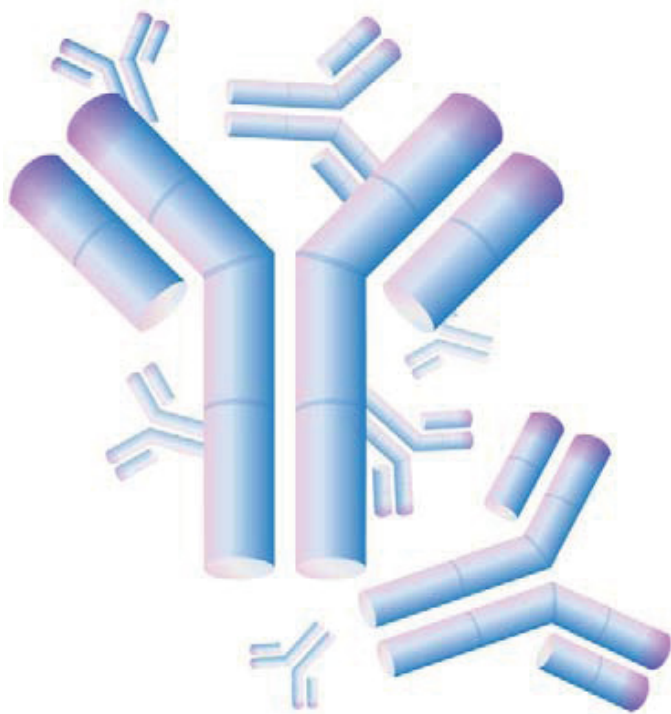


GE Healthcare



# 抗体纯化手册



# Handbooks from GE Healthcare



## **Protein Purification**

Handbook  
18-1132-29

## **Gel Filtration**

Principles and Methods  
18-1022-18

## **Affinity Chromatography**

Principles and Methods  
18-1022-29

## **Antibody Purification**

Handbook  
18-1037-46

## **Cell Separation Media**

Methodology and Applications  
18-1115-69

## **Ion Exchange Chromatography & Chromatofocusing**

Principles and Methods  
11-0004-21

## **Purifying Challenging Proteins**

Principles and Methods  
28-9095-31

## **GST Gene Fusion System**

Handbook  
18-1157-58

## **Hydrophobic Interaction and Reversed Phase Chromatography**

Principles and Methods  
11-0012-69

## **2-D Electrophoresis using immobilized pH gradients**

Principles and Methods  
80-6429-60

## **Microcarrier Cell Culture**

Principles and Methods  
18-1140-62

## **Recombinant Protein Purification Handbook**

Principles and Methods  
18-1142-75

## **Isolation of mononuclear cells**

Methodology and Applications  
18-1152-69

# 目 录

引言: .....	6
<b>第一章 抗体的结构、分类和产生</b> .....	8
自然来源:.....	8
遗传工程改造的来源.....	12
参考文献.....	14
<b>第二章 样品处理</b> .....	15
来源和可能的污染物.....	15
重组抗体以及片段的提取.....	16
血清、腹水、细胞悬浮物或者细胞裂解物的净化.....	18
样品纯化前处理.....	19
脱盐和更换缓冲液.....	25
<b>第三章使用亲和色谱层析进行小规模纯化</b> .....	44
注意事项.....	44
在最初的纯化后进一步纯化.....	46
G蛋白和A蛋白结合不同的IgG.....	48
使用G蛋白Sephacryl介质的纯化.....	50
纯化Fab和Fab' <sub>2</sub> 片段.....	54
预装有G蛋白Sephacryl High Performance的多孔板和柱子.....	55
使用MabSelect or MabSelect SuRe装Tricorn 10/100柱.....	85
纯化其它类型的抗体.....	95
使用定制配体制作免疫特异性纯化柱材.....	101
<b>第四章 在初始纯化后除去特定的污染物</b> .....	106
牛免疫球蛋白.....	106
白蛋白和铁传递蛋白.....	107
$\alpha_2$ -巨球蛋白和结合球蛋白.....	110
双体和聚集体.....	110
DNA和内毒素.....	111
亲和配体.....	112
<b>第五章 使用ÄKTAdesign系统进行抗体的自动纯化</b> .....	113
<b>第六章 多步纯化策略</b> .....	116
多步纯化的具体例子.....	116
<b>第七章 大规模分离纯化</b> .....	124

单克隆抗体纯化中的技术平台.....	124
过程设计.....	125
单克隆抗体纯化中的高产率介质.....	126
可以加快下游操作速度的预装可丢弃的材料.....	126
客户定制的柱材和柱子.....	127
<b>附件1 G蛋白和A蛋白Sepharose产品的特性.....</b>	<b>128</b>
<b>附件2 在纯化过程中的分析型检测.....</b>	<b>136</b>
<b>附件3 免疫共沉淀技术.....</b>	<b>138</b>
<b>附件4 使用HiTrap柱进行亲和纯化的一般建议.....</b>	<b>141</b>
<b>附件5 柱子的灌装和准备.....</b>	<b>143</b>
<b>附件6 生物样品的保存.....</b>	<b>146</b>
<b>附件7 线性流速(cm/h)和体积流速(ml/min)的相互转化.....</b>	<b>147</b>
<b>附件8 转化数值：蛋白，柱压.....</b>	<b>148</b>
<b>附件9 不同纯化技术的基本建议和条件.....</b>	<b>149</b>
产品目录.....	155
订货信息.....	157

## 常用简写与缩写:

A<sub>280</sub>: 在特定波长下的UV吸收值  
(在这里是指280nm处的吸收值)

AC: 亲和色谱层析

AIEX: 阴离子交换色谱层析

APMSF: 甲基磺酰氟  
(丝氨酸蛋白酶抑制剂)

BSA: 牛血清白蛋白

cGMP: 目前好的处理习惯

CHO: 中国大鼠卵巢

CIEX: 阳离子交换色谱层析

CIP: 原位清洗

CV: 柱体积

DNAse: 脱氧核糖核酸酶

DOC: 脱氧胆酸盐

DS: 脱盐处理

EDTA: 乙二胺四乙酸

EGTA: 乙二醇二乙醚二胺四乙酸

ELISA: 酶联免疫吸收检测技术

F(ab')<sub>2</sub>: 具有两种抗原活性的片段

Fragment: 由胃蛋白酶酶解获得的结合位点

Fab: 抗原结合片段

Fragment: 通过木瓜蛋白酶酶解获得

Fc: 可以被结晶的片段

Fragment: 通过木瓜蛋白酶酶解获得

Fv: 包含有不稳定的片段

Fragment: 抗原结合结构域

GF: 胶层析

GST: 谷胱甘肽转移酶

HCP: 宿主细胞蛋白

HIC: 疏水相互作用色谱层析技术

HMW: 高分子量

HAS: 人血清白蛋白

IEX: 离子交换色谱层析

IgA, IgG, etc: 不同种类的免疫球蛋白

LC-MS: 液相色谱层析-质谱连用

LMW: 低分子量

MAB: 单克隆抗体

MPa: 百万帕斯卡

Mr: 相对分子量

MS: 质谱

n: 有活性的, 就如同n-蛋白A

NHS: N-羟基琥珀酰亚胺

PBS: 磷酸盐缓冲液

PEG: 聚乙烯乙二醇

PI: 等电点, 此时蛋白的表面静电荷为零

PMSF: 苯甲基磺酰氟

Psi: 每平方英尺上的磅值

PVDF: 聚偏氟乙烯

PVP: 聚乙烯基吡咯烷酮

r: 重组的, 就如同在rProtein A 中

RNAse: 核糖核酸酶

RPC: 反相色谱层析

ScFv: 单链Fv片段

SDS: 十二烷基磺酸钠

SDS-PAGE: 十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳

TCEP: 磷酸三(2-氯乙基)酯

Tris: 三羟甲基氨基甲烷

v/v: 体积比体积

w/v: 重量比体积

# 引言:

抗原-抗体相互作用的多样性和我们能够有能力利用这种相互作用，使得我们在很多方面可以利用抗体和抗体片段，比如说在通常研究中使用的免疫化学技术，或者在诊断和疾病治疗中的应用。

现代重组表达技术的广泛使用使我们能够无限的将免疫球蛋白、免疫球蛋白片段、蛋白表达标签或者特定的蛋白进行重组表达，进而使得我们操作这些蛋白更加便利。

这本手册的主要目的正是介绍如何去最有效的制备样品，并说明了在实验室中最常用的制备各种各样的抗体或者抗体片段的方法。手册中也对实验室级制备抗体提出了一些建议，并在一开始就把要考虑的因素列在图1中。

多步的大量工业级制备抗体的策略也在本手册中作了介绍。

尽可能的，我们设计了一些例子和应用策略来方便读者直接使用，至少也给出如何开始优化一个特定的纯化过程的方法。

我们希望这本既有一般的理论指导又有具体实例的手册能够让读者在纯化任何抗体时都能获得成功。

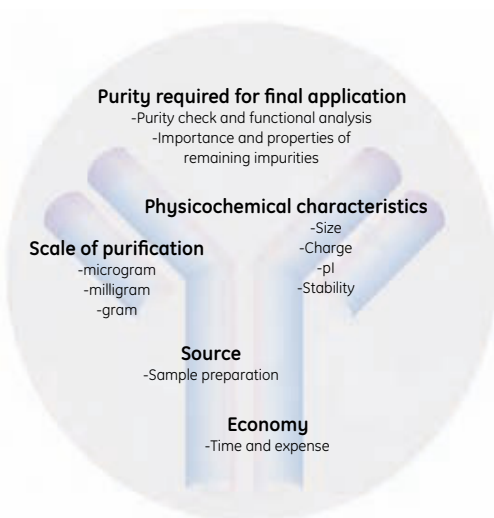


图1 在纯化时应该考虑的因素

## 标识和缩写：



这个标识代表基本的建议或者重要的步骤，或在特定条件下最为推荐的操作



这个标识代表这个建议是强制性的，在这里应该特别加以注意



重点强调的化学物质、缓冲液和仪器



标识了实验的操作步骤

# 第一章 抗体的结构、分类和产生

抗体是免疫球蛋白分子家族的成员，免疫球蛋白隶属于人体体液免疫系统，并在人体血浆总蛋白中大约占20%。在淋巴细胞的表面，人体外分泌物和血管外流质中存在着不同种类的免疫球蛋白，抗体则是母体受外来的物质或者内源的某些物质刺激而产生的母体蛋白。这种效应是母体抵御外来入侵的物质或者有机体而保护自身的一种方式。在这个过程中，B-淋巴细胞能够使用一种特殊的受体来识别并绑定抗原决定簇，从而促使一系列分裂和分化过程，使B-淋巴细胞变为体细胞，正是这些淋巴细胞或者体细胞合成了抗体。

自然来源:

## 免疫球蛋白

所有的免疫球蛋白，不论它的专一性是什么，都有一个共同的结构组成：四个多肽链，其中两个是相似的重链（H链），它们上面共价的连接着寡糖基团；另外两个是没有寡糖基团的轻链（L链）。一个二硫键将其中的一个重链和轻链连接起来，有时重链之间也会通过二硫键连接，这些二硫键处在一个称为绞链区的柔性部位上，这个区域由12个氨基酸组成，且易于被蛋白酶或者化学物质所切割。每一个围绕二硫键并由多肽链折叠成的球形区域都被称为一个结构域。在这四条链中，每一条都有一个保守的C区域和可变的V区域，分别存在于多肽的氨基端和羧基端。重链和轻链各有一个可变区域，然而，重链有三个保守区域，轻链只有一个。重链和轻链的可变区形成两个相似的抗原结合区域(抗体结合抗原的区域)。抗体作为的效应因子作用，例如胎盘运输或者抗原依赖的细胞毒性，都是由免疫球蛋白的Fc区域的结构决定的，图1-1表示这种最典型的H2L2的免疫球蛋白的结构。

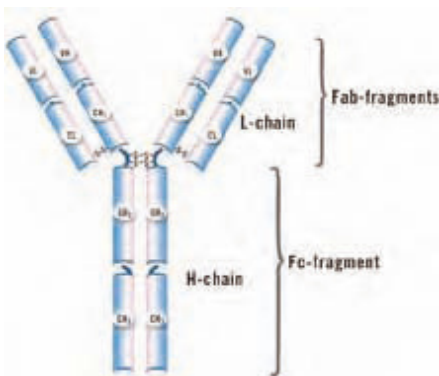


图1.1 典型的免疫球蛋白的基本H2L2结构



依据重链的组成，免疫球蛋白可能分成五个主要类型：IgG ( $\gamma$ )，IgA ( $\alpha$ )，IgM ( $\mu$ )，IgD ( $\delta$ ) and IgE ( $\epsilon$ )，轻链的类型总共有两种： $\kappa$  和  $\lambda$ ，单独的一个抗体分子只可能含有这两种轻链类型的一个，在人体中，这两种类型的比例是60:40,而在老鼠中则是95：5。图1.2和表1.1总结了人和老鼠中抗体的种类和基本的物理化学特性。

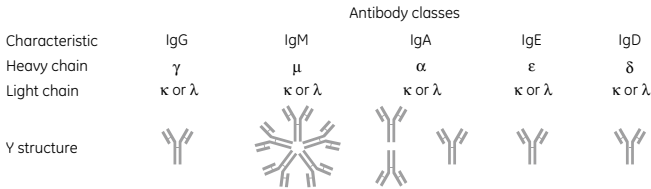


图 1.2 免疫球蛋白的物种基本类型

1. 抗体G、D、E属于单体抗体类型H2L2。
2. 在血清中的IgA主要是单体类型的，然而在分泌物如唾液和泪液中，它主要是由双体构成的，结合部位是装配肽和J-多肽链（H2L2）—SC—J—（H2L2）。这种二聚体有四个抗原结合位点。
3. IgM是由5个单体的组成的（H2L2）<sub>5</sub>，它有10个抗原结合位点。
4. IgG和IgA是因为小的氨基酸序列上的差异而分成的两个亚家族。在人类中，IgG的四个亚类型IgG1、IgG2、IgG3、IgG4，共有g1，g2，g3和g4四种重链。而在老鼠中，IgG家族有也有四个亚家族IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3，其对应的重链为g1，g2a，g2b和g3。这些重链在本质上都是大小相似、有共同的电荷性质的，但是它们的氨基酸组成是不同的。人类的IgA家族有IgA1和IgA1两种，而在老鼠中仅有一种。

免疫球蛋白	重链	轻链	沉淀系数	相对分子量	重链分子量	碳水化合物含量 (%)	A280吸收值	等电点
IgG <sub>1</sub>	$\lambda_1$	$\kappa_1 \lambda$	7S	146000	50000	2—3	13.8	5.0-9.5
IgG <sub>2</sub>	$\lambda_1$	$\kappa_1 \lambda$	7S	146000	50000	2—3		5.0-8.5
IgG <sub>3</sub>	$\lambda_1$	$\kappa_1 \lambda$	7S	170000	60000	2—3		8.2-9.0
IgG <sub>4</sub>	$\lambda_1$	$\kappa_1 \lambda$	7S	146000	50000	2—3		5.0-6.0
IgM	$\mu$	$\kappa_1 \lambda$	19S	900000	68000	12	12.5	5.1-7.8
IgA <sub>1</sub>	$\alpha$	$\kappa_1 \lambda$	7S	160000	56000	7—11	13.4	5.2-6.6
IgA <sub>2</sub>	$\alpha$	$\kappa_1 \lambda$	7S	160000	52000	7—11		5.2-6.6
IgD	$\delta$	$\kappa_1 \lambda$	7S	184000	68000	12	17.0	
IgE	$\epsilon$	$\kappa_1 \lambda$	8S	190000	72000	12	15.3	

表 1.1a 人源的免疫球蛋白的物理化学属性

免疫球蛋白	重链	轻链	沉淀系数	相对分子量	重链分子量	碳水化合物含量(%)	等电点
IgG <sub>1</sub>	$\lambda_1$	$\kappa_1\lambda$	7S	146000	50000	2-3	5.0-9.5
IgG <sub>2a</sub>	$\lambda_{2a}$	$\kappa_1\lambda$	7S	146000	50000	2-3	5.0-8.5
IgG <sub>2b</sub>	$\lambda_{2b}$	$\kappa_1\lambda$	7S	170000	60000	2-3	8.2-9.0
IgG <sub>3</sub>	$\lambda_3$	$\kappa_1\lambda$	7S	146000	50000	2-3	5.0-6.0
IgM	$\mu$	$\kappa_1\lambda$	19S	900000	68000	12	5.1-7.8
IgA	$\alpha$	$\kappa_1\lambda$	7S	160000	56000	7-11	5.2-6.6
IgD	$\delta$	$\kappa_1\lambda$	7S	184000	68000	12-14	
IgE	$\epsilon$	$\kappa_1\lambda$	8S	190000	72000	12	

表 1.1b 鼠源的免疫球蛋白物理化学属性

## IgY免疫球蛋白

鸟类产生的免疫球蛋白IgY在实际应用中有很多优点。鸟类能够产生一种能对高度保守而且免疫性较弱的哺乳动物的抗原具有免疫作用的增强型抗体。因为鸟类和哺乳动物的系统进化差异性较远，所以IgY可以被用作一类专门抗哺乳动物抗原且只产生较少背景反应的专一性抗体。

IgY免疫球蛋白型抗体通常是从小鸡中生产的，这是因为蛋比血液样品更加容易收集。每周收集到的少数蛋产生的免疫球蛋白的量就能够同从一只免疫过的兔子上不停的吸血得到的抗体数量相当。

## 抗体片段

限制性酶切免疫球蛋白产生的具有生物活性的抗体片段能够被用作研究抗体的结构或者作为一种特殊的试剂。这些片段也可以通过重组技术来获得。

免疫球蛋白的片段化能够产生一些特殊的应用价值，例如，经过处理而不能产生免疫反应的老鼠的Fab，Fab' 和F(ab')<sub>2</sub>在可能在癌症的治疗中得以应用，因为它们能够比全长的免疫球蛋白更快的进入肿瘤和被循环系统清除。

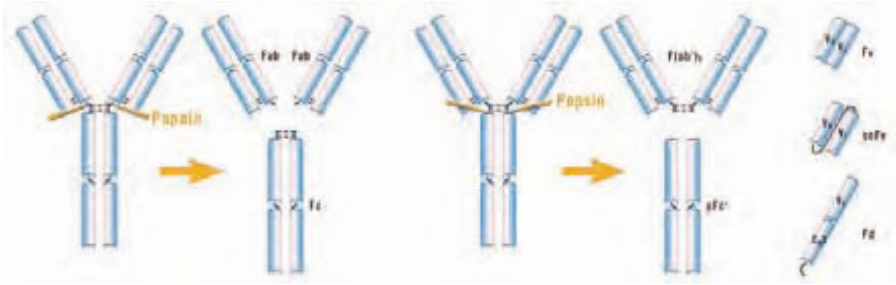


图 1.3 通过酶切产生的抗体片段

最常见的抗体片段类型是：

**Fab和Fc片段：**使用木瓜蛋白酶水解，产生两个Fab片段（抗原结合）和一个Fc片段（能够被结晶）。

**Fab' <sub>2</sub>片段：**使用胃蛋白酶水解，产生一个具有两个抗原结合位点和一个连接位点的片段，相当于两个Fab。

**Fv片段：**一个能够结合抗原的不稳定片段，它有两个区域：VL和VH。

**单链Fv片段（scFv）：**scFv通常是由重组技术产生的一个稳定的Fv，它由一个装配肽连接两个V区域。

**Fd片段：**H链的氨基末端。

## 多克隆抗体

通常情况下，一个宿主能产生大量的不同的抗体来识别不同的抗原决定簇（抗体结合位点）。每一个特定的抗体都是由不同的血浆细胞产生的。血清是一个多克隆抗体的非常好的来源，这些抗体在免疫化学技术中被广泛的应用，且大多使用粗血清作为来源。有时候会进一步纯化，或者是分离其中的某一类型的多克隆抗体或者是只分离其中的一种抗体。

## 单克隆抗体

单克隆抗体（MAbs）是由融合细胞产生的高度专一的抗体。这些融合细胞是由分离的血浆细胞原和不凋亡细胞融合成的。这些融合细胞都是单克隆的，并且能够只产生单一的单克隆抗体。

这种单克隆抗体在应用中有着巨大的优势，特别是在临床治疗中。单克隆抗体大都以从融合细胞悬浮培养物中获取，或者鼠同源肿瘤融和细胞粗提物中提取。

通过使用融合细胞制备单克隆抗体技术，人类成功的获取了老鼠的单克隆抗体，但是这同时也意味着在这些应用到疾病治疗的同时也有免疫反应的危险（只有人类的抗体才能对人类没有免疫反应）。但是，随着遗传技术抗体和抗体片段化技术的发展，人类可能能够克服鼠的单克隆抗体带来的免疫反应的副作用（见后页的遗传改造的来源）。

## 遗传工程改造的来源

重组表达技术在处理和生产抗体或者抗体片段中应用已越来越多。

对于抗体作为一种治疗试剂来应用，它必须具有以下优点：长的血清半衰期，低免疫反应，对抗原的高度亲和性和能够有效的压制抗原的活性。这些特性都可以通过现代遗传技术得以提高。为了降低免疫反应，鼠-人杂合抗体已经被制造出来，它们有人类抗体的保守区和鼠抗体的可变区。另外一种降低免疫反应的方法是制造具有人类抗体序列的单克隆抗体。抗体噬菌体文库和具有部分人类免疫系统的转基因老鼠为产生具有全部人类序列的抗体提供了新的方法。在参考文献1中，总结归纳从转基因老鼠中获取低免疫反应性的人类抗体的方法。



图 1.4 针对野生型和重组型抗体的各种修饰现在都已经成为现实

## 抗体片段

图1.4展示了各种各样的修饰单克隆抗体的方法。用酶解的方法产生抗体片段在前面的图1.3中已经详细描述了。尽管单克隆抗体是生物制药中增长最快的部分，然而重组抗体片段，例如经典的单价抗体片段（Fab，scFv等），成为一个新的发展点（见参考文献2）。然而，被称作 diabodies, triabodies, minibodies, 或者 single-domain antibodies 的重组抗体片段还没有得到生物制药的广泛接受。这些片段同全长一样，都具有很好的专一性，而且可以能够更加经济的被生产，以在诊断或者治疗中加以应用。参考文献2就是对这一问题加以了总结。

## 重组抗体

在研究、诊断和治疗中，抗体融合蛋白有着广泛的应用。把抗体的全长或者部分同特定的蛋白融合到一起能够使抗体到达宿主的某个特殊部位（例如，通过血-脑屏障），或者运输酶到某个部位（例如，用于治疗或者在某个部位使用药物），或者向某个部位运输毒素分子用于治疗。

抗体融合蛋白可以被分为两类：

1. Fab和Fab'<sub>2</sub>融合型，这种类型保留了一个或者两个抗原结合位点，融合蛋白取代或者连接在Fc区域上。
2. Fc融合型，或者叫做immuno-adhesions，这种类型中的抗原识别位点被融合体所取代，但是Fc区被保留。依据涉及的免疫球蛋白的类型，Fc融合型保留了效应子的功能，并能够使融合体具有更长的半寿期。

## 具有标签的重组抗体和片段

扩增一个具有标签并且已知大小和生化性质的蛋白时，在蛋白的分离和纯化就会很方便。例如，六聚组氨酸或者GST标签在各种量级的蛋白纯化中都被广泛的应用，在某些时候，蛋白产量因此还会增加。加入标签对于没有Fc区域的蛋白纯化会有很大帮助（Fc区能够增强蛋白在Protein A Sepharose 或者 Protein G Sepharose 上的挂柱能力）。

抗原决定簇标签（能够与抗体专一而且紧密结合的小的氨基酸序列）在很多免疫化学方法中被广泛的用来检测和纯化。表1.2总结常被应用的标签的优点和缺点：

优势	劣势
可以提高蛋白的可溶性和稳定性	标签有时候能够影响到蛋白的结构和折叠，进而影响蛋白的活性。
目标蛋白的信息可以通过标签获取	
标签为表达提供了一个标志	如果标签必须要被切掉，通常不能够达到100%的切割效率，因此，纯化到的抗体中可能有残留的标签的氨基酸序列。
可以通过亲和色谱层析在变性或者不变性条件下简单的进行纯化。实验室常用的两步纯化法就能实现蛋白的纯化。	有时候，重组蛋白会因为错误的折叠而聚集称为包含体，包含体中的蛋白没有任何的生物活性，而将包含体蛋白复性成为有活性的蛋白非常困难。
检测蛋白上面的标签而不是蛋白的一部分，这可以应用在诸如结构生物学平台上。	由于在实际操作中，标签的切除和纯化都有着实际的困难，所以有些出版物限制标签蛋白的使用。
有一些标签能够在变性条件下牢固的结合在亲和柱上，这就为柱上复性提供了良好的条件。	由于在实际操作中，标签的切除和纯化都有着实际的困难，所以有些出版物限制标签蛋白的使用。
很适合从大量的培养基中分离纯化大量的胞外蛋白。有一些标签能够在变性条件下牢固的结合在亲和柱上，这就为柱上复性提供了良好的条件。	由于在实际操作中，标签的切除和纯化都有着实际的困难，所以有些出版物限制标签蛋白的使用。

表1.2 具有标签的重组抗体的优势和劣势



关于蛋白表达和纯化以及包含体处理的相关建议均写在两本手册中：重组蛋白纯化手册---策略与方法（货号：18-1142-75）和GST基因融合系统手册（18-1157-58），两本书都由GE healthcare 出版。

## 参考文献：

1. Lonberg, N. Human antibodies from transgenic animals. Nature Biotechnology 23 (9), 1117-1125 (2005).
2. Holliger, P. and Hudson, P. J. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. Nature Biotechnology 23 (9), 1126-1136 (2005).

## 第二章 样品处理


### 来源和可能的污染物

抗体或者抗体片段通常是从天然或重组体系中提取的，表2.1总结了通常的来源。

来源的选择会影响到样品处理和纯化的步骤，因为不同来源的杂质和需要的目标分子纯度是不同的。然而，通常情况下，选择一个对目标分子高度亲和的柱子能够一步得到高纯度的样品，且尽可能的减少污染。

	分子类型	产量	特定的污染物
来源：野生型			
人类血清	多克隆的 IgG, IgM, IgA, IgD, IgE	IgG8-16mg/ml, IgM0.5-2mg/ml, IgA1-4mg/ml, IgD10-400mg/ml, IgE0.4mg/ml	白蛋白, 转运蛋白, $\alpha$ 大球蛋白和其它血清蛋白
杂交瘤细胞悬浮培养物	单克隆	多达1mg	苯酚红, 白蛋白, 转运蛋白, 牛IgG, $\alpha$ 大球蛋白和其它血清蛋白, 或者病毒
无血清的杂交瘤细胞悬浮培养物	单克隆	1-4mg/ml	白蛋白, 转运蛋白, 常常取决于培养基的情况
腹水	单克隆	1-15mg/ml	酯类, 白蛋白, 转运蛋白, 脂蛋白, 内源的IgG和其它的宿主蛋白
蛋清	IgY	3-4mg/ml	酯类, 脂蛋白
来源：重组表达			
胞外蛋白, 表达到上清里面	挂有表达标签的的抗体, 抗体融合蛋白, Fab, 或者其片段	取决于表达系统	宿主来源的蛋白, 如大肠杆菌中的蛋白等, 通常污染物较少
胞内表达		取决于表达系统	来自宿主的蛋白, 如大肠杆菌或者噬菌体等




表 2.1 天然和重组型抗体主要污染物来源的总结

 细胞体系的优点是体系可以无限扩大而且产品品质高，腹水表达则产品数量受限而且在有些国家受到法律限制。

## 重组抗体以及片段的提取

目标抗体的来源和位置情况决定了提取的步骤，细菌或者哺乳来源，胞内或者胞外表达系统，蛋白可溶还是包含体，这些都需要了解。

在提取过程中需要选择合适的缓冲液，在表2.2中列举了常用的缓冲液以及其活性。选择提取的技术取决于可用的仪器和提取的规模大小，在表2.3中列举了常用的提取步骤。

-  使用尽可能温和的提取手段，某些手段可能会使蛋白水解  
仅在必须稳定蛋白或者增强提取效果时才使用添加剂（表2.2）
-  选择容易被除去的添加剂，否则会增加纯化的步骤。
-  当需要溶解蛋白时，可以选择加入8M尿素或者6M盐酸胍，例如在纯化包含体时。



	使用条件	使用目的
缓冲液类型		
Tris	20mM, pH7.4	稳定pH
NaCl	100mM	保持溶液中的离子强度
EDTA	10mM	通过螯合金属离子来降低溶液的氧化性
蔗糖或者葡萄糖	25mM	稳定溶酶体外膜，减少蛋白酶的污染
离子或者非离子型去垢剂		稳定溶解性较差的蛋白，想要获得关于处理包含体的具体策略，可以参考重组蛋白纯化手册
核糖核酸酶或者脱氧核糖核酸酶	1ug/ml	降解核酸以减少溶液的粘度
蛋白酶抑制剂		
PMSF	0.5-1mM	抑制丝氨酸蛋白酶
APMSF	0.4-4mM	抑制丝氨酸蛋白酶
Benzamidine-HCl	0.2mM	抑制丝氨酸蛋白酶
Pepstatin	1uM	抑制天冬氨酸蛋白酶
Leupeptin	10-100um	抑制半胱氨酸和丝氨酸蛋白酶
Chymostain	10-100um	抑制一凝如蛋白酶和半胱氨酸蛋白酶
Antipain-HCl	10-100um	抑制半胱氨酸和丝氨酸蛋白酶
EDTA	2-10mM	抑制金属蛋白酶
EGTA	2-10mM	抑制金属蛋白酶
还原试剂		
DTT	1-10mM	保持半胱氨酸的还原性
DET	1-10mM	保持半胱氨酸的还原性
TCEP	1-10mM	保持半胱氨酸的还原性
其它试剂		
甘油	5%-10%	稳定蛋白质，最多可以用到多达50%


表2.2 分离提取重组抗体时常用的缓冲液和添加剂



PMSF是一种危险的化学品，在水相中的半寿期大约为35分钟，PMSF通常以10mM或者100mM的浓度溶于异丙醇中，并置于-20摄氏度中。

提取过程	经典条件	优缺点
温和的 细胞裂解（渗透压裂解）	两体积的水和一体积的细胞	减少了蛋白酶的释放，但是产量也会减少
酶解	0.2mg/ml的溶菌酶在37摄氏度酶解15分钟	仅用于实验室水平操作，有时候会同机械破碎结合
中等程度裂解 同研磨剂一起研磨 例如：玻璃小球	在细胞中加入小玻璃珠，vortex搅拌，重复5次后收集上清	机械手段，化学手段对于细胞的裂解可能不是很重要，但是对于后面的除去细胞碎片和纯化步骤却非常重要
冻融法	冷冻细胞，解冻用枪尖或者vortex轻轻混匀后温浴离心，保留上清	多次重复进行
剧烈裂解 超声破碎或球磨	参照说明书	仅用于小规模，释放的核酸会使溶液的粘度增高（DNA酶会有助于降低粘度），包含体必需被重溶
Manton-Gaulin homogenizer	参照说明书	大规模
French press	参照说明书	实验室规模
分级沉淀	见下文	沉淀需要被重旋


表2.3 重组抗体或抗体片段提取的例子

 提取物必须在低于环境温度下溶于合适的缓冲液中（详见表2.2），这是为了保持合适的PH值和离子强度，以确保样品的稳定性。如果样品由于高浓度宿主核酸而太粘稠不容易处理的话，可以继续超声一段时间，或者参照以下A-C的步骤：

- A. 加入脱氧核糖核酸酶至终浓度10ug/ml。
- B. 或者加入核糖核酸酶A至终浓度10ug/ml，并加入脱氧核糖核酸酶至终浓度5ug/ml，冰浴10-15分钟。
- C. 或者将裂解物压过一个细针，此时可以不加酶。

## 血清、腹水、细胞悬浮物或者细胞裂解物的净化


离心或者过虑是实验室净化样品最常用的手段，这些方法适用于任何来源的少量样品。


 离心或者过滤后马上进行色谱层析纯化。


脂类或者脂蛋白能够阻塞色谱层析的柱子，因此在过柱之前必须除去。腹水中含有较高浓度的脂蛋白，除去脂蛋白的方法见下文。


## 离心和过滤

离心用于除去大多数颗粒物质，如细胞碎片。如果在离心后样品仍然混浊，可以再选用一次5um的滤膜过滤，再用表2.4中列的滤膜再次过滤。

 对于少量的样品或者蛋白能吸附在滤膜上，可以用10000×g离心15分钟。

 对于细胞样品，可以在40000到50000×g离心15分钟，若样品需要短处理时间，可以减少到10到15分钟。

 离心时使用冷冻功能，并且在冷室或者离心机中提前预冷转子。


 血清样品可以在离心之后用玻璃绒毛过滤以除去剩余的酯类。

过滤能除去颗粒物质。醋酸纤维素膜和PVDF膜能够有效的减少对蛋白的非特异性吸附。在色谱层析前，依照色谱层析的胶粒大小选择合适的滤膜孔径，这些列在表2.4中。

滤膜通常的孔径大小	色谱层析柱中柱材的颗粒大小
1um	90um或者更大
0.45um	30或者40um
0.22um	3, 10, 15um, 或者需要更加干净的样品时采用

表2.4 选择滤孔大小

 用一个预跑来检测目标蛋白的收率，因为有时候样品可能被滤膜表面非特异性吸附。

 过滤器可能会饱和——就是滤膜有一个特定的载量，因此在建立一个纯化步骤时，需要考虑这些。

## 样品纯化前处理

在样品纯化前要做的主要工作有：

- 除去某些杂质，如脂蛋白或者苯酚红等。
- 除去大量的杂质，如粗品中的含量大的杂蛋白等。
- 更换缓冲液并除盐，把样品换到合适的缓冲液中（PH和盐浓度），并除去没有用处的小分子。

## 纯化前除去特定的杂质

### 脂蛋白

脂蛋白和其它含脂物质能够阻塞色谱层析柱，最好能在纯化前除去，腹水通常含有高浓度的脂蛋白。

在这里讨论的两种方法都适用于血清、腹水和细胞悬浮培养物。



离心通常能够避免过滤时造成的蛋白非特异性吸附，血清蛋白样品可以通过玻璃绒毛过滤以除去酯类。

#### 方法一：

在二价离子存在的情况下，硫酸右旋葡萄糖酐能够沉淀脂蛋白，沉淀可以通过离心除去。步骤如下：

1. 每毫升样品中加入0.04ml 10%的硫酸右旋葡萄糖酐和1ml 1M的CaCl<sub>2</sub>;
2. 混合15分钟;
3. 10,000g离心10分钟;
4. 丢弃沉淀;
5. 使用脱盐柱将样品换到适合纯化的缓冲液中;


#### 方法二：

PVP能产生一个pH值依赖的沉淀效应，PVP在pH=7.0时能够沉淀b-脂蛋白和球蛋白，但是脂蛋白不能够在低于pH4.0时沉淀。步骤如下：

1. 加入固体PVP到样品溶液中，至最终浓度为3%（w/v）；
2. 在4度搅拌4小时；
3. 17,000g离心；
4. 丢弃沉淀；
5. 使用脱盐柱将样品换到适合纯化的缓冲液中；

## 苯酚红

苯酚红是一种在实验室细胞培养中的pH指示剂，虽然并不直接的影响纯化，但是苯酚红可能结合到某些纯化介质上，应该尽可能早的被除去。苯酚红能够在pH>7时结合在阳离子柱上。

 使用脱盐柱除去苯酚红，并且把样品转移到合适的缓冲液中以做进一步纯化。

## 使用沉淀法去除大量的杂质 低分子污染物

如果样品中含有大量的低分子污染物，使用25页中叙述的脱盐柱作为第一步色谱层析制备样品。

## 分级沉淀

增加盐浓度能够增强蛋白间的疏水相互作用，疏水性的不同导致了一个选择性沉淀。分级沉淀是在实验室级别经常使用的，在少量的商业生产中也用于除去小量样品中的大量污染物。当在实验室水平使用HiTrap™亲和柱纯化时就不需要分级沉淀。

分级沉淀可以通过三种方法除去大量杂质，如图2-1所示。

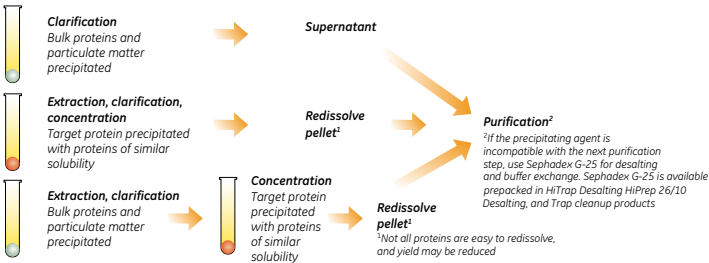



图 2.1 沉淀法的三种操作方法

 沉淀技术受到温度、pH和蛋白样品浓度影响，这些因素都可以被控制，以保证重复性结果。

 大多数沉淀技术不适合大规模生产。

在表2.5中，总结了沉淀剂的例子。最常用的方法是使用硫酸铵，在这里有详细叙述：

沉淀剂	使用的典型条件	样品类型	备注
硫酸铵	下文有叙	大于1mg/ml蛋白，特别使免疫球蛋白	用于稳定的蛋白，不会变性，上清可以直接上到HIC，减少了脂蛋白含量
右旋硫糖苷	加入0.04 ml of 10% 右旋硫糖苷和1 ml of 1 M CaCl <sub>2</sub> /ml混匀 15 min并10 000 × g离心	可用于高脂蛋白的样品，例如腹水	沉淀脂蛋白
乙烯聚合物	加入3% (w/v)后搅拌4小时，并17000×g离心	可用于高脂蛋白的样品，例如腹水	可以选择右旋硫糖苷
PEG (Mr > 4000)	最多到20%	血浆蛋白	没有变性，上清可以直接过离子交换或亲和柱，完全除去比较困难
丙酮（冷的）	在0摄氏度最多到80%，在最高转速离心后收集小球		可能会不可逆的使蛋白变性，适合于小肽的制备或者制备电泳样品
聚乙烯亚胺	0.1% (w/v)		沉淀聚集的核酸蛋白
硫化精蛋白	1% (w/v)		沉淀聚集的核酸蛋白
硫酸链霉素	1% (w/v)		沉淀核酸
辛酸	1:15 (w/w)	抗体含量应该大于1mg/ml	沉淀血清或者腹水中的大量蛋白，仅把免疫球蛋白留在溶液中

想要获得详细信息可以参考：Scopes, R. K., Protein Purification, Principles and Practice, Springer, (1994), Janson, J. C. and Rydén, L., Protein Purification, Principles, High Resolution Methods and Applications, 2nd ed. John Wiley and Sons, Inc., New York, (1998)

表2.5 沉淀技术例子

## 硫酸铵沉淀

硫酸铵沉淀通常作为蛋白浓缩纯化的第一步。这个方法通常可以有效的除去大量白蛋白、铁传递蛋白和其它大量可溶杂质。

然而，并不推荐用盐来沉淀单克隆抗体，因为盐析单克隆抗体会被宿主的多克隆抗体所污染。这个方法的原理是增加硫酸铵的浓度使其达到抗体开始被析出，不同的抗体在不同的浓度时析出，这个过程可以从粗品中除去杂蛋白。盐浓度需要被优化以除去杂质而不是需要的抗体。进一步增加盐浓度可以使抗体析出，如果抗体不能够被安全的沉淀并且重溶，那么只使用第一个步骤。

HIC是很好的下一步纯化措施，因为样品中已经含有高浓度的盐，可以不需处理直接上到HIC柱子上，高浓度的盐增强了蛋白疏水部分和柱子的相互作用。

### 所需溶液：

饱和硫酸铵溶液：100ml蒸馏水中加入100g硫酸铵，搅拌溶解；

1M Tris Hcl pH8.0；

作为第一步纯化的缓冲液

1. 过滤(0.45um),或者10,000g 4度离心；
2. 在10份样品中加入1份Tris Hcl pH8.0，以保持pH值；
3. 温和搅拌，逐滴加入硫酸铵溶液到50%饱和度，搅拌一小时；
4. 10,000g离心20分钟



离心后丢弃脂蛋白，样品可以通过玻璃绒毛以出去脂类。

5. 去除上清，用等体积的硫酸铵重悬洗涤沉淀两次  
(例如，不能够重悬蛋白或者进一步沉淀蛋白的溶液)，再次离心；
  6. 用少量下步中所用缓冲液重悬沉淀；
  7. 硫酸铵可以在superdex G25中得到除去；
- \*通过调整硫酸铵浓度既可以沉淀目的分子，又可以沉淀杂质。



一些抗体可能被直接使用固体硫酸铵所破坏，硫酸铵沉淀应该尽可能的使用液体，在重悬时尽可能避免气泡的产生。



在硫酸铵沉淀后，使用HIC作为后续步骤是最方便的。



通常，可重复的纯化过程，应该避免使用硫酸铵沉淀，而选择用proteinG 或proteinA Sepharose柱子。



通常，盐沉淀应该在蛋白浓度低于1mg/ml时进行。



加入等体积的饱和溶液（甚至35%-40%），能够减少铁转移蛋白和白蛋白的污染。





加入硫酸铵的量依据温度的不同而不同，表2.6列出了20度时所需要的量：

硫酸铵终浓度，饱和度/%																		
	10	20	25	30	33	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	90	100	
硫酸铵初浓度，饱和度/%	每一升溶液加固体硫酸铵的克数*																	
	0	56	114	114	176	196	209	243	277	313	351	390	430	472	516	561	662	767
	10		57	86	118	137	150	183	216	251	288	326	365	406	449	494	592	694
	20			29	59	78	81	123	155	189	225	262	300	340	382	424	520	619
	25				30	49	61	93	125	158	193	230	267	307	348	390	485	583
	30					19	30	62	94	127	162	198	235	273	314	356	449	546
	33						12	43	74	107	142	177	214	252	292	333	426	522
	35							31	63	94	129	164	200	238	278	319	411	506
	40								31	63	97	132	168	205	245	285	375	469
	45									32	65	99	134	171	210	250	339	431
	50										33	66	101	137	176	214	302	392
	55											33	67	103	141	179	264	353
	60												34	69	105	143	227	314
	65													34	70	107	190	275
	70														35	72	153	237
	75															36	115	198
	80																77	157
90																	79	

表 2.6 在20摄氏度时不同饱和度的溶液所需要的硫酸铵的量

## 羊脂酸沉淀

在从血清和腹水中沉淀大量蛋白时，羊脂酸同硫酸铵一样有效。羊脂酸是几种可以被用来沉淀抗体的脂肪酸之一，但却是唯一一种能够沉淀单克隆抗体的脂肪酸。

-  使用羊脂酸能够避免蛋白聚集。
-  不同于硫酸铵的是，羊脂酸不能够浓缩免疫球蛋白，因为它们都在溶液中。
-  这个方法不适用于细胞培养悬浮物，因为这样产量较低而且样品被稀释。
-  低溶解度的抗体可能被同杂质一起沉淀下来，因此要检查得率。

