第 2 卷: 标签蛋白	CY13980
亲和层析 - 第 3 卷: 特定生物分子群	CY13979
离子交换层析原理和方法	CY13983
多模式层析原理和方法	CY14738
尺寸排阻层析原理和方法	CY12707
ÄKTA™ 实验室规模层析系统	CY13989
切向流过滤方法手册	CY14739
蛋白质生产和纯化实验设计	CY14782
GST 基因融合系统	CY14588
使用 PreDictor 孔板进行高通量工艺开发 (HTPD)	CY16051
纯化具有挑战性的蛋白质	CY14791
蛋白质纯化策略	CY13986
分子成像	CY14828
蛋白质样品制备	CY14735
2-D 电泳	CY14825

这些手册可从[cytivalifesciences.com/handbooks](https://www.cytivalifesciences.com/handbooks) 下载

订购信息

疏水相互作用层析产品

Capto™、Capto™ ImpRes、SOURCE™、Sepharose™ High Performance 和 Sepharose™ Fast Flow 填料也可用作 BioProcess™ 填料, 用于大规模生产, 详情请参见 cytiva.com。

Capto™ HIC 产品

筛选套件

格式	数量	产品代码
HiTrap™ Capto™ HIC 选择套件	5 × 1 mL	29321087
套件包括以下 Capto™ HIC 填料: Capto™ Phenyl (高取代)、Capto™ Phenyl ImpRes、Capto™ Butyl、Capto™ Butyl ImpRes 和 Capto™ Octyl。预装填即用型 1 mL HiTrap™ 层析柱		
PreDicator™ Capto™ HIC 筛选套件	6 µL, 4 × 96 孔板	29711438
套件包括以下 Capto™ HIC 填料: Capto™ Phenyl (高取代)、Capto™ Phenyl ImpRes、Capto™ Butyl、Capto™ Butyl ImpRes、Capto™ Octyl 和 Capto™ Butyl-S	20 µL, 4 × 96 孔板	29711439

Capto™ Phenyl (高取代) 填料

格式	数量	产品代码
批量	25 mL	17545101
	100 mL	17545102
HiTrap™ 层析柱	5 × 1 mL	17545108
	5 × 5 mL	17545109
HiScreen™ 层析柱	1 × 4.7 mL	28992472
PreDicator™ 孔板	6 µL, 4 × 96 孔板	17545116
	20 µL, 4 × 96 孔板	29716136
	50 µL, 4 × 96 孔板	17545117
PreDicator™ RoboColumn™ 微型层析柱	200 µL, 1 × 8 层析柱	28986088
	600 µL, 1 × 8 层析柱	28986182

Capto™ Butyl 填料

格式	数量	产品代码
批量	25 mL	17545901
	100 mL	17545902
HiTrap™ 层析柱	5 × 1 mL	17545908
	5 × 5 mL	17545909
HiScreen™ 层析柱	1 × 4.7 mL	28992473
PreDicator™ 孔板	6 µL, 4 × 96 孔板	17545916
	20 µL, 4 × 96 孔板	29716137
	50 µL, 4 × 96 孔板	17545917
PreDicator™ RoboColumn™ 微型层析柱	200 µL, 1 × 8 层析柱	28986097
	600 µL, 1 × 8 层析柱	28966183

Capto™ Octyl 填料

格式	数量	产品代码
批量	25 mL	17546501
	100 mL	17546502
HiTrap™ 层析柱	5 × 1 mL	17546508
	5 × 5 mL	17546512
HiScreen™ 层析柱	1 × 4.7 mL	17546510
PreDicator™ 孔板	6 µL, 4 × 96 孔板	17546516
	20 µL, 4 × 96 孔板	29716138
	50 µL, 4 × 96 孔板	17546517
PreDicator™ RoboColumn™ 微型层析柱	200 µL, 1 × 8 层析柱	29275286
	600 µL, 1 × 8 层析柱	29275287

Capto™ Butyl-S 填料

格式	数量	产品代码
批量	25 mL	17549701
	100 mL	17549702
Capto™ PlasmidSelect 填料		
格式	数量	产品代码
批量	25 mL	17549901
	100 mL	17549902
HiTrap™ 层析柱	5 × 1 mL	17549911
	5 × 5 mL	17549912
HiScreen™ 层析柱	1 × 4.7 mL	29201790