下一页介绍了一种从腹水中利用羊脂酸沉淀单克隆抗体得方法，其它的可以仿照此进行。

### 沉淀所需溶液：

- 羊脂酸
- 2M HCl
- 2M NaOH
- 第一步纯化的缓冲液



1. 将一体积的腹水同两体积的PH=4.0的50mM醋酸盐缓冲液混合。
2. 用2M HCl 或者2M NaOH 调节PH到4.5
3. 在连续搅拌下，缓慢加入羊脂酸（1/15 w/w）。
4. 继续搅拌30分钟
5. 1000×g离心10分钟。
6. 除去上清，用2M NaOH调节PH到6.0。
7. 除去羊脂酸并通过脱盐柱进一步纯化。

## 重新溶解抗体沉淀

很多抗体在重新溶解时都使用较小体积的缓冲液，这样利于下一步的色谱层析纯化。然而，在遇到不易溶解的抗体时，需要使用去垢剂，具体情况依据抗体的不同而不同。去垢剂必须在进一步纯化中除去，否则会影响到抗体的折叠并降低其活力。除去去垢剂通常使用色谱层析法，在表2.7中给出了一些常用的去垢剂：

变性剂	通常使用的条件	除去时使用的条件
尿素	2—8M	使用Sephadex G-25或者离子交换
盐酸胍	3—6M	使用Sephadex G-25或者离子交换
Triton—X100	2%	使用Sephadex G-25或者离子交换
Sarcosyl	1.5%	使用Sephadex G-25或者离子交换
N—octyl glucoside	2%	使用Sephadex G-25或者离子交换
SDS	0.1-0.5%	在第一步色谱层析柱中交换非离子型去垢剂，避免使用阴离子交换层析
碱性PH	>9%, 氢氧化钠	在色谱层析前应该调整PH，以保持蛋白的稳定性

想要获得详细的信息可以参考Scopes, R. K., Protein Purification, Principles and Practice, Springer, (1994), Janson, J. C. and Rydén, L., Protein Purification, Principles, High Resolution Methods and Applications, 2nd ed. John Wiley and Sons, Inc., New York, (1998)



表 2.7 溶解低溶解度蛋白常用的变性试剂以及从溶液中除去这些试剂的方法

## 脱盐和更换缓冲液

### 通常要考虑的问题

实验室水平上的脱盐是一个广泛使用、简单且快速的除去小分子杂质，并能同时更换缓冲液的方法。

GE healthcare 提供了一系列的预装柱和96空过滤平板，连同整套的色谱层析系统或者高通量应用（表2.8）。这些产品包括Sephadex G-25，它是一种能够有效除去分子量低于5000的小分子杂质的分离介质。

-  仅在必需时脱盐或更换缓冲液，因为每增加一个步骤都会使产量降低，而且脱盐会稀释样品（离心过滤法不会稀释样品）。
-  可以除去分子量低于5000的盐和小分子杂质。

柱子或者96空板	柱材	上样体积 (ml)	洗脱体积 (ml)	稀释系数	操作方法
HiTrap Desalting	Sephadex G-25 Superfine	0.25	1.0	4	注射器, 蠕动泵, 色谱层析系统
		0.5	1.5	3	注射器, 蠕动泵, 色谱层析系统
		1.0	2.0	2	注射器, 蠕动泵, 色谱层析系统
		1.5	2.0	1.3	注射器, 蠕动泵, 色谱层析系统
2×HiTrap Desalting	Sephadex G-25 Superfine	3.0	4.0-5.0	1.3-1.7	注射器, 蠕动泵, 色谱层析系统
3×HiTrap Desalting	Sephadex G-25 Superfine	4.5	6.0-7.0	1.3-1.7	注射器, 蠕动泵, 色谱层析系统
HiProp26/10 Desalting	Sephadex G-25 Fine	10	10-15	1.0-1.5	蠕动泵, 色谱层析系统
		15	15-20	1.0-1.3	蠕动泵, 色谱层析系统
2×HiProp26/10 Desalting	Sephadex G-25 Fine	30	30-40	1.0-1.3	蠕动泵, 色谱层析系统
3×HiProp26/10 Desalting	Sephadex G-25 Fine	45	45-55	1.0-1.3	蠕动泵, 色谱层析系统
4×HiProp26/10 Desalting	Sephadex G-25 Fine	60	60-70	1.0-1.3	蠕动泵, 色谱层析系统
PD SpinTrapG-25	SephadexG-25 medium	0.07-0.13	0.07-0.13	没有洗脱	离心
PD MiltiTrapG-25	SephadexG-25 medium	0.07-0.13	0.07-0.13	没有洗脱	离心或者真空
PD MiniTrapG-25	SephadexG-25 medium	0.2—0.5	0.1-0.5	没有洗脱	离心或者重力柱
	SephadexG-25 medium	0.1-0.5	1.0	2	离心或者重力柱
PD MidiTrapG-25	SephadexG-25 medium	0.5-1.0	0.5-1.0	没有洗脱	离心或者重力柱
	SephadexG-25 medium	0.1-0.5	1.5	1.5	离心或者重力柱
PD-10 Desalting 柱	SephadexG-25 medium	1.0-2.5	1.0-2.5	没有洗脱	离心或者重力柱
	SephadexG-25 medium	0.1-0.5	3.5	1-1.5	离心或者重力柱

表 2.8 选择脱盐/更换缓冲液柱的简单指导

脱盐柱可以处理多大总柱体积30%上样量的样品, 这种高速大结合容量的分离使得在实验室水平上能够相对快速有效的处理大体积的样品。因为通常情况下, 抗体的浓度不会超过大约70mg/ml, 所以在分离过程中样品的浓度不会受到影响, 并且在使用的浓度下抗体时稳定可溶的。

当脱盐是色谱层析的第一步时，样品应该被净化，推荐使用离心过滤或者直接过滤。

当需要使用挥发性缓冲液时，推荐使用100mM的醋酸铵或者碳酸氢铵。

脱盐比稀释有很多优点，稀释需要很大体积的缓冲液，并可能带来样品的丢失。

在实验室级别上，若样品经过过滤或者离心过滤后足够干净，可以不脱盐和更换缓冲液。但是对于亲和层析和离子交换层析，改变PH甚至是离子强度都是很重要的。

稀释来降低离子浓度可以取代更换缓冲液，在疏水相互作用色谱层析或滴定调整pH之前加入硫酸铵。

### 样品的小规模脱盐

对于从0.2ml到2.5ml的少量样品，可以同时多样品的平行跑PD-10脱盐柱，PDMiDi™G-25和PD MiniTrap™G-25重力柱。这些重力柱有两个不同的方法，一种是在实验室操作台上手动进行，另一种是和一个标准的离心接头同时使用。

对于更少的70-130ul样品，多个样品可以同时用PD Spin Trap™ G-25离心柱或PD MultiTrap™ G-25 96孔板上离心或真空抽取。

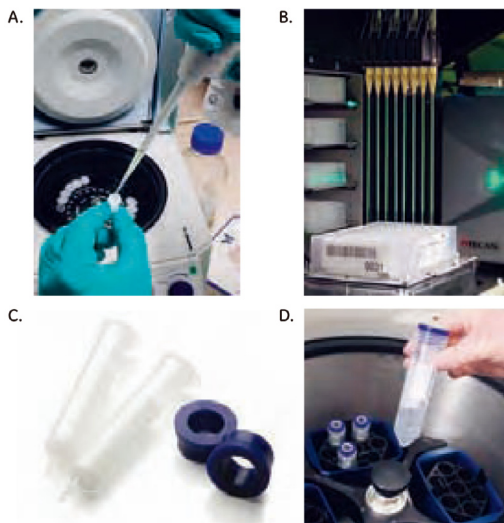


图 2.2 A. PD SpinTrap G-25样品处理。B. PD SpinTrap G-25中使用自动化系统处理样品。C和D. PD-10 Desalting Columns, PD MidiTrap G-25和 PD MiniTrap G-25使用的连接接头

## 使用HiTrap和HiPrep柱大量脱盐

连接三个HiTrap脱盐柱来增加样品容量，例如两个柱子可以达到3ml，三个柱子可以到达4.5ml（表2.8）

连接多达4个HiPrep 26/10脱盐柱来增加样品容量，例如两个柱子可以达到30ml，四个柱子可以达到60ml，甚至使用5个柱子，样品可以连续通过20-30分钟（表2.8）。

## 溶液处理

对于具有带点基团的底物，推荐使用有盐的缓冲提取液，含盐量最少为150mM，以阻止可能的与基质发生的可能的相互作用。NaCl是最常用的离子。通常情况下，含有25-50mM的缓冲液溶质是足够的。

当盐浓度大于1M时，疏水物质可能会吸附在基质上，甚至在更高的盐浓度时（>1.5M硫酸铵），柱材会收缩。

## 样品处理

只要样品和缓冲液的粘度不超过1.5，样品浓度就不影响分离效果，这同当使用水溶液时蛋白的最大浓度是70g/ml是一致的。

样品应该充分被溶解，离心过滤或过滤（0.45um的滤膜）后应立即上样。

蛋白的溶解度通常取决于pH和离子强度，有时候更换缓冲液后会导致蛋白沉淀，蛋白的活性也可能因pH的改变而丧失。在下面的章节中所叙述的脱盐和更换缓冲液所使用的方法均使用不同的预装柱。

## 手动使用HiTrap柱脱盐



图 2.3 HiTrap Desalting柱是一个高效易用的脱盐柱，它可以同注射器、泵和色谱层析系统共同使用

HiTrap脱盐柱是一个5ml的柱子，灌有可靠的胶过滤介质-Sephadex G-25 Superfine，这种介质是由交联的右旋葡萄糖酐构成，它具有很好的分辨率和较高的流速。对于球蛋白的分辨率从1000D到5000D，排阻极限为5000D。

这保证了能够分离分子量大于5000D的蛋白和小肽以及分子量小于1000的小分子物质。

HiTrap脱盐柱能够在pH值2-13的水溶液中使用，预装的介质在所有常有缓冲液中稳定，包括8M尿素，6M盐酸胍，所有的离子型和非离子型去垢剂。低醇（甲醇、乙醇、丙醇）可以在缓冲液或样品中使用，不过我们推荐浓度不超过25%。应该避免长时间的置于pH低于2或大于13或氧化剂中。

当需要完全出去小分子物质时，推荐的样品体积是0.1-1.5ml，在1-10ml/min的范围内分离不受流速影响，推荐的最大流速是15ml/min，分离可以通过注射器、泵或者色谱层析系统来实验。最大可以连续使用三个柱子，从而可以同时处理很多样品。图2.4画出了一个典型的使用HiTrap脱盐柱脱盐和更换缓冲液的过程。这用UV吸收值和电导变化来表示。

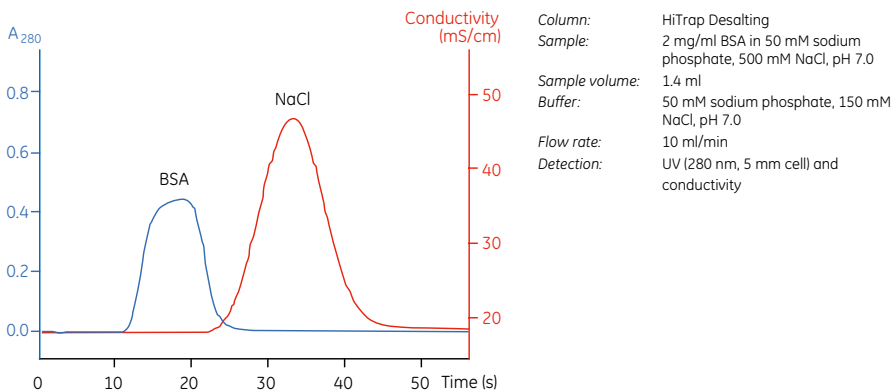



图 2.4 使用HiTrap Desalting柱的高效脱盐结果

 避免交叉污染，同一个柱子只通过同一种样品。


## 柱子平衡

1. 把注射器或泵充满缓冲液，移去阻止器避免在柱子中出现气泡，连接柱子点对点的连接柱子到注射器或者泵上。
2. 去除柱子出口的堵头。
3. 用25ml缓冲液以每分钟5ml的流速将柱子中的含有20%乙醇的保存缓冲液洗去，如果柱中含有气泡，使用脱气缓冲液将气泡冲出。在样品处理中偶然引入的气泡并不影响分离效果。

\*使用HiTrap5ml柱子时，5ml/min流速相当于每分钟120滴。


## 使用注射器手动脱盐


1. 使用注射器操作柱子时，将注射器通过一个提供的连接器连接到柱子上。
2. 平衡柱子，见上页的柱子平衡。
3. 使用2-5ml的注射器，以1-10ml/min的流速上样，抛弃从柱子上洗下的样品，如果样品少于1.5ml，使用缓冲液使上样体积达到1.5ml，去掉洗脱液体。
4. 使用合适体积的缓冲液（见表2.8）洗脱蛋白，收集脱盐蛋白。

 使用HiTrap 5ml脱盐柱的最大上样体积是1.5ml，如果使用更小体积时见表2.8。

上样体积 (ml)	加入的缓冲液 (ml)	洗脱和收集体积 (ml)	产量 (%) >95	残留盐浓度 (%)	稀释因子
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	0.0	2.0		<0.2	1.3

表 2.9 用注射器使用HiTrap Desalting时推荐上样和洗脱体积，并有典型的产量和样品中盐分

 柱子的体积是1.5ml，高分子量的组分在1.5和4.5ml之间被洗出，这取决于样品体积。低分子量组分在3.5ml时开始被洗出。

 特殊类型的分子如小的杂环或同环芳香族化合物（嘌呤、嘧啶、染料）可以同Sephadex相互作用，较慢的被洗脱出，在这种情况下可以增大上样体积，但是对于每种类型的污染物需要优化分离过程。

## 用泵脱盐

1. 平衡柱子，见前页平衡柱子。
2. 上样体积1.5ml。使用UV检测器或者电导检测器检测流出物，保持流速在1-10ml/min，收集组分。
3. 在上下一个样前使用10毫升缓冲液洗脱柱子，收集组分。

### 在ÄKTAprime plus上使用自动HiTrap 脱盐柱

ÄKTAprime™ plus上面包括使用HiTrap 脱盐柱和HiTrap 26/10脱盐柱的程序模板。下面的过程使用HiTrap 5ml脱盐柱。

## 缓冲液处理

平衡缓冲液（A1端口）：20mM磷酸钠，150mMNaCl pH7.0，至少准备500ml。

使用的水和化学物质必须是高纯度的，使用前需要经过0.45um的滤膜过滤。

## 样品处理

样品经过0.45um的滤膜过滤。

推荐的最大样品体积是1.5ml。

## 准备ÄKTaprime plus

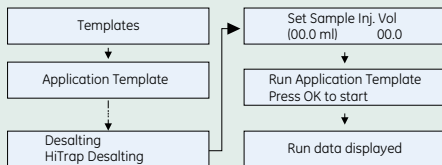
1. 把进样管置于A端口（阀门端口），B端口（2端口阀门）置于缓冲液中。
2. 把三个棕色的废液管放在废液瓶中。
3. 在上样阀的1端口和UV池之间连接柱子。
4. 在样品收集器上放置18mm管（最大20mm），将组分流出的白色板靠在第一个管子上。
5. 在2端口和6端口之间连接一个足够大的上样环。使用注射器手动上样。

注：如果需要Superloop，在Superloop说明书中有更多的信息。

如果系统被准备好，剩下的步骤（在选择应用模板和开始方法）会自动进行。

## 选择应用模版并开始程序

1. 检查是否连接到PrimeView™。在屏幕的右下角应该显示有ControlledBy: prime。
2. 使用箭头和确定键来激活下拉式菜单，直到找到Desalting HiTrap Desalting。



3. 输入样品体积并点击OK键。

图2.5表示了使用HiTrap脱盐柱和ÄKTaprime plus系统为一个标准大小的球蛋白脱盐的过程。这个图的结果同时也表示了为一个抗体更换缓冲液的过程。UV和电导的指示能有利于合适的组分的收集。

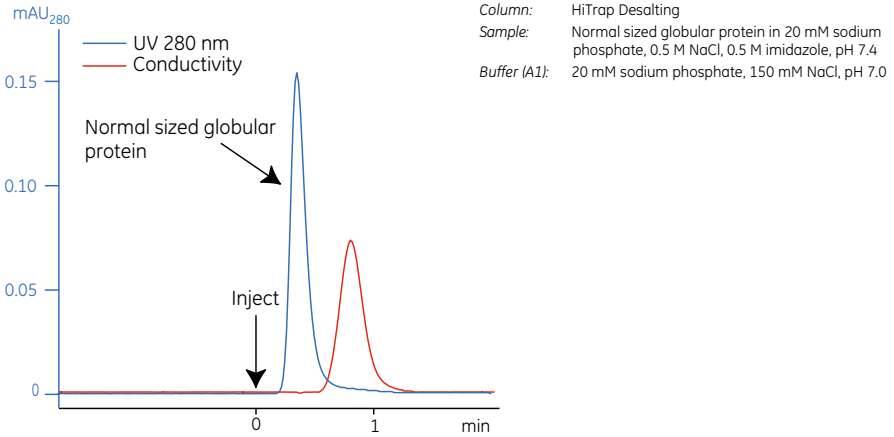


图 2.5 一般大小的球蛋白使用色谱层析系统进行脱盐

### 用HiPrep代替HiTrap来增大脱盐体积

为了为超过1.5ml的样品脱盐，或者增大高分子量的和分子量物质只间的分辨率，最多可以使用3个HiTrap脱盐柱（见表2.8）。如果使用注射器操作，在表2.8中建议的体积应该被适当增大，流速保持不变。通常在这样的操作中，比稀释因子会比表2.8中要低一些，洗脱体积通常要根据样品体积和串联的柱子的数目来优化。每根柱子在10ml/min时的压力通常在0.25bar左右。

HiPrep26/10脱盐柱使用的是SephadexG-25 Fine。它能分开分子量大于5000或者低于1000的物质，并且能可靠的可重复的为样品脱盐和更换缓冲液，每根柱子的上样体积为15ml。2到4根柱子可以被串联使用，使上样体积增大到30到60ml。



图2.6 使用4根串联的HiPrep 26/10 Desalting柱能够将上样体积增大到60ml



## 使用HiPrep 26/10 脱盐柱和 ÄKTaprime plus自动更换缓冲液 缓冲液处理

平衡缓冲液（A1端口）：20mM磷酸钠，150mMNaCl pH7.0，至少准备500ml洗脱液。

### 样品处理

- 使用的水和化学物质必须是高纯度的，使用前需要经过0.45um的滤膜过滤。
- 样品经过0.45um的滤膜过滤。
- 推荐的最大样品体积是15ml。

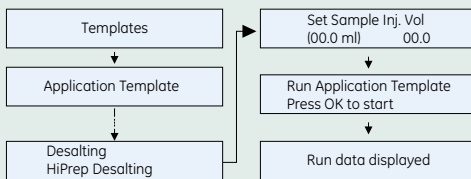
### 准备AKTaprime plus

1. 把进样管置于A端口（阀门端口），B端口（2端口阀门）置于缓冲液中。
  2. 把三个棕色的废液管放在废液瓶中。
  3. 在上样阀的1端口和UV池之间连接柱子。
  4. 在样品收集器上放置18mm管（最大20mm），将组分流出臂的白板块靠在第一个管子上。
  5. 在2端口和6端口之间连接一个足够大的上样环。
- 注：如果需要Superloop，在Superloop说明书中有更多的信息。

如果系统被准备好，剩下的步骤（在选择应用模板和开始方法）会自动进行。

### 选择应用模版并开始程序

1. 检查是否连接到PrimeView™。在屏幕的右下角应该显示有ControlledBy: prime。
2. 使用箭头和确定键来激活下拉式菜单，直到找到Desalting HiTrap Desalting。



3. 输入样品体积并点击OK键。

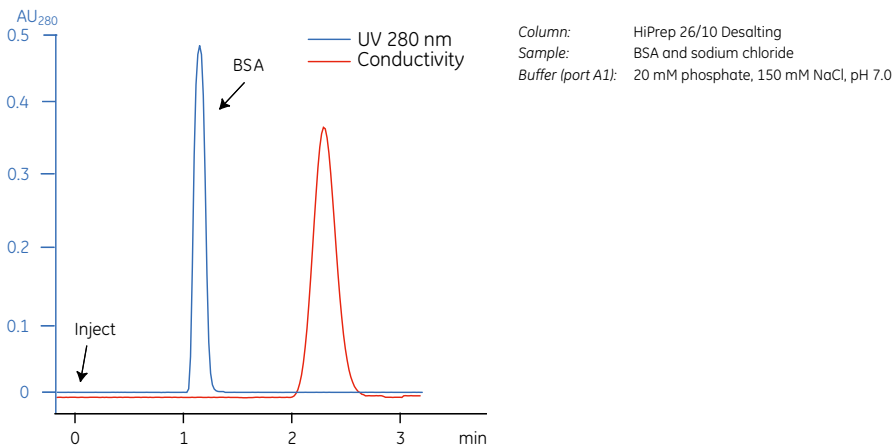


图 2.7 使用色谱层析系统为BSA脱盐的过程

### 使用PD脱盐柱进行小量的脱盐和更换缓冲液

PD-10 脱盐柱和PD MidiTrap G-25, PD MiniTrap G-25, PD SpinTrap G-25, 和PDMultiTrap G-25 和 96 孔过滤板都是填装的Sephadex G-25 基质，它用于分离分子量大于5000或者小于1000的物质，并为其脱盐和更换缓冲液。

这些都是Trap系列的产品，它们适用于少量制备蛋白或其它生物分子样品，以在后继的分析实验如凝胶电泳、液相色谱层析、LC-MS和MS中使用。这一系列的柱子和平板能处理从70ul到2.5ml的样品体积，并且可以同时多样品处理。PD-10脱盐柱、PD MidiTrap G-25和PD MiniTrap G-25都可以使用离心过滤法，这样不会造成样品稀释。



图 2.8 PD SpinTrap G-25柱是为各种生物分子脱盐和更换缓冲液的一次性使用柱，它的分离极限为5000

PD SpinTrap G-25是一次性使用的快速、高度可重复的脱盐和更换缓冲液的小离心柱，每次上样体积为70-130ul，使用小型离心机。柱子能够可重复的同时对样品进行脱盐和更换缓冲液，而且在纯化蛋白的同时不稀释样品。PD SpinTrap G-25中填装是Sephadex G-25基质，这种胶过滤基质能够有效的除去分子量低于5000的小分子物质。

每个包装的PD SpinTrap G-25中有可以使用50次的预装柱和收集管。

## 缓冲液

平衡缓冲液：高纯水

## 脱盐步骤

1. 用Vortex混匀基质，拧松螺旋盖并用塑料去底工具去掉底部。
2. 将柱子放在大小合适的收集管中，以 $800\times g$ 的速度离心1分钟，除去保存缓冲液。
3. 加入300ul平衡缓冲液以 $800\times g$ 的速度离心1分钟，除去平衡缓冲液，并把收集管放回。  
重复此步骤4次。

为了得到好的结果，要确保使用1.5ml以上的平衡缓冲液以完全除去保存缓冲液。

4. 用一个新的收集管来收集样品。
5. 在预装柱的中间缓慢的加入70-130ul样品。
6.  $800\times g$ 的速度离心2分钟来洗脱样品。

如需要大体积的样品脱盐时，建议使用大号的PD脱盐产品或者HiTrap、HiPrep 柱，见表2.8。若需多样品同时脱盐时，建议使用PD MultiTrap G-25。

收率取决于蛋白或者其它生物分子的性质，通常情况下，收率大约在70%-90%之间。浓缩样品会提高收率，若使样品体积少于100ul，等样品完全被吸收后再加入30ul的平衡缓冲液，这样可以提高收率。

## PD MultiTrap G-25



图2.9 PD MultiTrap G-25 96-well plates能够快速高重复性的净化生物分子，其排组极限为5000

PD MultiTrap G-25 96孔板是用来高通量的对样品脱盐、更换缓冲液和净化蛋白，并在孔与孔间和板与板间具有很好的重复性（图2.9）。使用96孔板，能够方便的对多个样品同时处理，PD MultiTrap G-25 既能够手动操作使用，也能够自动化仪器下进行脱盐和更换缓冲液，上样体积可以从70ul到100ul。在洗脱时，即可以用离心的方式，也可以仅凭重力洗脱。

PD MultiTrap G-25 96孔板中灌装的是Sephadex G-25 基质，这种胶过滤基质能够有效的从除去分子量大于5000的高分子中除去小分子杂质。

每个完整包装中共有四块PD MultiTrap G-25 96孔板，可以为384个样品进行脱盐和更换缓冲液处理，同时包装中还有离心收集样品的方法建议。另外，样品收集板（每个包装5块）也可以单独订购（见订购信息）。

96-well plate: PD MultiTrap G-25  
Sample: 1 mg/ml bovine serum albumin (BSA) in 1 M NaCl  
Sample volume: 130  $\mu$ l in each well  
Equilibration buffer: Ultrapure water

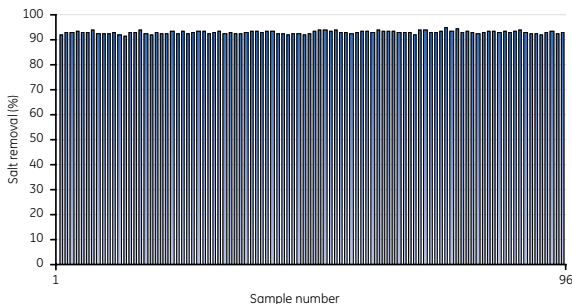


图 2.10 使用PD MultiTrap G-25 96-well plate从BSA中移除氯化钠的过程表现出了高度的可重复性，平均脱盐容量是93%，每孔之间的差距小于1%。

## 离心过滤法

### 缓冲液

平衡缓冲液：高纯水

### 脱盐步骤：

1. 轻轻的上下反转重混匀基质，除去上面和下面的封口并将板子置于收集板上。
2. 以 $800 \times g$ 的速度离心1分钟，除去保存缓冲液。
3. 在每孔中加入300ul的平衡缓冲液，以 $800 \times g$ 的速度离心1分钟，丢弃穿透液并将收集板放回原处。重复步骤4次。



为了得到好的结果，要确保使用1.5ml以上的平衡缓冲液以完全除去保存缓冲液。

4. 更换一个新的收集板以收集样品。
5. 在每个孔的中间加入70-130ul样品。
6. 以 $800\times g$ 的速度离心2分钟。

如需要大体积的样品脱盐时，建议使用大号的PD脱盐产品或者HiTrap、HiPrep柱，见表2.8。

收率取决于蛋白或者其他生物分子的性质，通常情况下，收率大约在70%-90%之间。浓缩样品会提高收率，若使样品体积少于100ul，等样品完全被吸收后再加入30ul的平衡缓冲液，这样可以提高收率。

### PD MiniTrap G-25



图 2.11 PD MiniTrap G-25是一个能够净化生物分子的预装柱，分子量极限是5000，上样量是500ul

PD MiniTrap G-25可以用来方便的为100-500ul蛋白样品脱盐和更换缓冲液（图2.11）。PD MiniTrap G-25灌装的是Sephadex G-25基质，这种胶过滤基质能够有效的从除去分子量大于5000的高分子中除去小分子杂质。当需要增大样品体积时，PD MiniTrap G-25是PD SpinTrap G-25的一个更好的替代品。

为了增强适用性，该产品有两套应用方案，一个是使用离心法，另一个使用重力作用。使用重力法时，可以在没有纯化系统时，同时对多个样品进行纯化。当使用离心法时，可以最大可能的减少对样品的稀释。

### 重力法 缓冲液

平衡缓冲液：高纯水

## 脱盐步骤:

1. 除去顶盖并使保存液流出。除去底部盖子。
2. 在柱子中加入平衡缓冲液，并使平衡缓冲液完全进入到柱子当中。重复此步骤2次，丢弃穿透液。

为了得到好的结果，要确保使用8ml以上的平衡缓冲液以完全除去保存缓冲液。

3. 加入100-500ul样品到柱子当中。若样品量少于500ul，可以在样品完全流入柱子基质后再补加一定体积的平衡缓冲液，使样品总体积达到500ul。
4. 使样品和平衡缓冲液完全进入到柱子中，丢弃穿透液。
5. 在柱子底部放置一个实验收集管，用1ml洗脱液洗脱样品。收集脱盐样品。

如需要大体积的样品脱盐时，建议使用HiTrap、HiPrep 柱，见表2.8。

收率取决于蛋白或者其它生物分子的性质，通常情况下，收率大约在70%-90%之间。浓缩样品会提高收率。使用重力法比离心法在收率和脱盐能力都要好一些。

在图2.12中展示了一个典型的蛋白脱盐的过程，虽然在图中脱盐的蛋白是BSA，但是在使用PD MiniTrap G-25为抗体脱盐时也能得到一个相似的结果。

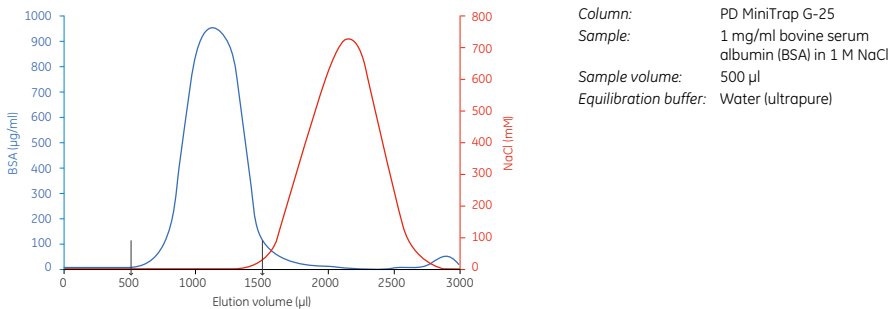


图 2.12 使用重力法为BSA脱盐，在这个过程中，蛋白的收率是95%

## 离心法 缓冲液

平衡缓冲液: 高纯水

## 脱盐步骤:

1. 除去顶盖并使保存液流出。
2. 用钳子除去顶部的滤膜，并除去底部盖子。
3. 将PD MiniTrap G-25放入一个15ml的收集管中，并将柱子的接头安放在管子的顶部。
4. 将柱子中加满平衡缓冲液，并等待所有的平衡缓冲液流入柱子当中。  
重复此步骤一次，丢弃穿透液。
5. 重新在柱子中装满平衡缓冲液， $1000\times g$ 离心2分钟，丢弃穿透液。



为了得到好的结果，要确保使用8ml以上的平衡缓冲液以完全除去保存缓冲液。

6. 在柱子的中间缓慢的加入200-500ul样品。
7. 将PD MiniTrap G-25柱子加入到一个新的15ml收集管中。
8.  $1000\times g$ 离心洗脱样品，并收集洗脱物。



如需要大体积的样品脱盐时，建议使用HiTrap、HiPrep 柱，见表2.8。



收率取决于蛋白或者其它生物分子的性质，通常情况下，收率大约在70%-90%之间。浓缩样品会提高收率。使用重力法比离心法在收率和脱盐能力都要好一些。

## PD MidiTrap G-25



图 2.13 PD MidiTrap G-25是用来净化蛋白的预装柱，它的分子极限为5000，上样量可以达到1ml

PD MidiTrap G-25可以用来方便的为500-1000ul蛋白样品脱盐和更换缓冲液（图2.13）。PD MidiTrap G-25灌装的是Sephadex G-25 基质，这种胶过滤基质能够有效的从除去分子量大于5000的高分子中除去小分子杂质。当需要增大样品体积时，PD MidiTrap G-25是PD MiniTrap G-25的一个更好的替代品。

为了增强适用性，该产品有两套应用方案，一个是使用离心法，另一个使用重力作用。使用重

力法时，可以在没有纯化系统时，同时对多个样品进行纯化。当使用离心法时，可以最大可能的减少对样品的稀释。

每个包装的PD MidiTrap G-25包含50根预装柱和4个在离心时需要用到的接头。


## 重力法

### 缓冲液


平衡缓冲液：高纯水


#### 脱盐步骤：

1. 除去顶盖并使保存液流出。除去底部盖子。
2. 在柱子中加入平衡缓冲液，并使平衡缓冲液完全进入到柱子当中。重复此步骤2次，丢弃穿透液。

 为了得到好的结果，要确保使用15ml以上的平衡缓冲液以完全除去保存缓冲液。

3. 加入500-1000ul样品到柱子当中。若样品量少于1000ul，可以在样品完全流入柱子基质后再补加一定体积的平衡缓冲液，使样品总体积达到1000ul。
4. 使样品和平衡缓冲液完全进入到柱子中，丢弃穿透液。
5. 在柱子底部放置一个实验收集管，用1.5ml洗脱液洗脱样品。收集脱盐样品。

 如需要大体积的样品脱盐时，建议使用HiTrap、HiPrep 柱，见表2.8。

 收率取决于蛋白或者其它生物分子的性质，通常情况下，收率大约在70%-90%之间。浓缩样品会提高收率。使用重力法比离心法在收率和脱盐能力都要好一些。

## 离心法

### 缓冲液

平衡缓冲液：高纯水

#### 脱盐步骤：

1. 除去顶盖并使保存液流出。
2. 用钳子除去顶部的滤膜，并除去底部盖子。
3. 将PD MidiTrap G-25放入一个50ml的收集管中，并将柱子的接头安放在管子的顶部。
4. 将柱子中加满平衡缓冲液，并等待所有的平衡缓冲液流入柱子当中。重复此步骤一次，丢弃穿透液。
5. 重新在柱子中装满平衡缓冲液，1000×g离心2分钟，丢弃穿透液。



为了得到好的结果，要确保使用15ml以上的平衡缓冲液以完全除去保存缓冲液。

6. 在柱子的中间缓慢的加入750-1000ul样品。
7. 将PD MiniTrap G-25柱子加入到一个新的50ml收集管中。
8.  $1000\times g$ 离心洗脱样品，并收集洗脱物。

如需要大体积的样品脱盐时，建议使用HiTrap、HiPrep 柱，见表2.8。

收率取决于蛋白或者其它生物分子的性质，通常情况下，收率大约在70%-90%之间。浓缩样品会提高收率。使用重力法比离心法在收率和脱盐能力都要好一些。

### 一次性PD-10脱盐柱

一次性PD-10脱盐柱可以用来方便的为1000-2500ul蛋白样品脱盐和更换缓冲液（图2.13）。一次性PD-10脱盐柱灌装的是Sephadex G-25 基质，这种胶过滤基质能够有效的从除去分子量大于5000的高分子中除去小分子杂质。当需要增大样品体积时，一次性PD-10脱盐柱是PD MidiTrap G-25的一个更好的替代品。

为了增强适用性，该产品有两套应用方案，一个是使用离心法，另一个使用重力作用。使用重力法时，可以在没有纯化系统时，同时对多个样品进行纯化。当使用离心法时，可以最大可能的减少对样品的稀释。

每个包装的一次性PD-10脱盐柱都有30根预装柱组成，为了简化一次性PD-10脱盐柱在重力法下的应用，一次性PD-10脱盐柱可以耦联LabMate™缓冲液池使用（见定购信息）。使用缓冲液池，可以在一步内完成清洗和平衡柱子。

图2.14显示了一个标准的分离效果图，虽然这是一张经典的白蛋白的脱盐图，但是这也可以看作是抗体脱盐的图谱。

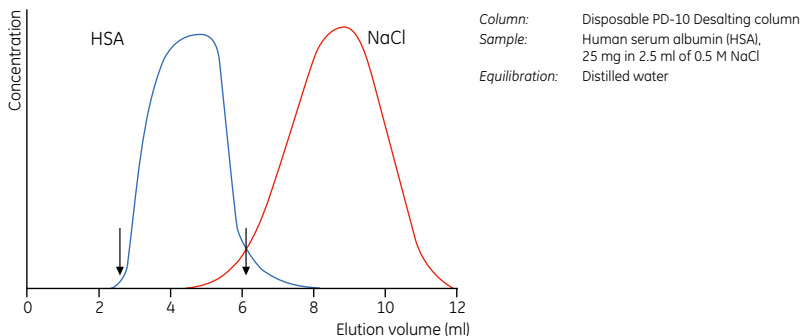


图 2.14 从白蛋白溶液中除去氯化钠。PD-10 Desalting使用蒸馏水平衡，样品中含有25mg人源血清白蛋白和2.5ml0.5M氯化钠，最后收得23.8g蛋白样品，蛋白得收率为95.3%。

## 重力法 缓冲液


平衡缓冲液：高纯水


### 脱盐步骤：

1. 切掉底部尖头，使多余的液体流出。
2. 如果可行，将LabMate缓冲液池放在PD-10脱盐柱的顶部，并将柱子放在PD-10 Desalting Workmate 内。
3. 用25ml平衡缓冲液平衡柱子，并丢弃穿透液（用塑料托盘收集穿透液）。

 为了得到好的结果，要确保使用25ml以上的平衡缓冲液以完全除去保存缓冲液。

4. 在柱子中加入2.5ml样品，如果样品体积少于2.5ml，可以用缓冲液补足，丢弃穿透液。
5. 用3.5ml缓冲液洗脱，收集穿透液。

 如需要大体积的样品脱盐时，建议使用HiTrap、HiPrep 柱，见表2.8。


 收率取决于蛋白或者其它生物分子的性质，通常情况下，收率大约在70%-90%之间。浓缩样品会提高收率。使用重力法比离心法在收率和脱盐能力都要好一些。

## 浓缩过滤法 缓冲液

平衡缓冲液：高纯水

### 脱盐步骤：

1. 除去顶盖并使保存液流出。
2. 用钳子除去顶部的滤膜，并除去底部盖子。
3. 将PD-10脱盐柱放入一个50ml的收集管中，并将柱子的接头安放在管子的顶部。
4. 将柱子中加满平衡缓冲液，并等待所有的平衡缓冲液流入柱子当中。重复此步骤一次，丢弃穿透液。
5. 重新在柱子中装满平衡缓冲液，1000×g离心2分钟，丢弃穿透液。

 为了得到好的结果，要确保使用25ml以上的平衡缓冲液以完全除去保存缓冲液。

6. 在柱子的中间缓慢的加入1750-2500ul样品。
7. 将PD-10脱盐柱加入到一个新的50ml收集管中。
8. 1000×g离心洗脱样品，并收集洗脱物。



如需要大体积的样品脱盐时，建议使用HiTrap、HiPrep 柱，见表2.8。



收率取决于蛋白或者其它生物分子的性质，通常情况下，收率大约在70%-90%之间。浓缩样品会提高收率。使用重力法比离心法在收率和脱盐能力都要好一些。

## 第三章

# 使用亲和色谱层析进行小规模纯化

因为我们对抗体或者抗体片段以及其它污染物的性质了解很多，所以我们在从各种材料中纯化抗体时就变的简便易行（见第二章，表2.1）。

当存在专一免疫相互作用时，亲和色谱层析（AC）通常是作为第一步甚至是唯一一步纯化过程。然而，为了获得均一的抗体，通常在亲和色谱层析层析后再加一步分子筛。亲和色谱层析通常能够高选择性和高容量的纯化蛋白。目的蛋白分子能够被高度浓缩在一根柱子上面，此时纯度通常能够达到95%以上。纯化过程可以使用重力法批量进行，或者使用离心柱，96孔板，预装的HiTrap柱。

这一章总结了亲和介质和GE Healthcare出品的可用于小规模纯化抗体的预包装产品，这些包括色谱层析柱和96孔板、离心柱。

现代工程化抗体和抗体片段的生产和纯化上的进步为抗体的制造创造了很多机会，不仅仅是在其蛋白生化性质上，而且可以增加它的纯度。例如，可以在抗体上面增加标签，以使原来不能通过亲和色谱层析纯化的蛋白得以通过亲和柱纯化。

如果想要获得进一步的关于重组蛋白纯化的信息，包括GST和六聚组氨酸标签融合蛋白，可以参考《重组蛋白纯化手册——策略与方法》（18-1142-75）和《GST基因融合蛋白手册》（18-1157-58）。关于proteinA融合蛋白纯化的技术可以参考《亲和色谱层析：策略与方法》（18-1022-29）。

## 注意事项

### 样品处理

对于样品处理，依据抗体来源的不同，在第二章中推荐了一些步骤。适用高纯水和化合物，并过滤缓冲液，在使用前离心或过滤样品。如果样品很容易挥发，应适用结合缓冲液稀释。通过适用脱盐柱更换缓冲液，使样品和结合缓冲液的组分相同，可以增强样品的结合能力。

### 用于一步纯化的基质的类型


抗体亲和纯化的基础是，G蛋白和A蛋白对IgG不同来源的Fc区域的高度亲和性。G蛋白和A蛋白被固定在不同的介质上产生了从腹水、细胞悬浮培养物和血清中分离IgG和IgG亚家族的很好的方法。

## 大体积Sepharose介质

G蛋白和A蛋白是从Streptococci以及Staphylococcus aureus分离得到的细菌蛋白，当它们被偶联到Sepharose上，G蛋白和A蛋白成为方便的纯化抗体的一个有利工具。

GE healthcare提供了从大肠杆菌中重组表达G蛋白的方法，在这里，G蛋白的白蛋白结合区域被删除，重组的G蛋白配体被偶联到G蛋白Sepharose 4 fast flow和G蛋白Sepharose High performance介质上，并且能够以预装的形式应用在HiTrap和SpinTrap柱子上，也可用在96孔板上。而且，当需要大量纯化时，G蛋白Sepharose 4 fast flow可以大量的使用。

野生型A蛋白（nProtein A）同样也可以被偶联在Sepharose 4 fast flow和G蛋白Sepharose High performance介质上，同时，重组的A蛋白（rProtein A）也可以被偶联在和G蛋白Sepharose fast flow上。同野生型A蛋白相比，结合在Sepharose上的重组A蛋白有很多潜在的优势。重组A蛋白通过硫醚键单点定向被固定，这增强了对IgG的结合能力，更进一步重组A蛋白是由大肠杆菌产生的，在发酵和纯化过程中不会有人源的IgG被吸附，这降低了人源IgG的污染。野生型A蛋白Sepharose 4 fast flow和重组型A蛋白Sepharose fast flow可以在实验室被灌装，使用预装的HiTrap可以更大规模的纯化。如果需要增大纯化量，Sepharose介质可以被灌装进XK或者Tricorn柱子中。

 因为G蛋白能够结合真核来源的广泛的IgG和IgG亚家族，因此它是实验室水平纯化抗体的一个好的选择。通常情况下，G蛋白比A蛋白对IgG的亲和能力更强，而对白蛋白的亲和能力更弱，这样能提高蛋白的纯度和产量。G蛋白同IgG的结合强度取决于IgG的来源物种和免疫球蛋白的类型。结合动力学取决于结合强度和其他几个因素，如样品流速。

MabSelect介质适用于从大上样量的体系中纯化单克隆抗体，MabSelect的重组的A蛋白配体，被改造成定向偶联从而增强了结合能力。MabSelect SuRe使用耐碱的重组A蛋白配体，它可以忍受剧烈的清洗试剂（例如0.1-0.5M的NaOH）。MabSelect Xtra使用同MabSelect一样的重组A蛋白配体，但是其介质是一种更小的多孔颗粒，以增强在高流速时的结合动力学性质。MabSelect、MabSelect SuRe、MabSelect Xtra可以在实验室水平上大量使用，小规模纯化的预装的HiTrap柱也在逐渐的被应用。

## 预装形式

GE Healthcare提供不同大小和种类的预装柱和预装的96孔板以及被用来自己灌装的空的柱子（图3.1）。通过简单的使样品经过装有合适介质的柱子可以一步纯化抗体，这些不同种类的预装柱也可以使用XK和Tricorn柱自己大量灌装以提高纯化规模。所有的预装柱都提供了详细的使用方法，并强调了最佳的缓冲液和步骤。


当少量纯化时，例如抗体筛选实验，预装的MultiTrap96孔板是最适合的。每一个孔都能够结合多达0.5mg抗体，样品被吸进每一个被预装的孔里，使用离心或真空冲洗或洗脱。使用这些板子可以高通量的处理样品。当同时使用许多板子时可以使用自动化系统处理。


预装SpinTrap柱被用在微量离心中，当只有较少的样品而不宜使用96孔板时，可使用SpinTrap柱。Ab SpinTrap被用来快速纯化和筛选抗体，每一个柱子能结合多达1mg抗体。

预装的HiTrap柱提供了多样的和方便的抗体纯化方法，它们可以被串联，以提高纯化规模，可以同注射器、泵或者色谱层析系统同时使用。



图 3.1 MultiTrap 96-well plates, SpinTrap columns和 HiTrap columns是用来小规模地从血清、细胞悬浮培养物和腹水中筛选和纯化单克隆、多克隆抗体

 大多数介质能够被扩大规模和灌装更大的柱子。客户设计的亲和介质也可以被生产。

 亲和介质的重复使用取决于样品的性质，并且只能处理相同的样品以避免交叉污染。


### 在最初的纯化后进一步纯化


一步亲和纯化通常能得到目的抗体的满意纯度。为了使纯化的抗体足够均一，推荐使用进一步的分子过滤。表3.1列出了实验室规模纯化抗体中推荐使用的产品。

	筛选	实验室规模	增大规模
捕获蛋白	Protein G HP MultiTrap Protein A HP MultiTrap Protein G HP SpinTrap Protein A HP SpinTrap Ab Spin Trap	HiTrap Protein G HP MabTrap Kit HiTrap Protein A HP HiTrap rProtein A FF HiTrap MabSelect HiTrap MabSelect SuRe HiTrap MabSelect Xtra	Protein G Sepharose 4 Fast Flow nProtein A Sepharose 4 Fast Flow rProtein A Sepharose Fast Flow MabSelect MabSelect SuRe MabSelect Xtra
进一步纯化	Superdex200 5/150 GL Superdex 75 5/150 GL	Superdex 200 10/300 GL Superdex 75 10/300 GL	HiLoad 16/60 Superdex 200 pg HiLoad 26/60 Superdex 200 pg HiLoad 16/60 Superdex 75 pg HiLoad 26/60 Superdex 75 pg
更换缓冲液, 脱盐 或是净化 样品	PD SpinTrap G- 25 PD MultiTrap G- 25 PD MiniTrap G- 25 PD MidiTrap G-25	HiTrap Desalting PD-10 Desalting columns HiPrep 26/10 Desalting	HiPrep 26/10 Desalting columns connected in series

表3.1 适合于纯化抗体的多种产品，用于捕获抗体、最后纯化（凝胶过滤）和脱盐产品

图3.2表示了一个经典的使用高分辨率的胶过滤的图。Superdex™预装柱可以根据分子的大小来分离杂质，同时可以把样品更换到保存缓冲液中，并移除多余的盐分和小分子。

 对于抗体而言，进一步的纯化通常用于区分单体和二聚体（图3.2），同时也可以除去很大的抗体聚集体。

 第六章中总结了多步分离纯化策略。

Column: Superdex 200 10/300 GL  
Column volume: 24 ml  
Sample: Monoclonal antibody  
Sample volume: 100  $\mu$ l  
Elution buffer: 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5  
Flow rate: 0.25 ml/min  
System: ÄKTAexplorer 100

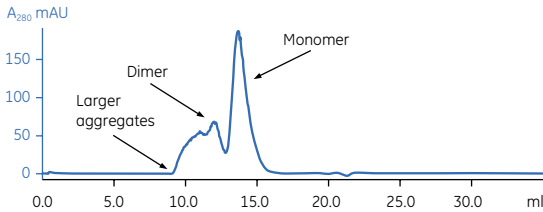


图 3.2 凝胶过滤技术通常是抗体纯化的最后一步，同时也是除去二聚化蛋白和多聚体的方法，图中展示的使用预装的Superdex 200 10/300 GL来分离单克隆抗体中的多聚体、双体和单体

### G蛋白和A蛋白结合不同的IgG

纯化包含Fc区域的IgG或者IgG片段时所基于的原理通常是G蛋白或A蛋白对多克隆或单克隆的IgG抗体上的Fc区域高度的亲和能力。

G蛋白和A蛋白是分别来自于G类 Streptococci和Staphylococcus aureus 的细菌蛋白，当它们被偶联到Sepharose上，G蛋白和A蛋白成为方便的纯化抗体的一个有利工具。

表3.2比较了G蛋白和A蛋白对不同的免疫球蛋白的结合强度，这些信息都来自于不同的出版物。结合强度都是使用游离的G蛋白和A蛋白检测的，因此可以被用作预测G蛋白和A蛋白在分离纯化效果的依据。然而，当G蛋白或A蛋白被偶连到柱子上时，这种相互作用可能会受到影响。例如，鼠源的IgG<sub>1</sub>能够结合到G蛋白Sepharose上，但是不能结合到A蛋白Sepharose上。



物种	亚家族	G蛋白结合能力	A蛋白结合能力
人类	IgA	—	可变的
	IgD	—	—
	IgE	—	—
	IgG <sub>1</sub>	++++	++++
	IgG <sub>2</sub>	++++	++++
	IgG <sub>3</sub>	++++	—
	IgG <sub>4</sub>	++++	++++
	IgM*	—	可变的
鸟卵清	IgY <sup>†</sup>	—	—
牛		++++	++
狗		+	++
小山羊		++	—
几内亚猪	IgG <sub>1</sub>	++	++++
东亚大鼠		++	+
马		++++	++
树袋熊		+	—
骆驼		+	—
猴子		++++	++++
鼠	IgG <sub>1</sub>	++++	+
	IgG <sub>2a</sub>	++++	++++
	IgG <sub>2</sub>	+++	+++
	IgG <sub>3</sub>	+++	++
	IgM*	—	可变的
猪		+++	+++
兔		+++	++++
田鼠	IgG <sub>1</sub>	+	—
	IgG <sub>2a</sub>	++++	—
	IgG <sub>2b</sub>	++	—
	IgG <sub>3</sub>	++	+
绵羊		++	+/-

\* 使用 HiTrap IgM Purification HP columns

† 使用 HiTrap IgY Purification HP columns

++++ = 强结合

++ = 中结合

— = 很弱或者没有结合能力

表 3.2 通过ELISA检测到的不同种属来源的抗体对A蛋白和G蛋白抗体的相对结合能力



依靠Fc区域特异性结合A或者G蛋白的一步纯化策略可能会有宿主IgG和少量血清蛋白的污染，为了避免宿主的IgG的污染，可以考虑选用其它的技术进一步纯化，例如抗宿主IgG免疫特异性亲和层析，就像NHS-activated Sepharose，或者离子交换色谱层析连接 Cpto™ adhere 或者疏水色谱层析（HIC，见第六章）。

### 使用G蛋白Sepharose介质的纯化

G蛋白是一种来自Group G streptococci 的细胞表面蛋白，它属于第三类的Fc受体蛋白。同A蛋白一样，G蛋白能够同IgG上的Fc区域特异性的结合，但是对某些多克隆的IgG和人源的IgG<sub>3</sub>的结合更加紧密。在通常的缓冲液体系下，G蛋白能够同所有的人源和鼠源的IgG结合，包括鼠源IgG<sub>1</sub>。G蛋白也能够结合A蛋白所不能结合或者结合很弱的IgG<sub>2a</sub> IgG<sub>2b</sub>。



G蛋白是在实验室水平上纯化抗体的一个很好的选择，因为它能够广泛的结合真核来源的各种抗体，这比A蛋白结合的要多。通常情况下，G蛋白能够比A蛋白对IgG的具有更强的结合能力，而且对白蛋白的结合性更弱，这能提高产品的品质和产量。G蛋白同IgG的结合能力取决于免疫球蛋白的来源和家族。结合量取决于结合强度和其它几个因素，例如样品的流速。



很多抗体可以通过Fab区域和G蛋白发生弱相互作用。G蛋白不能同人源骨髓瘤IgM、IgA和IgE结合。人源骨髓瘤IgM、IgA则能同A蛋白发生弱相互作用。



在使用亲和柱时，应该考虑柱子配体的连接强弱，特别是需要用到剧烈的洗脱条件时。G蛋白同Sepharose是多点连接，这大大减少了G蛋白的损失，使其能忍受许多洗脱条件。除去G蛋白的污染时可以用分子筛或者离子交换色谱层析进一步纯化。

下一页的表3.3展示了使用G蛋白Sepharose纯化抗体的过程。


产品	规格	结合能力 (mg IgG/ml)	特点
Protein G Sepharose 4 Fast Flow	5 ml 25 ml	> 20 (human) 23 (cow) 19 (goat) 17 (guinea pig) 10 (mouse) 7 (rat)	用于小规模纯化、筛选抗体，或者用于优化缓冲液，免疫沉淀中蛋白的富集
Protein G HP MultiTrap	96-well plates	> 25 (human)	用于小规模纯化IgG和它的片段
Ab SpinTrap	100 $\mu$ l spin columns	> 25 (human)	用于小规模纯化IgG和它的片段，包括人源的IgG <sub>3</sub> ，也可用于目标抗原的富集。
Protein G HP SpinTrap	100 $\mu$ l spin columns	> 25 (human)	实验室规模纯化IgG和片段，包括人源的IgG <sub>3</sub>
HiTrap Protein G HP	1 ml, 5 ml columns	> 25 (human)	实验室规模纯化IgG和片段，包括人源的IgG <sub>3</sub>
MAbTrap Kit	1 Kit		实验室规模纯化IgG和片段，包括人源的IgG <sub>3</sub>
Ab Buffer Kit	1 Kit		Ab SpinTrap, Protein G HP SpinTrap, HiTrap Protein G
			HP and Protein G HP MultiTrap 中推荐使用的预制缓冲液

表3.3 Protein G Sepharose 4 Fast Flow 和 Protein G Sepharose High Performance纯化建议

### G蛋白Sepharose4 Fast Flow

G蛋白Sepharose4 Fast Flow是由90um的高度交联的琼脂糖构成的小球，它能够提供一个稳定坚固而且高流速的色谱层析基质。G蛋白Sepharose4 Fast Flow能够广泛的结合各种真核的抗体和更多家族的IgG（表3.2）。

G蛋白Sepharose4 Fast Flow的配体G蛋白是经过改造的蛋白，其上面的同白蛋白结合的位点已经被删除，这避免了白蛋白的非特异性结合。重组G蛋白包含两个Fc结合区域，这对于纯化免疫复合物是非常有利的。这种介质很适合一般情况下纯化抗体和实验室水平大量纯化。

 G蛋白Sepharose4 Fast Flow能够在很广泛的PH范围内结合抗体，并且在中性PH时结合能力最强。为了能够洗脱IgG，需要依据抗体的不同将PH调整到2.5-3之间。如果抗体或者抗体片段在这个PH下会失去活性，可以尝试A蛋白Sepharose，此时洗脱条件会温和一些。

G蛋白Sepharose4 Fast Flow可以用来大量的灌装XK和Tricorn柱子（图3.4）。另外，G蛋白Sepharose4 Fast Flow也能够被灌装成很大的柱子用于商业纯化多克隆抗体或者单克隆抗体。



图 3.3 Protein G Sepharose 4 Fast Flow可以被批量使用，应用在实验室或者生产规模上



图3.4 空的Tricorn柱子，用于泵或者色谱层析系统

## 柱子的灌装

参照附件5中的柱子灌装的一般策略。



理论上，Sepharose4 Fast Flow介质可以在两步内被灌装进XK和Tricorn柱子中，但是在第一步和第二步灌装时，压力分别不要超过0.3bar(0.03MPa)和3.5bar(0.35MPa)。如果装柱器中没有压力探测装置，可以使用如下流速灌装：第一步时，2.5 ml/min (XK 16/20 柱) 或者 1.0 ml/min (Tricorn 10/100 柱)，第二步时，14 ml/min (XK 16/20 柱) 或者 5.5 ml/min (Tricorn 10/100 柱)。

1. 把所有的材料平衡到纯化蛋白所需要的温度，并对基质进行脱气处理。
2. 使用结合缓冲液快速通过柱子末端的接头以除去气泡。确保在柱子的末端没有被封闭的气泡，关闭柱子，使柱子底部充满蒸馏水。
3. 重悬介质，一次把介质倒入柱中，不断用玻璃棒沿着柱子内壁搅动介质，以减少气泡的出现。
4. 如果使用装柱器，立刻将柱子中充满蒸馏水，将接头或装柱器的盖子加上，并将柱子接在一个泵上。避免在接头的下部或进样管中充满气泡。
5. 打开柱子底部的出口，开动泵并设定好流速。
6. 在保持一定流速下，使蒸馏水流过最少三个柱体积，直到柱子达到预定高度。标出柱床高度。
7. 关闭泵和柱子出口。
8. 如果使用装柱器，去掉装柱器并在柱子上安放接口。
9. 在除掉上样接口后，将接头压入柱子中，直到达到刻线，使缓冲液流过上样接口，关闭接口。
10. 将柱子连接到一个泵上或色谱层析系统，并开始平衡。如果需要重新调整接口。

注：如果下面要进行色谱层析，不要超过装柱流速的75%。

## 样品处理

参照第二章的基本建议


-  离心样品（10000g，10min）以除去细胞和碎片。使用0.45um的滤膜过滤。
-  来自很多物种的IgG在pH大于等于7时对G蛋白有很强的吸附能力，因此样品应该在pH=7时过柱子。如果需要调整样品结合缓冲液的pH和离子强度，这可以通过使用脱盐柱或稀释。

## 缓冲液处理

结合缓冲液：20mM磷酸钠，pH7.0

洗脱缓冲液：0.1M 甘氨酸-盐酸缓冲液，pH2.7

中性缓冲液：1M Tris-HCl，pH9.0

-  缓冲液使用的水和化合物必须是高纯度的，使用前必须经过0.45um的滤膜过滤。

## 纯化步骤

1. 在收集管中加入60-200ul 1M Tris-HCl，pH9.0（每管收集1ml样品）。

为了保持酸依赖的IgG活性，我们推荐在每个收集管中加入60-200ul 1M Tris-HCl，pH9.0，这保证了最终样品的pH趋近中性。

2. 如果柱子中含有20%乙醇，用5倍柱体积的蒸馏水冲洗，线性流速为50-100cm/h。
3. 使用5-10倍柱体积的结合缓冲液，以150cm/h的速度平衡柱子。
4. 加入处理好的样品。
5. 用结合缓冲液冲洗，直到吸收值达到基线。

\*见附件7中关于怎样将线性流速 (cm/h) 转化为体积流速 (ml/min)。

大多数物种来源的IgG可以在生理pH值和离子强度下结合于G蛋白上，如果优化一个特定物种的IgG结合条件，请参考最近的文献。如果两者结合强度较弱，请避免过度冲洗，否则会降低产量。

6. 使用洗脱缓冲液，以逐步或线性梯度洗脱，对于逐步洗脱，5倍柱体积的洗脱缓冲液就已足够。对于线性梯度洗脱，20倍柱体积可以分开具有相似结合能力的蛋白。
7. 洗脱后使用5-10倍柱体积的结合缓冲液再生柱子，柱子可以用于新一轮的纯化。

G蛋白Sepharose能够在一个很广泛的PH范围内结合抗体，并且在中性PH时结合能力最强。为了能够洗脱IgG，需要依据抗体的不同将PH调整到2.5-3之间。如果抗体或者抗体片段在这个PH下会失去活性，可以尝试A蛋白Sepharose，此时洗脱条件会温和一些。（见表3.5）

可以使用脱盐柱为IgG蛋白脱盐或更换合适的缓冲液（见第二章）。

## 保存

在4-8度保存到20%乙醇中。

## 纯化Fab和F(ab')<sub>2</sub>片段

G蛋白同样对特定Fab区域具有结合能力，因此，G蛋白介质在某些情况下可以用于纯化Fab和F(ab')<sub>2</sub>片段。图3.5表示了纯化一个在大肠杆菌中表达的重组鼠源Fab片段，只用了G蛋白Sepharose 4 Fast Flow一步纯化。

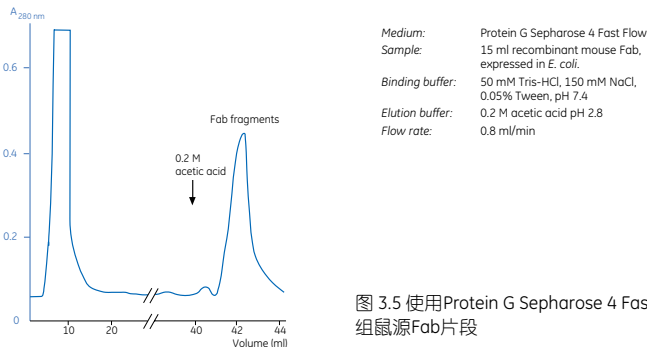


图 3.5 使用Protein G Sepharose 4 Fast Flow纯化大肠杆菌表达的重组鼠源Fab片段

## 预装有G蛋白Sepharose High Performance的多孔板和柱子

G蛋白HP MultiTrap, Ab SpinTrap, G蛋白HP SpinTrap和 HiTrap G蛋白 HP都是使用G蛋白Sepharose High Performance灌装的预装柱，这种介质是由34um高度交联的琼脂糖颗粒组成，可以高效的纯化抗体（表3.3）。这种介质能够提供最大的结合容量，并能够同抗体纯化中经常使用添加剂相适应。G蛋白Sepharose High Performance在广泛的pH下都很稳定。很高的化学和物理稳定性连同广泛的pH操作范围最大限度上保证了抗体的生化活性和纯度。

G蛋白Sepharose High Performance能够提供尖锐的洗脱峰，比G蛋白Sepharose 4 Fast Flow更浓的洗脱抗体。然而，由于G蛋白Sepharose High Performance比G蛋白Sepharose 4 Fast Flow基质小球体积更小，因此柱压也会增大。所以，G蛋白Sepharose 4 Fast Flow更适合于大量纯化。

### G蛋白HP MultiTrap

G蛋白HP MultiTrap是预装有G蛋白Sepharose High Performance的96孔板，G蛋白HP MultiTrap是一个多功能的工具，它可以筛选不同蛋白，处理蛋白样品，从净化的细胞裂解物和生物液体中富集感兴趣的蛋白，也能够小规模纯化抗体（图3.6）。它可以同时纯化多个样品，这保证了从较大数量的样品复合物中快速可靠的纯化抗体。

每个包装的G蛋白HP MultiTrap包含四块预装的多孔板和通过免疫沉淀收集目标抗体-抗原复合物以及小规模抗体纯化的方法。用于收集洗脱物的收集板可以单独订购（见订购信息）。

下面讲述了小规模筛选纯化抗体的过程，要想获取免疫共沉淀的步骤可以到[www.gelifsciences.com/protein-purification](http://www.gelifsciences.com/protein-purification)上下载注释28-9067-73。



图 3.6 Protein G HP MultiTrap 96-well plates可以被用来少量同时筛选或者纯化多个单克隆或多克隆样品

### 样品处理

来自很多物种的IgG在pH大约为7时对G蛋白有很强的吸附能力，因此样品应该在pH=7时过柱子。如果需要调整样品结合缓冲液的pH和离子强度，这可以通过使用脱盐柱或稀释。

## 缓冲液处理

结合缓冲液：20mM磷酸钠，pH7.0

洗脱缓冲液：0.1M 甘氨酸-盐酸缓冲液，pH2.7

中性缓冲液：1M Tris-HCl，pH9.0

缓冲液使用的水和化合物必须是高纯度的，使用前必须经过0.45um的滤膜过滤。

缓冲液可以使用由Ab buffer Kit（28-9030-59）提供的10X结合、洗脱缓冲液母液。

## 纯化

1. 准备两个收集板，每板每孔都装有15ul中性缓冲液。

为了保持酸依赖的IgG活性，我们推荐在每个收集管中加入15ul 1M Tris-HCl，pH9.0，这保证了最终样品的pH趋近中性。

2. 翻转并轻轻振动MultiTrap板以重悬基质，除去顶部和底部的封口，并把板子放在收集板上，70-100g离心1min，以除去保存溶液。

3. 加入300ul结合缓冲液平衡，70-100g离心30s。

4. 最多加入300ul抗体样品，温浴4min，并轻轻混匀，70-100g离心30s。

5. 加入300ul结合缓冲液冲洗，70-100g离心30s。重复此步。

大多数物种来源的IgG可以在生理pH值和离子强度下结合于G蛋白上，如果优化一个特定物种的IgG结合条件，请参考最近的文献。如果两者结合强度较弱，请避免过度冲洗，否则会降低产量。

6. 更换在步骤1中准备的干净的收集板。

7. 加入200ul洗脱缓冲液洗脱抗体，70g离心30s，收集洗脱物。重复此步。

\*大多结合的抗体两步就可以洗下来。

G蛋白Sephacrose能够在一个很广泛的PH范围内结合抗体，并且在中性PH时结合能力最强。为了能够洗脱IgG，需要依据抗体的不同将PH调整到2.5-3之间。如果抗体或者抗体片段在这个PH下会失去活性，可以尝试A蛋白Sephacrose，此时洗脱条件会温和一些。（见表3.5）

可以使用脱盐柱为IgG蛋白脱盐或更换合适的缓冲液（见第二章）。



## 保存

在4-8度保存到20%乙醇中。

## Ab SpinTrap柱

Ab SpinTrap柱是从没有净化的血清和细胞悬浮培养物中纯化单克隆抗体或多克隆抗体的一次性预装柱（图3.7）。这种柱子适合于多样品小规模的同时纯化和抗体筛选实验。Ab SpinTrap柱包含G蛋白Sepharose High Performance，它具有很高的蛋白结合容量，并能适应抗体纯化中使用的各种缓冲液。

每个包装中提供的50根柱子都可以在一个标准的小离心机上使用，一次纯化时间小于20分钟。直接从未净化的样品中纯化减少了由手动纯化造成的样品损失。



图 3.7 同离心机一起使用，Ab SpinTrap柱和Ab Buffer Kit能够提供快速的小规模的纯化抗体的解决方案

Ab SpinTrap柱适用于未经纯化稀释和过滤的血清。图3.8表示了从未稀释的免疫兔血清中纯化的anti-HAS（人血清白蛋白，SDS胶第二道）。

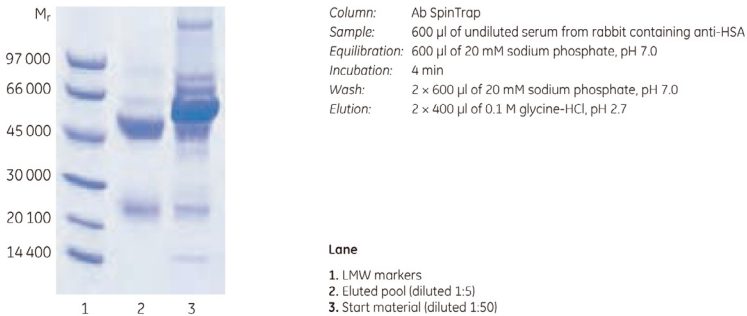


图3.8 还原条件的SDS-PAGE，ExcelGel™ SDS Gradient 8-18; Coomassie™ Blue染色。

## 样品处理



来自很多物种的IgG在pH大约为7时对G蛋白有很强的吸附能力，因此样品应该在pH=7时过柱子。如果需要调整样品结合缓冲液的pH和离子强度，这可以通过使用脱盐柱或稀释。

## 缓冲液处理

结合缓冲液：20mM磷酸钠，pH7.0


洗脱缓冲液：0.1M 甘氨酸-盐酸缓冲液，pH2.7

中性缓冲液：1M Tris-HCl，pH9.0


-  缓冲液使用的水和化合物必须是高纯度的，使用前必须经过0.45um的滤膜过滤。
-  缓冲液可以使用由Ab buffer Kit（28-9030-59）提供的10X结合、洗脱缓冲液母液。


## 纯化

1. 准备两个收集管，每管都装有30ul中性缓冲液。


-  为了保持酸依赖的IgG活性，我们推荐在每个收集管中加入30ul 1M Tris-HCl，pH9.0，这保证了最终样品的pH趋近中性。

2. 翻转并轻轻振动柱子以重悬基质，用塑料底盖移除工具除去顶部和底部的封口，保存底盖。  
70-100g离心30s，除去保存溶液。
3. 加入600ul结合缓冲液平衡，70-100g离心30s。
4. 最多加入600ul抗体样品，拧紧顶部盖子，温浴4min，并轻轻混匀，70-100g离心30s。
5. 加入600ul结合缓冲液冲洗，70-100g离心30s。

-  G蛋白Sepharose能够在一个很广泛的PH范围内结合抗体，并且在中性PH时结合能力最强。为了能够洗脱IgG，需要依据抗体的不同将PH调整到2.5-3之间。如果抗体或者抗体片段在这个PH下会失去活性，可以尝试A蛋白Sepharose，此时洗脱条件会温和一些。（见表3.5）

-  大多数物种来源的IgG可以在生理pH值和离子强度下结合于G蛋白上，如果优化一个特定物种的IgG结合条件，请参考最近的文献。如果两者结合强度较弱，请避免过度冲洗，否则会降低产量。

6. 加入400ul洗脱缓冲液，并颠倒混匀。将柱子放在一个2ml含有20ul中性缓冲液的离心管上。  
70g离心30s，并收集洗脱物。
7. 将柱子放在一个新的2ml含有20ul中性缓冲液的离心管上加入200ul洗脱缓冲液洗脱抗体，  
70g离心30s，并收集洗脱物。

 可以使用脱盐柱为IgG蛋白脱盐或更换合适的缓冲液（见第二章）。

## 保存

在4-8度保存到20%乙醇中。

## G蛋白HP SpinTrap 柱

G蛋白HP SpinTrap 柱是从没有净化的血清和细胞悬浮培养物中纯化单克隆抗体或多克隆抗体的一次性预装柱（图3.7）。这种柱子适合于多样品小规模的同时纯化和抗体筛选实验。G蛋白HP SpinTrap 柱包含G蛋白Sepharose High Performance，它具有很高的蛋白结合容量，并能适应抗体纯化中使用的各种缓冲液。

每个包装中所包含的16根预装柱都能够在一个标准的微型离心机上使用，每一个包装的G蛋白HP SpinTrap 柱中都包括一本关于通过免疫共沉淀提取抗原-抗体复合体和抗体纯化的手册。同样，下面也叙述了如何小规模地筛选和纯化抗体。想要获得关于免疫共沉淀的详细信息，可以在[www.gelifsciences.com/protein-purification](http://www.gelifsciences.com/protein-purification)上下载实验建议28-9067-72。



图 3.9 Protein G HP SpinTrap columns适用于蛋白的富集，它利用G蛋白对抗体的亲和力，其适合于实验室中小规模的纯化操作

## 样品处理


来自很多物种的IgG在pH大约为7时对G蛋白有很强的吸附能力，因此样品应该在pH=7时过柱子。如果需要调整样品结合缓冲液的pH和离子强度，这可以通过使用脱盐柱或稀释。


## 缓冲液处理

结合缓冲液：20mM磷酸钠，pH7.0

洗脱缓冲液：0.1M 甘氨酸-盐酸缓冲液，pH2.7


中性缓冲液：1M Tris-HCl，pH9.0

 缓冲液使用的水和化合物必须是高纯度的，使用前必须经过0.45um的滤膜过滤。


 缓冲液可以使用由Ab buffer Kit (28-9030-59) 提供的10X结合、洗脱缓冲液母液。


## 纯化步骤

1. 准备两个收集管，每管都装有30ul中性缓冲液。


 为了保持酸依赖的IgG活性，我们推荐在每个收集管中加入30ul 1M Tris-HCl, pH9.0, 这保证了最终样品的pH趋近中性。

2. 翻转并轻轻振动柱子以重悬基质，用塑料底盖移除工具除去顶部和底部的封口，保存底盖。  
70-100g离心30s，除去保存溶液。
3. 加入600ul结合缓冲液平衡，70-100g离心30s。
4. 最多加入600ul抗体样品，拧紧顶部盖子，温浴4min，并轻轻混匀，70-100g离心30s。
5. 加入600ul结合缓冲液冲洗，70-100g离心30s。

 G蛋白Sephacrose能够在一个很广泛的PH范围内结合抗体，并且在中性PH时结合能力最强。为了能够洗脱IgG，需要依据抗体的不同将PH调整到2.5-3之间。如果抗体或者抗体片段在这个PH下会失去活性，可以尝试A蛋白Sephacrose，此时洗脱条件会温和一些。（见表3.5）

 大多数物种来源的IgG可以在生理pH值和离子强度下结合于G蛋白上，如果优化一个特定物种的IgG结合条件，请参考最近的文献。如果两者结合强度较弱，请避免过度冲洗，否则会降低产量。

6. 加入400ul洗脱缓冲液，并颠倒混匀。将柱子放在一个2ml含有20ul中性缓冲液的离心管上。  
70g离心30s，并收集洗脱物。
7. 将柱子放在一个新的2ml含有20ul中性缓冲液的离心管上加入200ul洗脱缓冲液洗脱抗体，  
70g离心30s，并收集洗脱物。

 可以使用脱盐柱为IgG蛋白脱盐或更换合适的缓冲液（见第二章）。

## 保存

在4-8度保存到20%乙醇中。

### HiTrap Protein G HP columns

HiTrap Protein G HP columns是装有Protein G Sepharose High Performance介质的预装柱，它能够

比A蛋白介质更方便易用的从牛、羊和马中提取多克隆抗体（见表3.2）。同时，G蛋白介质还能够纯化鼠源的IgG和人源的IgG<sub>3</sub>、鼠源的IgG<sub>1</sub>。

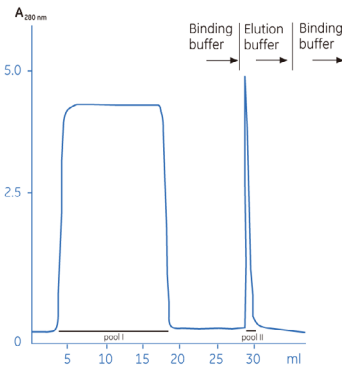
这种柱子有1ml和5ml两种灌装形式，并同所有的HiTrap柱一样，HiTrap Protein G HP可以同注射器、泵或者色谱层析系统AKTAdesign™联合使用来快速高效的纯化抗体。同时，若串联使用多个柱子时，可以增大纯化量。



图 3.10 HiTrap Protein G HP columns可以同注射器、泵或者色谱层析系统联合使用用来纯化抗体

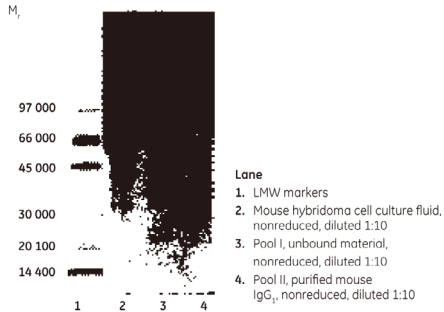
图3.11表示一个使用HiTrap Protein G HP 纯化鼠源的IgG<sub>1</sub>的过程，这种单克隆抗体是从杂交瘤细胞悬浮培养物中纯化得到的。

A. Purification using HiTrap Protein G HP



Column: HiTrap Protein G HP 1 ml  
 Sample: 12 ml hybridoma cell culture fluid containing mouse IgG<sub>1</sub>  
 Binding buffer: 20 mM sodium phosphate, pH 7.0  
 Elution buffer: 0.1 M glycine-HCl, pH 2.7  
 Flow rate: 1 ml/min  
 Electrophoresis: SDS-PAGE, PhastSystem, PhastGel Gradient 10-15, 1 µl sample, silver stained  
 Immunodiffusion: 1% Agarose A in 0.75 M Tris, 0.25 M 5,5-diethylbarbituric acid, 5 mM Ca-lactate, 0.02% sodium azide, pH 8.6

B. SDS-PAGE



C. Immunodiffusion

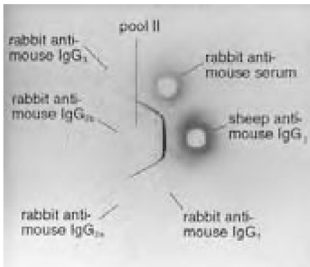




图 3.11 A 使用HiTrap Protein G HP 纯化鼠源的IgG<sub>1</sub>的过程，这种单克隆抗体是从杂交瘤细胞悬浮培养物中纯化得到的 B 纯化的鼠源的IgG<sub>1</sub>的纯度使用还原型SDS—PAGE检测（PhastSystem™ using PhastGel™ 10-15 (银染)）  
C 琼脂糖凝胶免疫扩散实验

## 样品处理

参照第二章的基本建议

 将样品10000×g离心10分钟以除去细胞和碎片，然后用一个0.45um滤膜过滤。

来自很多物种的IgG在pH大约为7时对G蛋白有很强的吸附能力，因此样品应该在pH=7时过柱子。如果需要调整样品结合缓冲液的pH和离子强度，这可以通过使用脱盐柱或稀释。


 如果样品是血清或者腹水，可以用结合缓冲液进行1: 1稀释。


## 缓冲液处理

结合缓冲液：20mM磷酸钠，pH7.0

洗脱缓冲液：0.1M 甘氨酸-盐酸缓冲液，pH2.7

中性缓冲液：1M Tris-HCl，pH9.0


 缓冲液使用的水和化合物必须是高纯度的，使用前必须经过0.45um的滤膜过滤。

 缓冲液可以使用由Ab buffer Kit（28-9030-59）提供的10×结合、洗脱缓冲液母液。

## 纯化步骤

见附件4中关于使用HiTrap columns纯化抗体的基本策略

1. 在收集管中加入60-200ul 1M Tris-HCl，pH9.0（每管收集1ml样品）。

 为了保持酸依赖的IgG活性，我们推荐在每个收集管中加入60-200ul 1M Tris-HCl，pH9.0，这保证了最终样品的pH趋近中性。

2. 将注射器或者泵中充满蒸流水，除去阻塞头并将柱子连接到注射器（使用提供的连接接头），或实验室用的泵或色谱层析系统上，连接时要点对点的连接以避免在系统中引入气泡。

3. 除去柱子出口的阻塞头。

4. 使用3-5倍柱体积的蒸流水将柱子中的乙醇除去。

5. 使用5倍柱体积的结合缓冲液来平衡柱子，推荐的流速为1ml/min（1ml柱子）和5 ml/min（5 ml 柱子）\*。

6. 使用注射器或者泵将预处理过的样品加入泵中，为了或者良好的结果，在上样过程中推荐的流速为：0.2 to 1 ml/min (1 ml 柱) 和 0.5 to 5 ml/min (5 ml 柱)。
7. 使用大量结合冲洗柱子（通常最少5-10倍柱体积），直到吸收值达到基线或者没有物质被洗脱出来。在冲洗的时候推荐的流速是：1 to 2 ml/min (1 ml 柱) 和 5 to 10 ml/min (5 ml 柱)。  
\*当使用1 ml HiTrap柱并采用注射器上样时，1 ml/min的流速大约相当于30 滴/min；  
当使用5 ml HiTrap柱并采用注射器上样时，5 ml/min的流速大约相当于 120滴/min 。



大多数物种来源的IgG可以在生理pH值和离子强度下结合于G蛋白上，如果优化一个特定物种的IgG结合条件，请参考最近的文献。如果两者结合强度较弱，请避免过度冲洗，否则会降低产量。

8. 使用洗脱缓冲液进行一步或者线性梯度洗脱。对于一步洗脱，5倍柱体积通常就已足够。对于线性梯度洗脱，10-20倍柱体积就可以将样品洗脱完毕。洗脱时，推荐的流速为：1 to 2 ml/min (1 ml 柱子) and 5 to 10 ml/min (5 ml 柱子)。



Protein G Sepharose能够在一个很广泛的PH范围内结合抗体，并且在中性PH时结合能力最强。为了能够洗脱IgG，需要依据抗体的不同将PH调整到2.5-3.0之间。如果抗体或者抗体片段在这个PH下会失去活性，可以尝试A蛋白Sepharose，此时洗脱条件会温和一些。

9. 洗脱完毕后，使用3-5倍柱体积的结合缓冲液冲洗再生柱子。处理完毕后的柱子可以再次进行下一步的纯化。



使用脱盐柱为IgG样品脱盐或者更换缓冲液（见第二章）。



预装的Protein G HiTrap HP 柱提供了多样的和方便的抗体纯化方法，它们可以被串联，以提高纯化规模，可以同注射器、泵或者色谱层析系统同时使用（见第五章中 ÄKTA 色谱层析系统）。



HiTrap Protein G Sepharose HP重复使用取决于样品的性质，并且只能处理相同的样品以避免交叉污染。

## 保存

在4-8度保存到20%乙醇中。

## MABTrap Kit

MABTrap™ Kit中包含一根HiTrap Protein G HP 1ml柱和结合缓冲液、洗脱缓冲液、中性缓冲液，还有一个带有接头的注射器以及关于如何优化纯化过程的材料（图3.12）。这个试剂盒中的材料

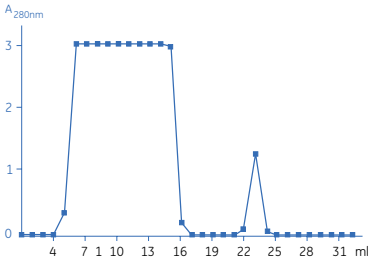
能够纯化多达20次单克隆或多克隆抗体，材料的来源可以是血清、细胞悬浮培养物或者腹水。试剂盒中的柱子既可以用注射器驱动，也可以用蠕动泵驱动。



图 3.12 用于蛋白抗体纯化的MabTrap Kit

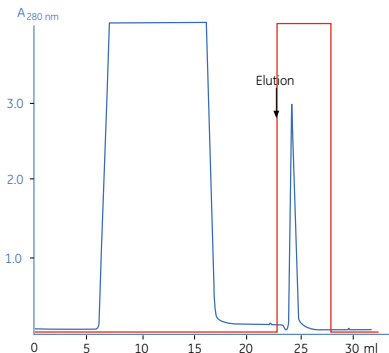
图3.13展示了分别用注射器和蠕动泵从细胞悬浮培养物中纯化IgG<sub>1</sub>的过程，使用注射器和HiTrap Protein G HP 1ml柱相连时，能得到大约3ml吸收峰A<sub>280</sub>大约为0.44洗脱产物，对应的纯鼠源单克隆IgG<sub>1</sub>产量大约为0.9mg。若同样的纯化过程使用αP-1蠕动泵来实现，最终能得到2mlA<sub>280</sub>大约为0.6洗脱产物，对应的纯鼠源单克隆IgG<sub>1</sub>产量也大约为0.9mg。

**A. Purification using a syringe**

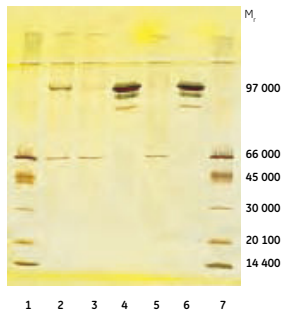


Column: HiTrap Protein G HP 1ml  
 Sample: 10 ml cell supernatant containing mouse monoclonal Ig<sub>1</sub>, anti-transferrin  
 Binding buffer: 20 mM sodium phosphate, pH 7.0  
 Elution buffer: 0.1 M glycine-HCl, pH 2.7  
 Electrophoresis: SDS-PAGE, PhastSystem, PhastGel Gradient 10-15, 1 μl sample, silver stained

**B. Purification using a pump**



**C. SDS-PAGE analysis**






- Lane**
1. LMW markers
  2. Cell culture supernatant, mouse monoclonal Ig<sub>1</sub>, diluted 1:1
  3. Flowthrough, using peristaltic pump, diluted 1:10
  4. Eluted mouse monoclonal Ig<sub>1</sub>, using a peristaltic pump
  5. Flowthrough, using a syringe, diluted 1:10
  6. Eluted mouse monoclonal Ig<sub>1</sub>, using a syringe
  7. LMW markers



图 3.13 从细胞悬浮培养物中纯化鼠源的单克隆抗体IgG<sub>1</sub>，A 使用注射器 B 使用蠕动泵 C 使用 SDS-PAGE 检测洗脱的样品（PHastSystem using PHastGel 10-15, silver stained）

## 样品处理

参照第二章的基本建议

-  将样品10000×g离心10分钟以除去细胞和碎片，然后用一个0.45um滤膜过滤。
-  来自很多物种的IgG在pH大约为7时对G蛋白有很强的吸附能力，因此样品应该在pH=7时过柱子。如果需要调整样品结合缓冲液的pH和离子强度，这可以通过使用脱盐柱或稀释。
-  如果样品是血清或者腹水，可以用结合缓冲液进行1: 1稀释。

## 缓冲液处理

结合缓冲液：将结合缓冲液的浓度稀释10倍

洗脱缓冲液：将洗脱缓冲液的浓度稀释10倍

中性缓冲液：1 M Tris-HCl, pH 9.0


使用高纯水来稀释10×的浓缩缓冲液：

1. 2.5 ml 结合缓冲液浓缩液+22.5 ml高纯水，使总体积达到25ml。
2. 0.5 ml洗脱缓冲液浓缩液加入4.5 ml高纯水使总体积达到5 ml。

见附件4中关于使用HiTrap柱纯化的基本策略。

## 纯化步骤

1. 在收集管中加入60-200ul 1M Tris-HCl, pH9.0（每管收集1ml样品）。

 为了保持酸依赖的IgG活性，我们推荐在每个收集管中加入60-200ul 1M Tris-HCl, pH9.0，这保证了最终样品的pH趋近中性。

2. 将注射器或者泵中充满蒸流水，除去阻塞头并将柱子连接到注射器（使用提供的连接接头）。
3. 除去柱子出口的阻塞头。
4. 使用5倍柱体积的蒸流水将柱子中的乙醇除去。
5. 使用至少3ml的结合缓冲液来平衡柱子，推荐的流速为1ml/min\*。

6. 使用注射器或者泵将预处理过的样品加入泵中，为了或者良好的结果，在上样过程中推荐的流速为：0.2 ml/min。
7. 使用大量结合冲洗柱子（通常最少5-10倍柱体积），直到吸收值达到基线或者没有物质被洗脱出来。在冲洗的时候推荐的流速是：1 to 2 ml/min。

\*当使用1 ml HiTrap柱并采用注射器上样时，1 ml/min的流速大约相当于30 滴/min；  
当使用5 ml HiTrap柱并采用注射器上样时，5 ml/min的流速大约相当于 120滴/min。



大多数物种来源的IgG可以在生理pH值和离子强度下结合于G蛋白上，如果优化一个特定物种的IgG结合条件，请参考最近的文献。如果两者结合强度较弱，请避免过度冲洗，否则会降低产量。