Capto™ Phenyl ImpRes 填料

格式	数量	产品代码
批量	25 mL	17548401
	100 mL	17548402
HiTrap™ 层析柱	5 × 1 mL	17548411
	5 × 5 mL	17548412
HiScreen™ 层析柱	1 × 4.7 mL	17548410
PreDicator™ 孔板	6 µL, 4 × 96 孔板	29711440
	20 µL, 4 × 96 孔板	29711441
PreDicator™ RoboColumn™ 微型层析柱	200 µL, 1 × 8 层析柱	29701638
	600 µL, 1 × 8 层析柱	17548441

Capto™ Butyl ImpRes

格式	数量	产品代码
批量	25 mL	17371901
	100 mL	17371902
HiTrap™ 层析柱	5 × 1 mL	17371911
	5 × 5 mL	17371912
HiScreen™ 层析柱	1 × 4.7 mL	17371910
PreDicator™ 孔板	6 µL, 4 × 96 孔板	29711442
	20 µL, 4 × 96 孔板	29711443
PreDicator™ RoboColumn™ 微型层析柱	200 µL, 1 × 8 层析柱	29701637
	600 µL, 1 × 8 层析柱	17371941

SOURCE™ HIC 产品

SOURCE™ 15PHE

格式	数量	产品代码
批量	200 mL	17014702
RESOURCE™ 层析柱	1 × 1 mL	17118601
4.6/100 PE 层析柱	1 × 1.7 mL	17518601

SOURCE™ 15ISO

格式	数量	产品代码
批量	200 mL	17014802
RESOURCE™ 层析柱	1 × 1 mL	17118501

Sepharose™ HIC 产品

筛选套件

格式	数量	产品代码
HiTrap™ HIC 选择套件	7 × 1 mL	28411007
套件包括以下填料: Phenyl Sepharose™ High Performance、Phenyl Sepharose™ 6 Fast Flow (低取代)、Phenyl Sepharose™ 6 Fast Flow (高取代)、Butyl Sepharose™ High Performance、Butyl-S Sepharose™ 6 Fast Flow、Butyl Sepharose™ 4 Fast Flow、Octyl Sepharose™ 4 Fast Flow		

Phenyl Sepharose™ 6 Fast Flow (高取代) 填料

格式	数量	产品代码
批量	25 mL	17097310
	100 mL	17097305
HiTrap™ 层析柱	5 × 1 mL	17135501
	5 × 5 mL	17519301
HiScreen™ 层析柱	1 × 4.7 mL	28926988

Phenyl Sepharose™ 6 Fast Flow (低取代) 填料

格式	数量	产品代码
批量	25 mL	17096510
	100 mL	17096505
HiTrap™ 层析柱	5 × 1 mL	17135301
	5 × 5 mL	17519401
HiScreen™ 层析柱	1 × 4.7 mL	28926989

Butyl Sepharose™ 4 Fast Flow 填料

格式	数量	产品代码
批量	25 mL	17098010
	100 mL	17098001
HiTrap™ 层析柱	5 × 1 mL	17135701
	5 × 5 mL	17519701
HiScreen™ 层析柱	1 × 4.7 mL	28926984

Octyl Sepharose™ 4 Fast Flow 填料

格式	数量	产品代码
批量	100 mL	17094602
HiTrap™ 层析柱	5 × 1 mL	17135901
	5 × 5 mL	17519601
HiScreen™ 层析柱	1 × 4.7 mL	28926986

Butyl-S Sepharose™ 6 Fast Flow 填料

格式	数量	产品代码
批量	100 mL	17097802
HiTrap™ 层析柱	5 × 1 mL	17097813
HiScreen™ 层析柱	1 × 4.7 mL	28926985

Phenyl Sepharose™ High Performance 填料

格式	数量	产品代码
批量	75 mL	17108201
HiTrap™ 层析柱	5 × 1 mL	17135101
	5 × 5 mL	17519501
HiScreen™ 层析柱	1 × 4.7 mL	28950516

Butyl Sepharose™ High Performance 填料

格式	数量	产品代码
批量	200 mL	17543202
HiTrap™ 层析柱	5 × 1 mL	28411001
	5 × 5 mL	28411005
HiScreen™ 层析柱	1 × 4.7 mL	28978242

反相层析产品

SOURCE™ 15RPC 和 SOURCE™ 30RPC 填料也可作为 BioProcess™ 填料提供, 用于大规模生产, 详情请参见 cytiva.com。