8. 使用3-5ml洗脱缓冲液进行一步或者线性梯度洗脱。使用线性梯度洗脱时，有时需要大体积的洗脱缓冲液来打破这种相互作用。



Protein G Sepharose能够在一个很广泛的PH范围内结合抗体，并且在中性PH时结合能力最强。为了能够洗脱IgG，需要依据抗体的不同将PH调整到2.5-3.0之间。如果抗体或者抗体片段在这个PH下会失去活性，可以尝试A蛋白Sepharose，此时洗脱条件会温和一些。

9. 洗脱完毕后，使用3-5倍柱体积的结合缓冲液冲洗再生柱子。处理完毕后的柱子可以再次进行下一步的纯化。



使用脱盐柱为IgG样品脱盐或者更换缓冲液（见第二章）。



HiTrap Protein G Sepharose HP重复使用取决于样品的性质，并且只能处理相同的样品以避免交叉污染。

## 保存

在4-8度保存到20%乙醇中。

### 使用A蛋白介质纯化

A蛋白是来自SA菌株的蛋白，它包含可以结合IgG上Fc区域的五个结构域，作为亲和配体，A蛋白通常被偶联到Sepharose上，并可暴露出这些结构域，用来结合IgG。一分子偶联的A蛋白最少可以结合两分子的IgG。

野生型的A蛋白和重组型A蛋白在GE health care公司均有销售。这两种分子对IgG的Fc区域具有相似的亲和能力，但是重组型A蛋白包括一个C段的半胱氨酸，它可以被单点的偶联到Sepharose上，这增强了A蛋白的结合能力。除了能经典的结合IgG的Fc区域外，A蛋白还可以结合具有Fab

区域的特定突变体，因此，A蛋白亲和介质在某些情况下可以被用来纯化特定的Fab和F(ab')<sub>2</sub>片段。GE公司生产的A蛋白结合介质比G蛋白结合介质具有更强的亲和容量，是工业化生产单克隆抗体的更好的选择(第7章)。




nProtein A Sepharose 4 Fast Flow在生产过程中没有引入任何动物来源的组分，重组型A蛋白是由大肠杆菌产生，在发酵和纯化过程中都没有引入人源的IgG亲和步骤，这最大程度上减少了人源的IgG污染的可能性。

野生型和重组型A蛋白Sepharose可以被大量使用或者在预装的高性能HighTrap柱中用于小规模纯化抗体，野生型A蛋白Sepharose同样可以被预装在离心柱和96孔板中，用于小规模筛选和纯化。

Protein A Sepharose High Performance介质能够产生尖锐的洗脱峰，这同Protein A Sepharose 4 Fast Flow相比能够更大程度上浓缩抗体，然而由于Protein A Sepharose High Performance比Protein A Sepharose 4 Fast Flow的介质小球更小，因此前者的柱压更大，因此，后者更适用于在高流速下大规模纯化。

MabSelect介质是GE公司生产的最主要的A蛋白介质，它用于在工业水平上纯化单克隆抗体，MabSelect介质是由具有高通透性的交联琼脂糖构成，这有利于纯化大体积的细胞培养物。MabSelect介质中使用的重组型A蛋白配体，被定向的偶联在介质上，这增强了它的结合容量，MabSelect SuRe使用耐碱的重组型A蛋白，它能够抵抗诸如NaOH一类的剧烈的洗脱溶剂。MabSelect Xtra使用同MabSelect一样的重组型A蛋白，但是柱材小球体积更小，并且更加多孔，这增强了它的动力结合能力。

MabSelect介质既可以大量使用，也可以被预装在HighTrap柱中，用于纯化筛选、小规模纯化和工艺开发。

-  A蛋白介质比G蛋白介质更容易分离纯化或出去各种类型的IgG，例如来源于马或者小牛血清中的不同种属的IgG污染物。尽管IgG是人类重要的免疫球蛋白，也有另外类型的免疫球蛋白同样可以结合在A蛋白上（见IgA和IgM）。
-  A蛋白同IgG的结合强度取决于这些免疫球蛋白的来源，而动力结合容量则取决于结合强度和其他因素，例如上样时的流速。
-  在使用过程中配体的丢失同样需要被考虑，特别是在剧烈洗脱时，A蛋白同Sepharose介质的多点结合使得在一个很广泛的洗脱条件内只具有很少的配体丢失，除去污染的配体可以使用凝胶过滤或者离子交换。


在表3.4中总结了使用A蛋白Sepharose介质不同的纯化策略，表3.5总结了使用A蛋白Sepharose介质常用的结合缓冲液和洗脱条件。


产品	规格	结合能力	备注
nProtein A Sepharose 4 Fast Flow	5 ml 25 ml	Approx. 30 (human)	批量提供, 能够用于灌装所有型号的柱子, 适合于大规模的纯化,
Protein A HP MultiTrap	96-well plates	Approx. 20 (human)	适合小量的纯化抗体或是筛选, 优化缓冲液条件, 通过免疫共沉淀富集蛋白等
Protein A HP SpinTrap	100 $\mu$ l spin columns	Approx. 20 (human)	适合小量的纯化抗体或是筛选, 优化缓冲液条件, 通过免疫共沉淀富集蛋白等
HiTrap Protein A HP	1 ml, 5 ml columns	Approx. 20 (human)	实验室规模纯化IgG和片段, 预装的1ml或5ml柱子能够串联使用以提高结合容量, 高结合能力, 适用于过程优化, 筛选和小量纯化
rProtein A Sepharose Fast Flow	5 ml 25 ml	Approx. 20 (human)	实验室规模纯化IgG和片段, 预装的1ml或5ml柱子能够串联使用以提高结合容量, 高结合能力,
HiTrap rProtein A FF	1 ml, 5 ml columns	Approx. 20 (human)	适用于过程优化, 筛选和小量纯化 批量提供, 能够用于灌装所有型号的柱子, 适合于大规模的纯化, 而且结合容量大流速大
MabSelect	25 ml	Approx. 20 (human)	实验室规模纯化IgG和片段, 预装的1ml或5ml柱子能够串联使用以提高结合容量, 高结合能力, 适用于过程优化, 筛选和小量纯化
HiTrap MabSelect	1 ml, 5 ml columns	Approx. 20 (human)	实验室规模纯化IgG和片段, 预装的1ml或5ml柱子能够串联使用以提高结合容量, 高结合能力, 适用于过程优化, 筛选和小量纯化
MabSelect SuRe	25 ml	Approx. 20 (human)	实验室规模纯化IgG和片段, 预装的1ml或5ml柱子能够串联使用以提高结合容量, 高结合能力, 适用于过程优化, 筛选和小量纯化
HiTrap MabSelect SuRe	1 ml, 5 ml columns	Approx. 30 (human)	实验室规模纯化IgG和片段, 预装的1ml或5ml柱子能够串联使用以提高结合容量, 高结合能力, 适用于过程优化, 筛选和小量纯化
MabSelect Xtra	25 ml	Approx. 40 (human)	批量提供, 能够用于灌装所有型号的柱子, 适合于大规模的纯化, 而且结合容量大流速大
HiTrap MabSelect Xtra	1 ml, 5 ml columns	Approx. 40 (human)	实验室规模纯化IgG和片段, 预装的1ml或5ml柱子能够串联使用以提高结合容量, 高结合能力, 适用于过程优化, 筛选和小量纯化
Ab BufferKit	1 Kit		适合于Protein A HP MultiTrap, Protein A HP SpinTrap, HiTrap Protein A HP, and HiTrap rProtein A FF等的预制缓冲液


表3.4 使用protein A Sepharose进行纯化的策略建议

物种	亚家族	结合A蛋白的pH	从A蛋白上洗脱的pH
人类	IgG <sub>1</sub>	6.0-7.0	3.5-4.5
	IgG <sub>2</sub>	6.0-7.0	3.5-4.5
	IgG <sub>3</sub>	8.0-9.0	≤ 7.0
	IgG <sub>4</sub>	7.0-8.0	3.0-6.0
牛	IgG <sub>2</sub>	没有	2.0
山羊	IgG <sub>2</sub>	没有	5.8
猪	IgG <sub>1</sub>	没有	4.8
	IgG <sub>2</sub>	没有	4.3
鼠	IgG <sub>2</sub>	8.0-9.0	4.5-6.0
	IgG <sub>2a</sub>	7.0-8.0	3.5-5.5
	IgG <sub>2b</sub>	Approx. 7.0	3.0-4.0
	IgG <sub>3</sub>	Approx. 7.0	3.5-5.5
田鼠	IgG <sub>1</sub>	≥ 9.0	7.0-8.0
	IgG <sub>2a</sub>	≥ 9.0	≤ 8.0
	IgG <sub>2b</sub>	≥ 9.0	≤ 8.0
	IgG <sub>3</sub>	≥ 9.0	3.0-4.0

表 3.5 使用protein A Sepharose从不同物种中纯化IgG时常用的结合和洗脱缓冲液

- 

结合强度是使用游离的A蛋白检测的，因此可以用来预测A蛋白在分离纯化效果上的依据。然而当A蛋白被偶联到柱子上时，这种相互作用可能会受到影响。例如鼠源的IgG<sub>1</sub>能够结合到G蛋白Sepharose上，但是不能结合到A蛋白Sepharose上。
- 

对于某些抗体，例如鼠源的IgG<sub>1</sub>在结合缓冲液中加入高浓度的NaCl，是获得有效结合所必须的，推荐使用的结合缓冲液是1.5M甘氨酸，3M氯化钠，pH8.9；或者20mM硫酸钠，3M氯化钠，pH7.0。  
大多数抗体都能在生理PH和离子强度下同A蛋白结合，如果目标蛋白和配体之间的相互作用比较弱，避免过度冲洗，这样会降低产量。
- 

当纯化不稳定的抗体时，使用缓和的洗脱方法，使用冲洗缓冲液反向冲洗，并使用0.1M的氨基乙酰胺和2M的氯化钠，pH7.0在室温洗脱（氨基乙酰胺用于检测蛋白质的波长时具有强烈的吸收值）。这种特殊的洗脱方法是如此的温和以致于IgG是不可能被变性的。可选择的洗脱缓冲液pH3.0的1M乙酸，0.1M的甘氨酸-盐酸缓冲液，pH3.0，或者3M的异硫氰酸钾。注：异硫氰酸钾有时候可以影响免疫球蛋白的活性。

- 使用脱盐柱为IgG片段脱盐或者更换合适的缓冲液（见第二章）。
- 为了增强结合容量，可以串联使用多根HiTrap柱子（1ml或者5ml），或者使用nProtein A Sepharose 4 Fast Flow，或rProtein A Sepharose 4 Fast Flow灌装更大的柱子（见附件5）。
- 当使用大规模发酵时，可以考虑使用任何一种MabSelect，MabSelect是被设计用来增大结合容量，能够以最快的速度处理更大的体积。
- 重新使用A蛋白Sepharose介质时应考虑样品的性质，每一根柱子只能处理相同的样品以避免交叉污染。

### nProtein A Sepharose 4 Fast Flow



图 3.14 nProtein A Sepharose 4 Fast Flow是一种亲和层析柱材，它能够从细胞悬浮培养物、血清和腹水中纯化单克隆抗体和多克隆抗体

nProtein A Sepharose 4 Fast Flow（图3.14）是使用野生型A蛋白偶联到Sepharose 4 Fast Flow上，这种介质适用于从细胞悬浮培养物和血清腹水中回收和纯化单克隆抗体。

Sepharose 4 Fast Flow介质中配体的丢失率是很低的，更进一步nProtein A Sepharose 4 Fast Flow具有很高的机械和化学稳定性。能够耐受高浓度的破坏氢键试剂，例如尿素、盐酸胍和硫氰酸钠。

nProtein A Sepharose 4 Fast Flow可以在实验室水平上被用来大量的灌装XK和Tricorn柱子。nProtein A Sepharose 4 Fast Flow所具有的低配体丢失率和高流速的特性使其能被用于大规模的单克隆抗体和多克隆抗体的纯化。

### 柱子的灌装

参考附件5中柱子灌装的基本建议。



理论上，Sepharose4 Fast Flow介质可以在两步内被灌装进XK和Tricorn柱子中，但是在第一步和第二步灌装时，压力分别不要超过0.3bar(0.03MPa)和3.5bar(0.35MPa)。如果装柱器中没有压力探测装置，可以使用如下流速灌装：第一步时，2.5 ml/min (XK 16/20 柱) 或者 1.0 ml/min (Tricorn 10/100 柱)，第二步时，14 ml/min (XK 16/20 柱) 或者 5.5 ml/min (Tricorn 10/100 柱)。

1. 把所有的材料平衡到纯化蛋白所需要的温度，并对基质进行脱气处理。
2. 使用结合缓冲液快速通过柱子末端的接头以除去气泡。确保在柱子的末端没有被封闭的气泡，关闭柱子，使柱子底部充满蒸馏水。
3. 重悬介质，一次把介质倒入柱中，不断用玻璃棒沿着柱子内壁搅动介质，以减少气泡的出现。
4. 如果使用装柱器，立刻将柱子中充满蒸馏水，将接头或装柱器的盖子加上，并将柱子接在一个泵上。避免在接头的下部或进样管中充满气泡。
5. 打开柱子底部的出口，开动泵并设定好流速。
6. 在保持一定流速下，使蒸馏水流过最少三个柱体积，直到柱子达到预定高度。标出柱床高度。
7. 关闭泵和柱子出口。
8. 如果使用装柱器，去掉装柱器并在柱子上安放接口。
9. 在除掉上样接口后，将接头压入柱子中，直到达到刻线，使缓冲液流过上样接口，关闭接口。
10. 将柱子连接到一个泵上或色谱层析系统，并开始平衡。如果需要重新调整接口。

注：如果下面要进行色谱层析，不要超过装柱流速的75%。


## 样品处理

参照第二章的基本建议

-  离心样品（10000g，10min）以除去细胞和碎片。使用0.45um的滤膜过滤。
-  来自很多物种的IgG在pH大于等于7时对G蛋白有很强的吸附能力，因此样品应该在pH=7时过柱子。如果需要调整样品结合缓冲液的pH和离子强度，这可以通过使用脱盐柱或稀释。


## 缓冲液处理

结合缓冲液：20mM磷酸钠，pH7.0  
洗脱缓冲液：0.1M 柠檬酸缓冲液，pH3.0  
中性缓冲液：1M Tris-HCl，pH9.0

-  缓冲液使用的水和化合物必须是高纯度的，使用前必须经过0.45um的滤膜过滤。


## 纯化步骤

1. 在收集管中加入60-200ul 1M Tris-HCl, pH9.0 (每管收集1ml样品)。


 为了保持酸依赖的IgG活性, 我们推荐在每个收集管中加入60-200ul 1M Tris-HCl, pH9.0, 这保证了最终样品的pH趋近中性。

2. 如果柱子中含有20%乙醇, 用5倍柱体积的蒸馏水冲洗, 线性流速为50-100cm/h。
3. 使用5-10倍柱体积的结合缓冲液, 以150cm/h的速度平衡柱子。
4. 加入处理好的样品。
5. 用结合缓冲液冲洗, 直到吸收值达到基线。

\*见附件7中关于怎样将线性流速 (cm/h) 转化为体积流速 (ml/min)。

 大多数物种来源的IgG可以在生理pH值和离子强度下结合于G蛋白上, 如果优化一个特定物种的IgG结合条件, 请参考最近的文献。如果两者结合强度较弱, 请避免过度冲洗, 否则会降低产量。

6. 使用洗脱缓冲液, 以逐步或线性梯度洗脱, 对于逐步洗脱, 5倍柱体积的洗脱缓冲液就已足够。对于线性梯度洗脱, 20倍柱体积可以分开具有相似结合能力的蛋白。
7. 洗脱后使用5-10倍柱体积的结合缓冲液再生柱子, 柱子可以用于新一轮的纯化。

 可以使用脱盐柱为IgG蛋白脱盐或更换合适的缓冲液 (见第二章)。

## 保存

在4-8度保存到20%乙醇中。

### Protein A HP MultiTrap

Protein A HP MultiTrap是预装有Protein A Sepharose High Performance介质的96孔板, 它常用于蛋白样品处理缓冲液条件优化和从细胞裂解物或生物液体中富集感兴趣的蛋白或抗体。可以同时多个样品的纯化, 这保证了能从很大数量的复合蛋白样品中快速可靠的纯化抗体。

每个包装的Protein A HP MultiTrap包括四块预装好介质的板子和关于目标抗体-抗原复合体的富集免疫共沉淀和抗体纯化的方法手册。用于收集洗脱液和纯化抗体的收集板 (鉴定或信息) 可以被单独订购。

下面的步骤是用来筛选和纯化抗体的, 如果想要知道更多免疫共沉淀的信息, 请从 [www.gelifesciences.com/protein-purification](http://www.gelifesciences.com/protein-purification) 上下载手册28-9067-71。





图 3.15 Protein A HP MultiTrap 96-well plates能够用来快速的多样品筛选和纯化单克隆或多克隆抗体

## 样品处理

参考第二章的基本建议

- 将样品以 $10000\times g$ 的速度离心10分钟，以除去细胞和细胞碎片，并用 $0.45\mu\text{m}$ 滤膜过滤。
- 来自很多物种的IgG在生理PH时对G蛋白有很强的吸附能力，因此样品应该在pH在6-9时过柱子。如果需要调整样品结合缓冲液的pH和离子强度，这可以通过使用脱盐柱或稀释(见第二章)。

## 缓冲液处理

结合缓冲液: 20mM磷酸钠, pH7.0

洗脱缓冲液: 0.1M 甘氨酸-盐酸缓冲液, pH2.7

中性缓冲液: 1M Tris-HCl, pH9.0

- 缓冲液使用的水和化合物必须是高纯度的，使用前必须经过 $0.45\mu\text{m}$ 的滤膜过滤。
- 缓冲液可以使用由Ab buffer Kit (28-9030-59) 提供的10X结合、洗脱缓冲液母液。

## 纯化步骤

1. 准备两个收集板，每板每孔都装有15ul中性缓冲。  
为了保持酸依赖的IgG活性，我们推荐在每个收集管中加入15ul 1M Tris-HCl, pH9.0，这保证了最终样品的pH趋近中性。
2. 翻转并轻轻振动MultiTrap板以重悬基质，除去顶部和底部的封口，并把板子放在收集板上，70-100g离心1min，以除去保存溶液。
3. 加入300ul结合缓冲液平衡，70-100g离心30s。
4. 最多加入300ul抗体样品，温浴4min，并轻轻混匀，70-100g离心30s。
5. 加入300ul结合缓冲液冲洗，70-100g离心30s。重复此步。

大多数物种来源的IgG可以在生理pH值和离子强度下结合于G蛋白上，如果优化一个特定物种的IgG结合条件，请参考最近的文献。如果两者结合强度较弱，请避免过度冲洗，否则会降低产量。

6. 更换在步骤1中准备的干净的收集板。
7. 加入200ul洗脱缓冲液洗脱抗体，70g离心30s，收集洗脱物。重复此步。  
\*大多结合的抗体两步就可以洗下来。

可以使用脱盐柱为IgG蛋白脱盐或更换合适的缓冲液（见第二章）。

## 保存

在4-8度保存到20%乙醇中。

## Protein A HP SpinTrap柱

Protein A HP SpinTrap（图3.16）是用来从抗体-抗原复合物中富集目标抗原和从未经净化的血清和细胞悬浮培养物中纯化抗体的一次性离心柱。这种柱子适用于同时对多个样品进行小规模纯化或用于抗体筛选实验。Protein A HP SpinTrap柱是由Protein A Sepharose High Performance 介质灌装成，它具有很高的蛋白结合能力，并能同抗体纯化中常用的各种缓冲液相适应。


每个包装提供可用于一个标准离心机上使用的16根柱子，和关于目标抗体-抗原复合物的富集免疫共沉淀和抗体纯化的方法手册。在下面叙述到的过程可以被用来筛选和纯化抗体。如果想要知道更多免疫共沉淀的信息，请从[www.gelifesciences.com/protein-purification](http://www.gelifesciences.com/protein-purification)上下载手册28-9067-70。




图 3.16 Protein A HP SpinTrap columns是连有A蛋白配体的分离纯化柱，它能够用于小规模筛选目标抗体

## 样品处理

参考第二章的基本建议

 将样品以10000×g的速度离心10分钟，以除去细胞和细胞碎片，并用0.45um滤膜过滤。


 来自很多物种的IgG在生理PH时对G蛋白有很强的吸附能力，因此样品应该在pH在6-9时过柱子。如果需要调整样品结合缓冲液的pH和离子强度，这可以通过使用脱盐柱或稀释(见第二章)。


## 缓冲液处理

结合缓冲液：20mM磷酸钠，pH7.0

洗脱缓冲液：0.1M 甘氨酸-盐酸缓冲液，pH2.7


中性缓冲液：1M Tris-HCl，pH9.0

 缓冲液使用的水和化合物必须是高纯度的，使用前必须经过0.45um的滤膜过滤。

 缓冲液可以使用由Ab buffer Kit (28-9030-59) 提供的10X结合、洗脱缓冲液母液。

## 纯化步骤

1. 准备两个收集管，每管都装有30ul中性缓冲液。

 为了保持酸依赖的IgG活性，我们推荐在每个收集管中加入30ul 1M Tris-HCl，pH9.0，这保证了最终样品的pH趋近中性。


2. 翻转并轻轻振动柱子以重悬基质，用塑料底盖移除工具除去顶部和底部的封口，保存底盖。

70-100g离心30s，除去保存溶液。

3. 加入600ul结合缓冲液平衡，70-100g离心30s。

4. 最多加入600ul抗体样品，拧紧顶部盖子，温浴4min，并轻轻混匀，70-100g离心30s。

5. 加入600ul结合缓冲液冲洗，70-100g离心30s。

 大多数物种来源的IgG可以在生理pH值和离子强度下结合于G蛋白上，如果优化一个特定物种的IgG结合条件，请参考最近的文献。如果两者结合强度较弱，请避免过度冲洗，否则会降低产量。

6. 加入400ul洗脱缓冲液，并颠倒混匀。将柱子放在一个2ml含有20ul中性缓冲液的离心管上。

70g离心30s，并收集洗脱物。

7. 将柱子放在一个新的2ml含有20ul中性缓冲液的离心管上加入200ul洗脱缓冲液洗脱抗体，

70g离心30s，并收集洗脱物。



可以使用脱盐柱为IgG蛋白脱盐或更换合适的缓冲液（见第二章）。

## 保存

在4-8度保存到20%乙醇中。

## HiTrap Protein A HP columns

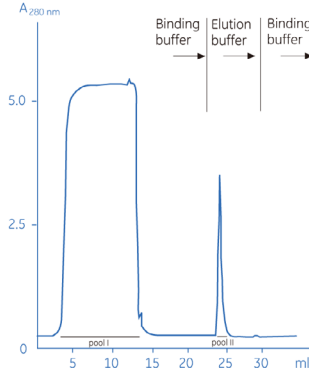


图 3.17 HiTrap Protein A HP columns同注射器、泵或者色谱层析系统连用能够快速的纯化抗体

HiTrap Protein A HP columns是装有1-5ml Protein G Sepharose High Performance介质的预装柱（图 3.17），这种柱子能够方便的从细胞悬浮培养物、血清和腹水中纯化抗体，并可以同注射器、泵或者色谱层析系统ÄKTAdesign™联合使用来快速高效的纯化抗体。同时，若串联使用多个柱子时，可以增大纯化量。

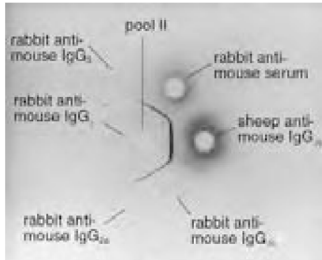
图3.18展示了一个使用1ml HiTrap Protein A HP column 从杂交瘤细胞悬浮培养物中纯化鼠源单克隆抗体IgG<sub>2b</sub>的图谱。

## A. Purification using HiTrap Protein A HP



**Column:** HiTrap Protein A HP 1 ml  
**Sample:** 10 ml hybridoma cell culture containing mouse IgG<sub>2b</sub>  
**Binding buffer:** 20 mM sodium phosphate, pH 7.0  
**Elution buffer:** 0.1 M citric acid-NaOH, pH 3.0  
**Flow rate:** 1 ml/min  
**Electrophoresis:** SDS-PAGE, PhastSystem, PhastGel Gradient 10-15, 1 µl sample, silver stained  
**Immunodiffusion:** 1% Agarose A in 0.75 M Tris, 0.25 M 5,5-diethylbarbituric acid, 5 mM Ca-lactate, 0.02% sodium azide, pH 8.6

## C. Immunodiffusion



## B. SDS-PAGE analysis

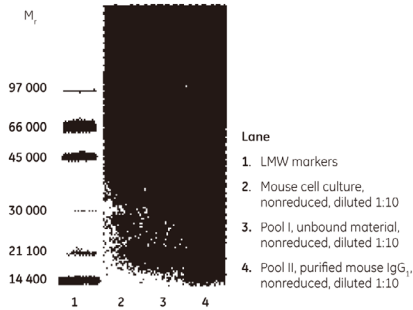


图 3.18 A 使用HiTrap Protein A HP, (1 ml) 柱子纯化鼠源单克隆抗体IgG B 用SDS—PAGE检测用HiTrap Protein A HP, (1 ml) 柱子纯化鼠源单克隆抗体IgG的纯度 (PhastSystem using PhastGel 10-15 (silver stained)) C 琼脂糖凝胶免疫扩散实验

## 样品处理

参考第二章的基本建议

将样品以10000×g的速度离心10分钟，以除去细胞和细胞碎片，并用0.45µm滤膜过滤。

来自很多物种的IgG在生理PH时对A蛋白有很强的吸附能力，因此样品应该在pH在6-9时过柱子。如果需要调整样品结合缓冲液的pH和离子强度，这可以通过使用脱盐柱或稀释(见第二章)。

## 缓冲液处理

结合缓冲液: 20mM磷酸钠, pH7.0

洗脱缓冲液: 0.1M 甘氨酸-盐酸缓冲液, pH2.7

中性缓冲液: 1M Tris-HCl, pH9.0

- 缓冲液使用的水和化合物必须是高纯度的，使用前必须经过0.45um的滤膜过滤。
- HiTrap Protein A HP柱应该同一个注射器共同使用，缓冲液可以用由Ab buffer Kit (28-9030-59) 提供的10×结合、洗脱缓冲液母液。

## 纯化步骤

见附件4中关于使用HiTrap columns纯化抗体的基本策略

1. 在收集管中加入60-200ul 1M Tris-HCl, pH9.0 (每管收集1ml样品)。

- 为了保持酸依赖的IgG活性，我们推荐在每个收集管中加入60-200ul 1M Tris-HCl, pH9.0, 这保证了最终样品的pH趋近中性。

2. 将注射器或者泵中充满蒸流水，除去阻塞头并将柱子连接到注射器（使用提供的连接接头），或实验室用的泵或色谱层析系统上，连接时要点对点的连接以避免在系统中引入气泡。
3. 除去柱子出口的阻塞头。
4. 使用3-5倍柱体积的蒸流水将柱子中的乙醇除去。
5. 使用5倍柱体积的结合缓冲液来平衡柱子，推荐的流速为1ml/min (1ml柱子) 和 5 ml/min (5 ml 柱子)\*。
6. 使用注射器或者泵将预处理过的样品加入泵中，为了或者良好的结果，在上样过程中推荐的流速为：0.2 to 1 ml/min (1 ml 柱) 和 0.5 to 5 ml/min (5 ml 柱)。
7. 使用大量结合冲洗柱子（通常最少5-10倍柱体积），直到吸收值达到基线或者没有物质被洗脱出来。在冲洗的时候推荐的流速是：1 to 2 ml/min (1 ml 柱) 和 5 to 10 ml/min (5 ml 柱)。  
\*当使用1 ml HiTrap柱并采用注射器上样时，1 ml/min的流速大约相当于 30 滴/min;  
当使用5 ml HiTrap柱并采用注射器上样时，5 ml/min的流速大约相当于 120滴/min。

- 大多数物种来源的IgG可以在生理pH值和离子强度下结合于G蛋白上，如果优化一个特定物种的IgG结合条件，请参考最近的文献。如果两者结合强度较弱，请避免过度冲洗，否则会降低产量。

8. 使用洗脱缓冲液进行一步或者线性梯度洗脱。对于一步洗脱，5倍柱体积通常就已足够。对于线性梯度洗脱，10-20倍柱体积就可以将样品洗脱完毕。洗脱时，推荐的流速为：1 to 2 ml/min (1 ml 柱子) and 5 to 10 ml/min (5 ml 柱子)。
9. 洗脱完毕后，使用3-5倍柱体积的结合缓冲液冲洗再生柱子。处理完毕后的柱子可以再次进行下一步的纯化。

- 使用脱盐柱为IgG样品脱盐或者更换缓冲液（见第二章）。
- 同时串联多个HiTrap ProteinA柱子（5ml或1ml）可以 提高蛋白结合的容量，HiTrap ProteinA柱可以同注射器、蠕动泵或者液相色谱层析系统相连接使用（见第五章中关于ÅKTA design 色谱层析系统的详细介绍。）
- 👉 HiTrap Protein A Sepharose HP重复使用取决于样品的性质，并且只能处理相同的样品以避免交叉污染。

## 保存

在4-8度保存到20%乙醇中。

rProtein A Sepharose Fast Flow



图 3.19 rProtein A Sepharose Fast Flow是一种具有高结合容量的亲和层析柱，每毫升柱材能够结合多达50mg抗体

rProtein A Sepharose Fast Flow是对单克隆抗体和多克隆抗体都有很强结合容量的亲和介质。通常认为，rProtein A Sepharose Fast Flow的结合容量高于nProtein A Sepharose 4 Fast Flow。rProtein A Sepharose Fast Flow中使用的重组A蛋白被改造为定向的结合于柱材上，这提高了它对抗体的结合容量，而且具有较低的配体丢失率。

重组A蛋白是由大肠杆菌产生的，在发酵和纯化过程中没有使用人源的IgG作为亲和纯化步骤，因此柱子中不会有人源的IgG被吸附，这降低了人源IgG的污染。

rProtein A Sepharose Fast Flow可以在实验室被灌装入XK或者Tricorn柱中，以扩大产量。rProtein A Sepharose Fast Flow所具有的较低的配体丢失率和高通量的特性使其能够被用来大量的纯化单克隆或者多克隆抗体。它还能被灌装进1ml或5ml的HiTrap rProtein A FF柱中，这可以方便的用于抗体的一步纯化。另外，通过串联多个柱子在一起可以增大它的结合容量。

## 柱子的灌装

参照附件5中的柱子灌装的一般策略。

理论上，Sephacrose4 Fast Flow介质可以在两步内被灌装进XK和Tricorn柱子中，但是在第一步和第二步灌装时，压力分别不要超过0.3bar(0.03MPa)和3.5bar(0.35MPa)。如果装柱器中没有压力探测装置，可以使用如下流速灌装：第一步时，2.5 ml/min (XK 16/20 柱) 或者 1.0 ml/min (Tricorn 10/100 柱)，第二步时，14 ml/min (XK 16/20 柱) 或者 5.5 ml/min (Tricorn 10/100 柱)。

1. 把所有的材料平衡到纯化蛋白所需要的温度，并对基质进行脱气处理。
2. 使用结合缓冲液快速通过柱子末端的接头以除去气泡。确保在柱子的末端没有被封闭的气泡，关闭柱子，使柱子底部充满蒸馏水。
3. 重悬介质，一次把介质倒入柱中，不断用玻璃棒沿着柱子内壁搅动介质，以减少气泡的出现。
4. 如果使用装柱器，立刻将柱子中充满蒸馏水，将接头或装柱器的盖子加上，并将柱子接在一个泵上。避免在接头的下部或进样管中充满气泡。
5. 打开柱子底部的出口，开动泵并设定好流速。
6. 在保持一定流速下，使蒸馏水流过最少三个柱体积，直到柱子达到预定高度。标出柱床高度。
7. 关闭泵和柱子出口。
8. 如果使用装柱器，去掉装柱器并在柱子上安放接口。
9. 在除掉上样接口后，将接头压入柱子中，直到达到刻线，使缓冲液流过上样接口，关闭接口。
10. 将柱子连接到一个泵上或色谱层析系统，并开始平衡。如果需要重新调整接口。

注：如果下面要进行色谱层析，不要超过装柱流速的75%。

## 样品处理

参照第二章的基本建议



离心样品（10000g，10min）以除去细胞和碎片。使用0.45um的滤膜过滤。



来自很多物种的IgG在生理pH时对A蛋白有很强的吸附能力，因此样品应该在生理pH时过柱子。如果需要调整样品结合缓冲液的pH和离子强度，这可以通过使用脱盐柱或稀释。

## 缓冲液处理

结合缓冲液：20mM磷酸钠，pH7.0  
洗脱缓冲液：0.1M 甘氨酸-盐酸缓冲液，pH3-6  
中性缓冲液：1M Tris-HCl，pH9.0



缓冲液使用的水和化合物必须是高纯度的，使用前必须经过0.45um的滤膜过滤。



## 纯化

1. 在收集管中加入60-200ul 1M Tris-HCl, pH9.0 (每管收集1ml样品)。

为了保持酸依赖的IgG活性, 我们推荐在每个收集管中加入60-200ul 1M Tris-HCl, pH9.0, 这保证了最终样品的pH趋近中性。

2. 如果柱子中含有20%乙醇, 用5倍柱体积的蒸馏水冲洗, 线性流速为50-100cm/h。
3. 使用5-10倍柱体积的结合缓冲液, 以150cm/h的速度平衡柱子。
4. 加入处理好的样品。
5. 用结合缓冲液冲洗, 直到吸收值达到基线。

\*见附件7中关于怎样将线性流速 (cm/h) 转化为体积流速 (ml/min)。

大多数物种来源的IgG可以在生理pH值和离子强度下结合于A蛋白上, 如果优化一个特定物种的IgG结合条件, 请参考最近的文献。如果两者结合强度较弱, 请避免过度冲洗, 否则会降低产量。

6. 使用洗脱缓冲液, 以逐步或线性梯度洗脱, 对于逐步洗脱, 5倍柱体积的洗脱缓冲液就已足够。对于线性梯度洗脱, 20倍柱体积可以分开具有相似结合能力的蛋白。
7. 洗脱后使用5-10倍柱体积的结合缓冲液再生柱子, 柱子可以用于新一轮的纯化。

可以使用脱盐柱为IgG蛋白脱盐或更换合适的缓冲液 (见第二章)。

## 保存

在4-8度保存到20%乙醇中。

HiTrap rProtein A FF columns



图 3.20 HiTrap rProtein A FF columns是预装有rProtein A Sepharose Fast Flow的分离纯化柱, 它对单克隆抗体具有很高的结合容量

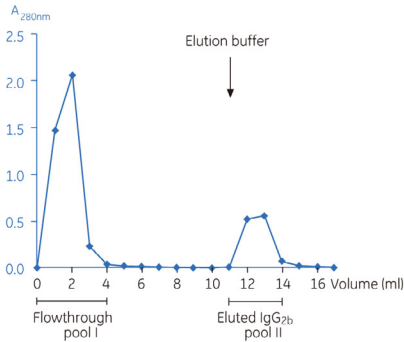
HiTrap rProtein A FF柱是一种装有rProtein A Sepharose Fast Flow介质的预装柱, 它能方便的从细胞悬浮培养物、血清和腹水中纯化单克隆抗体。这类柱子特别适合纯化多种物种的单克隆抗体或用于抗体筛选、过程发展。

柱子有1ml和5ml两种型号，HiTrap rProtein A FF通常同HiTrap柱子一起使用，当连接有注射器、泵或者色谱层析系统时，能够快速的纯化抗体。另外，当多个柱子串联使用时，能够大大的提高抗体的结合容量。

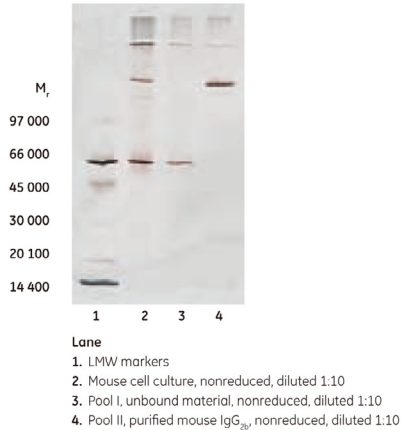
图3.21展示了一张使用1ml的HiTrap rProtein A FF从腹水种纯化鼠源的IgG<sub>2b</sub>，并使用SDS-PAGE银染的过程，目标蛋白的纯度大于95%。

**A. Purification using HiTrap rProtein A FF**

Column: HiTrap rProtein A FF, 1 ml  
 Sample: 1 ml mouse ascites containing IgG<sub>2b</sub> filtered through a 0.45 μm filter.  
 The sample was a kind gift from Dr. N. Linde, EC Diagnostics, Sweden  
 Binding buffer: 20 mM sodium phosphate, pH 7.0  
 Elution buffer: 0.1 M sodium citrate, pH 3.0  
 Flow rate: Approx. 1 ml/min  
 Instrumentation: Syringe



**B. SDS-PAGE analysis**



- Lane**
1. LMW markers
  2. Mouse cell culture, nonreduced, diluted 1:10
  3. Pool I, unbound material, nonreduced, diluted 1:10
  4. Pool II, purified mouse IgG<sub>2b</sub>, nonreduced, diluted 1:10

图 3.21 A 使用 1 ml HiTrap rProtein A FF column 纯化鼠源的 IgG 用 SDS-PAGE 检测用 1 ml HiTrap rProtein A FF column 纯化鼠源的 IgG 的纯度 (on PHastSystem and a PHastGel Gradient 10-15 precast gel (silver staining))，其纯度高于 95%

**样品处理**

参考第二章的基本建议

- 将样品以 10000 × g 的速度离心 10 分钟，以除去细胞和细胞碎片，并用 0.45 μm 滤膜过滤。
- 来自很多物种的 IgG 在生理 pH 时对 A 蛋白有很强的吸附能力，因此样品应该在 pH 在 6-9 时过柱子。如果需要调整样品结合缓冲液的 pH 和离子强度，这可以通过使用脱盐柱或稀释 (见第二章)。

## 缓冲液处理

结合缓冲液：20mM磷酸钠，pH7.0

洗脱缓冲液：0.1M 甘氨酸-盐酸缓冲液，pH2.7

中性缓冲液：1M Tris-HCl，pH9.0

缓冲液使用的水和化合物必须是高纯度的，使用前必须经过0.45um的滤膜过滤。

HiTrap rProtein A FF 1ml或者5ml柱可以同注射器共同使用，缓冲液可以用由Ab buffer Kit (28-9030-59) 提供的10×结合、洗脱缓冲液母液。

## 纯化步骤

见附件4中关于使用HiTrap columns纯化抗体的基本策略

1. 在收集管中加入60-200ul 1M Tris-HCl，pH9.0（每管收集1ml样品）。

为了保持酸依赖的IgG活性，我们推荐在每个收集管中加入60-200ul 1M Tris-HCl，pH9.0，这保证了最终样品的pH趋近中性。

2. 将注射器或者泵中充满蒸流水，除去阻塞头并将柱子连接到注射器（使用提供的连接接头），或实验室用的泵或色谱层析系统上，连接时要点对点的连接以避免在系统中引入气泡。

3. 除去柱子出口的阻塞头。

4. 使用3-5倍柱体积的蒸流水将柱子中的乙醇除去。

5. 使用5倍柱体积的结合缓冲液来平衡柱子，推荐的流速为1ml/min（1ml柱子）和5 ml/min（5 ml 柱子）\*。

6. 使用注射器或者泵将预处理过的样品加入泵中，为了或者良好的结果，在上样过程中推荐的流速为：0.2 to 1 ml/min（1 ml 柱）和 0.5 to 5 ml/min（5 ml 柱）。

7. 使用大量结合冲洗柱子（通常最少5-10倍柱体积），直到吸收值达到基线或者没有物质被洗脱出来。在冲洗的时候推荐的流速是：1 to 2 ml/min（1 ml 柱）和5 to 10 ml/min（5 ml 柱）。

\*当使用1 ml HiTrap柱并采用注射器上样时，1 ml/min的流速大约相当于30 滴/min；

当使用5 ml HiTrap柱并采用注射器上样时，5 ml/min的流速大约相当于120滴/min。

大多数物种来源的IgG可以在生理pH值和离子强度下结合于G蛋白上，如果优化一个特定物种的IgG结合条件，请参考最近的文献。如果两者结合强度较弱，请避免过度冲洗，否则会降低产量。

8. 使用洗脱缓冲液进行一步或者线性梯度洗脱。对于一步洗脱，5倍柱体积通常就已足够。对于线性梯度洗脱，10-20倍柱体积就可以将样品洗脱完毕。洗脱时，推荐的流速为：1 to 2 ml/min (1 ml 柱子) and 5 to 10 ml/min (5 ml 柱子)。
9. 洗脱完毕后，使用3-5倍柱体积的结合缓冲液冲洗再生柱子。处理完毕后的柱子可以再次进行下一步的纯化。



使用脱盐柱为IgG样品脱盐或者更换缓冲液（见第二章）。



同时串联多个HiTrap rProtein A FF柱子（5ml或1ml）可以提高蛋白结合的容量，HiTrap rProtein A FF柱可以同注射器、蠕动泵或者液相色谱层析系统相连接使用（见第五章中关于ÅKTA design 色谱层析系统的详细介绍。）



HiTrap rProtein A FF柱重复使用取决于样品的性质，并且只能处理相同的样品以避免交叉污染。

## 保存

在4-8度保存到20%乙醇中。

## MabSelect柱材和预装柱

MabSelect家族主要包括MabSelect, MabSelect SuRe, and MabSelect Xtra等柱材和预装在HiTrap柱中用来实验室水平纯化单克隆抗体和过程优化的预装柱。MabSelect 柱材和BioProcess™ 亲和柱材能以色谱层析的方法从大量的上样体积中纯化到单克隆抗体。被改造过的重组A蛋白能定向的连接到高度交联的琼脂糖凝胶上，这种牢固的亲介质能够增强柱材对IgG的结合容量。低配体丢失率和新的高度稳定的基质使得MabSelect柱材能够用于大量的纯化单克隆抗体。

在实验室水平上，MabSelect可以被灌装成1ml或者5ml的柱子用于纯化单克隆抗体，也可以通过串联多根HiTrap柱来增加抗体的结合容量。预装的MabSelect柱材可以耐受很高的流速和较高的柱压，并能在大体积应用时保持较高的结合容量。



图 3.22 用于实验室水平纯化单克隆抗体的 HiTrap MabSelect, HiTrap MabSelect SuRe和 HiTrap MabSelect Xtra columns, 它们能在高流速下仍有优异的结合能力

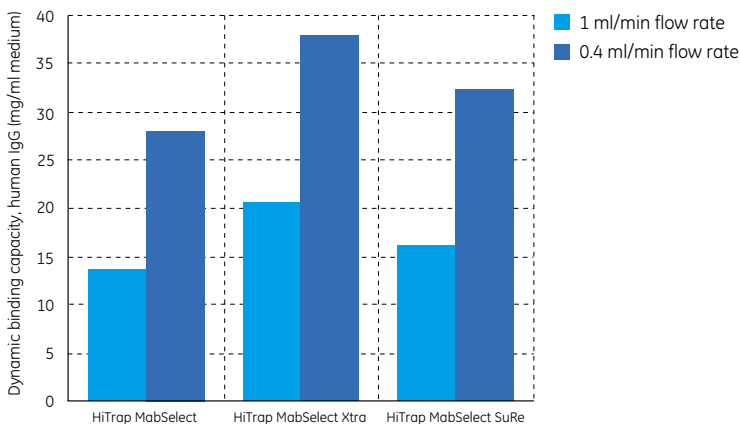


图 3.23 MabSelect 介质采用高度交联的琼脂糖，可以用于生产规模的纯化，它具有的牢固的特性能够用于高通量的亲和色谱纯化 IgG

MabSelect SuRe 采用了一种 MabSelect 家族广泛采用的高交联度的琼脂糖作为介质，这种琼脂糖能够在较低的压力下就具有较高的流速。不同于不同的 MabSelect 家族所采用的重组型 A 蛋白，MabSelect SuRe 采用了一种耐碱性的重组 A 蛋白，它能够耐受诸如氢氧化钠等剧烈的洗脱条件，这大大节约了使用成本。这种高度耐碱性的重组 A 蛋白柱子也使得在平时的大规模纯化中增加了使用循环。

HiTrap MabSelect SuRe columns 是预装有 MabSelect SuRe 的分离纯化柱，这些柱子能够充分的利用原位清洗的方法，这大大的方便了工业级单克隆抗体的纯化过程。

MabSelect Xtra 是为了满足在单克隆抗体的表达和纯化过程中需要增大纯化量的需要。MabSelect Xtra 使用的是同 MabSelect 家族相同的重组 A 蛋白，但是减小了介质颗粒的大小并增加了介质的多孔性，这增加了柱材在高流速时的动力结合能力。因为这种柱材能够处理低体积高浓度的上样样品，所以它能有效的降低总的生产成本。使用 HiTrap MabSelect Xtra 可以进行过程优化、筛选纯化条件和小规模的纯化单克隆抗体。

## 使用 MabSelect or MabSelect SuRe 装 Tricorn 10/100 柱

参考附件 5 中装柱的一般策略

## 准备胶悬液

悬胶溶液：50mM磷酸缓冲液，0.15 M NaCl, pH 7.0

装柱溶液：0.15 M NaCl

10mlMabSelect或者MabSelect SuRe（相当于14ml20%乙醇的MabSelect或者MabSelect SuRe）

布氏漏斗（中号，G3类型）

过滤锥形瓶

1. 把所有的材料平衡到室温。
2. 将布氏漏斗安装在过滤锥形瓶上。
3. 将14ml20%乙醇的MabSelect或者MabSelect SuRe放在布氏漏斗上，然后在用2 × 20 ml 的灌注溶液冲洗后，再用2 × 20 ml蒸馏水冲洗。
4. 然后把所有的介质从布氏漏斗上转移到一个烧杯里面，加入9.5ml灌注溶液，这就得到51%的悬胶液。

## 组合并灌注

### 需要的仪器

Tricorn 10/100 column,

Tricorn 10 Coarse Filter Kit

Tricorn Packing Connector 10-10

Tricorn Glass Tube 10/100

Tricorn 10 bottom unit with a 10 mm filter mounted

Pump P-901 or similar

20 ml pipettes

所需要仪器的货号见订货信息中。

1. 关于所有的柱子的部件和装柱仪器的详细说明在随柱子所提供的说明书里都能找到，在装柱以前要确保所有的部件都是完整和干净的。
2. 用70%的乙醇湿润Tricorn 10 Coarse Filter Kit中提供的柱子底部滤膜，并将其放入柱子底部。
3. 将滤膜固定器放入柱子中，保证锁定位置能够同柱子的卡槽部分牢牢卡住。  
最后将固定器固定好。
4. 将柱子末端的堵头旋上，并在末端加一个阻止头。
5. 将Tricorn Packing Connector 10-10旋在柱子的顶部，这个装柱器同特定的O-Rings相适应，这在Tricorn Packing Connector 10-10有提供。
6. 将柱子和装柱部分固定好。
7. 将Tricorn Glass Tube 10/100旋在Tricorn Packing Connector 10-10的顶部对应部分。
8. 使用20ml的枪头不断的将重旋好的51% MabSelect or MabSelect SuRe悬胶加入到玻璃管中。



将重旋好的51% MabSelect or MabSelect SuRe悬胶小心的沿着玻璃管的管壁往下加，以避免出现气泡。

9. 将加装有10mm滤膜的Tricorn 10 Bottom Unit安放在玻璃管的顶端，这个滤膜可能会打断以前装柱的流速。将一个烧杯放在柱子的出口处，并将柱子顶部连接到泵上，除去阻止头。装柱通常情况下是两步完成的：对于MabSelect而言，第一步为2.5 ml/min (191 cm/h)，20min，第二步为10 ml/min (764 cm/h)，2 min。对于MabSelect SuRe而言，第一步为0.8 ml/min(61 cm/h)，20 min，第二步为10 ml/min (764 cm/h)，2 min。



在装柱过程中要保证柱压不能超过压力限度 (<5MPa)。

10. 关闭并且取出泵体，重新关闭Tricorn 10 Bottom Unit。除去Tricorn 10/100 Glass Tube 和 packing connector。重新装好柱子。
11. 如果需要，可以通过一个巴斯德枪头或者小抹刀重旋顶部的胶并除去，对于10cm长的柱子，柱子的顶部应该和玻璃管口部底末端相平，并用灌注溶液填平。
12. 用70%的乙醇润湿Tricorn 10 Coarse Filter Kit中的滤膜、adapter和O-ring。将滤膜放在adapter的正中央并使滤膜的粗糙的一面朝向adapter，将adapter加装在柱子上，连上泵。
13. 除去阻止头，并继续以10 ml/min (764 cm/h)冲洗 2 min。
14. 标记柱子的顶部的位置，关闭泵，重新将阻止头放在柱子的底部，将adapter放在柱子上标记位置1mm一下的位置。
15. 在检查装柱效果以前使用15ml蒸馏水以5 ml/min (382 cm/h)的流速冲洗。

## 用MabSelect Xtra装Tricorn 10/100柱

参考附件5中装柱的一般策略

### 准备胶悬液

悬胶溶液：50mM磷酸缓冲液，0.15 M NaCl, pH 7.0

装柱溶液：0.15 M NaCl

4 M NaCl

10ml MabSelect Xtra（相当于14ml20%乙醇的MabSelect Xtra）

布氏漏斗（中号，G3类型）

过滤锥形瓶

1. 把所有的材料平衡到室温。
2. 将布氏漏斗安装在过滤锥形瓶上。
3. 将14ml20%乙醇的MabSelect Xtra放在布氏漏斗上，然后在用2 × 20 ml的灌注溶液冲洗后，再用2 × 20 ml蒸馏水冲洗。
4. 然后把所有的介质从布氏漏斗上转移到一个烧杯里面，加入15ml灌注溶液，这就得到40%的悬胶液。

## 组合并灌注

### 需要的仪器

Tricorn 10/100 column,

Tricorn 10 Coarse Filter Kit

Tricorn Packing Connector 10-10

Tricorn Glass Tube 10/100

Tricorn 10 bottom unit with a 10 mm filter mounted

Pump P-901 or similar

25 ml pipettes

所需要仪器的货号见订货信息中。

1. 关于所有的柱子的部件和装柱仪器的详细说明在随柱子所提供的说明书里都能找到，在装柱以前要确保所有的部件都是完整和干净的。
2. 用70%的乙醇湿润Tricorn 10 Coarse Filter Kit中提供的柱子底部滤膜，并将其放入柱子底部。
3. 将滤膜固定器放入柱子中，保证锁定位置能够同柱子的卡槽部分牢牢卡住。最后将固定器固定好。
4. 将柱子末端的堵头旋上，并在末端加一个阻止头。
5. 将Tricorn Packing Connector 10-10旋在柱子的顶部，这个装柱器同特定的O-Rings相适应，这在Tricorn Packing Connector 10-10有提供。
6. 将柱子和装柱部分固定好。
7. 将Tricorn Glass Tube 10/100旋在Tricorn Packing Connector 10-10的顶部对应部分。
8. 使用枪头将Tricorn柱中加入14ml的4M氯化钠。
9. 使用25ml的枪头不断的将重旋好的40% MabSelect Xtra悬胶加入到玻璃管中。



将重旋好的40% MabSelect Xtra悬胶小心的沿着玻璃管的管壁往下加，以避免出现气泡。



悬胶应该在4M的氯化钠上面形成一层。



10. 将加装有10mm滤膜的Tricorn 10 Bottom Unit安放在玻璃管的顶端，这个滤膜可能会打断以前装柱的流速。将一个烧杯放在柱子的出口处，并将柱子顶部连接到泵上，除去阻止头。装柱通常情况下是两步完成的：对于MabSelect而言，第一步为2.5 ml/min (191 cm/h)，20min，第二步为10 ml/min (764 cm/h)，2 min。对于MabSelect SuRe而言，第一步为0.8 ml/min(61 cm/h)，20 min，第二步为10 ml/min (764 cm/h)，2 min。



在装柱过程中要保证柱压不能超过压力限度 (<5MPa)。

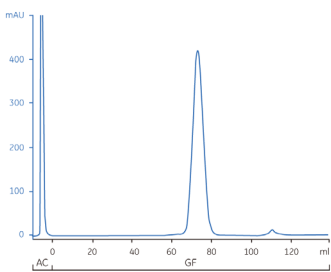
11. 关闭并且取出泵体，重新关闭Tricorn 10 Bottom Unit。除去Tricorn 10/100 Glass Tube和packing connector。重新装好柱子。
12. 如果需要，可以通过一个巴斯德枪头或者小抹刀重旋顶部的胶并除去，对于10cm长的柱子，柱子的顶部应该和玻璃管口部底末端相平，并用灌注溶液填平。
13. 用70%的乙醇润湿Tricorn 10 Coarse Filter Kit中的滤膜、adapter和O-ring。将滤膜放在adapter的正中央并使滤膜的粗糙的一面朝向adapter，将adapter加装在柱子上，连上泵。
14. 除去阻止头，并继续以10 ml/min (764 cm/h)冲洗 2 min。
15. 标记柱子的顶部的位置，关闭泵，重新将阻止头放在柱子的底部，将adapter放在柱子上标记位置1mm一下的位置。
16. 在检查装柱效果以前使用15ml蒸馏水以5 ml/min (382 cm/h)的流速冲洗。

## HiTrap MabSelect和 HiTrap MabSelect Xtra

这一部分简要的叙述了使用HiTrap MabSelect和 HiTrap MabSelect Xtra纯化单克隆抗体的简要步骤。

图3.24展示了使用HiTrap MabSelect纯化鼠源的单克隆抗体IgG<sub>2a</sub>的亲亲和层析过程，所后又进行了凝胶过滤的进一步纯化过程，纯化好的单克隆抗体在SDS-PAGE上是第四道。

### A. Purification using HiTrap MabSelect on ÄKTApur MAB



**Affinity column:** HiTrap MabSelect 1 ml  
**Gel filtration column:** HiLoad 16/60 Superdex 200 pg  
**Sample:** Filtered mouse myeloma cell culture, 165 mg/l IgG<sub>2a</sub>  
**Sample volume:** 75 ml  
**Binding buffer (affinity):** 20 mM phosphate, 0.15 M NaCl, pH 7.4  
**Elution buffer (affinity):** 0.1 M sodium citrate, pH 3.0  
**Buffer (gel filtration):** 0.15 M NaCl  
**Flow rate:**  
**affinity:** 1 ml/min  
**gel filtration:** 1.5 ml/min  
**System:** ÄKTApur MAB

### B. SDS-PAGE analysis

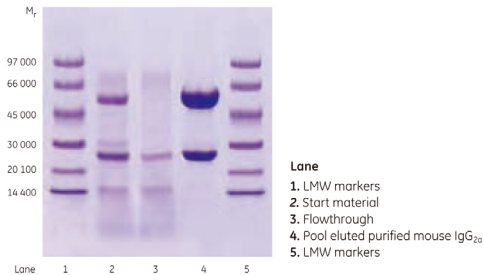
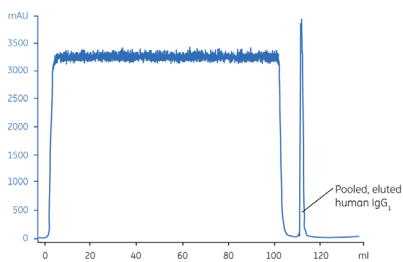


图3.24用HiTrap MabSelect纯化鼠源的单克隆抗体IgG<sub>2a</sub>的亲亲和层析过程，并用凝胶过滤的进一步纯化过程，纯化好的单克隆抗体在SDS-PAGE第四道

在图3.25中展示了使用HiTrap MabSelect Xtra纯化人源的单克隆抗体IgG的过程，纯化好的高纯度的单克隆抗体在SDS-PAGE的第四道。

### A. Purification using HiTrap MabSelect Xtra on ÄKTApur Explorer 10



**Column:** HiTrap MabSelect Xtra 1 ml  
**Sample:** Clarified CHO cell culture, 0.11 mg/ml human IgG<sub>1</sub>  
**Sample volume:** 100 ml  
**Binding buffer:** 20 mM sodium phosphate, 0.15 M NaCl, pH 7.4  
**Elution buffer:** 0.1 M sodium citrate, pH 3.0  
**Flow rate:** 1 ml/min  
**System:** ÄKTApur Explorer 10

### B. SDS-PAGE analysis

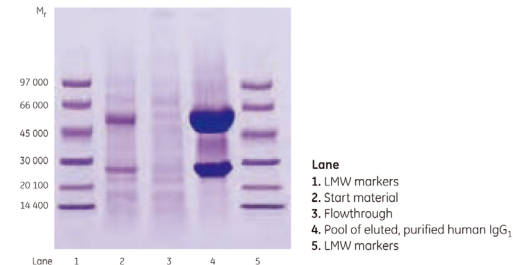


图3.25 用HiTrap MabSelect Xtra纯化人源的单克隆抗体IgG的过程，纯化好的高纯度的单克隆抗体在SDS-PAGE的第四道

## 样品处理

参考第二章中的基本建议



用10000×g离心样品10分钟，以除去细胞和碎片，并用0.45um滤膜过滤。



来自很多物种的IgG在生理PH条件下同A蛋白有着很强的结合能力，样品应该在PH6到9间上样，如果需要的话，应该调节结合缓冲液的PH和离子强度，具体操作可以通过脱盐柱来实现，或者稀释样品，更换PH。

## 缓冲液处理

结合缓冲液：20mM磷酸钠，0.15M 氯化钠pH7.2

洗脱缓冲液：0.1M 柠檬酸钠，pH3-3.6

中性缓冲液：1M Tris-HCl，pH9.0



使用的水和化学试剂都必须是高纯度的，所有的缓冲液在使用前都必须经过0.45um的滤膜过滤。

## 纯化过程

见附件4中关于使用HiTrap columns纯化抗体的基本策略

1. 在收集管中加入60-200ul 1M Tris-HCl，pH9.0（每管收集1ml样品）。



为了保持酸依赖的IgG活性，我们推荐在每个收集管中加入60-200ul 1M Tris-HCl，pH9.0，这保证了最终样品的pH趋近中性。

2. 将注射器或者泵中充满蒸流水，除去阻塞头并将柱子连接到注射器（使用提供的连接接头），或实验室用的泵或色谱层析系统上，连接时要点对点的连接以避免在系统中引入气泡。

3. 除去柱子出口的阻塞头。

4. 使用3-5倍柱体积的蒸流水将柱子中的乙醇除去。

5. 使用5倍柱体积的结合缓冲液来平衡柱子，推荐的流速为1ml/min（1ml柱子）和5 ml/min（5 ml 柱子）\*。

6. 使用注射器或者泵将预处理过的样品加入泵中，为了或者良好的结果，在上样过程中推荐的流速为：0.2 to 1 ml/min（1 ml 柱）和0.5 to 5 ml/min（5 ml 柱）。

7. 使用大量结合冲洗柱子（通常最少5-10倍柱体积），直到吸收值达到基线或者没有物质被洗脱出来。在冲洗的时候推荐的流速是：1 to 2 ml/min（1 ml 柱）和5 to 10 ml/min（5 ml 柱）。

8. 使用洗脱缓冲液进行一步或者线性梯度洗脱。对于一步洗脱，5倍柱体积通常就已足够。对于线性梯度洗脱，10-20倍柱体积就可以将样品洗脱完毕。洗脱时，推荐的流速为：1 to 2 ml/min (1 ml 柱子) and 5 to 10 ml/min (5 ml 柱子)。

\*当使用1 ml HiTrap柱并采用注射器上样时，1 ml/min的流速大约相当于30 滴/min，；当使用5 ml HiTrap柱并采用注射器上样时，5 ml/min的流速大约相当于 120滴/min 。



使用分布洗脱能够更加浓缩蛋白并能够节约缓冲液和每一个循环的时间。当每一个洗脱收集池中蛋白浓度过高时，应该适当降低流速。



当优化洗脱条件时，应该采用能够有效洗脱抗体蛋白的最高的PH，因为这能有效的避免某一些对低PH敏感的抗体的变性。

9. 洗脱完毕后，使用3-5倍柱体积的结合缓冲液冲洗再生柱子。

处理完毕后的柱子可以再次进行下一步的纯化。

10. 如果需要，使用原位再生法再生柱子（见后面的原位再生法）。



使用脱盐柱为IgG样品脱盐或者更换缓冲液（见第二章）。



HiTrap MabSelect Xtra重复使用取决于样品的性质，并且只能处理相同的样品以避免交叉污染。

## 原位清洗

为了除去沉淀或是变性的污染物，或者因为疏水作用而结合到柱子上面的一些物质，可以采用原位清洗的策略，具体操作见附件1中的HiTrap MabSelect/HiTrap MabSelect Xtra (28-4084-14)原位清洗法，也可以参考网站[www.gelifesciences.com/protein-purification](http://www.gelifesciences.com/protein-purification)。

## 保存

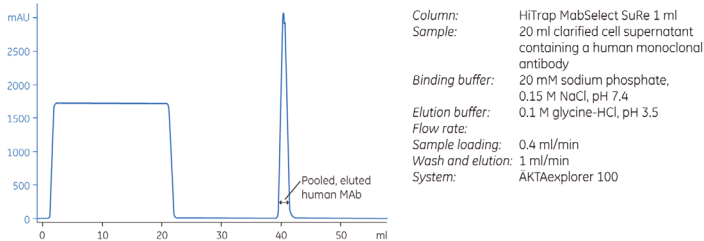
保存于4° C to 8° C.的20%乙醇中。

## HiTrap MabSelect SuRe

这一部分描述了如何用HiTrap MabSelect SuRe来纯化单克隆抗体，并包含了如何对柱子进行原位清洗以避免在不同批次抗体的纯化时所造成的交叉污染，同时，此部分还叙述了在一次纯化后所需要的通常的柱子处理手段。

图3.26展示了一个使用HiTrap MabSelect SuRe柱亲和纯化人源单克隆抗体的过程。同时，也包括了SDS-PAGE检测，通过一步亲和纯化，得到了很高纯度的人源的单克隆抗体（见SDS-PAGE第三泳道）。

#### A. Purification using HiTrap MabSelect SuRe on ÄKTAexplorer 100



#### B. SDS-PAGE analysis

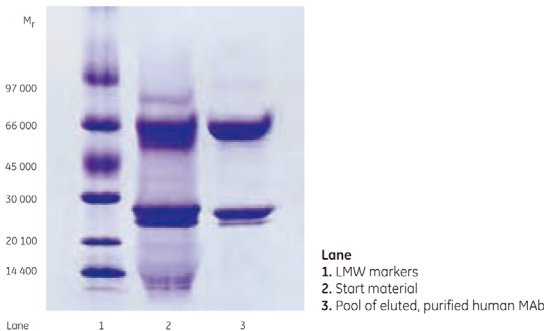


图3.26用HiTrap MabSelect SuRe柱亲和纯化人源单克隆抗体的过程，并用SDS-PAGE检测，通过一步亲和纯化，得到了很高纯度的人源的单克隆抗体（SDS-PAGE第三泳道）。

### 样品处理

参考第二章中的基本建议

- 用10000×g离心样品10分钟，以除去细胞和碎片，并用0.45μm滤膜过滤。
- 来自很多物种的IgG在生理PH条件下同A蛋白有着很强的结合能力，样品应该在PH6到9间上样，如果需要的话，应该调节结合缓冲液的PH和离子强度，具体操作可以通过脱盐柱来实现，或者稀释样品，更换PH。

### 缓冲液处理

结合缓冲液：20mM磷酸钠，0.15M 氯化钠pH7.2

洗脱缓冲液：0.1M 柠檬酸钠，pH3-3.6

中性缓冲液：1M Tris-HCl，pH9.0

- 使用的水和化学试剂都必须是高纯度的，所有的缓冲液在使用前都必须经过0.45um的滤膜过滤。

## 纯化过程

见附件4中关于使用HiTrap columns纯化抗体的基本策略

1. 在收集管中加入60-200ul 1M Tris-HCl, pH9.0 (每管收集1ml样品)。

- 为了保持酸依赖的IgG活性，我们推荐在每个收集管中加入60-200ul 1M Tris-HCl, pH9.0, 这保证了最终样品的pH趋近中性。

2. 将注射器或者泵中充满蒸流水，除去阻塞头并将柱子连接到注射器（使用提供的连接接头），或实验室用的泵或色谱层析系统上，连接时要点对点的连接以避免在系统中引入气泡。
3. 除去柱子出口的阻塞头。
4. 使用3-5倍柱体积的蒸流水将柱子中的乙醇除去。
5. 使用5倍柱体积的结合缓冲液来平衡柱子，推荐的流速为1ml/min (1ml柱子)和5 ml/min (5 ml 柱子)\*。
6. 使用注射器或者泵将预处理过的样品加入泵中，为了或者良好的结果，在上样过程中推荐的流速为：0.2 to 1 ml/min (1 ml 柱) 和 0.5 to 5 ml/min (5 ml 柱)。
7. 使用大量结合冲洗柱子（通常最少5-10倍柱体积），直到吸收值达到基线或者没有物质被洗脱出来。在冲洗的时候推荐的流速是：1 to 2 ml/min (1 ml 柱) 和 5 to 10 ml/min (5 ml 柱)。
8. 使用洗脱缓冲液进行一步或者线性梯度洗脱。对于一步洗脱，5倍柱体积通常就已足够。对于线性梯度洗脱，10-20倍柱体积就可以将样品洗脱完毕。洗脱时，推荐的流速为：1 to 2 ml/min (1 ml 柱子) and 5 to 10 ml/min (5 ml 柱子)。  
\*当使用1 ml HiTrap柱并采用注射器上样时，1 ml/min的流速大约相当于30 滴/min; 当使用5 ml HiTrap柱并采用注射器上样时，5 ml/min的流速大约相当于 120滴/min 。

- 使用分布洗脱能够更加浓缩蛋白并能够节约缓冲液和每一个循环的时间。当每一个洗脱收集池中蛋白浓度过高时，应该适当降低流速。

- 当优化洗脱条件时，应该采用能够有效洗脱抗体蛋白的最高的PH，因为这能有效的避免某一些对低PH敏感的抗体的变性。

9. 洗脱完毕后，使用3-5倍柱体积的结合缓冲液冲洗再生柱子。处理完毕后的柱子可以再次进行下一步的纯化。
10. 如果需要，使用原位再生法再生柱子（见后面的原位再生法）。



使用脱盐柱为IgG样品脱盐或者更换缓冲液（见第二章）。



HiTrap MabSelect SuRe重复使用取决于样品的性质，并且只能处理相同的样品以避免交叉污染。

## 原位清洗

为了除去沉淀或是变性的污染物，或者非常紧密的结合到柱子上面的一些物质，可以采用原位清洗的策略。如果这样的污染物非常容易聚集，那么它们可能改变柱子的性质，如减少柱子的结合容量或者污染后继的纯化操作等。如果沉淀比较严重，则可能阻塞柱子，使柱压增高流速减慢。



经常的进行原位清洗能够除去污染物并能保持柱子的结合能力，流速特性和HiTrap MabSelect SuRe的基本性能。如果观察到柱子的压力升高，这就说明柱子需要清洗了。我们在进行下一次纯化前推荐跑一次没有上样的柱层析，包括原位清洗，以除去可能残留的微量的A蛋白。

具体操作见附件1中的HiTrap MabSelect/HiTrap MabSelect Xtra (28-4084-14)原位清洗法，也可以参考网站[www.gelifsciences.com/protein-purification](http://www.gelifsciences.com/protein-purification)。

## 保存

保存于4° C to 8° C.的20%乙醇中。

## 纯化其它类型的抗体

### IgA

A蛋白能够吸附人源的IgA和人源的骨髓瘤IgA<sub>2</sub>，但是不能吸附IgA<sub>1</sub>。来自猪、狗、猫和犬科动物的IgA也同样能够被A蛋白所吸附。



对于常规纯化，最好能够发展一种能够同IgA特异性结合的抗体来对IgA进行免疫特异性纯化，并把这种抗体偶连道亲和柱材上，这样能够获得高分辨率和高选择性的纯化介质（见下文叙述），同样，也可以采用多步纯化的策略来进行纯化（见第六章）。

## IgD

G蛋白和A蛋白都不能结合IgD。



对于常规纯化，最好能够发展一种能够同IgD特异性结合的抗体来对IgD进行免疫特异性纯化，并把这种抗体偶连道亲和柱材上，这样能够获得高分辨率和高选择性的纯化介质（见下文叙述），同样，也可以采用多步纯化的策略来进行纯化（见第六章）。

## IgE

IgE在人和鼠的血清中存在的浓度都很低，这使得纯化IgE时难度非常大，而且G蛋白和A蛋白都不能结合IgE。



对于常规纯化，最好能够发展一种能够同IgE特异性结合的抗体来对IgE进行免疫特异性纯化，并把这种抗体偶连道亲和柱材上，这样能够获得高分辨率和高选择性的纯化介质（见下文叙述）。

## IgM

IgM存在于人和鼠的血清当中，它能同A蛋白产生微弱的作用。在纯化IgM时，实践证明，使用嗜硫吸附配体是一个纯化这种蛋白有效的手段。

在下文中讨论了使用HiTrap IgM Purification HP从杂交骨髓瘤细胞悬浮培养物中纯化IgM单克隆抗体的技术，但这中技术有时仅适用于从其它种类的IgM纯化时作为开始筛选结合和洗脱条件。

### 使用HiTrap IgM Purification HP纯化IgM的技术

HiTrap IgM Purification HP 1 ml是预装有嗜硫吸附介质（在Sepharose High Performance上偶连了2-mercaptopyridine）的亲合层析柱。这种柱子结合IgM的结合容量是5mg/ml。这种柱子能够用于纯化天然状态的人源IgM或是单克隆的IgM。IgM抗体蛋白同嗜硫配体间的结合方式是电子的释放与结合和疏水疏水相互作用的联合作用的结果。



在某些情况下，Protein A Sepharose介质能够替代HiTrap IgM Purification HP用来纯化人源单克隆抗体IgM，或者来自平常血清的IgM，来自犬科的IgM或能够结合A蛋白的猪、狗和猫的多克隆IgA。

图3.28展示了从杂交瘤细胞悬浮培养物中纯化单克隆 $\alpha$ -Shigella IgM的结果。使用SDS-PAGE检测发现纯化的纯度超过80%，使用ELISA检测能够看到纯化后的样品具有很高的活性（结果没有展示）。



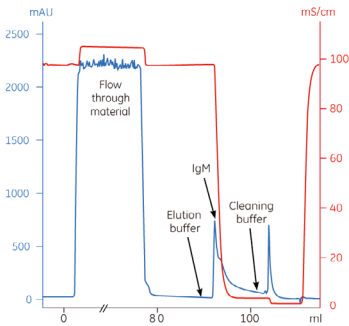


Fig 3.28. Purification of  $\alpha$ -Shigella IgM on HiTrap IgM Purification HP.

Column: HiTrap IgM Purification HP  
 Sample: 75 ml of cell culture supernatant containing  $\alpha$ -Shigella IgM, filtered through a 0.45  $\mu$ m filter  
 Binding buffer: 20 mM sodium phosphate buffer, 0.5 M potassium sulfate, pH 7.5  
 Elution buffer: 20 mM sodium phosphate buffer, pH 7.5  
 Cleaning buffer: 20 mM sodium phosphate buffer, pH 7.5, 30% isopropanol  
 Flow rate: 1 ml/min

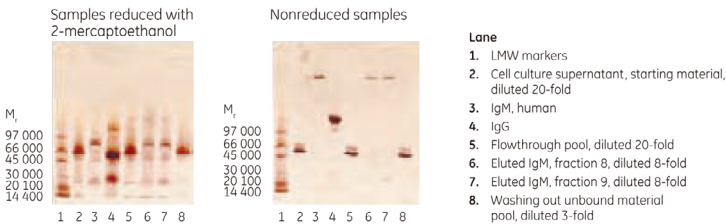


图3.28从杂交瘤细胞悬浮培养物中纯化单克隆 $\alpha$ -Shigella IgM的结果，用SDS—PAGE检测（PhastGel 4-15, silver staining）

## 样品处理

参考第二章中的基本建议

## 缓冲液处理

结合缓冲液：20mM磷酸钠，0.8M硫酸铵，PH7.5  
 洗脱缓冲液：20mM磷酸钠，PH7.5  
 冲洗缓冲液：20mM磷酸钠，30%异丙醇，PH7.5，



样品中必须含有同结合缓冲液中同样浓度的硫酸铵（0.8M）。可以在细胞悬浮培养物中缓慢的加入少量的固体硫酸铵直到最终浓度达到0.8M，整个过程都要轻轻连续的搅拌。在上样以前要用0.45 $\mu$ m的滤膜过滤样品。有些单克隆的IgM可能在0.8M的硫酸铵中并不结合到柱子上，此时可以提高硫酸铵的浓度到1M以提高其结合能力。



为了避免IgM的沉淀，在加入硫酸铵时要非常缓慢。当在细胞悬浮培养基中加入血清时，增加硫酸铵的浓度会增加IgG的结合，这是在纯化中应该注意到的。如果在纯化到的IgM中有IgG的污染，那么可以用HiTrap Protein A HP, HiTrap rProtein A FF, 或者HiTrap Protein G HP除去IgG。



在某些情况下，0.8M的硫酸铵可以被0.5M的硫酸钾所代替，大多数单克隆的IgM都能够在0.5M的硫酸钾存在时结合到柱子上去，并且0.8M的硫酸铵和0.5M的硫酸钾中纯化的单克隆的IgM的纯度是相当的。

## 纯化过程

见附件4中关于使用HiTrap columns纯化抗体的基本策略

1. 将注射器或者泵中充满蒸流水，除去阻塞头并将柱子连接到注射器（使用提供的连接接头）。
2. 除去柱子出口的阻塞头。
3. 使用3-5倍柱体积的蒸流水将柱子中的乙醇除去。
4. 使用5倍柱体积的结合缓冲液来平衡柱子，推荐的流速为1ml/min（1ml柱子）。
5. 使用注射器或者泵将预处理过的样品加入泵中，为了或者良好的结果，在上样过程中推荐的流速为：0.2 to 1 ml/min (1 ml 柱)
6. 使用15ml结合冲洗柱子，直到吸收值达到基线或者没有物质被洗脱出来。在冲洗的时候推荐的流速是：1 to 2 ml/min (1 ml 柱)。
7. 使用12ml洗脱缓冲液进行一步或者线性梯度洗脱，但有时候需要更大体积的洗脱缓冲液来打破这种相互作用。
8. 洗脱完毕后，使用7ml的冲洗缓冲液来再生柱子，并用5ml的结合缓冲液重新平衡柱子，这样柱子可以用于下一轮新的纯化过程。

\*当使用1 ml HiTrap柱并采用注射器上样时，1 ml/min的流速大约相当于30 滴/min。



有些单克隆的IgM同柱材之间结合的过于紧密而不容易被完全洗脱，残留的IgM能够在清洗柱子的过程中被完全洗掉，但是高浓度的异丙醇能够使IgM变性沉淀。这可以立刻为IgM更换缓冲液（见第二章）或是稀释样品以保存IgM。可能更低浓度的异丙醇同样能够洗脱IgM并减少IgM沉淀的风险。



HiTrap IgM Purification HP重复使用取决于样品的性质，并且只能处理相同的样品以避免交叉污染。



将多个HiTrap IgM Purification HP柱串联起来能够增加对IgM的结合容量，HiTrap IgM Purification HP能够同注射器、蠕动泵或者液相层析系统相连接。

## 保存

保存于4° C to 8° C的20%乙醇中。

## IgY

IgY是仅存于鸟类中的一种抗体，它不能够使用A蛋白和G蛋白纯化。IgY能够很容易的使用HiTrap IgY Purification HP从鸟卵黄中纯化得到，纯度高于70%。

### 使用HiTrap IgY Purification HP纯化IgY

HiTrap IgY Purification HP 5ml是预装有嗜硫吸附介质（在Sepharose High Performance上偶连了2-mercaptopyridine）的亲合层析柱。IgY抗体蛋白同嗜硫配体间的结合方式是电子的释放与结合和疏水疏水相互作用的联合作用的结果。

图3.30展示了从45ml蛋卵黄（相当于一个卵黄的四分之一）中纯化 $\alpha$ -Hb IgY的过程，SDS-PAGE（图3.31）显示其纯度超过70%。

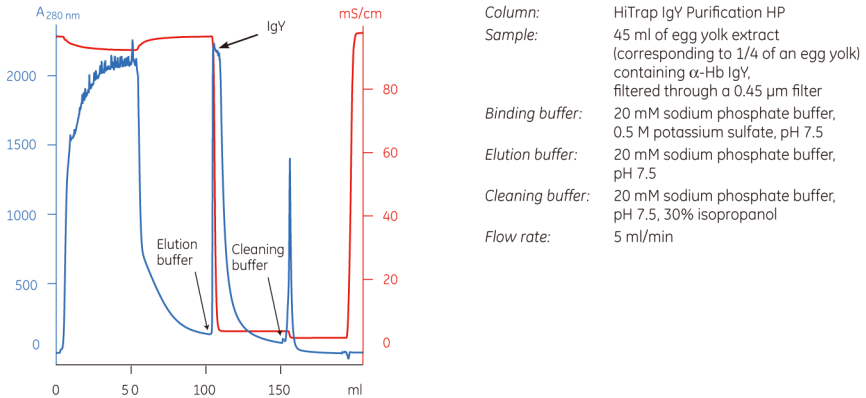


图3.30使用HiTrap IgY Purification HP纯化IgY

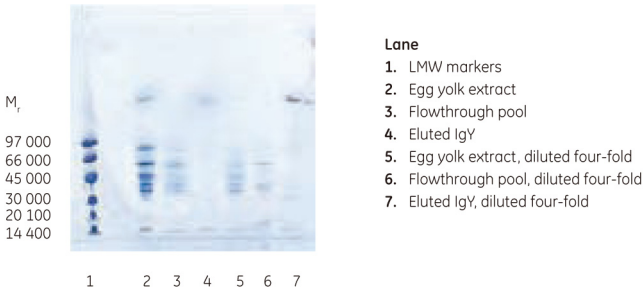



图3.31 非还原样品的SDS-PAGE（PhastSystem using PhastGel 4-15, Coomassie staining）

## 样品处理

参考第二章中的基本建议


 在纯化前，最好尽可能的除去卵磷脂，水或者聚乙二醇都能够用于沉淀酯类，在下文中叙述了利用水沉淀酯类的方法。

## 缓冲液处理

结合缓冲液：20mM磷酸钠，0.5M硫酸钾，PH7.5

洗脱缓冲液：20mM磷酸钠，PH7.5

冲洗缓冲液：20mM磷酸钠，30%异丙醇，PH7.5，

 为了提高总的IgY的得率或者特定的IgY抗体的产量，可以使用0.6到0.8M的硫酸铵代替0.5M硫酸钾，同时，在样品中应该含有同结合缓冲液中同样浓度的硫酸铵。使用含有比推荐浓度更高的硫酸铵的结合缓冲液可能会减低最终IgY的纯度。

1. 分离蛋黄和蛋清。
2. 在一份的蛋黄液体中加入九份的蒸馏水。
3. 在4摄氏度混匀并轻轻搅拌6小时。
4. 在4摄氏度10000×g离心25分钟，以沉淀酯类。
5. 收集包含有IgY的上清。
6. 轻轻加入硫酸钾固体，并连续搅拌，使最终硫酸钾的浓度达到0.5M。
7. 调节PH到7.5。
8. 在上样之前，将样品经过0.45um滤膜过滤。

## 纯化过程

见附件4中关于使用HiTrap columns纯化抗体的基本策略

1. 将注射器或者泵中充满蒸流水，除去阻塞头并将柱子连接到注射器（使用提供的连接接头）。
2. 除去柱子出口的阻塞头。
3. 使用25ml蒸流水将柱子中的乙醇除去。
4. 使用25ml结合缓冲液来平衡柱子，推荐的流速为5ml/min。
5. 使用注射器或者泵将预处理过的样品加入泵中，为了或者良好的结果，在上样过程中推荐的流速为：0.5 to 5 ml/min。
6. 使用50ml结合冲洗柱子，直到吸收值达到基线或者没有物质被洗脱出来。在冲洗的时候推荐的流速是：5 to 10 ml/min。
7. 使用50ml洗脱缓冲液进行一步或者线性梯度洗脱，但有时候需要更大体积的洗脱缓冲液来打破这种相互作用。

8. 洗脱完毕后，使用35ml的冲洗缓冲液来再生柱子，并用25ml的结合缓冲液重新平衡柱子，这样柱子可以用于下一轮新的纯化过程。

\*当使用5 ml HiTrap柱并采用注射器上样时，5 ml/min的流速大约相当于120 滴/min。



使用线性梯度洗脱能够提高Ig Y 的纯度，例如，使用10倍柱体积从0%到100%洗脱，然后用几个柱体积的100%的洗脱缓冲液冲洗柱子。



将多个HiTrap IgY Purification HP柱串联起来能够增加对IgM的结合容量，HiTrap IgY Purification HP能够同注射器、蠕动泵或者液相层析系统相连接。



HiTrap IgY Purification HP重复使用取决于样品的性质，并且只能处理相同的样品以避免交叉污染。

## 保存

保存于4° C to 8° C.的20%乙醇中。

## 使用定制配体制作免疫特异性纯化柱材

如果在纯化过程中没有可以利用的亲合柱材，就可以自己在合适的介质上偶连一个配体（例如纯化好的抗体或者抗原）来自己制作用于纯化的免疫特异性亲和柱。虽然这个过程需要极具耐心的优化和发展，但这是值得的，例如当一个蛋白需要被能够常规制备时。免疫特异性纯化特别适用于当目的蛋白同A蛋白和G蛋白只有很弱的结合或者压根不能和它们结合时，或者这种免疫特异性纯化能够除去某个关键的污染物。

这个部分讨论了最简单的偶连方法，这就是配体通过它的胺基连接到预先激活的介质上。GE Healthcare公司提供两种预先激活的介质用于连接抗体或者抗原配体：NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow，这种是可以被大量的使用并用来自己灌装柱子的；NHS-activated Sepharose High Performance，这种已经被灌装为方便易用的HiTrap NHS-activated HP柱。

NHS-activated Sepharose所具有的高度的亲水性能够有效的减少非特异性的疏水作用吸附而对结合容量的影响。偶连的PH范围能够适应很多的免疫球蛋白。同时，介质能够耐受较高的PH的直接洗脱（也取决于偶连的配体的PH稳定性）。

NHS-activated Sepharose通常作为最初的捕获蛋白的步骤，通常在此步骤之后再行凝胶过滤层析以保证更高的纯度和蛋白的均一性（除去聚集体、双体和脱离的配体）。

- 如果需要偶连的配体上没有可以利用的胺基，那么可以考虑使用羧基、硫醇基或者羟基。这些偶连的步骤在《亲和层析：策略和方法》（货号：18-1022-29）中有叙述。
- 这个过程需要一个能够同目标分子有可逆的亲和合作用的纯的配体，如使用抗原或者抗体则能够提供高度纯化的过程，如果可能，应该检测这种亲和相互作用。
- 免疫特异性相互作用通常需要剧烈的洗脱条件。收集样品时应该加入中性缓冲液，一般每毫升样品中加入60到200  $\mu$ l 1 M Tris-HCl, pH 9.0。

图3.32展示了使用IgE特异性亲和配体偶连到HiTrap NHS-activated HP 1 ml柱上从人源T细胞系中部分纯化IgE激活因子的过程。

图3.33展示了将IgG<sub>1</sub>偶连到HiTrap NHS-activated HP 1 ml柱上从羊血清纯化抗鼠源Fc-IgG的过程。

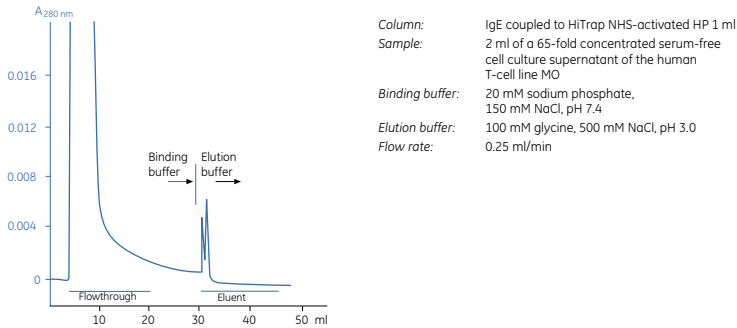


图3.32用IgE特异性亲和配体偶连到HiTrap NHS-activated HP 1 ml柱上从人源T细胞系中部分纯化IgE激活因子的过程

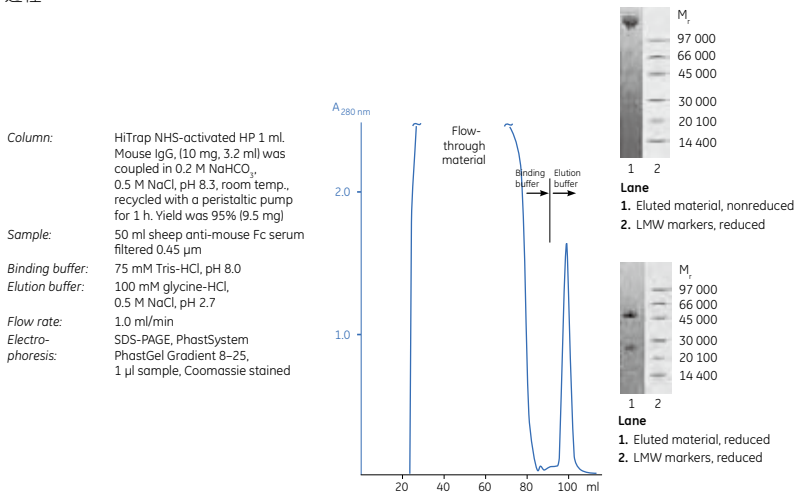


图3.33 将IgG<sub>1</sub>偶连到HiTrap NHS-activated HP 1 ml柱上从羊血清纯化抗鼠源Fc-IgG的过程

## 将配体偶连到HiTrap NHS-activated HP柱上

下面的方法介绍了制备预装的HiTrap NHS-activated HP柱的过程，并说明了初步纯化的方法。这里提到的很多细节都使用于NHS-activated Sepharose介质。偶连过程可以在PH6.5到9进行，在PH8时能够获得最大的产率。