SOURCE™ 15RPC 填料

格式	数量	产品代码
批量	10 mL	17072720
	200 mL	17072702
	500 mL	17072703
RESOURCE™ 层析柱	1 × 1 mL	17118101
	1 × 3 mL	17118201
4.6/100 ST 层析柱	1 × 1.7 mL	17506801

SOURCE™ 30RPC 填料

格式	数量	产品代码
批量	10 mL	17512020
	200 mL	17512002
	500 mL	17512003

其他层析柱和附件

脱盐层析柱

产品名称	数量	产品代码
HiTrap™ 脱盐柱	5 × 5 mL	17140801
HiPrep™ 26/10 Desalting	1 × 53 mL	17508701
HiPrep™ 26/10 Desalting	5 × 53 mL	17508702
一次性 PD-10 脱盐层析柱	30	17085101

空层析柱

有关 Tricorn™ 层析柱系列的完整信息, 请访问 Cytiva 网站

产品名称	数量	产品代码
Tricorn™ 5/100 层析柱	1	28406410
Tricorn™ 10/100 层析柱	1	28406415
HiScale™ 26/20 层析柱	1	28964514
HiScale™ 26/40 层析柱	1	28964513
HiScale™ 50/20 层析柱	1	28964445
HiScale™ 50/40 层析柱	1	28964444

空层析柱

有关 Tricorn™ 层析柱系列的完整信息, 请访问 Cytiva 网站

产品名称	数量	产品代码
Tricorn™ 装填设备 5/50	1	18115324
适用于 Tricorn™ 5 mm 层析柱的 Tricorn™ 装填设备 5/50 包括: Tricorn™ 装填连接器 5-5、Tricorn™ 玻璃管 5/50、底部装置和止动塞。		
Tricorn™ 装填设备 10/100	1	18115325
适用于 Tricorn 10 mm 层析柱的 Tricorn™ 装填设备 10/100 包括: Tricorn™ 装填连接器 10-10、Tricorn™ 玻璃管 10/100、底部装置和止动塞。		
Tricorn™ 装填连接器 5-5	1	18115321
Tricorn™ 装填连接器 5-10	1	18115322
Tricorn™ 装填连接器 10-10	1	18115323
适用于 HiScale™ 26 的全套装填管 20	1	28980383
适用于 HiScale™ 50 的全套装填管 20	1	28980251

cytiva.com.cn/HIC

Cytiva 和 Drop 标识是 Global Life Sciences IP Holdings Corporation 或以 Cytiva 名义开展业务的关联公司的商标。ÄKTA、ÄKTA avant、ÄKTA go、ÄKTA pure、ÄKTA start、AxiChrom、BioProcess、Capto、Chromaflow、Cy、Fast Trak、FineLINE、HiPrep、HiScale、HiScreen、HiTrap、PreDicator、Puradisc、RESOURCE、Sephadex、Sephacrose、SOURCE、SPARTAN、STREAMLINE、Superdex、Tricorn、UNICORN 和 Whatman 是 Global Life Sciences Solutions USA LLC 或以 Cytiva 名义开展业务的关联公司的商标。

Coomassie 是 Thermo Fisher Scientific 的商标。RoboColumn 是 Repligen GmbH 的商标。Tween 是 Croda Group of Companies 的商标。所有其他第三方商标是其所有者的财产。

CyDye: 购买 CyDye 产品包括将 CyDye 产品用于内部研发的有限许可证, 但不可用于任何商业用途。将 Cy 和 CyDye 商标用于商业目的的许可需与 Cytiva 签署单独的许可协议。商业用途包括: 出售、出租、许可或其他转让材料或从中派生或产生的任何材料。出售、租赁、许可或授予其他权利使用本材料或从中派生或产生的任何材料。使用该材料为第三方提供服务, 收取费用, 包括合同研究和药物筛选。

如果您需要使用 Cy 和 CyDye 商标的商业许可证, 请联系 LSlicensing@cytiva.com。

ECL Prime: 本产品或其部分产品在 Cyanagen Srl 的许可下进行生产和销售, 并获得了美国第 7,855,287、7,803,573 和 9,040,252 号专利, 以及其他国家的同等授权专利和专利申请。

© 2024 Cytiva

如需查看当地办公室的联系信息, 请访问 cytiva.com.cn/contact

CY45316-27May24-HB