一般的装柱的策略见附件5。

### 缓冲液处理

酸化溶液：1 mM HCl（冰浴）

偶连缓冲液：0.2 M NaHCO<sub>3</sub>, 0.5 M NaCl, pH 8.3



缓冲液使用的水和化合物必须是高纯度的，使用前必须经过0.45um的滤膜过滤。



提供的预先激活的柱材为了保持其偶连前的稳定性，通常是保存在100%的异丙醇中的。千万不要在偶连配体以前将其中的异丙醇置换掉。

### 配体和HiTrap柱的处理

1. 用偶连缓冲液溶解需要偶连的配体到浓度大约为0.5到10mg/ml（对蛋白配体而言），或者使用脱盐柱为蛋白配体更换缓冲液（见第二章）。最适合的浓度取决于配体的种类。使用一个柱体积的偶连缓冲液溶解配体。
2. 除去顶部的盖子并在柱子的顶部加入一滴酸化溶液以避免气泡的产生。
3. 在柱子的顶部连上一个接头（当使用泵或者色谱系统时，连上管子）。
4. 除去柱子出口的堵头。

### 配体连接

1. 使用酸化溶液将柱子中的异丙醇全部冲洗出。使用3 × 2 ml对于HiTrap 1 ml和3 × 10 ml对于HiTrap 5 ml。



在这个过程中，不要使流速超过1 ml/min（1 ml柱） 5 ml/min（5 ml柱），以免不可逆的压缩柱子。

2. 立刻在柱子中注入1 ml（HiTrap 1 ml）或5 ml（HiTrap 5 ml）配体溶液。
3. 封闭柱子，在25摄氏度放置15到30分钟或者在4摄氏度放置4小时。  
如果需要大体积的配体溶液，可以使用另外一个注射器接在柱子的出口上将溶液从出口压回并重新温浴15到30分钟。这种配体溶液的循环利用同样也可以使用蠕动泵来实现，例如Pump P-1。

## 冲洗和去激活

将没有偶连配体的多余的激活配体去激活，并将非特异性结合的配体洗掉可以按照下面的步骤进行：

### 需要的缓冲液：

缓冲液A：0.5M乙醇胺，0.5 M NaCl, pH 8.3

缓冲液B：0.1 M 醋酸, 0.5 M NaCl, pH 4

1. 加入 3 × 2 ml (HiTrap 1 ml) 或者 3 × 10 ml (HiTrap 5 ml)缓冲液 A。
2. 加入 3 × 2 ml (HiTrap 1 ml) 或者 3 × 10 ml (HiTrap 5 ml)缓冲液 B。
3. 加入 3 × 2 ml (HiTrap 1 ml) 或者 3 × 10 ml (HiTrap 5 ml)缓冲液 A。
4. 将柱子置于室温15到30 min或者4 h 在 4 ° C。
5. 加入 3 × 2 ml (HiTrap 1 ml) 或者 3 × 10 ml (HiTrap 5 ml) 缓冲液 B。
6. 加入 3 × 2 ml (HiTrap 1 ml) 或者 3 × 10 ml (HiTrap 5 ml) 缓冲液 A。
7. 加入 3 × 2 ml (HiTrap 1 ml) 或者 3 × 10 ml (HiTrap 5 ml)缓冲液 B。
8. 最后，加入 2 ml (HiTrap 1 ml) 或者 10 ml (HiTrap 5 ml)中性缓冲液来调节PH。

## 保存

将柱子保存在能够保持配体稳定性并且能够抑制细菌生长的试剂中，例如，磷酸盐缓冲液（PBS），0.05%叠氮钠，PH7.2。



柱材的PH稳定性取决于偶连的配体的PH稳定性，叠氮钠能够影响很多的偶连方法和生物检测，它可以通过脱盐柱除去。



叠氮钠是致癌物质，处理时应该很小心。

## 使用偶连有配体的HiTrap NHS-activated柱进行纯化



缓冲液使用的水和化合物必须是高纯度的，使用前必须经过0.45um的滤膜过滤。应该根据每个配体的不同而优化纯化特定目标分子的结合和洗脱条件（见下面的推荐洗脱缓冲液）。通用的策略仅适用于初步的纯化。



当跑第一次时，先跑一个没有上样的，确保一些疏松结合的配体能够被冲洗掉。样品在离心后立刻用0.45um的滤膜过滤，如果样品过于粘稠，可以用结合缓冲液稀释样品。



通过调整结合缓冲液的组分能够增强样品同柱子的结合能力。可以使用脱盐柱为样品更换缓冲液（见第二章）或者用结合缓冲液稀释样品。



1. 利用如下缓冲液冲洗柱子：
  - a. 3 ml (HiTrap 1 ml) 或者 15 ml (HiTrap 5 ml) 结合缓冲液。
  - b. 3 ml (HiTrap 1 ml) 或者 15 ml (HiTrap 5 ml) 洗脱缓冲液 (见下面的关于洗脱缓冲液的建议)。
2. 用10倍柱体积的结合缓冲液冲洗柱子。
3. 样品处理。样品中的组成应该和结合缓冲液中的组成保持一致，可以使用脱盐柱为样品更换缓冲液（见第二章）或者用结合缓冲液稀释样品。样品在上样前应该经过0.45um的滤膜过滤或者离心。
4. 上样。使用注射器和一个连接头或者使用泵将样品上到柱子上，推荐的流速为：  
0.2 to 1 ml/min (HiTrap 1 ml) 或者 1 to 5 ml/min (HiTrap 5 ml)\*。最佳流速取决于配体结合常数。
5. 用结合缓冲液冲洗5到10倍柱体积，或者直到没有物质流出。如果配体同目标分子之间结合不够紧密，避免过度的冲洗，因为这样会降低产量。
6. 用洗脱缓冲液洗脱。通常1到3倍柱体积就已经足够，但是有时候也需要更大的洗脱体积。
7. 纯化的蛋白可以使用脱盐柱脱盐（见第二章）。
8. 使用5到10倍柱体积的结合缓冲液再生柱子。这样柱子能够用于新一轮纯化过程。  
\*当使用1 ml HiTrap柱并采用注射器上样时，1 ml/min的流速大约相当于30 滴/min；  
当使用5 ml HiTrap柱并采用注射器上样时，5 ml/min的流速大约相当于 120滴/min。



为了保持酸依赖的IgG活性，我们推荐在每个收集管中加入60-200ul 1M Tris-HCl, pH9.0，这保证了最终样品的pH趋近中性。

## 洗脱缓冲液

免疫特异性相互作用有时是非常强的，此时不容易破坏。这种特殊的相互作用的特点决定了洗脱的条件。应该在偶连一个配体到介质上之前检查这种相互作用的可逆性。如果普通的洗脱条件不能够破坏这种相互作用，可以尝试下面列出的洗脱缓冲液：




1. 低PH（PH低于2.5）。
2. 高PH（PH高于11）。
3. 某些能够降低缓冲液极性的物质可能能够洗脱蛋白但不影响蛋白的活性，例如二氧杂环乙烷（高达10%），乙烯乙二醇（可达50%）。

## 第四章 在初始纯化后除去特定的污染物

在很多实验室水平的应用上，少量的污染物分子并不是一个很严重的问题。有时候，少量的污染物分子并不影响最终的应用目的，所以仅仅一步的亲色层析就能达到足够的纯度，这样的样品可以直接应用。

然而，正如在表2.1中所强调的，污染物的种类是与来源材料紧密相关的，这些污染物即可能在纯化开始前被除去（如酯类或是苯酚红），或是在初始纯化以后。


在初始纯化以后的主要污染物包括：白蛋白、铁传递蛋白、抗体聚集体、丢失的A蛋白、DNA等，如果是在腹水或者细胞悬浮培养物中提取，还可能含有宿主免疫球蛋白。从动物来源中纯化抗体的污染物的原因主要来自无血清培养系统的广泛应用，例如利用牛细胞悬浮培养物生产单克隆抗体。这样而来的污染物主要有三种：白蛋白、铁传递蛋白和宿主或牛免疫球蛋白，这三种不同的污染物代表了三种在纯化遇到的不同的问题：白蛋白在生产体系中存在广泛；铁传递蛋白同很多抗体有着相似的电荷性质；宿主或牛免疫球蛋白和目标免疫球蛋白有着相似的性质。

-  对于配置某些细胞培养基时，可以适当减少血清的加入量，从而在纯化前就降低因加入血清而引入的各种杂质。另外，也可以通过选择不同的宿主细胞而避免使用这些血清材料。
-  在选择色谱层析系统时，要根据目标分子和污染物之间不同的性质来区分它们：如用离子交换色谱层析（IEX）来区分带电性质不同的蛋白；用疏水作用层析（HIC）来区分具有不同疏水性的蛋白；用凝胶过滤层析来区分大小不同的蛋白质。在附件9中总结了实验室水平上各种色谱层析技术的特性。
-  如果抗体的等电点和污染蛋白的等电点相差足够大，可以利用离子交换介质（负电介质）来除去杂质分子，调节PH使溶液的PH能够高于杂质分子的等电点而低于抗体的等电点。这能够保证抗体分子（带正电的）能够结合在柱子上面，而带负电的杂质分子和带负电的DNA分子不能够结合在柱子上，直接流出而除去。

### 牛免疫球蛋白

当使用亲和柱从原始材料中提取野生型抗体或是在细胞培养基中添加有小牛血清或牛血清白蛋白时，就不可避免把宿主或牛的免疫球蛋白同目标抗体共纯化下来。不过这种问题，在大规模生产抗体时可以通过使用无血清的细胞培养系统而得以解决。

当纯化鼠源的单克隆抗体分子时，也会遇到类似的困难。在这样的体系中，存在着一些和目标抗体分子具有相似的物理性质的污染物分子，它们需要仔细的被筛选和纯化，选用合适的色谱层析技术才能够被分离开来。在纯化中可以使用疏水作用色谱层析和离子交换色谱层析。

 蛋白的疏水性是很难被预测的性质，从具有不同疏水性的不同柱材中筛选使用合适的柱材才可能获得最好侧纯化结果（例如，使用HiTrap HIC Selection Kit）。

HiTrap HIC Selection Kit中包含了多种具有不同疏水性的疏水作用色谱层析柱材，它能够小规模地用于筛选样品的最佳结合和洗脱条件。图4.1展示了一个在不同的疏水作用HiTrap 1 ml预装柱上筛选鼠源多克隆抗体的例子，在这个例子中最佳的纯化介质是HiTrap Phenyl HP。

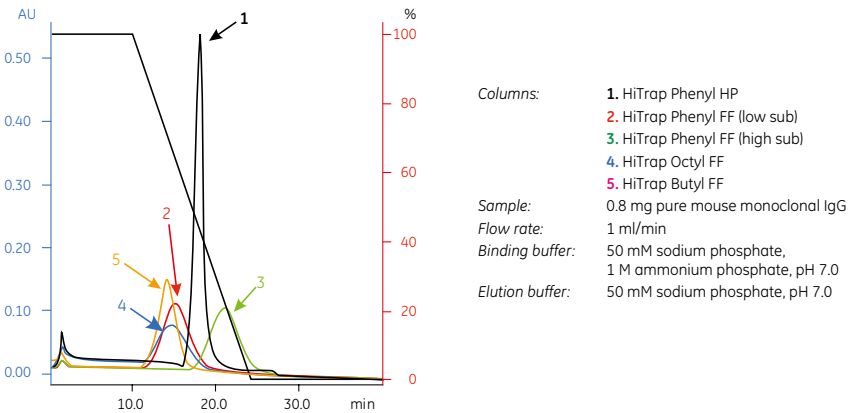



图4.1 在不同的疏水作用HiTrap 1 ml预装柱上筛选鼠源多克隆抗体

RESOURCE™ HIC Test Kit中包含一些装有SOURCE™介质的预装柱，它们的配体同HiTrap HIC Selection Kit不尽相同。具体可以参考《疏水作用层析和反向层析：策略和方法》，货号为11-0012-69 AA。

## 白蛋白和铁传递蛋白

例子交换色谱层析和疏水作用色谱层析是除去白蛋白和铁传递蛋白的两中不同的方法，它们分别依据蛋白所具有的不同的等电点和输水性来分离它们（见附件9中这些技术的方法分析）。

 如果白蛋白和铁传递蛋白同目标抗体分子的性质相似，那么在经过离子交换色谱层析以后可能它们仍然存在于样品当中。在某些情况下，可以通过优化PH和洗脱条件来分离杂质和目标抗体分子（见附件9）。



既然大多数的抗体分子比白蛋白和铁转运蛋白具有更强的输水性质，那么可以使用疏水作用色谱层析来分离它们，使目标抗体蛋白挂在柱子上而污染物分子流出。

然而，可以使用Blue Sepharose 6 Fast Flow作为亲和层析来替代离子交换层析或者疏水作用层析来除去白蛋白。

### 使用Blue Sepharose 6 Fast Flow除去白蛋白

Blue Sepharose 6 Fast Flow是一种被灌装在HiTrap Blue HP 1 ml 或 5 ml柱中的柱子（图4.2），它能够在纯化步骤前或者纯化步骤后除去白蛋白（见表4.1）。白蛋白能够以非特异性的电荷方式或者疏水作用结合在一个芳香族配体—Cibacron™ Blue F3G-A上，这种配体被偶连在Sepharose上。



图 4.2 预装有Blue Sepharose High Performance的HiTrap Blue HP柱，它能够快速而且有效的通过亲和层析除去白蛋白

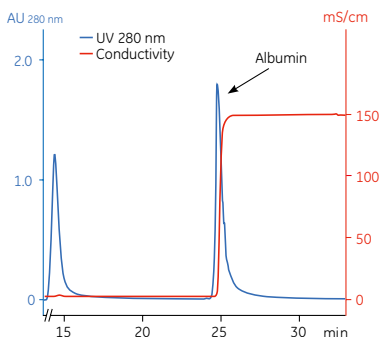


使用HiTrap Blue HP 1 ml 或者 5 ml柱子从哺乳动物细胞表达系统或是其它已知包含有高浓度的白蛋白的表达体系除去白蛋白时，可能白蛋白的UV吸收峰会掩盖其它蛋白的吸收峰。



在免疫球蛋白或是其它的目标蛋白同白蛋白具有相似的疏水特性时，不要使用Blue Sepharose介质。

	每毫升介质的结合量	备注
HiTrap Blue HP	HSA 20 mg	除去白蛋白， 有1ml和5ml两种类型的柱子
Blue Sepharose 6 Fast Flow	HSA >18 mg	可以用于柱子的灌装



*Sample:* Human plasma, buffer exchanged to binding buffer with HiTrap Desalting  
*Column:* HiTrap Blue HP 1 ml  
*Binding buffer:* 20 mM sodium phosphate, pH 7.0  
*Elution buffer:* 20 mM sodium phosphate, 2 M NaCl, pH 7.0  
*Flow rate:* 1 ml/min  
*System:* ÄKTAprime

图 4.3 使用HiTrap Blue HP 1 ml柱从人源血浆中直接有效的除去白蛋白

图 4.3展示了使用HiTrap Blue HP 1 ml柱从人源血浆中直接有效的除去白蛋白的过程。

使用HiTrap Blue HP 1 ml或5ml柱直接有效的除去白蛋白的操作步骤见下面的叙述。

## 缓冲液处理

结合缓冲液：20mM磷酸钠，PH 7.0或者50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.0

洗脱缓冲液：20mM磷酸钠，2 M NaCl，PH 7.0, 或者50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.5 M KCl, pH 7.0。

## 白蛋白的除去

1. 在注射器或者泵中充满蒸馏水，除去堵头并将柱子以一滴一滴的方式连接到注射器（使用提供的接口）、实验室泵或者色谱层析系统上，操作中要避免引入气泡。
2. 去掉在柱子末端出口处的密封器。
3. 用3到5倍的蒸馏水除去柱子中的乙醇。
4. 用至少5倍柱体积的结合缓冲液平衡柱子，推荐的流速为1 ml/min (1 ml 柱)和5 ml/min (5 ml 柱)。
5. 使用注射器或者泵为柱子上样，为了获得良好的结果，推荐的上样速度为0.2 to 1 ml/min (1 ml 柱)和0.5 to 5 ml/min (5 ml 柱)。
6. 使用结合缓冲液冲洗柱子，通常冲洗5到10倍柱体积或者UV吸收值达到基线没有物质流出，冲洗时推荐的流速为1 to 2 ml/min (1 ml 柱)和5 to 10 ml/min (5 ml 柱)。
7. 使用分步洗脱或者线性梯度洗脱，对于分步洗脱，5倍柱体积就已经足够，对于线性梯度洗脱，10到20倍的柱体积就已经足够。洗脱时推荐的流速为1 to 2 ml/min (1 ml 柱)和5 to 10 ml/min (5 ml 柱)。
8. 在洗脱完毕后，用结合缓冲液继续冲洗柱子3到5倍柱体积，这样柱子就能接着用于下一轮的纯化过程。


## 保存

保存于4° C to 8° C 20%的乙醇中。

## $\alpha_2$ -巨球蛋白和结合球蛋白

$\alpha_2$ -巨球蛋白和结合球蛋白或者其它诸如血浆铜蓝蛋白等都可能存在于野生来源或者血清制备物中。

$\alpha_2$ -巨球蛋白(Mr 820 000)同IgM具有相似大小的分子量，因此它能使用凝胶过滤同IgG等小分子量的蛋白分类开来，相似的，结合球蛋白也能使用凝胶过滤同IgM分离开来。


 通常情况下，使用合适的离子交换柱材和合适的条件（PH和电导）能够保证除去这些污染分子。对于除去  $\alpha_2$ -巨球蛋白可以考虑使用Blue Sepharose 6 Fast Flow 和 Chelating Sepharose Fast Flow。


## 双体和聚集体


在纯化免疫球蛋白时常常遇见的一个问题是抗体常常聚集成双体或者多聚体。当蛋白以高浓度存在时，蛋白聚集是常常发生的。当存在高浓度的盐分时，蛋白经过反复的冻融会形成双体或者多聚体。这些聚集体能够显著的降低生物活性。

凝胶过滤时在实验室水平上除去聚集体常用的手段，并且通常作为纯化蛋白的最后一个手段。诸如Superdex200等凝胶过滤材料时区分单体和双体的很好的材料，在附件9中总结了凝胶过滤材料的特点。

在大规模纯化抗体时，离子交换层析，例如使用Capto adhere材料是有效的除去聚集体的方法（详细内容见第七章）。

 凝胶过滤通常作为在经过任何的亲和层析以后最后的纯化过程，在这一步中样品被最后的放入具有正确的PH环境的缓冲液中，并且各种的分子量的物质，如盐分等都将被除去。

 凝胶过滤不属于结合技术，因此在大多数情况下，样品的上样体积都不能超过总柱体积的1%到3%。

 当需要大体积纯化蛋白时，可以考虑使用HiLoad™ 16/60 Superdex 200 pg 或者HiLoad 26/60 Superdex 200 pg prepacked柱。

在生产水平上除去聚集体或者二聚体时通常使用离子交换介质来进行，并在A蛋白亲和层析以后。多模型的离子交换层析Capto MMC和Capto adhere也可以在A蛋白亲和层析以后用于除去污染物，具体见第七章。

图4.4展示了一个使用Superdex 200 10/300 GL凝胶过滤来分离人源IgG单体和二聚体的过程的例子

Column: Superdex 200 10/300 GL  
Sample: Monoclonal antibody  
Sample volume: 100  $\mu$ l  
Buffer: 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5  
Flow rate: 0.25 ml/min  
System: AKTAexplorer 100

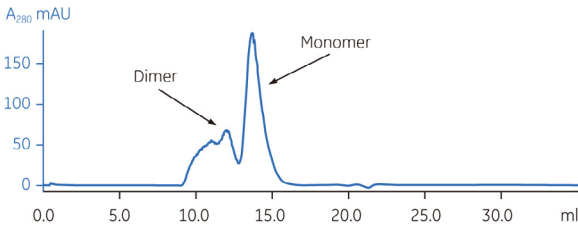


图4.4使用Superdex 200 10/300 GL凝胶过滤来分离人源IgG单体和二聚体的过程

## DNA和内毒素

对于大规模的纯化，如果纯化的样品要用于临床诊断的应用，通常就需要检测特定的不纯污染物是什么。然而实际上，在普通的研究目的的纯化中，鉴定和建立起一套鉴定特定的污染物的手段通常是非常消耗时间的，这些污染物包括DNA和内毒素等。通常的操作手段是在纯化蛋白到所需要的纯度后，使用SDS-PAGE检测并保存，以观测是否受到蛋白酶的降解。同时应该加入合适的对照实验以观察这些污染物是否会影响到实验结果。使用Superdex 200凝胶过滤也能够测试蛋白的纯度和聚集程度。

在高盐溶液中，核酸通常能够从蛋白上面解离下来，因此疏水作用色谱层析很适合结合目标蛋白并除去核酸。

内毒素和DNA在很广泛的一段PH范围内都带有负电荷，因此，可以在低于目标抗体的等电点的PH范围内使用阳离子色谱层析柱结合抗体，并使带有负电的内毒素和DNA从柱子里面穿透。如果最初使用的是一个阴离子交换柱，那么这些杂质在纯化的最初步骤里面就已经被除去。

如果想要在纯化好的抗体内除去DNA或内毒素，可以使用诸如Capto Q 或Capto adhere等阴离子交换柱，并使PH略低于目标抗体的等电点，这样内毒素和DNA能够结合在柱子

上，而抗体将会从柱子中流出。另外，也可是使它们都结合在柱子上面，然后使它们能够在线性梯度洗脱中在不同的位置被洗脱下来。

在大规模生长中除去DNA和内毒素的过程和优化策略在第七章中有讨论。

## 亲和配体

对于任何的亲和层析柱材而言，配体的丢失都有可能发生，特别是在洗脱目标蛋白分子时需要用到剧烈的洗脱条件时。在很多情况下，这种配体的丢失是可以忽略的，所获得的目标分子的纯度也是足够的。在实验室水平上，配体的丢失是一个并不严重的问题。

GE Healthcare提供一系列的低配体丢失率的Sephacrose 和 high-flow agarose柱材（详见第三章）。MabSelect SuRe，例如，是一个high-flow agarose，连接有A蛋白配体，它能够忍受生物制药生产中所使用的剧烈的洗脱条件。MabSelect SuRe中的配体丢失率是很低的，这就使得这种柱材很适合用在大规模纯化单克隆抗体中第一步的捕获抗体，这样在最终样品中极少的A蛋白配体是可以忽略的。

图4.5展示了一张使用HiTrap SP HP 1 ml柱子从鼠源的IgG<sub>2b</sub>中除去A蛋白配体的过程。通常情况下，A蛋白配体的丢失量是很少的，因此我们在样品中加入了少量的A蛋白以使A蛋白的峰呈现出来。

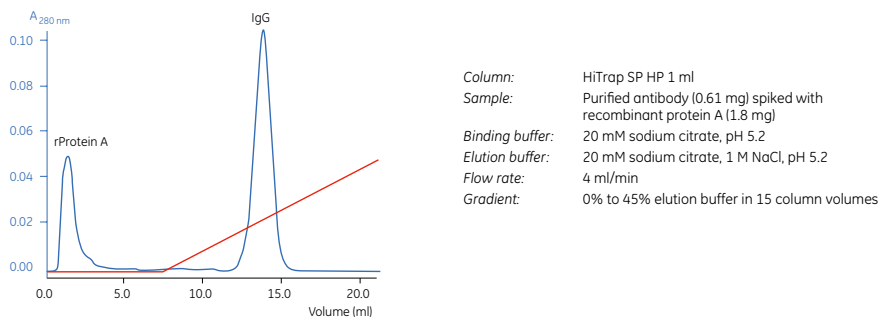


图4.5 使用HiTrap SP HP 1 ml柱子从鼠源的IgG<sub>2b</sub>中除去A蛋白配体的过程,重组的A蛋白被加入了事先用rProtein A Sepharose Fast Flow纯化过的鼠源的IgG<sub>2b</sub>中。



## 第五章 使用ÄKTAdesign系统进行抗体的自动纯化

对于不同的实验研究和工业生产的抗体，有着不同的数量要求，从毫克级到公斤级。设计合适的分离纯化手段以满足特定抗体的质量和数量的要求是抗体生产中一个很重要的环节，同样，要纯化的抗体的数目也是必须要考虑到的问题。对于很多的实际操作，仔细研究色谱层析系统能够节约大量宝贵的时间、精力和样品。我们在第三章中总结了手动的纯化技术。

当实验的重复性和手动纯化蛋白显得即浪费时间又效率低下时，就需要使用自动的色谱层析系统。特别实在需要多次重复实验以获取大量的样品或者是需要处理的样品量非常巨大时，或同时有多个样品需要处理。相对手动纯化而言，使用自动的色谱层析系统能够使实验结果更加具有可重复性，并且使得实验可以自动进行。另外，自动的色谱层析系统能够精确的控制分步梯度洗脱和线性梯度洗脱以获得高分辨率。系统牢固耐用并且使用方便，而且可以高流速的进行以适应现代纯化柱材的需求。在下面将要叙述ÄKTAdesign系统是如何自动纯化蛋白抗体的。

ÄKTAprime plus（图5.1）是一个经济高效并且易于使用的系统。如果同合适的柱子一起使用，ÄKTAprime plus系统能够仅使用一次色谱层析制备毫克级的抗体，而且这些都是在电脑上控制完成的。在系统中，有预先写好的使用不同的预装柱纯化抗体的方法。使用ÄKTAprime plus时所获得的收率要比手动纯化高，若使用预装柱和优化好的纯化策略，产量和纯度都能够保持高度的稳定。



图 5.1 ÄKTAprime plus



图 5.2 ÄKTExplorer

纯化抗体的过程可以在更加先进的色谱层析系统上面进行，ÄKTExplorer (图5.2)系统是一个更加方便的纯化蛋白的系统，它能够从毫克级到克级纯化蛋白。它能够同时在一个步骤中自动的纯化多达8个蛋白抗体样品，这最大限度上减少了样品间的手动操作。

当一个单一的纯化步骤不能满足抗体纯化的纯度要求，或是需要在抗体纯化中更换缓冲溶液，或是需要一个额外的在亲和色谱层析后面的纯化步骤时，多步色谱层析就要被利用。ÄKTExpress™ (图5.3)就是这样一个高度自动化的系统，ÄKTExpress™ 是模块化设计，它由电脑控制的12个平行的模块组成，能够同时纯化多达48个样品。在没有人工干涉的情况下，ÄKTExpress™系统能够大量的以最大通量的纯化单克隆抗体。通过自动的清洗步骤，该系统能够在同时纯化多个样品的同时有效的避免不同样品间的交叉污染。ÄKTExpress™能够每次以一步或者两步的纯化方式最多纯化多达4个不同的抗体。

其他的ÄKTAdesign系统也可以用于抗体的纯化，在图5.4中展示了不同的ÄKTAdesign系统的特点。



图 5.3 四模块的ÄKTExpress系统

工作方式	ÄKTA process	ÄKTA prime plus	ÄKTA FPLC	ÄKTA purifier	ÄKTA explorer	ÄKTA pilot	ÄKTA xpress	ÄKTA crossflow
操作并生产	●					●		
UNICORN	●		●	●	●	●	●	●
PrimeView		●						
一步简单纯化		●					●	
常规纯化的重复程序	●	●	●	●	●	●	●	●
系统控制和数据处理	●		●	●	●	●	●	●
自动的方法优化				○	●	●		●
自动缓冲液处理				○	●	●		
自动pH筛选				○	●			
自动柱材筛选				○	●	●	●	
自动多步纯化					○			
过程优化和增加规模				○	●	●		●
cGMP						●		●
规模增大，过程优化和生产						●		●

表 5.1 标准的ÄKTAdesign的特点

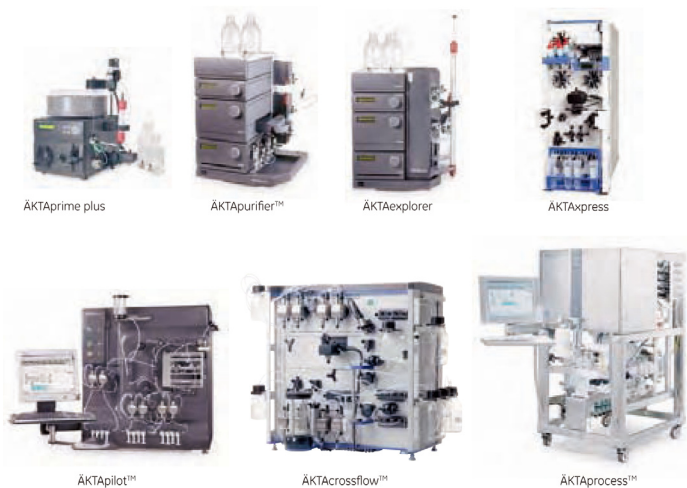


图 5.4 标准的ÄKTAdesign系统

## 第六章 多步纯化策略

如同第三章中所讨论的，仅使用一个单步骤的、快速的亲和色谱层析纯化的抗体，已经在纯度和质量上满足大多数研究实验的需要。一些不需要的小分子，如盐分等，可以通过使用脱盐（更换缓冲液）柱子或者使用高分辨率的凝胶过滤来除去。当不能只使用一步亲和层析时，即纯化抗体片段或者需要更高纯度的抗体时，就需要将亲和层析步骤同其它的纯化过程一起使用来自称一个多步纯化的策略。

对于一个特定的纯化步骤而言，纯化过程的挑战很大程度上来源于纯化开始的材料，同样，纯化的目的也因为这个纯化步骤在整个体系中位置的不同而不同，即这个纯化过程或者作为第一步从原始样品中捕获蛋白，或者作为中间步骤将半纯化的蛋白进一步纯化，或者将几乎完全纯化的蛋白作最后修饰性纯化。现在纯化野生型或者重组型抗体的最大优势是我们已知目的蛋白的性质和主要的污染物是什么，见表6.1和表2.1。分离纯化和洗脱技术就是为了在最少步骤内获得最高纯度的蛋白。

分子量	Mr 150 000-160 000 (IgG) Mr 900 000 (IgM)
等电点	4-9, 大多数大于6, 大多时候比血清蛋白要更偏碱性
疏水性	IgG的疏水性比其它蛋白更强一些, 因此在硫酸铵里面更容易沉淀
可溶性	IgG在水溶液里很容易溶解, 但是在等电点(不同的抗体具有不同等电点)附近或者低盐溶液中容易沉淀
温度稳定性	在室温时相对稳定(但是各种抗体不同)
PH稳定性	通常在很大的PH范围内稳定, 但在酸性溶液中不够稳定(不同抗体不一样)
糖含量	IgG大约为2%-3%, IgM更高一些, 约为12%, 大多数糖同重链上的Fc区域结合

表6.1 野生型IgG和IgM的性质

正确的选择和组合捕获蛋白、纯化蛋白和进一步纯化蛋白的技术对于一个有效的纯化过程是很重要的，这些操作的基本要领在附件9中有详细的叙述。

### 多步纯化的具体例子

下面叙述的例子描述了一个在实验室水平上两步纯化抗体的成功的实例。对于大规模纯化，见第七章。

### 实例1: 使用HiTrap rProtein A FF作为第一步来纯化鼠源的单克隆抗体IgG<sub>1</sub>

这个例子中, 选用高选择性的亲和柱材作为纯化抗体的第一步, 同大多数抗体一样, 鼠源的IgG也能聚集成为双体, 因此需要进一步纯化来获取更高纯度的抗体。为了获得更高质量的抗体, 需要一步凝胶过滤作为进一步纯化步骤, 关于这一点更详细的叙述可以在Application Note 18-1128-93中找到。

目标分子: 鼠源的单克隆抗体IgG<sub>1</sub>。

原始材料: 细胞悬浮培养物。

提取和净化: 将细胞悬浮培养物通过0.45um的滤膜过滤。

### 捕获:

在捕获目标蛋白时, 使用HiTrap rProtein A FF柱, 这一步能够除去大部分污染蛋白, 低分子量杂质并显著的减少样品的体积。

同其它家族的IgG相比, 鼠源的单克隆抗体IgG<sub>1</sub>需要很高浓度的盐才能结合到rProteinA上去。图6.1表示一个筛选最佳结合盐浓度的实验, 同时也筛选了最佳的洗脱PH, 在这个实验中选择的最佳洗脱PH为4.5, 正如图中所示的。



使用ÅKTAdesign systems可以自动的筛选最佳的结合盐浓度和洗脱PH, 并提高特定抗体的收率, 同时, 优化好的条件能够自动的用于平时的纯化。

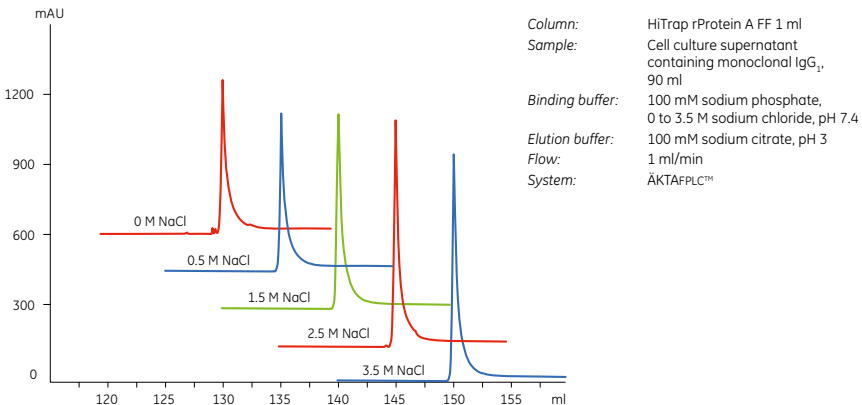


图6.1 在HiTrap rProtein A FF自动筛选结合缓冲液的盐离子浓度

优化好的结合和洗脱条件能够得到一个包含鼠源的单克隆抗体IgG<sub>1</sub>的很好的峰型，如图6.2所示。

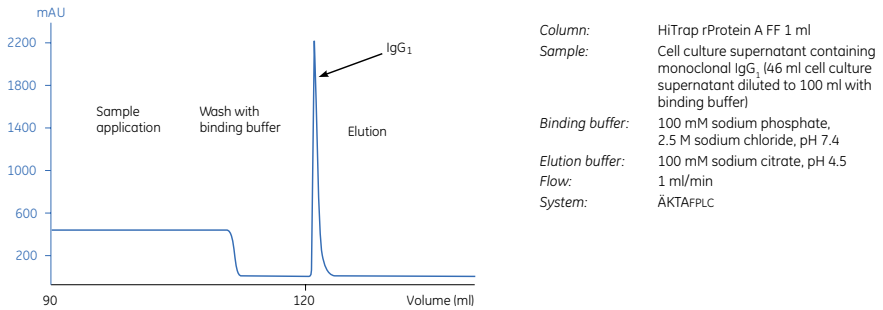


图6.2 在HiTrap rProtein A FF已经优化好的纯化步骤

### 进一步纯化过程

因为在第一步捕获蛋白的过程中，蛋白已经足够的纯，所以并不需要进一步纯化的步骤，因此只需要最后的纯化。

### 最后纯化

在最后的纯化中，使用HiLoad 16/60 Superdex 200凝胶过滤来除去少量的污染物和IgG的聚集体或者双体（图6.3）。

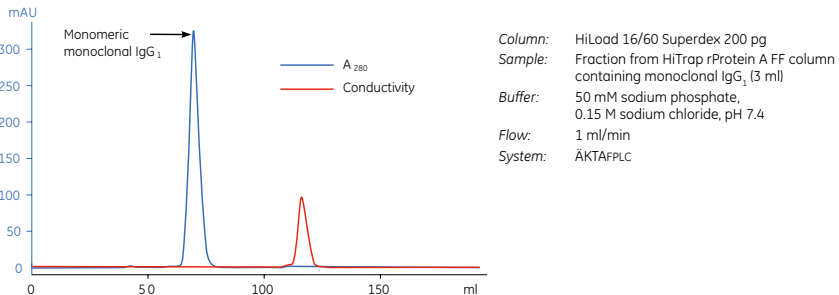


图6.3 使用HiLoad 16/60 Superdex 200的进一步纯化

亲和纯化能够显著的减少样品的体积并能够浓缩蛋白，而凝胶过滤使整个纯化过程中最慢的一步，柱子的体积决定了上样的体积，因此通常在样品大大浓缩减少后才使用凝胶过滤。

### 产量和检测

大约从50ml细胞悬浮培养物中能够纯化到1.2mg左右的单克隆抗体，经过蛋白捕获和最终纯化后蛋白的收率高于95%，图6.4表示了使用SDS-PAGE检测收集物的图。

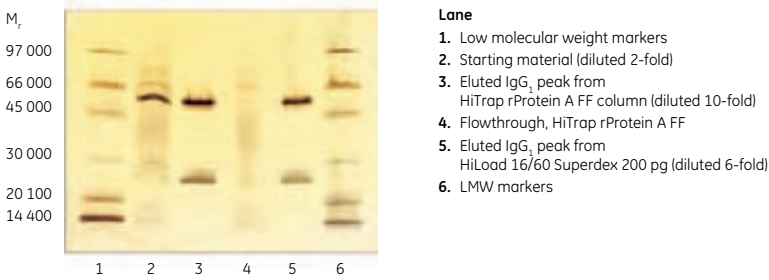


图 6.4 使用SDS-PAGE检测纯度，还原环境，使用PhastGel Gradient 10–15 gel on PhastSystem

## 实例2：使用HiTrap Protein G HP作为第一步捕获步骤的双步纯化鼠源单克隆抗体IgG<sub>1</sub>

这个例子展示了使用HiTrap Protein G HP作为第一步捕获鼠源单克隆抗体IgG<sub>1</sub>，并使用凝胶过滤HiLoad Superdex 16/60 200 pg最为最终纯化步骤的一个双步纯化策略。整个捕获和最终纯化鼠源单克隆抗体IgG<sub>1</sub>都在ÄKTAprime plus上进行。鼠源单克隆抗体IgG<sub>1</sub>在第一步中被捕获并用低PH缓冲液洗脱。

目标分子：鼠源的单克隆抗体IgG<sub>1</sub>。

原始材料：细胞悬浮培养物。

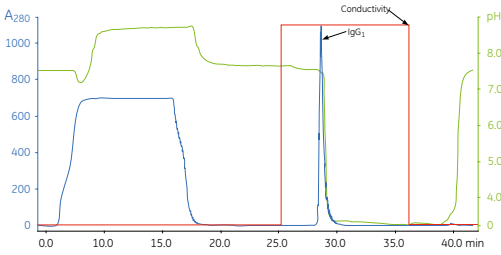
提取和净化：将细胞悬浮培养物通过0.45um的滤膜过滤。

### 捕获：

结合缓冲液：20mM磷酸钾，PH7.0

洗脱缓冲液：0.1M甘氨酸-盐酸，PH2.7

1. 使用5倍柱体积的结合缓冲液平衡柱子。
2. 上样。
3. 使用10倍柱体积的结合缓冲液处理柱子或者直到在280nm处的吸收值达到基线。
4. 使用5到10倍的洗脱缓冲液洗脱。
5. 使用5倍的结合缓冲液重新平衡柱子。



**Column:** HiTrap Protein G HP 1 ml  
**Sample:** 10 ml cell culture supernatant containing mouse monoclonal IgG<sub>1</sub>  
**Binding buffer:** 20 mM potassium phosphate, pH 7.0.  
**Elution buffer:** 0.1 M glycine-HCl, pH 2.7  
**Flow rate:** 1 ml/min  
**System:** ÄKTaprime plus

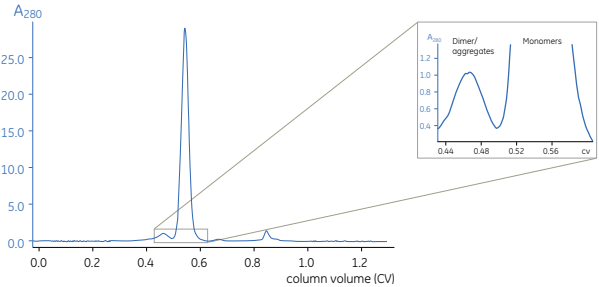
图6.5使用HiTrap Protein G HP作为第一步捕获步骤的双步纯化鼠源单克隆抗体Ig<sub>1</sub>

### 进一步纯化步骤

因为在第一步捕获蛋白的过程中，蛋白已经足够的纯，所以并不需要进一步纯化的步骤，因此只需要最后的纯化。

### 最终纯化

1. 使用磷酸盐缓冲液平衡柱子，PH7.4（见表A3.1）。
2. 上样（最大上样体积为柱体积的1%–2%）。
3. 使用同样的缓冲液洗脱样品，并收集组分。
4. 继续使用2到3倍柱体积的缓冲液冲洗柱子。



**Column:** HiLoad 16/60 Superdex 200 µg  
**Sample:** Pooled fractions from the capture step, 2 ml  
**Buffer:** Phosphate buffered saline, pH 7.4  
**Flow rate:** 1 ml/min  
**System:** ÄKTaprime plus

图6.6 注意图上单体和双体的分离过程（已被放大）。



亲和纯化能够显著的减少样品的体积并能够浓缩蛋白，而凝胶过滤使整个纯化过程中最慢的一步，柱子的体积决定了上样的体积，因此通常在样品大大浓缩减少后才使用凝胶过滤。



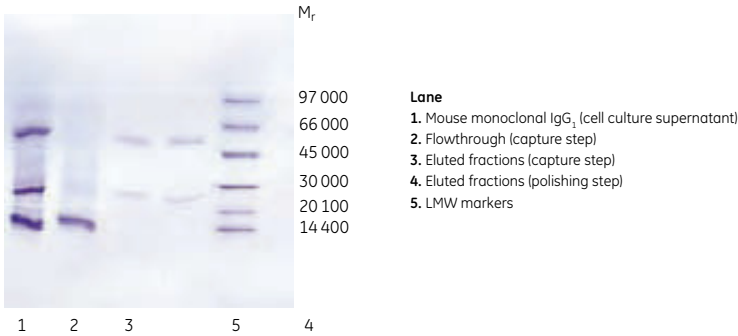


图6.7使用SDS-PAGE检测鼠源的单克隆抗体IgG<sub>2</sub>纯度，还原环境。

纯度是使用SDS-PAGE在还原环境中检测，图上显示抗体在第一步的亲亲和层析后纯度就变的很高。凝胶层析通过分离单体和双体从而进一步纯化了抗体，注意到无论是双体还是单体在还原环境下都分为重链和轻链两条带。

### 实例3：自动的抗体双步纯化过程

在这个过程中，使用ÅKTExpress来自动的双步纯化抗体并且达到毫克级，一步或者两步的纯化过程，并且包括一个原位清洗的过程都可以使用UNICORN™软件自动创建。这个例子在自动的亲亲和层析后接着进行脱盐处理。

目标分子：人源单克隆抗体

来源材料：细胞悬浮培养物

提取和净化：将细胞悬浮培养物通过0.45um的滤膜过滤。

结合缓冲液：20mM磷酸，150mM NaCl, pH 7.0  
 洗脱缓冲液：100mM柠檬酸钠，PH3.0  
 脱盐缓冲液：50mM磷酸缓冲液，150mM NaCl, pH 7.2

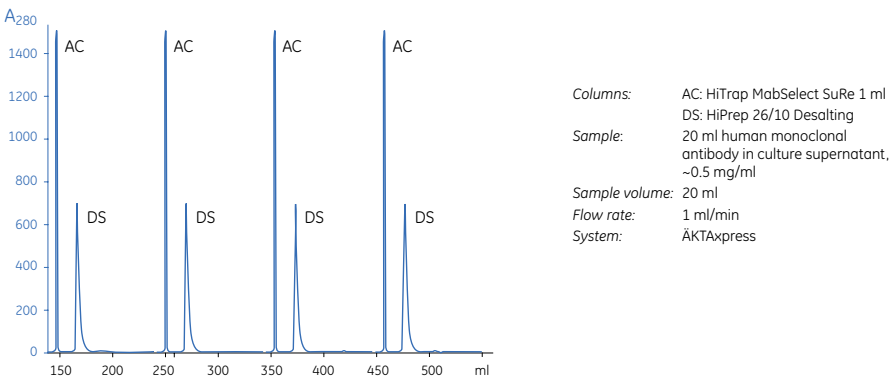


图6.8 使用亲和色谱层析并脱盐的方法纯化人源单克隆抗体的四次重复过程的色谱图

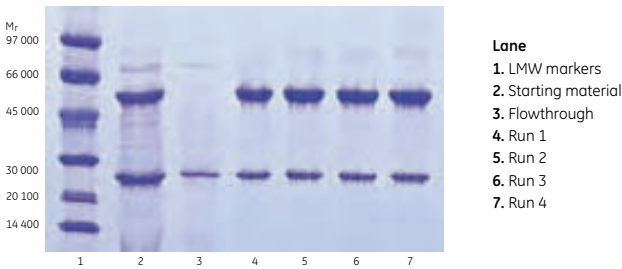


图6.9在还原环境使用SDS-PAGE检测人源抗体的纯度，抗体在ÄKTaXpress上使用亲和色谱层析柱纯化。低4-7泳道表示在图6.8中的脱盐步骤。这些数据由G.J. Perdock, T. Verhagen and P.H.C. van Berkel, Genmab BV, Utrecht, Netherlands等提供，并获得他们的许可。

脱盐的步骤对于保持抗体的生理条件和活性都很重要。平均上，在每次双步纯化后能够获得大约 $8.3 \pm 0.17$  mg的高纯度抗体。

#### 实例4：双步纯化用于诊断目的的鼠源的单克隆抗体IgG<sub>1</sub>

这次纯化的目的是纯化用于体外诊断目的的鼠源的单克隆抗体IgG<sub>1</sub>。这次的双步纯化结合了疏水作用色谱层析和凝胶过滤。

目标分子：鼠源单克隆抗体IgG<sub>1</sub> anti-IgE.

材料来源：杂交瘤细胞悬浮培养物

材料净化：样品被过滤并被加入0.05M的硫酸铵，这保证了能够结合到疏水作用柱上又能不被硫酸铵沉淀。

#### 捕获：

选择使用疏水作用柱来捕获蛋白是因为在这里抗体能够紧密的结合在柱材上(Phenyl Sepharose High Performance)，而且最大量的污染物牛血清蛋白能够从柱子上直接穿透，如图6.10所示。样品被浓缩到一个很小的体积内再通过分子筛净化。

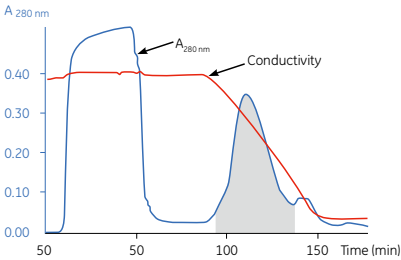
可以使用HiTrap HIC Selection Kit 或者 RESOURCE HIC Test Kit来筛选疏水作用色谱柱，以获得最佳的结果。可以见《疏水作用色谱层析和反向层析：策略和方法》，订货号：11-0012-69。

应该筛选合适的缓冲液，确保硫酸铵的浓度能够最最大效率的使抗体挂在柱子上且避免白蛋白结合在柱子上。

结合缓冲液：20mM磷酸钾，500mM硫酸铵，PH7.0;

洗脱缓冲液：20mM磷酸钾，PH7.0;

1. 使用结合缓冲液平衡柱子。
2. 上样。
3. 使用结合缓冲液平衡柱子直到在280nm处的吸收值达到基线位置且保持不变。
4. 使用洗脱缓冲液建立一个线性梯度（10倍柱体积），硫酸铵浓度从0.5M一直到0。
5. 使用100%的洗脱缓冲液冲洗柱子2-3个柱体积。
6. 使用2到3个柱体积的结合缓冲液重新平衡柱子。



**Column:** HiLoad 16/10  
**Sample:** Phenyl Sepharose High Performance  
 Hybridoma cell culture supernatant, mouse IgG<sub>1</sub>, anti-IgE.  
**Binding buffer:** Ammonium sulfate added to 0.5 M  
 20 mM potassium phosphate, 500 mM ammonium sulfate, pH 7.0  
**Elution buffer:** 20 mM potassium phosphate, pH 7.0  
**Gradient:** 0% to 100% elution buffer, 10 column volumes  
**Flow rate:** 3.3 ml/min

图 6.10 在上结合鼠源的IgG3的过程

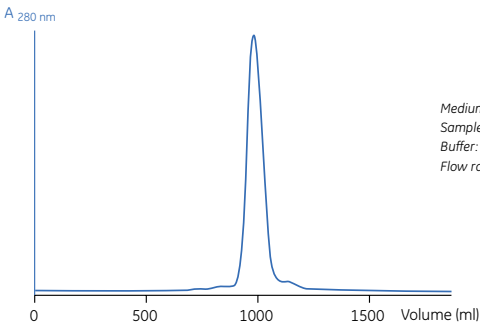
## 进一步纯化

因为第一步的捕获纯化中，蛋白的纯度大于95%，所以不需要进一步的纯化。

## 最后纯化

使用Superdex200 pregrade能使最终的蛋白纯度达到大于99%。

1. 使用PH7.5的磷酸盐缓冲液平衡柱子。
2. 上样，上样体积一般在总柱体积的1%到2%之间。
3. 使用同一种缓冲液洗脱蛋白，并收集蛋白样品。
4. 使用2到3倍的缓冲液继续冲洗柱子。



**Medium:** Superdex 200 prep grade, 60 cm bed height  
**Sample:** Fraction from HIC capture step (Fig 6.10)  
**Buffer:** Phosphate buffered saline, pH 7.5  
**Flow rate:** 15 ml/min

## 第七章 大规模分离纯化

单克隆抗体在临床上的使用成功是近代药学上一件很令人兴奋的事情，这使得每年人们对单克隆抗体都有数吨的需求量，它连同胰岛素和血浆蛋白一起成为大需求量蛋白。单克隆抗体在生物技术制药市场上的需求量仅次于生长因子而成为第二大生物产品，而且目前为止，单克隆抗体市场也是增长最快和生物技术工业中最具有前景的市场。为了满足这种需求，生物培养体系的保有量已经达到了25000L。另外，表达水平（目前为3-5g/ml）的提高，对高通量高效的分离纯化介质和处理体系提出了更高的要求。

在大规模分离纯化时考虑的因素和实验室水平上分离纯化考虑的因素并不一致，大规模分离纯化时，通常要发展一种稳定牢固并且廉价的纯化策略，尽量减少纯化操作以提高过程的经济性。现在的大规模分离纯化时，都倾向于使用A蛋白亲和色谱层析（例如MabSelect亲和色谱层析系列）作为一种有效的分离抗体的手段。

### 单克隆抗体纯化中的技术平台

在单克隆抗体纯化中的技术平台是指对于一个固定家族的分子的纯化所建立的一系列整体操作、条件和方法，这能够使整个过程快速而经济的进行并有利于扩大生产。对于大规模的纯化单克隆抗体，我们推荐使用GE Healthcare公司提供的技术平台，它包括以A蛋白为基础的亲和层析和后续的一个或者两个补充的色谱层析过程。其中A蛋白的亲和纯化过程是一个快速稳定而且高纯度（通常大于99%）高收率的纯化单克隆抗体的过程。后续的色谱层析过程主要包括阳离子色谱层析（CIEX）、阴离子色谱层析（AIEX）和疏水作用层析（HIC）等进一步纯化的过程。一个合适的纯化过程可以根据不同的单克隆抗体的性质而设计优化，例如根据它的等电点、疏水性、稳定性、糖基化性质、污染物和聚集趋势等。

#### 亲和色谱层析

关于使用A蛋白进行亲和色谱层析的主要建议在第三章中都已经讨论过了。

#### 离子交换色谱层析

通常情况下，单克隆抗体的等电点要比大多数宿主细胞蛋白（HCP）要高，这就大大有利于使用离子交换色谱层析（IEX）进行进一步纯化。使用阴离子交换色谱层析能够使单克隆抗体结合到柱子上，而其它的杂质如DNA、内毒素等都能通过冲洗阴离子柱而除去。同时，如果单克隆抗体不挂柱时，可以尝试使用阳离子交换色谱层析，这样能使杂质如DNA、内毒素、宿主细胞蛋白等结合到柱子上面而使单克隆抗体穿透得到纯化。当作为一个进一步纯化的步骤时，使用阳离子交换色谱层析能够只吸附杂质，这就为纯化提供了很大的有利条件。另外，阳离子交换色谱层析还可以除去病毒。

新的类型的离子交换柱材能够以新的相互作用机制结合带有离子的配体，这通常叫做多模型柱材，这些现在也正在被利用。Capto adhere正是这样一种多模型的柱材，它不但能够吸附除去DNA、病毒、内毒素，而且能够除去A蛋白和宿主细胞蛋白。Capto adhere是一个多模型的强阴离子型亲和色谱柱，它设计为单克隆抗体穿透型纯化方式。

### 疏水作用色谱层析

很多抗体都能形成二聚体甚至聚集体，特别实在表达量比较高的时候。聚集体蛋白能够相对于单体蛋白更加紧密的结合在疏水作用色谱层析柱上，因此，通过收集穿透的方法，使用疏水作用色谱层析能够除去体系中的聚集体和二聚体，聚集体能够结合在柱子上，然而单体的抗体蛋白直接从柱子穿透。疏水作用色谱层析也是除去宿主细胞蛋白和内毒素的有利工具。

### 过程设计

在设计纯化技术平台时，单克隆抗体的性质决定了使用哪一种整体操作（色谱层析步骤）和它们使用的顺序，其中图7.1总结了这些推荐的技术平台。

在通常情况下，一般有三种整体的操作策略用于纯化单克隆抗体，对于低聚合度的蛋白，使用A蛋白作为第一步纯化单克隆抗体的策略（如图7.1种方法1-3），接着是两步离子交换色谱层析，或者采用阴离子色谱层析来结合抗体，或者采用阳离子色谱层析，让蛋白流出（方法2、3）。对于高聚合度的抗体，可以在A蛋白纯化后加入一个中间步骤阳离子色谱层析以除去体系种的DNA、内毒素和宿主细胞蛋白、病毒等，然后通过疏水作用色谱层析除去聚合的蛋白质。另外，经过优化的Capto adhere层析技术可以减少层析的步骤，发展出一个两步纯化的方法（方法4）。这种两步纯化的策略显著的减少了时间消耗、缓冲液的使用，从而降低了成本，同时也提高了产量。

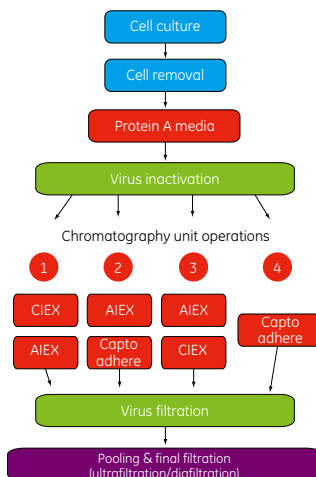


图7.1 在单克隆抗体纯化使用的不同的色谱层析的总结

## 单克隆抗体纯化中的高产率介质

GE Healthcare公司自从1950左右就成为色谱柱材的主要供应商，这些柱材广泛的应用在各种生物分子的下游纯化过程中。最近公司的研发组合大部分集中在用于单克隆抗体纯化的MabSelect系列和用于高通量高结合效率的Capto家族上。

表7.1总结了能够用在大规模纯化单克隆抗体中的高效低耗的柱材。

纯化步骤	色谱层析方法	产品性质
MabSelect SuRe	A蛋白亲和柱	增加了产品的耐碱性，可以原位清洗，高通量，高纯度
MabSelect	A蛋白亲和柱	高通量，高纯度
MabSelect Xtra	A蛋白亲和柱	高结合量，高纯度
纯化的中间步骤		
Capto Q	离子交换柱	高结合量，高纯度
Capto S	离子交换柱	高结合量，高纯度
SP Sepharose Fast Flow	离子交换柱	高选择性
Capto adhere	多模型离子交换柱	可以两步纯化，除去宿主细胞蛋白，A蛋白配体，减少聚集
Phenyl Sepharose FastFlow	多模型离子交换柱	高结合量和选择性，除去双体和聚集体

表7.1 下游纯化单克隆抗体的有效介质

## 可以加快下游操作速度的预装可丢弃的材料

作为纯化单克隆抗体的工业级大柱子和批量材料的补充，GE Healthcare公司还提供了广泛的、可以丢弃的ReadyToProcess™柱子，这些柱子都是经过预装处理，并且定量处理的小柱子。这些柱子可以用于很广泛的生物过程，它们的柱材包括：MabSelect SuRe, Capto Q, Capto S, Capto adhere,和Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (low sub)。ReadyToProcess™柱子适用于各种体积的纯化（图7.2），特殊的设计使它们方便易用，并能够同各种色谱层析系统连接，在完成纯化过程后也容易处理。

ReadyToProcess™柱子适合于纯化生物制药学中的各种分子，如蛋白和抗体、疫苗、质粒和病毒等，并可以用于临床一期和二期，这且取决于操作规模的不同。因为ReadyToProcess™柱子已经做好了装柱、定量和灭菌处理，因此能够在蛋白纯化的下游处理过程中节约大量的时间。



图7.2 ReadyToProcess™柱子能够方便地连接到色谱层析系统上，并且在使用完毕后易于处理

## 客户定制的柱材和柱子

当常用的柱材不适合于特定的纯化过程时，客户定制的柱材（CDM）可以用于特殊的纯化步骤。客户定制材料组（CDM组）同用户紧密合作，来设计、制作、检测和运输柱材来满足特别需要的纯化。当一个色谱层析系统成为一个纯化过程中的一个固定步骤时，选择合适的柱子就成为稳定可靠的纯化的必需。GE Healthcare公司为此提供的一系列广泛的柱子来满足现代制药操作的需要，同时，预装柱，由客户定制的柱材和GE Healthcare公司提供的柱子制成，也可由客户定制材料组提供。

# 附件一

## G蛋白和A蛋白Sepharose产品的特性

通过亲和层析进行抗体纯化的基础是G蛋白和A蛋白对各种来源的IgG所具有的Fc区域的特异性吸附作用。在这些产品中，G蛋白和A蛋白被固定在不同的介质上来从腹水、血清或细胞悬浮培养物中分离IgG或者IgG的亚家族。

表A1.1-A1.3总结了G蛋白和A蛋白Sepharose的主要特性，表A1.41-A1.6总结了这些介质被包装进预装柱或96孔板时所具有的特点。

特性	Protein G Sepharose 4 Fast Flow
配体	缺失白蛋白结合位点的重组型G蛋白
配体结合方式	溴化氰激活
介质	高度交联的琼脂糖，4%
结合容量	每毫升介质能结合超过20mg人源IgG
平均颗粒大小	90um
配体密度	每毫升介质中大约2毫克G蛋白
推荐流速	50-300 cm/h
化学稳定性	在通用的水溶液缓冲液里都能保持稳定：1 M 醋酸, 1% SDS, 6 M 盐酸胍(37° C保持7天), 0.1 M 甘氨酸-NaOH, pH 11, 1 M 盐酸, and 8 M 尿素(室温2小时内保持稳定)
PH稳定性 (长时间/短时间)	3-9/2-10
保存溶液	20%乙醇
保存温度	4°C to 8°C

表A1.1 Protein G Sepharose 4 Fast Flow特性

1. 有时候在洗脱强烈结合的IgG时，需要使用PH低于3的洗脱缓冲液。这时候因该注意配体蛋白在很低的PH时会被水解。



特性	Protein A Sepharose 4 Fast Flow
配体	野生型A蛋白
配体结合方式	溴化氰激活
介质	高度交联的琼脂糖，4%
结合容量	每毫升介质能结合超过30mg人源IgG
平均颗粒大小	90um
配体密度	每毫升介质中大约6毫克A蛋白
推荐流速	50-300 cm/h
化学稳定性	在通用的水溶液缓冲液里都能保持稳定：1 M 醋酸,1% SDS, 6 M 盐酸胍(37° C保持7天), 0.1 M 甘氨酸-NaOH, pH 11, 1 M盐酸, and 8 M 尿素(室温2小时内保持稳定)
PH稳定性（长时间/短时间）	3-9/2-10
保存溶液	20%乙醇
保存温度	4°C to 8°C

表A1.2 Protein A Sepharose 4 Fast Flow特性

1. 有时候在洗脱强烈结合的IgG时，需要使用PH低于3的洗脱缓冲液。这时候因该注意配体蛋白在很低的PH时会被水解。

特性	rProtein A Sepharose Fast Flow
配体	大肠杆菌异源表达的重组A蛋白
配体结合方式	溴化氰激活
介质	高度交联的琼脂糖，4%
结合容量	每毫升介质能结合超过50mg人源IgG
平均颗粒大小	90um
配体密度	每毫升介质中大约6毫克G蛋白
推荐流速	50-300 cm/h
化学稳定性	在通用的水溶液缓冲液里都能保持稳定：1 M 醋酸,1% SDS, 6 M 盐酸胍(37° C保持7天), 0.1 M 甘氨酸-NaOH, pH 11, 1 M盐酸, and 8 M 尿素(室温2小时内保持稳定)
PH稳定性（长时间/短时间）	3-9/2-10
保存溶液	20%乙醇
保存温度	4°C to 8°C

表A1.3 rProtein A Sepharose Fast Flow特性

1. 有时候在洗脱强烈结合的IgG时，需要使用PH低于3的洗脱缓冲液。这时候因该注意配体蛋白在很低的PH时会被水解。

特性	HiTrap Protein G HP/MAb Trap Kit	HiTrap Protein A HP	HiTrap rProtein A FF
配体	缺失白蛋白结合位点的重组型G蛋白	野生型A蛋白	大肠杆菌异源表达的重组A蛋白
配体结合方式	N-羟基丁二酰亚胺 激活	N-羟基丁二酰亚胺 激活	环氧激活, 硫醚键连接
配体密度	每毫升介质中大约2毫克G蛋白	每毫升介质中大约3毫克A蛋白	每毫升介质中大约6毫克G蛋白
介质	高度交联的琼脂糖, 4%	高度交联的琼脂糖, 4%	高度交联的琼脂糖, 4%
预装柱	Protein G Sepharose High Performance	Protein A Sepharose High Performance	rProtein A Sepharose Fast Flow
平均颗粒半径	34um	34um	90um
结合容量	每毫升介质能结合超过25mg人源IgG	每毫升介质能结合超过20mg人源IgG	每毫升介质能结合超过50mg人源IgG
平均颗粒半径	34um	34um	90um
推荐流速			
1ml柱:	1 ml/min	1 ml/min	1 ml/min
5ml柱:	5 ml/min	5 ml/min	5 ml/min
最大流速			
1ml柱:	4 ml/min	4 ml/min	4 ml/min
5ml柱:	20 ml/min	20 ml/min	20 ml/min
PH稳定性:			
长时间:	3-9	3-9	3-9
短时间:	2-9	2-9	2-9
保存缓冲液	20%乙醇	20%乙醇	20%乙醇
保存温度	4°C to 8°C	4°C to 8°C	4°C to 8°C

1. 试剂盒包括: HiTrap Protein G HP (1 ml 柱), 结合缓冲液母液(50 ml), 洗脱缓冲液母液(15 ml), 中性缓冲液母液(25 ml), 连接器, 终止头 (1/16”), 注射器和说明书。

2. 有时候在洗脱强烈结合的IgG时, 需要使用PH低于3的洗脱缓冲液。这时候因该注意配体蛋白在很低的PH时会被水解。

表A1.4 HiTrap Protein G HP, MAb Trap Kit, HiTrap Protein A HP, HiTrap rProtein A FF特性

特性	Ab SpinTrap/ Protein G HP SpinTrap	Protein G HP MultiTrap
配体	缺失白蛋白结合位点的重组型G蛋白	缺失白蛋白结合位点的重组型G蛋白
配体结合方式	N-羟基丁二酰亚胺 激活	N-羟基丁二酰亚胺 激活
配体密度	每毫升介质中大约2毫克G蛋白	每毫升介质中大约2毫克G蛋白
介质	高度交联的琼脂糖, 6%	高度交联的琼脂糖, 6%
柱材	Protein G Sepharose High Performance	Protein G Sepharose High Performance
平均颗粒半径	34um	34um
结合容量	能结合超过1mg人源IgG	能结合超过0.5mg人源IgG
平均颗粒半径	34um	34um
孔体积	-	800ul
柱材体积	100ul	50ul
最大上样体积	600ul	600ul
柱/多孔板材料	聚丙烯和聚乙烯	聚丙烯和聚乙烯
过滤板体积	-	127.8×85.5×30.6mm
PH稳定性:		
长时间:	3-9	3-9
短时间:	2-9	2-9
保存缓冲液	20%乙醇	20%乙醇
保存温度	4°C to 8°C	4°C to 8°C

1. 有时候在洗脱强烈结合的IgG时, 需要使用PH低于3的洗脱缓冲液。这时候因该注意配体蛋白在很低的PH时会被水解。

2. 遵照美国国家标准说明 (ANSI) 和生物分子筛选协会 (SBS) 标准1-2004,3-2004和4-2004。

表A1.5 Ab SpinTrap/Protein G HP SpinTrap/Protein G HP MultiTrap 特性

特性	Protein A HP SpinTrap	Protein A HP MultiTrap
配体	野生型A蛋白	野生型A蛋白
配体结合方式	N-羟基丁二酰亚胺 激活	N-羟基丁二酰亚胺 激活
配体密度	每毫升介质中大约3毫克A蛋白	每毫升介质中大约3毫克A蛋白
介质	高度交联的琼脂糖, 6%	高度交联的琼脂糖, 6%
柱材	Protein A Sepharose High Performance	Protein A Sepharose High Performance
平均颗粒半径	34um	34um
结合容量	能结合超过1mg人源IgG	能结合超过0.5mg人源IgG
平均颗粒半径	34um	34um
孔体积	-	800ul
柱材体积	100ul	50ul
最大上样体积	600ul	600ul
柱/多孔板材料	聚丙烯和聚乙烯	聚丙烯和聚乙烯
过滤板体积	-	127.8×85.5×30.6mm
PH稳定性:		
长时间:	3-9	3-9
短时间:	2-9	2-9
保存缓冲液	20%乙醇	20%乙醇
保存温度	4°C to 8°C	4°C to 8°C

1. 有时候在洗脱强烈结合的IgG时, 需要使用PH低于3的洗脱缓冲液。这时候因该注意配体蛋白在很低的PH时会被水解。

2. 遵照美国国家标准说明 (ANSI) 和生物分子筛选协会 (SBS) 标准1-2004,3-2004和4-2004。

表A1.6 Protein A HP SpinTrap/Protein A HP MultiTrap特性

## 再生A蛋白和G蛋白Sepharose产品

当纯化完毕后, 柱子应该按照小面的步骤进行再生:

1. 洗脱完毕后, 继续用洗脱液冲洗柱子2-3倍柱体积。
2. 立刻用2-3倍柱体积的结合缓冲液进行再平衡柱子。

### 原位再生



当发现柱子的压力升高时, 说明需要对柱子进行再生处理了。在一些情况下, 变性的蛋白和脂类在通常的再生条件下并不能被洗脱。

除去沉淀或者变性的蛋白可以按照如下步骤:

1. 使用6M的盐酸胍冲洗2倍柱体积。
2. 立刻用5倍柱体积的结合缓冲液进行再生。

除去结合紧密的疏水性蛋白、脂蛋白或者脂类可以按照如下步骤：

1. 在37摄氏度用非离子型去垢剂冲洗柱子一分钟，如使用0.1%TritonX-100。
2. 立刻用5倍柱体积的结合缓冲液进行再生。

上述步骤也可这样操作：用70%的乙醇浸泡柱材至少12小时，浸泡完毕后，立刻用5倍柱体积的结合缓冲液进行再生。



保持一定的流速能够提高原位再生的效果，在再生完毕后，立刻用20%的乙醇保存。



使用70%乙醇冲洗时能够增大柱压，因此应该适当降低流速。

## MabSelect介质特性

MabSelect介质能够在大体积上样量的情况下从各种材料中纯化单克隆抗体，MabSelect介质中使用的重组型A蛋白被定向的连接在介质上，这大大的增强了它对抗体的结合容量。MabSelect SuRe使用一种高度耐碱的重组型A蛋白，它能够耐受剧烈的洗脱条件（如0.1-0.5M的氢氧化钠）。MabSelect Xtra使用同MabSelect一样的重组型A蛋白，但是使用了一种更加小颗粒的结合介质，这提高了它的动力结合容量。表A1.7总结了这些介质的基本特性，表A1.8则总结了这些介质预装柱的基本特点。

特性	MabSelect	MabSelect Xtra	MabSelect SuRe
配体	大肠杆菌异源表达的重组A蛋白	大肠杆菌异源表达的重组A蛋白	大肠杆菌异源表达的耐碱型重组A蛋白
配体结合方式	环氧激活	环氧激活	环氧激活
介质	快速，高度交联的琼脂糖	快速，高度交联的琼脂糖	快速，高度交联的琼脂糖
结合容量	每毫升介质能结合超过30mg人源IgG	每毫升介质能结合超过40mg人源IgG	每毫升介质能结合超过30mg人源IgG
平均颗粒大小	85um	75um	85um
推荐流速	100-500 cm/h	100-300 cm/h	100-500 cm/h
化学稳定性	在6 M 盐酸胍, 8 M 尿素或20%乙醇中保存1周后，色谱层析时不会有明显的电荷	在6 M 盐酸胍, 8 M 尿素或20%乙醇中保存1周后，色谱层析时不会有明显的电荷	在6 M 盐酸胍, 8 M 尿素或20%乙醇中保存1周后，色谱层析时不会有明显的电荷
PH稳定性: 长时间: 短时间:	3-10 2-12	3-10 2-12	3-10 2-12
保存溶液	20%乙醇或2%苯甲醇	20%乙醇或2%苯甲醇	20%乙醇或2%苯甲醇
保存温度	4°C to 8°C	4°C to 8°C	4°C to 8°C

1. 有时候在洗脱强烈结合的IgG时，需要使用PH低于3的洗脱缓冲液。这时候因该注意配体蛋白在很低的PH时会被水解。

表A1.7 MabSelect, MabSelect Xtra和MabSelect SuRe特性

特性	HiTrap MabSelect	HiTrap MabSelect Xtra	HiTrap MabSelect SuRe
配体	大肠杆菌异源表达的重组A蛋白	大肠杆菌异源表达的重组A蛋白	大肠杆菌异源表达的重组耐碱型A蛋白
配体结合方式	环氧激活	环氧激活	环氧激活
介质	快速, 高度交联的琼脂糖	快速, 高度交联的琼脂糖	快速, 高度交联的琼脂糖
柱材	MabSelect	MabSelect Xtra	MabSelect SuRe
结合容量	每毫升介质能结合超过30mg人源IgG	每毫升介质能结合超过40mg人源IgG	每毫升介质能结合超过30mg人源IgG
平均颗粒半径	85um	75um	85um
柱体积	1ml或5ml	1ml或5ml	1ml或5ml
推荐流速			
1ml柱:	1 ml/min	1 ml/min	1 ml/min
5ml柱:	5 ml/min	5 ml/min	5 ml/min
最大流速			
1ml柱:	4 ml/min	4 ml/min	4 ml/min
5ml柱:	20 ml/min	20 ml/min	20 ml/min
PH稳定性:			
长时间:	3-10	3-10	3-10
短时间:	2-12	2-12	2-12
保存缓冲液	20%乙醇	20%乙醇	20%乙醇
保存温度	4°C to 8°C	4°C to 8°C	4°C to 8°C

1. 有时候在洗脱强烈结合的IgG时, 需要使用PH低于3的洗脱缓冲液。这时候因该注意配体蛋白在很低的PH时会被水解。

表A1.8 HiTrap MabSelect, HiTrap MabSelect Xtra和HiTrap MabSelect SuRe特性

## 再生MabSelect系列产品

所有的MabSelect系列产品都可以使用下面叙述的方法再生:

除去沉淀或者变性的物质:

1. 使用2倍柱体积的50 mM NaOH和0.5 M  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 或者50 mM NaOH和1.0 M NaCl, 或者0.1 M  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , 或者6 M 盐酸胍和10 mM NaOH. 冲洗柱子, 至少冲洗10分钟以上。
2. 立刻用至少5倍柱体积经过消毒过滤的结合缓冲液 (PH7-8) 冲洗。

MabSelect SuRe介质使用的是耐碱蛋白, 可以使用更高浓度的氢氧化钠溶液冲洗:

1. 使用至少3倍柱体积的结合缓冲液冲洗柱子。
2. 使用0.1-0.5 M NaOH冲洗至少2个柱体积, 连接时间为10-15分钟。
3. 立刻用至少5倍柱体积经过消毒过滤的结合缓冲液 (PH7-8) 冲洗。

除去结合紧密的疏水性蛋白、脂蛋白或者脂类可以按照如下步骤：

1. 用非离子型去垢剂冲洗柱子一分钟，如使用0.1%TritonX-100。
2. 立刻用至少5倍柱体积经过消毒过滤的结合缓冲液（PH7-8）冲洗。
3. 上述步骤也可这样操作：用3-4倍柱体积的70%乙醇或者30%2-丙醇冲洗柱子，然后立刻用至少5倍柱体积经过消毒过滤的结合缓冲液（PH7-8）冲洗。当使用高浓度有机溶剂是，应该逐步提高浓度以防止气泡的产生。

保持一定的流速能够提高原位再生的效果，在再生完毕后，立刻用20%的乙醇保存。

用3-4倍柱体积的70%乙醇或者30%2-丙醇冲洗柱子冲洗时能够增大柱压，因此应该适当降低流速。

## 嗜硫吸附介质

HiTrap IgY Purification HP 和 HiTrap IgM Purification HP柱都是灌装的一种嗜硫吸附介质，它是在 Sepharose High Performance 上偶联了2-巯基吡啶。表A1.9总结了这种2-巯基吡啶介质纯化IgY和IgM的特性：

特性	HiTrap IgY Purification HP	HiTrap IgM Purification HP
配体	2-巯基吡啶	2-巯基吡啶
柱材	2-mercaptopyridine Sepharose High Performance	2-mercaptopyridine Sepharose High Performance
介质	高度交联的琼脂糖，6%	高度交联的琼脂糖，6%
结合容量	每5ml柱材可以结合100mg纯的IgY或者四分之一的卵蛋白	每毫升柱材能够结合5mg人源的IgM
平均颗粒大小	34um	34um
配体密度	每毫升介质中大约3毫克	每毫升介质中大约3毫克
推荐流速	5 ml/min	1 ml/min
最大流速	20 ml/min	4 ml/min
PH稳定性： 长时间： 短时间：	3-11 2-13	3-11 2-13
柱体积	5ml	1ml
保存溶液	20%乙醇	20%乙醇
保存温度	4°C to 8°C	4°C to 8°C


1. 有时候在洗脱强烈结合的IgG时，需要使用PH低于3的洗脱缓冲液。这时候因该注意配体蛋白在很低的PH时会被水解。

表A 1.9 HiTrap IgY Purification HP和HiTrap IgM Purification HP特性

## 附件2

### 在纯化过程中的分析型检测

分析型检测在重复蛋白的纯化过程时是非常必需的，它反应了每一步纯化的有效性，通常的形式有产量、生物活性、收率和优化实验条件等。对目标分子的有效分析的重要性也不必过度重视。

 当对色谱层析的收集物进行分析是，要确保使用的缓冲液对检测没有影响。

#### 总蛋白测定

Lowry法或者Bradford法是测定总蛋白浓度时最长用到的方法，Bradford法特别适用于蛋白样品中含有大量的酯类时的检测，因为Lowry法会受到酯类的影响。

#### 纯度测定


检测纯度时，最常用的方法是SDS-PAGE，但有时候，也可以使用等电聚焦，毛细管电泳，反向柱层析或者质谱方法检测。

#### SDS-PAGE检测

需要的试剂：

6×SDS-PAGE上样缓冲液：0.35 M Tris-HCl (pH 6.8), 10.28% (w/v) SDS, 36% (v/v) 甘油, 0.6 M DTT (or 5% 2-硫苏糖醇), 0.012% (w/v) 溴酚蓝。0.5ml每管保存于-80° C。

1. 在5-10ul从粗提物、细胞裂解物或是纯化的蛋白上清中加入2ul上样缓冲液。
2. 用Vortex轻轻混匀，并在90° C - 100° C间加热5分钟。
3. 将样品上入SDS-PAGE中。
4. 跑胶并在完毕后用考马斯亮兰染色(Coomassie Blue R Tablets)或银染(PlusOne Silver Staining Kit)。

 在SDS-PAGE胶中所选择的丙烯酰胺的浓度取决于目标蛋白的分子量，在表A2.1中列出了常见的对比表：

	丙烯酰胺的浓度	可分离的分子量
单一浓度	5%	36-200
	7.5%	24-200
	10%	14-200
	12.5%	14-100
	15%	14-60
梯度浓度	5-15%	14-200
	5-20%	10-200
	10-20%	10-150

表A2.1 在SDS-PAGE胶中所选择的丙烯酰胺的浓度与目标蛋白的分子量的对应表  
大蛋白可能不能很好的跑进胶中。





想要获得更多关于电泳方面的信息，可以参考《蛋白电泳技术手册》（货号：80-6013-88）。

## 功能型检测

免疫特异性相互作用使得我们能够检测体系中有活性的目标蛋白分子的浓度。

Western-Blot可以用来检测SDS-PAGE胶中因蛋白量少而不能被考马斯亮兰或者硝酸银染色的蛋白。

1. 利用SDS-PAGE胶分离蛋白。
2. 将分离的蛋白转移到一张合适的膜上，这取决于检测试剂的选择。对于化学发光检测，推荐使用ECL™, ECL Plus, 或者ECL Advance™, Hybond™ ECL, Hybond P 薄膜。  
对于荧光检测，推荐使用ECL Plex™, Hybond LFP™薄膜。
3. 使用合适的专一性试剂浸泡薄膜。

电泳和蛋白的转膜可以使用一系列的仪器和试剂，想要获得进一步的信息，可以参考《蛋白电泳技术手册》（货号：80-6013-88），在手册中也提供了跟踪检测试剂盒。

ELISAs是最常用的活性检测手段。

利用表面细胞基因组反应来检测免疫专一性相互作用的功能检测（如：使用Biacore™ systems）使我们能够检测活性浓度、抗原决定簇或研究相互作用动力学。

## 附件三

# 免疫共沉淀技术

通过免疫共沉淀技术(也被称为免疫共吸附或者免疫下拉技术)能够从原始的细胞裂解物中分离并富集目标蛋白。具有专一性结合能力的抗体能够同偶连有A蛋白或是G蛋白的Sepharose小颗粒发生相互作用,进而,我们可以利用固定化的抗体来结合和富集诸如抗原等我们感兴趣的蛋白。目标蛋白通过这个步骤能够被数倍的富集,这也取决于抗体的专一性。同SDS-PAGE、免疫印迹等其它技术相结合,免疫共沉淀技术能够用来定量检测抗原或是检测相对分子量、测定蛋白翻译后修饰、测定酶活等。

基于A蛋白和G蛋白对人源IgG中的Fc区域的特异性结合,A蛋白和G蛋白Sepharose颗粒能够快速而且有效的分离纯化如抗原-抗体复合体等物质。


Protein A Sepharose High Performance和Protein G Sepharose High Performance有两种包装形式:方便的普通柱型包装和96孔板包装,而nProtein A Sepharose 4 Fast Flow 和Protein G Sepharose 4 Fast Flow都有大量的单独包装的形式。每毫升A蛋白Sepharose对人源IgG的结合容量大约在20-30mg之间,而每毫升G蛋白Sepharose对人源IgG的结合容量则大于25mg。

GE Healthcare公司生产的Immunoprecipitation Starter Pack (图 A3.1) 是一个理想地开始尝试免疫共沉淀的试剂盒。每个包装中包括nProtein A Sepharose 4 Fast Flow (2 ml) 和Protein G Sepharose 4 Fast Flow (2 ml), 这些使得试剂盒能够在广泛的抗体范围内使用。



图 A3.1 能够在广泛的抗体中使用并具有不同结合能力的Immunoprecipitation Starter Pack


优化免疫共沉淀的结果是一个很依赖经验的过程,例如在选择细胞裂解条件时,要考虑细胞的类型和抗原的用途。当处理没有细胞壁的细胞(如动物细胞)时,使用温和的去垢剂就能轻易的将细胞裂解开,而对于有细胞壁的细胞,则需要使用机械剪切力,例如超声破碎或者压力破碎等。

 参照第三章中的表3.2来选择不同的介质以分离纯化不同的抗体类型或者亚家族，也可以使用Immunoprecipitation Starter Pack来测试。

## 细胞裂解条件

在选择细胞裂解条件时，应该时条件能够足够剧烈以充分裂解细胞释放目标蛋白，但又不能使目标蛋白失去免疫活性。在表3.1中列出了裂解细胞常用的一些裂解缓冲液。

NP-40 (IGEPAL™ CA-630) 和RIPA 缓冲液是开始实验最常选用的细胞裂解液，因为它能释放大多数细胞质和核酸蛋白，但不释放染色体DNA。

 在实验中影响抗原提取效果的主要因素有：盐浓度(0 to 1 M)，非离子型去垢剂(0.1% to 2%)，离子型去垢剂(0.01% to 0.5%)和PH (6—9)。

缓冲液和溶液	溶质	裂解能力
裂解缓冲液		
Low salt	1% IGEPAL CA-630, 50 mM Tris, pH 8.0, 1 mM PMSF	+
NP-40 (IGEPAL CA-630)	150 mM NaCl, 1% IGEPAL CA-630, 50 mM Tris, pH 8.0, 1 mM PMSF	++
RIPA	150 mM NaCl, 1% IGEPAL CA-630, 0.5% sodium deoxycholate (DOC), 0.1% SDS, 50 mM Tris, pH 8.0, 1 mM PMSF	+++
High salt	500 mM NaCl, 1% IGEPAL CA-630, 50 mM Tris, pH 8.0, 1 mM PMSF	++++
其它的缓冲液和溶液		
PBS	1 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, pH 7.4	
冲洗缓冲液	50 mM Tris, pH 8.0	
样品缓冲液 (还原型)	1% SDS, 100 mM DTT, 50 mM Tris, pH 7.5	

表A3.1 常用的细胞裂解液

## 抗体的选择

多克隆血清中的抗体能够识别一个抗原中的多个抗原决定簇，这些抗体能够稳定抗原-抗体复合物，但是同样也能增加在研究分析中的背景。

相比之下，单克隆抗体更加具有专一性，这降低了背景，但是单克隆抗体形成的抗原-抗体复合物不够稳定，这一缺点可以通过使用多种单克隆抗体的混合物来克服。


## 蛋白的富集



图A3.2 能够从多种生物样品中富集蛋白的Protein A HP SpinTrap spin columns和 Protein A HP MultiTrap 96-well 板

A蛋白和G蛋白Trap系列产品（Protein A HP SpinTrap, Protein G HP SpinTrap, Protein A HP MultiTrap 和 Protein G HP MultiTrap）是被用来小规模富集蛋白的，例如作为凝胶电泳、液相层析或者质谱检测的上游操作步骤（图A3.2）。在使用这些产品来富集蛋白时，通常有两种操作方法：交叉技术和经典操作技术。

在交叉技术中，抗原所结合的抗体通过交联试剂被共价的连接在Protein A Sepharose High Performance 或者Protein G Sepharose High Performance介质上，当抗原被从样品中富集时，经过冲洗和洗脱，抗原被从柱子上洗脱下来，而抗体则仍然保留在柱子上。

 当要纯化的抗原或者目标蛋白的分子量同抗体的轻链或重链差不多，使其不能在SDS-PAGE上分开，或是抗体会影响到下一步的研究时，才推荐使用交叉法。

在经典的方法中，用于结合抗原的抗体被固定在Protein A Sepharose High Performance 或者Protein G Sepharose High Performance上，这些抗体就用来结合抗原。这个方法需要抗体能够同柱子上的A蛋白或者G蛋白结合。目标抗原通过这种方式被从样品中富集并经过冲洗后同抗体一起从柱子上洗脱下来。

可以通过改变特定的抗体抗原的结合来优化这个蛋白的富集过程，为了获得最好的结果，每一个抗原-抗体的结合都需要被优化。在实验中，也可以通过改变样品的前处理、要富集的蛋白样品的量、温浴时间、选择的缓冲液和冲洗的次数来优化结果。

如果想要获得关于使用Immunoprecipitation Starter Pack或是使用Protein A和Protein G HP SpinTrap 或者MultiTrap的详细说明，可以参考网站[www.gelifsciences.com/protein-purification](http://www.gelifsciences.com/protein-purification)上的说明。

## 附件四

### 使用HiTrap柱进行亲和纯化的一般建议

#### 选择一. 使用注射器手动纯化



图A4.1 将HiTrap柱同注射器一起使用。(A) 准备样品和缓冲液。除去柱子的顶盖并拧去末端堵头。(B) 平衡柱子，上样并收集样品。(C) 冲洗和洗脱，继续收集样品。

1. 将注射器中充满结合缓冲液，除去堵头并将注射器一滴一滴的连接在柱子上（使用提供的连接接头），以避免出现气泡。
2. 除去柱子底部出口的堵头。
3. 使用至少5倍柱体积的结合缓冲液平衡柱子。
4. 使用注射器将样品上到柱子上去，为了获得良好的结果，推荐的流速为0.2– 1 ml/min (1 ml 柱)和0.5 – 5 ml/min (5 ml柱)。
5. 以5– 10倍柱体积的缓冲液冲洗柱子，或直到没有物质从柱子中流出。在冲洗时保持流速为2 ml/min (1 ml 柱)和 5 – 10 ml/min (5 ml 柱)。
6. 以5– 10ml洗脱缓冲液洗脱蛋白，在洗脱时，保持流速为0.2– 1 ml/min (1 ml 柱)和 0.5 – 5 ml/min (5 ml柱)。
7. 洗脱完毕后，用3– 5倍的结合缓冲液冲洗柱子，这样柱子可以用于新一轮纯化过程。

\*当使用1 ml HiTrap柱并采用注射器上样时，1 ml/min的流速大约相当于30 滴/min；

当使用5 ml HiTrap柱并采用注射器上样时，5 ml/min的流速大约相当于 120滴/min。




如果要增大上样量，可以使用蠕动泵来加入样品和缓冲液。

## 选择二：使用ÄKTApriime plus纯化样品

ÄKTApriime plus中包含了使用合适的HiTrap柱纯化IgG、IgM和IgY的预设程序。



 每个缓冲液至少准备500ml。

1. 按照ÄKTApriime plus中提供的说明按步骤连接柱子并将系统中充满结合缓冲液。
2. 选择应用模板。
3. 开始程序。
4. 输入样品体积并按确认键开始。



A



B



D




C

图A4.2 ÄKTApriime plus使用的经典步骤。A 准备缓冲液。B 连接柱子。C 准备样品收集器。D 加入样品。

## 附件5

# 柱子的灌装和准备

来自GE Healthcare公司的预装柱能够确保可重复的结果和高效的纯化

 在方法优化中，使用预装柱或者96孔过滤板来筛选或是进行优化能够有效的提高效率。

有效合理的灌装是获得高质量的分离的前提，特别是使用梯度洗脱时，若柱子灌装出现问题，则会导致不正常的流出物、峰型的变宽、分辨率降低。如果确实需要灌装柱子，下面的建议适用于任何体积的柱子：

1. 当使用亲和层析技术时，可以使用短的、粗的柱子（通常为5—15cm柱床高度），这样有利于快速纯化。
2. 柱子中柱材的体积取决于柱材的结合容量和样品的量，然而柱材的结合容量同上样的类型和柱材本身有着密切的关系，这些都需要通过经验来估计。实验时，应该估计结合样品所需要的柱材体积并以5倍的柱体积来灌装柱子。如果分辨率足够时，可以适当减少柱材的体积。
3. 一旦分离纯化的参数被确定后，可以通过增大柱子的半径来增加柱材的体积，以增加结合容量。实验时应该避免增加柱子的长度，因为这样会改变分离条件。



图A5.1 “柱子的灌装—电影”中提供了关于柱子的灌装の詳細步骤。

1. 把所有的材料平衡到进行分离纯化时的温度。
2. 使用推荐的缓冲液快速流过柱子以除去柱子中的气泡，并确保柱子中没有残留的气泡。关闭柱子的出口使柱子中保留1—2ml的缓冲液。
3. 轻轻的重旋介质。

GE Healthcare提供的亲和柱柱材都是可以直接被使用的。



一定避免使用磁力搅拌器，因为这样会损害柱材。

4. 估计说明书中推荐的柱体积所需要的重旋好的柱材的量。
5. 将所需要的重旋柱材倒入柱子中，将一根细玻璃棒抵在柱子内侧并沿玻璃棒倒下可以最大程度减小引入气泡的机会。
6. 将柱子中立刻灌满缓冲液。
7. 将柱子连上顶盖并连接到泵上。
8. 打开柱子的出口并将泵设定到指定的流速（如XK 16/20为15ml/min）。



当重旋好的介质的体积显著大于柱体积时，应该在柱子上面安放一个装柱器（见订货信息中的详细叙述），这保证了装柱过程中的连续性，避免了阻断并提高装柱的条件。



如果泵不能达到推荐的流速，可以使用泵所能达到的最大流速。



不要超过柱子或者柱材的最大操作压。

9. 在柱子中柱床的高度稳定后，保持流速至少3个柱体积，并标记该柱床高度。



在任何纯化过程中都不要超过装柱流速的75%。

10. 关闭泵和柱子上的出口。轻轻的移去顶盖并把柱子的剩余部分灌满缓冲液且形成凸页面。
11. 倾斜着在柱子中插入接头，以避免气泡的产生。
12. 使接头开口打开，并将接头轻轻的划下，直到达到刻度线位置，关闭接头。
13. 将柱子连接在泵上并开始平衡，必要时重新固定接头位置。



介质中的保存缓冲液，通常是20%的乙醇，必须完全除去，因为乙醇会对后面的步骤产生很大的影响。



很多介质能够在含有抗菌物质的灭菌磷酸盐缓冲液里4摄氏度保存多到1个月，但是更经常使用说明书中介绍的方法来保存。

## 柱子的选择

Tricorn 和 XK柱子能够同现在新型介质的高流速的特点相适应，每个系列的柱子都有很多型号可供选择（见表5.1）。在大多数情况下，柱子的结合能力和上样体积决定了柱子的体积。同时，



在重力下使用的可丢弃的PD-10柱能够用于一次性纯化。如果想要获得关于各种型号的柱子的详细信息，可以参考GE Healthcare公司中关于生命科学类的订货目录，或者参照网站 [www.gelifesciences.com/protein-purification](http://www.gelifesciences.com/protein-purification)。

柱子的型号				
类型	标号 (mm)	长度 (mm)	柱床体积 (ml)	柱高 (cm)
Tricorn 5/20	5	20	0.31-0.55	1.6-2.8
Tricorn 5/50	5	50	0.90-1.14	4.6-5.8
Tricorn 10/20	10	20	1.26-2.20	1.6-2.8
Tricorn 10/50	10	50	3.61-4.56	4.6-5.8
Tricorn 10/100	10	100	7.54-8.48	9.6-10.8
XK 16/20	16	20	5-31	2.5-15.0
XK 16/40	16	40	45-70	22.5-35
XK 26/20	26	18	5.3-66	1-12.5
XK 26/40	26	40	122-186	23-35
XK 50/20	50	18	0-274	0-14
XK 50/30	50	30	265-559	13.5-28.5
Disposable PD-102	15	7.4	8.3	4.8-5.0

表A5.1 柱子的高度和体积

1. 所有的Tricorn 和 XK柱子都与特定的连接接头相配套。
2. 对于重力法应用，如果和LabMate Buffer Reservoir一起使用能使上样体积增大到25ml，这样可以减少处理时间。

## 附件6

# 生物样品的保存



在本文中给出的建议都是在一般情况下才成立的，并不是适用于所有的生物样品。在使用这些推荐的建议时，应该首先考虑特定的样品的性质和用途。

### 通常处理情况：

1. 在需要的时候加入稳定试剂，通常情况下，在纯化好的蛋白中都需要加入稳定试剂。
2. 血清、细胞悬浮培养物和腹水通常保存在 $-20^{\circ}\text{C}$  或者  $-70^{\circ}\text{C}$ 中，而且是少量的保存。
3. 尽量避免反复冻融和干燥溶解操作，因为这样会降低其中的生物活性。
4. 尽量避免接近稳定极限的操作，例如极端的PH或者盐离子浓度、还原、螯合试剂等。
5. 将样品保存在 $4^{\circ}\text{C}$  的密闭容器中，以避免细菌生长和降低蛋白酶活性。如果要长时间保存（如超过24小时），则应该加入诸如0.01%硫柳汞等保存试剂。



叠氮钠能够影响偶联反应和某些生物活性检测，并对人身体产生危害，它可以通过脱盐柱除去（见第二章）。

### 储存纯化后蛋白的一般条件

1. 在高浓度的硫酸铵溶液里以沉淀的形式保存，如在4M硫酸铵里面保存。
2. 冻存在50%甘油里面，这种方法特别适合于酶类。
3. 如果样品要用于生物活性检测或者用于体内实验，都不能加入保存试剂，此时应把样品小量分管冻存。
4. 尽量避免反复冻融和干燥溶解操作，因为这样会降低其中的生物活性。



某一些蛋白质，例如鼠源的IgG<sub>3</sub>抗体的某些亚类型，不能够被保存在 $4^{\circ}\text{C}$ 中，因为在此温度下蛋白会沉淀（冷沉淀蛋白），这种蛋白应该保存在含有保存液的室温环境中。

## 附件7

### 线性流速(cm/h)和体积流速(ml/min)的相互转化

在比较不同体积的柱子的流速时，使用线性流速会很方便(cm/h)，然而，在通常情况下，流速是用体积流速来计算的(ml/min)。线性流速(cm/h)和体积流速(ml/min)的相互转化可以使用如下的公式来进行：

**将线性流速(cm/h)转化为体积流速(ml/min)：**

$$\text{体积流速(ml/min)} = \text{线性流速(cm/h)} \times \text{柱子的横节面积} / 60 = y \times \pi \times d^2 / 240$$

其中：y=线性流速(cm/h)；

$$d = \text{柱子的直径 (cm)}$$

例子：

一个XK 16/70（内径1.6cm）的线性流速为150cm/h，那么它的体积流速是多少？

$$Y = \text{线性流速} = 150 \text{ cm/h}$$

$$d = \text{内径} = 1.6 \text{ cm}$$

$$\text{体积流速(ml/min)} = \text{线性流速(cm/h)} \times \text{柱子的横节面积} / 60 = 5.03 \text{ ml/min}$$

将线体积流速(ml/min)转化为线性流速(cm/h)：

$$\text{线性流速(cm/h)} = \text{体积流速(ml/min)} \times 60 / \text{柱子的横节面积} = 240Z / \pi \times d^2$$

其中：Z=体积流速(ml/min)；

$$d = \text{柱子的直径}$$

例子：

Tricorn 5/50 柱 (内径 0.5 cm)的体积流速为1 ml/min，那么它的线性流速是多少？

$$Z = \text{体积流速(ml/min)} = 1 \text{ ml/min}$$

$$d = \text{柱子的直径} = 0.5 \text{ cm}$$

$$\text{线性流速(cm/h)} = \text{体积流速(ml/min)} \times 60 / \text{柱子的横节面积} = 240Z / \pi \times d^2 = 305.6 \text{ cm/h}$$

使用注射器时：

$$1 \text{ ml/min} = \text{大约} 30 \text{ 滴/min (HiTrap 1 ml)}$$

$$5 \text{ ml/min} = \text{大约} 120 \text{ 滴/min (HiTrap 5 ml)}$$

## 附件8

### 转化数值：蛋白，柱压

分子量 (g/mol)	1ug	1nmol
10000	100 pmol; $6 \times 10^{13}$ 分子	10 $\mu$ g
50000	20 pmol; $1.2 \times 10^{13}$ 分子	50 $\mu$ g
100000	10 pmol; $6.0 \times 10^{12}$ 分子	100 $\mu$ g
150000	6.7 pmol; $4.0 \times 10^{12}$ 分子	150 $\mu$ g

蛋白	1mg/ml的A280
IgG	1.35
IgM	1.20
IgA	1.30
Protein A	0.17
Avidin	1.50
Streptavidin	3.40
Bovine Serum Albumin	0.70

1 kb of DNA = 333 氨基酸= 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

每个氨基酸的平均分子量 = 120g/mol

## 柱压

最大的操作基本柱压是指当高于此压力时柱材开始被破坏。

压力的表示方法有MPa和psi两种，这两个的转化关系为：1 MPa = 10 bar = 145 psi

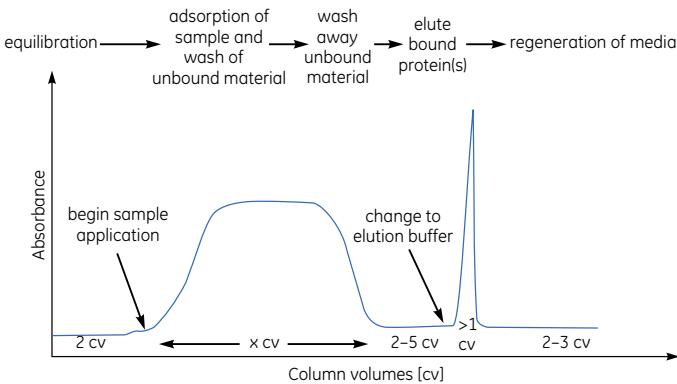
# 附件9

## 不同纯化技术的基本建议和条件

### 亲和色谱层析 (AC)

亲和色谱层析是基于蛋白质或者蛋白质的某一个基团能够可逆的同偶连在柱材上一个配体结合而分离纯化的过程，这项技术可以作为筛选或者纯化蛋白的过程，它只需要能够找到一个可以和目标分子就有足够特异性结合的配体并偶连到柱子上就可以使用。亲和色谱层析通常具有高分辨率和高亲和容量的性质。亲和色谱层析通常作为双步纯化的第一步来进行，在进行完亲和色谱层析后通常还有一步其它方法的纯化来进一步除去杂质。

目标分子一般是可逆的结合在柱材上面的配体上，上样时使用的条件通常是有利于目标分子同配体分子结合的。没有结合的分可以通过冲洗而除去，而结合上去的目标分子则可以通过有利于其解离的洗脱条件而得到收集。洗脱时需要特定的条件，常常是竞争性的把目标分子游离出来，如改变PH、离子强度或者极性等等。样品会因结合而富集，并以纯化且浓缩的形式被洗脱下来。在图A9.1中表示了亲和色谱层析的主要步骤。有时候亲和色谱层析也可以用来除去特定的杂质，例如苯米咪。Sephacrose 4 Fast Flow可以除去丝氨酸蛋白酶。



图A9.1 经典的亲和纯化

### 更多的信息

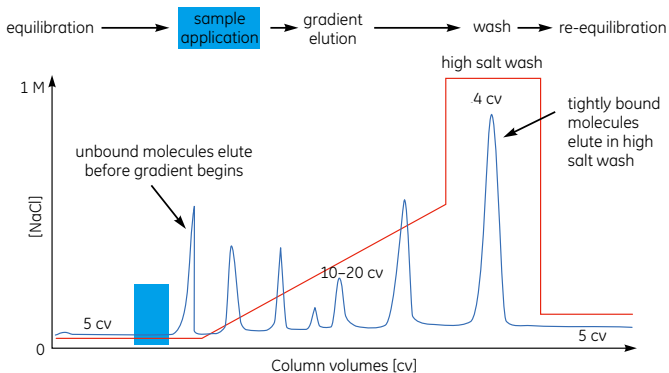
蛋白质纯化手册 (货号: 18-1132-29)

亲和色谱层析手册: 策略与方法 (货号: 18-1022-29)

本手册第三章纯化抗体的方法。

## 离子交换色谱层析 (IEX)

离子交换色谱层析是基于蛋白质具有不同的表面电荷的特性的分离方法，它具有高分辨率和高上样容量的特性。离子交换色谱层析依赖于蛋白质表面带的电荷和具有相反电荷的柱材颗粒只见可逆的相互作用而达到分离纯化效果的。当上样时，蛋白被挂在离子交换柱上，当条件改变时，目标蛋白和杂质被分别洗脱下来而分开。洗脱过程通常是增加盐离子浓度或者改变PH的过程，这种改变通常是分步或者以线性梯度进行。大多数时候增加盐离子浓度使用的是NaCl（图A9.2）。目标蛋白在结合和被洗脱的过程中得到浓缩和纯化。



图A9.2 经典的离子交换色谱层析的洗脱过程

蛋白表面的静电荷会随着周围环境中的PH条件的改变而改变，一般的，当周围环境中的PH高于蛋白质的等电点时，蛋白结合阴离子交换柱，当周围环境中的PH低于蛋白的等电点时，蛋白结合阳离子交换柱。然而值得注意的时，蛋白与柱子的结合能力取决有蛋白表面能够起作用的净电荷。典型的离子交换色谱层析是将目标分子结合在柱子上，然后让杂蛋白流过，在某些情况下也可以让杂蛋白结合在柱子上然后让目标蛋白流过。离子交换色谱层析也可以通过改变环境中的PH而多次进行，如图A9.3中所示：

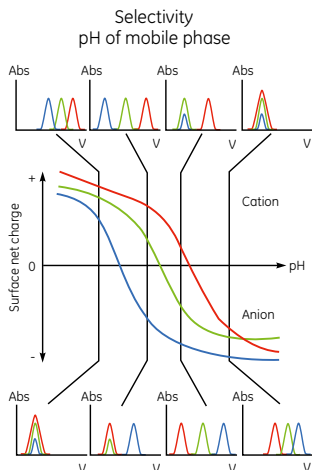


图9.3 不同PH对蛋白洗脱的影响

## 过程优化（以重要者优先）

1. 使用小的离子交换柱来选择合适的离子交换色谱层析条件，如使用HiTrap IEX Selection Kit，这样可以减少时间和样品的浪费。
2. 寻找具有最佳分离效果和结合容量的条件，如果已知蛋白的等电点，那么以0.5-1为一个单位从蛋白的等电点开始寻找。
3. 在可接受的分辨率内，选择最佳陡峭的洗脱梯度。
4. 在能保持分辨率的前提下，选择最快的流速以节约时间，在使用前检查特点柱材的流速限制。



在优化完毕后，建议使用分布洗脱过程以避免时间和缓冲液的浪费，如图A9.4所示。使用分布洗脱时可以增大上样体积。

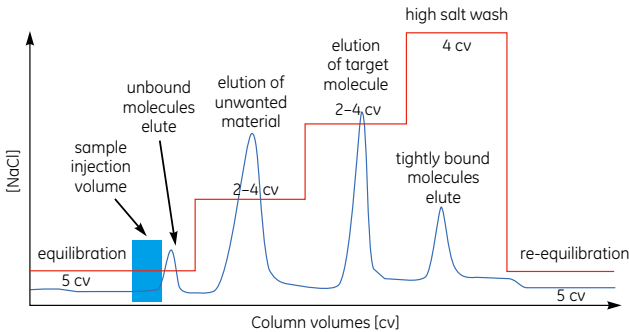


图 A9.4 分布洗脱

## 更多的信息

蛋白纯化手册（货号：18-1132-29）

离子交换色谱层析与色谱聚焦手册：策略与方法（货号：11-0004-21）

## 疏水作用色谱层析（HIC）

疏水作用色谱层析是基于蛋白质的疏水性的不同而设计的分离纯化手段，它既可以作为第一步获取蛋白的手段，也可以作为进一步纯化蛋白的方法。疏水作用色谱层析依赖蛋白的疏水基团同柱材的疏水部分之间可逆的相互作用，这种相互作用可以被高的盐离子浓度所加强，因此疏水作用色谱层析特别适合于在硫酸沉淀或者高浓度的盐洗脱的离子交换色谱层析之后。样品通常溶在高盐溶液里（如1.5M硫酸铵），然后被加入柱子内，此时样品结合在柱子上面，最后通过改变条件使蛋白洗脱下来。

洗脱通常以降低盐浓度来进行（图A9.5），降低盐浓度的方式通常有分布和线性梯度降低两种方式。大多数情况下，样品通过线性降低硫酸铵的浓度来进行。目标蛋白在这个过程中被浓缩

和纯化。其它的洗脱方法包括降低洗脱溶液的极性（乙烯乙二醇梯度至50%），加入离液序列高的试剂（尿素，盐酸胍）或是去垢剂，改变PH和温度等。

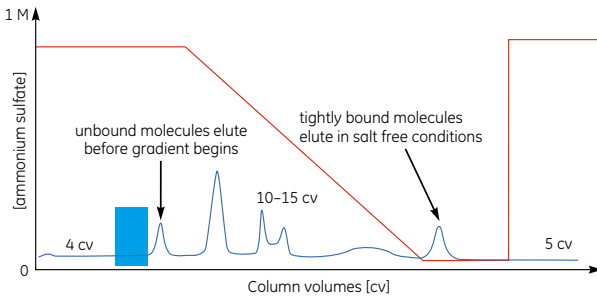
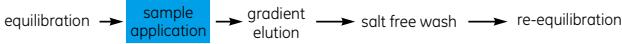


图 A9.5 典型的疏水作用色谱层析洗脱图

## 过程优化

1. 蛋白的疏水性是很难被直接预测的，因此蛋白同疏水柱的相互作用需要仔细的被研究。使用HiTrap HIC Selection Kit或者RESOURCE HIC Test Kit可以在需要的盐浓度范围内寻找最佳的结合和洗脱条件。对于不知道疏水性质的蛋白通常在0%–100%B液内尝试（例如B液为1M的硫酸铵）。了解蛋白在高浓度的盐溶液中是否沉淀也很重要，因为过高浓度的硫酸铵会使蛋白沉淀。
2. 选择一个具有足够分辨率的合适的洗脱梯度。
3. 在能保持分辨率的前提下，选择最快的流速以节约时间，在使用前检查特点柱材的流速限制。
4. 如果样品同柱材结合的很紧密，可以选用如PH、温度或者有机溶剂来分类，但是可能会导致蛋白构象的变化。蛋白的构象变化对于每一个具体的蛋白都是不同的，但是可以使用筛选条件来测试这些试剂，同时也可以选择一些低疏水性的柱材。

在优化完毕后，建议使用分布洗脱过程以避免时间和缓冲液的浪费，如图A9.6所示。使用分布洗脱时可以增大上样体积。

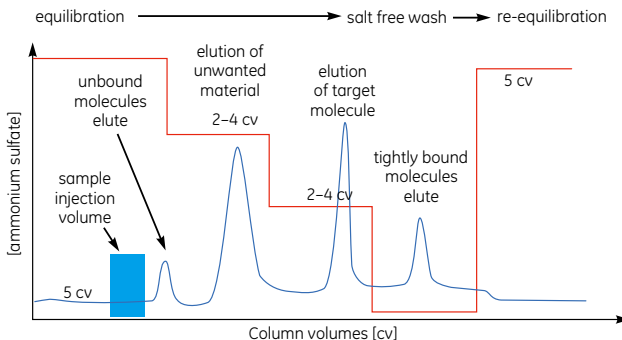


图 9.6 分布洗脱



## 更多的信息

蛋白纯化手册（货号：18-1132-29）

疏水作用色谱层析与反向层析手册：策略与方法（货号：11-0012-69）

## 凝胶过滤层析（GF）

凝胶过滤层析是根据分子大小来分离纯化蛋白的一种手段，这种技术很适合用在分离纯化的最后一步中，因为此时蛋白样品被浓缩（样品的体积和浓度很大程度上影响着凝胶过滤层析的速度和分辨率）。样品在凝胶过滤层析中单一缓冲液洗脱的，如图A9.7所示。缓冲液的条件可以根据样品的类型或者进一步纯化、分析、保存的需要，因为缓冲液的组成通常并不影响凝胶过滤层析的分辨率，因此蛋白就保存在选择的缓冲液中。

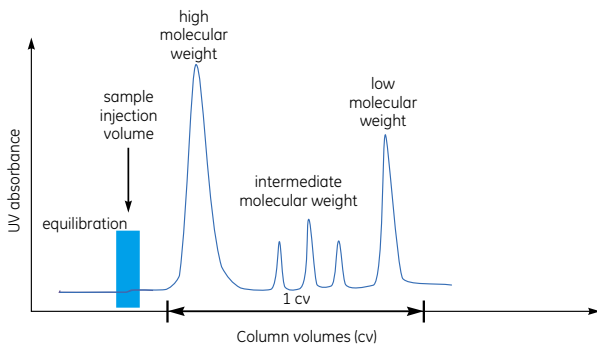


图 A9.7 典型的凝胶过滤层析洗脱图

## 更多的信息

蛋白纯化手册（货号：18-1132-29）

凝胶过滤层析手册：策略与方法（货号：18-1022-18）

## 反向色谱层析（RPC）

反向色谱层析是根据蛋白或者小肽的疏水性不同，从而和反向色谱层析柱产生不同的疏水相互作用而分离纯化。当样品被上到柱子上时，它们被结合到柱子上。再通过改变条件以洗脱柱子上的不同物质。因为反向色谱层析柱柱材本身的性质，样品和柱材只见的结合通常非常紧密，但是这种结合强度能通过改变溶液中的有机溶剂或者其它添加剂来改变。在洗脱时，最常用的洗脱试剂是乙腈，通过增加乙腈的浓度来洗脱蛋白。样品在结合和分离的过程中会被浓缩和纯化，并以浓缩的形式被收集。在图A9.8中表示了这个分离过程。

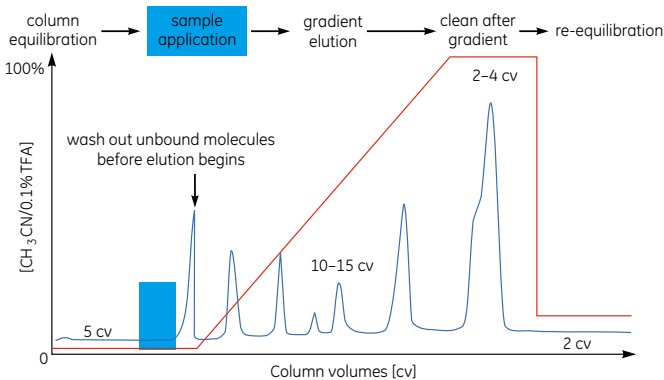


图 A9.8 典型的反向色谱层析洗脱图

反向色谱层析大多应用在寡聚核酸和小肽的进一步分离纯化中，也可以用于分析型分离，例如小肽的测定。

反向色谱层析并不适用于需要保持活性和三位结构的蛋白质的分类纯化，因为当存在有机溶剂时蛋白常常会变性。

## 方法优化

1. 从筛选结果中筛选柱材。
2. 选择合适的洗脱梯度以获得足够的分辨率，对于未知蛋白可以从0%洗脱到100%。
3. 在不影响分辨率的情况下，选择最大流速以节约时间。
4. 如果需要大规模纯化，使用分步洗脱。
5. 如果样品同柱材结合过于紧密，可以选用一个具有低疏水性的柱子使用。

## 更多的信息

蛋白纯化手册（货号：18-1132-29）

疏水作用色谱层析与反向层析手册：策略与方法（货号：11-0012-69）

# 产品目录

Ab Buffer Kit	50, 57, 59, 62, 69, 73, 75, 78, 83	MabSelect SuRe	44, 46, 67-68, 84-87, 127
Ab SpinTrap	45, 46, 50, 54, 56-58, 132	MabSelect Xtra	44, 46, 67, 69, 84-85, 87-89, 127, 134-135
Benzamidine Sepharose 4 Fast Flow (high sub)	150	MabTrap Kit	46, 50, 63-66, 131
Blue Sepharose 6 Fast Flow	106, 107	NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow	101
Capto adhere	48, 109-110, 126-1 7	nProtein A Sepharose 4 Fast Flow	44, 46, 67, 68, 70-72, 79, 130, 139
Capto MMC	109	PD MidiTrap G-25	25, 26, 33, 39-41, 46
Capto Q	110, 127	PD MiniTrap G-25	25, 26, 33, 37-38, 39, 46
Capto S	127	PD MultiTrap G-25	25, 26, 33, 34, 35-36, 46
Chelating Sepharose Fast Flow	109	PD SpinTrap G-25	25, 26, 33, 34, 37, 46
Disposable PD-10 Desalting Columns	25, 26, 33, 41-42,46	PheNyL Sepharose 6 Fast Flow	127
ECL	138	Protein A HP MultiTrap	46, 68, 69, 72-74, 133, 141
ECL Advance	138	Protein A HP SpinTrap	46, 68, 69, 74-76, 133, 141
ECL Plex	138	Protein A Sepharose High Performance	67, 72, 74, 76, 131, 133, 139
ECL Plus	138	Protein G HP MultiTrap	46, 50, 54-56, 132, 141
HiLoad 16/10 PHeNyL Sepharose HP	123	Protein G HP SpinTrap	46, 50, 58-60, 132, 141
HiLoad 16/60 Superdex 200 pg	46, 89, 109, 119, 121	Protein G Sepharose 4 Fast Flow	44, 46, 50-54, 129, 139
HiLoad 16/60 Superdex 75 pg	46	RESOURCE HIC Test Kit	116, 123, 153
HiLoad 26/60 Superdex 200 pg	46, 109	rProtein A Sepharose 4 Fast Flow	44, 46, 68, 70, 79-81, 82, 111, 130-131
HiLoad 26/60 Superdex 75 pg	46	SP Sepharose Fast Flow	127
HiPrep 26/10 Desalting	25, 27, 29, 31-32, 33, 46, 122	rProtein A Sepharose 4 Fast Flow	44, 46, 68, 70, 79-81, 82, 111, 130-131
HiTrap Blue HP	107-108	SP Sepharose Fast Flow	127
HiTrap Butyl FF	106	Superdex 200 10/300 GL	46, 47, 109, 110
HiTrap Desalting	25, 27-30, 31, 46	Superdex 200 5/150 GL	46
HiTrap HIC Selection Kit	106, 123, 153	Superdex 75 10/300 GL	46
HiTrap IEX Selection Kit	152	Superdex 75 5/150 GL	46
HiTrap IgM Purification HP	95-97, 136	Tricorn accessories	86-89
HiTrap IgY Purification HP	97-99, 136	Tricorn empty columns	44, 50, 51, 68, 70, 71, 79, 80, 86, 87, 144, 146
HiTrap MabSelect	46, 68, 85, 89-92, 135	XK empty columns	44, 50, 51, 68, 70, 71, 79, 80, 144, 146
HiTrap MabSelect SuRe	46, 68, 85, 92-94, 122, 135	AKTAcrossflow	115
HiTrap MabSelect Xtra	46, 69, 85, 89-92, 135	ÅKTAdesign	60, 63, 78, 84, 113-115, 118
HiTrap NHS-activated HP	100, 101-104	ÅKTAEplorer	47, 90, 92, 110, 113, 114, 115
HiTrap Octyl FF	106	ÅKTAFPLC	118-119
HiTrap PHeNyL FF (high sub)	106	ÅKTApilot	115
HiTrap PHeNyL FF (low sub)	106	ÅKTAPrime	107
HiTrap PHeNyL HP	106	ÅKTAPrime plus	29-30, 32, 113, 115, 10, 11, 143
HiTrap Protein A HP	46, 68, 69, 76-79, 96, 131	ÅKTAProcess	115
HiTrap Protein G HP	46, 50, 54, 60-64, 66, 96, 120, 131	ÅKTAPurifier	115
HiTrap rProtein A FF	46, 68, 69, 79, 81-84, 96, 118-119, 120, 131	ÅKTAPress	89, 114, 115, 122
HiTrap SP HP	111		
Hybond ECL	138		
Hybond LFP	138		
Hybond P	138		
Immunoprecipitation Starter Pack	139-140		
MabSelect	44, 46, 67-68, 70, 84-87, 127, 134-135		

	货号
手册	
亲和色谱层析手册：策略与方法	18-1022-29
纯化有挑战性的蛋白：策略与方法	28-9095-31
重组蛋白表达与纯化：策略与方法	18-1142-75
GST融合蛋白系统手册	18-1157-58
凝胶过滤：策略与方法	18-1022-18
疏水作用和反向层析：策略与方法	11-0012-69
离子交换色谱层析与色谱聚焦：策略与方法	11-0004-21
蛋白纯化	18-1132-29
二维电泳技术：策略与方法	80-6429-60
蛋白电泳技术手册	80-6013-88
选择指引和手册	
亲和柱材、柱选择手册	18-1121-86
方便的蛋白纯化，HiTrap柱手册	18-1129-81
凝胶过滤柱材和柱选择手册	18-1124-19
离子交换柱材和柱选择手册	18-1127-31
使用AKTAdesign系统的预装色谱柱选择手册	18-1173-49
每个柱子的经验总结	28-9090-94
压缩光盘	
装柱的压缩光盘——视频描述	18-1165-33
蛋白纯化——基于软件的蛋白纯化策略	18-1155-49
数据文件	
Ab SpinTrap/Ab Buffer Kit	28-9020-30
Protein A HP MultiTrap/Protein A HP SpinTrap/Buffer kit	28-9067-89
Protein G HP MultiTrap/Protein G HP SpinTrap/Buffer kit	28-9067-90
HiTrap rProtein A FF/HiTrap Protein A HP/HiTrap Protein G HP	11-0035-58
MabTrap Kit	18-1034-14
HiTrap MabSelect Sure/HiTrap MabSelect Xtra/HiTrap MabSelect	11-0034-90
nProtein A Sepharose 4 Fast Flow	18-1125-19
rProtein A Sepharose Fast Flow	18-1113-94
Protein G Sepharose 4 Fast Flow	18-1012-91
HiTrap IgM Purification HP	18-1127-43
HiTrap IgY Purification HP	18-1127-42
Immunoprecipitation Starter Pack	18-1141-04
HiPrep Desalting/HiTrap Desalting	28-9137-87
PD-10 Desalting Columns/PD MidiTrap G-25/PD MiniTrap G-25,	28-9267-48
PD SpinTrap G-25, and PD MultiTrap G-25	28-9267-48

## 订货信息

产品	数量	货号
亲和色谱层析		
预装柱		
Protein G HP MultiTrap	4 × 96-well plates	28-9031-35
Protein G HP SpinTrap	16 columns	28-9031-34
Ab SpinTrap	5 × 1 ml	17-0404-01
HiTrap Protein G HP	5 × 1 ml	17-0404-01
	2 × 1 ml	17-0404-03
	1 × 5 ml	17-0405-01
	5 × 5 ml	17-0405-03
MABTrap Kit	HiTrap Protein G HP (1 × 1 ml), accessories, pre-made buffers for 10 purifications	17-1128-01
Protein A HP MultiTrap	4 × 96-well plates	28-9031-33
Protein A HP SpinTrap	16 columns	28-9031-32
HiTrap Protein A HP	5 × 1 ml	17-0402-01
	2 × 1 ml	17-0402-03
	1 × 5 ml	17-0403-01
	5 × 5 ml	17-0403-03
HiTrap rProtein A FF	5 × 1 ml	17-5079-01
	2 × 1 ml	17-5079-02
	1 × 5 ml	17-5080-01
	5 × 5 ml	17-5080-02
HiTrap MabSelect	5 × 1 ml	28-4082-53
	1 × 5 ml	28-5042-55
	5 × 5 ml	28-4082-56
HiTrap MabSelect SuRe	5 × 1 ml	11-0034-93
	1 × 5 ml	11-0034-94
	5 × 5 ml	11-0034-95
HiTrap MabSelect Xtra	5 × 1 ml	28-4082-58
	1 × 5 ml	28-4082-60
	5 × 5 ml	28-4082-61
Immunoprecipitation Starter Pack	2 × 2 ml	17-6002-35
Protein A Sepharose 4 Fast Flow		
Protein G Sepharose 4 Fast Flow		
HiTrap IgY Purification HP	1 × 5 ml	17-5111-01
HiTrap IgM Purification HP	5 × 1 ml	17-5110-01
HiTrap NHS-activated HP	5 × 1 ml	17-0716-01
	1 × 5 ml	17-0717-01
HiTrap Blue HP	5 × 1 ml	17-0412-01
	1 × 5 ml	17-0413-01
附加产品		
Ab Buffer Kit	10 × stock solutions of binding, buffer, elution buffer, and neutralization buffer	28-9030-59

产品	数量	货号
实验室水平的大量灌装柱材		
Protein G Sepharose 4 Fast Flow	5 ml	17-0618-01
	25 ml	17-0618-0
nProtein A Sepharose 4 Fast Flow	5 ml	17-5280-01
	25 ml	17-5280-04
rProtein A Sepharose 4 Fast Flow	5 ml	17-1279-01
	25 ml	17-1279-0
Protein A Sepharose CL 4B	1.5 g	17-0780-01
MabSelect	25 ml	17-5199-01
MabSelect SuRe	25 ml	17-5438-01
MabSelect Xtra	25 ml	17-5269-07
NHS-activated Sepharose Fast Flow	25 ml	17-0906-01
CNBr-activated Sepharose 4 Fast Flow	10 g	17-0981-01
Chelating Sepharose Fast Flow	50 ml	17-0575-01
Blue Sepharose 6 Fast Flow	50 ml	17-0948-01
Benzamidine Sepharose 4 Fast Flow (high sub)	25 ml	17-5123-10
离子交换色谱层析		
预装柱		
HiTrap IEX Selection Kit	7 × 1 ml	17-6002-33
HiTrap Q XL 1 ml		
HiTrap SP XL 1 ml		
HiTrap ANX FF (high sub) 1 ml		
HiTrap DEAE FF 1 ml		
HiTrap CM FF 1 ml		
HiTrap Q FF 1 ml		
HiTrap SP FF 1 ml		
HiTrap Q HP	5 × 1 ml	17-1153-01
	5 × 5 ml	17-1154-01
HiTrap SP HP	5 × 1 ml	17-1151-01
	5 × 5 ml	17-1152-01
实验室水平的大量包装的柱材		
SP Sepharose Fast Flow	25 ml	17-0729-10
Capto Q	25 ml	17-5316-10
Capto S	25 ml	17-5441-10
Capto MMC	25 ml	17-5317-10
Capto adhere	25 ml	17-5444-10

产品	数量	货号
疏水作用色谱层析		
预装柱		
HiTrap HIC Selection Kit	7 × 1 ml	28-4110-08
HiTrap Phenyl HP		
HiTrap Phenyl FF (low sub)		
HiTrap Phenyl FF (high sub)		
HiTrap Butyl HP		
HiTrap Butyl FF		
HiTrap Butyl-S FF		
HiTrap Octyl FF		
RESOURCE HIC Test Kit	3 × 1 ml	17-1187-01
SOURCE 15 ETH		
SOURCE 15ISO		
SOURCE 15 PHE		
HiTrap Phenyl FF (high sub)	5 × 1 ml	17-1355-01
	5 × 5 ml	17-5193-01
HiTrap Phenyl FF (low sub)	5 × 1 ml	17-1353-01
	5 × 5 ml	17-5194-01
HiTrap Phenyl HP	5 × 1 ml	17-1351-01
	5 × 5 ml	17-5195-01
HiTrap Butyl FF	5 × 1 ml	17-1357-01
	5 × 5 ml	17-5197-01
HiTrap Octyl FF	5 × 1 ml	17-1359-01
	5 × 5 ml	17-5196-01
HiLoad 16/10 Phenyl Sepharose HP	1 × 20 ml	17-1085-01
HiLoad 26/10 Phenyl Sepharose HP	1 × 53 ml	17-1086-01
实验室水平上大量包装的柱材		
Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (high sub)	25 ml	17-0973-10
Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (low sub)	25 ml	17-0965-10
Phenyl Sepharose High Performance	75 ml	17-1082-01
凝胶过滤层析（脱盐或者缓冲液更换）		
预装柱		
HiTrap Desalting	5 × 5 ml	17-1408-01
Disposable PD-10 Desalting Columns	30 columns	17-0851-01
PD SpinTrap G-25	50 columns	28-9180-04
PD MultiTrap G-25	4 × 96-well plates	28-9180-06
PD MiniTrap G-25	50 columns	28-9180-07
PD MidiTrap G-25	50 columns	28-9180-08
HiPrep 26/10 Desalting	1 × 53 ml	17-5087-01

产品	数量	货号
附加产品		
MiniSpin Adapter	10	28-9232-43
MidiSpin Adapter	10	28-9232-44
PD-10 Spin Adapter	10	28-9232-45
LabMate PD-10 Buffer Reservoir	10	18-3216-03
Collection plate 500 $\mu$ l (V-bottom)	5 $\times$ 96 well plates	28-4039-43
凝胶过滤层析 (高分辨率)		
预装柱		
Superdex200 10/300 GL	1 $\times$ 24 ml	17-5175-01
Superdex 75 10/300 GL	1 $\times$ 24 ml	17-5174-01
Superdex 200 5/150 GL	1 $\times$ 3 ml	28-9065-61
Superdex 75 5/150 GL	1 $\times$ 3 ml	28-9205-04
HiLoad 16/60 Superdex 200 pg	1 $\times$ 120 ml	17-1069-01
HiLoad 26/60 Superdex 200 pg	1 $\times$ 320 ml	17-1071-01
HiLoad 16/60 Superdex 75 pg	1 $\times$ 120 ml	17-1068-01
HiLoad 26/60 Superdex 75 pg	1 $\times$ 320 ml	17-1070-01
HiLoad 16/60 Superdex 30 pg	1 $\times$ 120 ml	17-1139-01
HiLoad 6/60 Superdex 30 pg	1 $\times$ 320 ml	17-1140-01
Western blotting		
Hybond P, 20 $\times$ 20 cm	10 sheets	RPN2020F
Hybond ECL, 20 $\times$ 20 cm	10 sheets	RPN2020D
Hybond LFP, 20 $\times$ 20 cm	10 sheets	RPN2020LFP
ECL Western Blotting Detection Reagents	for 1000 cm <sup>2</sup>	RPN2109
ECL Plus Western Blotting Detection Reagents	for 1000 cm <sup>2</sup>	RPN2132
ECL Advance Western Blotting Detection Kit	for 1000 cm <sup>2</sup>	RPN2135
ECL Plex Western Blotting Combination Pack (Cy <sup>TM</sup> 3, Cy5, Hybond ECL)	for 1000 cm <sup>2</sup>	RPN998
ECL Plex Western Blotting Combination Pack (Cy3, Cy5, Hybond ELFP)	for 1000 cm <sup>2</sup>	RPN999
空柱子		
Tricorn 5/20	1	28-4064-08
Tricorn 5/50	1	28-4064-09
Tricorn 10/20	1	28-4064-13
Tricorn 10/50	1	28-4064-14
Tricorn 10/100	1	28-1065-15
Tricorn 柱中包括一个空的柱管, 一个连接器, 一个末端封口, 一个滤膜体系, 包括顶端和末端滤膜, O-环, 两个堵头, 两个适配器, 关卡和滤膜适配器, 还有两个M6的连接用于FPLC色谱层析系统。		



产品	数量	货号
XK 16/20	1	18-8773-01
XK 16/40	1	18-8774-01
XK 26/20	1	18-1000-72
XK 26/40	1	18-8768-01
XK 50/20	1	18-1000-71
XK 50/30	1	18-8751-01
XK柱中包括AK适配器, TEFZEL管 (0.8 mm i.d. for XK 16 and XK 6 columns, 1. mm i.d. for XK 50 columns), 还有M6连接器, 热稳定的包装, 支持环, 拆除器 (XK 16 and XK 6 only), 和说明书。		
Empty Disposable PD-10 Desalting columns	50	17-0435-01
附件和其它部件		
Tricorn 10 Coarse Filter Kit	1	11-001 -54
Tricorn Packing Connector 10-10	1	18-1153-23
Glass Tube 10/100	1	18-1153-15
Glass Tube 10/300	1	18-1153-18
Tricorn 10 Bottom Unit	1	18-1153-10
Packing Connector XK 16	1	18-1153-44
Packing Connector XK 26	1	18-1153-45

若想获得更多信息，可以参看  
[www.gelifesciences.com/contact](http://www.gelifesciences.com/contact)  
GE Healthcare Bio-Sciences AB  
Björkgatan 30  
751 84 Uppsala  
Sweden  
[www.gelifesciences.com/protein-purification](http://www.gelifesciences.com/protein-purification)

## 详情请与通用电气(中国) 医疗集团各办事处联系:

### 香港办事处

香港九龙旺角亚皆老街8号  
朗豪坊办公大楼12楼  
电话: (852) 2100 6314  
传真: (852) 2100 6338

### 北京办事处

北京市经济技术开发区  
永昌北路1号  
电话: (010) 5806 9403  
传真: (010) 6787 1162  
邮编: 100176

### 上海办事处

上海市浦东新区张江高科技园区  
华佗路1号  
电话: (021) 3877-7888  
传真: (021) 3877-7449  
邮编: 201203

### 成都办事处

成都市新华大道文武路42号  
新时代广场12层A-C单元  
电话: (028) 8678 2581  
传真: (028) 8678 2582  
邮编: 610017

### 广州办事处

广州市建设六马路33号  
宜安广场1212室  
电话: (020) 8363 3828-67961,67956  
传真: (020) 8363 4302  
邮政: 510060



imagination at work