

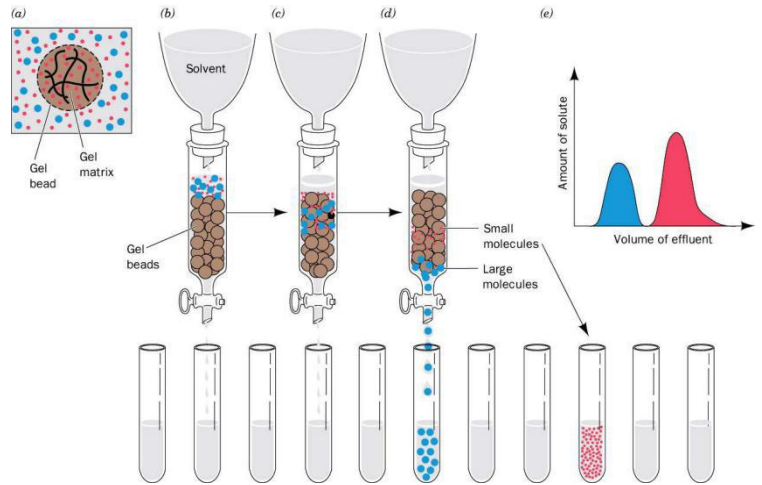
凝胶过滤色谱

凝胶过滤色谱蛋白纯化法，又称为空间排阻色谱，分子筛等。其原理是应用蛋白质分子量或分子形状的差异来分离。

当样品从色谱柱的顶端向下运动时，大的蛋白质分子不能进入凝胶颗粒从而被迅速洗脱；而较小的蛋白质分子能够进入凝胶颗粒中，且进入凝胶的蛋白质在凝胶中保留时间也不同，分子量越大，流出时间就越早，最终分离分子大小不同的蛋白质。

通常，多数凝胶基质是化学交联的聚合物分子制备的，交联程度决定凝胶颗粒的孔径。常用的色谱基

质有：葡聚糖凝胶（Sephadex）、琼脂糖凝胶（Sephacrose）、聚丙烯酰胺凝胶（Bio-Gel P）等。高度交联的基质可用来分离蛋白质和其他分子量更小的分子，或是除去低分子量缓冲液成分和盐，而较大孔径的凝胶可用于蛋白质分子之间的分离。选用合适孔径的凝胶很大程度取决于目标蛋白的分子量和杂蛋白的分子量。



实验方案设计

1. 凝胶介质的选择

凝胶介质的选择主要是根据待分离的蛋白和杂蛋白的分子量选择具有相应分离范围的凝胶，同时还需要考虑到分辨率和稳定性的因素。比如，如果是要将目的蛋白和小分子物质分开，可以根据他们分配系数的差异，选用 Sephadex G-25 和 G-50；对于小肽和低分子量物质的脱盐，则可以选择 Sephadex G-10、G-15 以及 Bio-Gel P-2 或 P-4；如果是分子量相近的蛋白质，一般选用排阻限度略大于样品中最高分子量物质的凝胶。具体凝胶过滤色谱介质应用如下：

常用凝胶过滤色谱介质的分离范围

凝胶介质	蛋白质的分离范围	凝胶介质	蛋白质的分离范围
	/103		/103
Sephadex G25	1~5	Sephacrose 2B	70~40000
Sephadex G50	1.5~30	Bio-Gel P-4	0.5~4

Sephadex G100	4~150	Bio-Gel P-10	5~17
Sephadex G200	5~600	Bio-Gel P-60	30~70
Sepharose 6B	10~4000	Bio-Gel P-150	50~150
Sepharose 4B	60~20000	Bio-Gel P-300	100~400

2. 凝胶介质的预处理

凝胶在使用前应用水充分溶胀（胶：水=1：10），自然溶胀的耗时较长，可采用加热的方法使溶胀加速，即在沸水浴中将凝胶升温至沸，1~2h 即可达到溶胀。在烧杯中将干燥凝胶加水或缓冲液，搅拌，静置，倾去上层混悬液，除去上清液中的凝胶碎块，重复数次，直到上清澄清为止。

3. 色谱柱的选择

色谱柱的体积和高径比与色谱分离效果密切相关，凝胶柱床的体积、柱长和柱的直径以及柱比的选择必须根据样品的数量，性质和分离目的进行确定。组别分离时，大多采用 2~30cm 长的色谱柱，柱床体积为样品溶液体积的 5 倍以上，柱比一般在 5~10 之间；而分级分离一般需要 100cm 左右的色谱柱，并要求柱床体积大于样品体积 25 倍以上，柱比在 20~100 之间。

4. 凝胶柱的填装

凝胶色谱柱与其它色谱方法不同，溶质分子与固定相之间没有力的作用，样品组分的分离完全依赖于他们各自的流速差异。装柱时关上柱子下口，在柱内加入约 1/3 柱床体积的水或缓冲液，然后沿着柱子一侧将缓冲液中的凝胶搅拌均匀，缓慢并连续的一次性注入柱内。待凝胶沉积约 5 厘米左右时，打开柱子下口，控制流速在 1ml/min。

5. 样品的处理与上样

根据样品的类型和纯化分析，需要选择合适的缓冲液，为了达到良好的分析效果，上样量必须保持在较小的体积，一般为柱床体积的 1%~5%，蛋白质样品上样前应进行浓缩，使样品浓度不大于 4%（样品浓度与分配系数无关），但需要注意的是，较大分子量的物质，溶液粘度会随浓度增加而增大，使分子运动受限，影响流速。上样前，样品要经滤膜过滤或离心，除去可能堵塞色谱柱的杂质。

6. 洗脱与收集

凝胶过滤色谱的缓冲液用单一缓冲液或含盐缓冲液作为洗脱液即可，主要考虑两个方面的原因：蛋白的溶解性和稳定性。所用的缓冲液要保证蛋白质样品在其中不会变性或沉淀，PH 应选在样品较稳定、溶解性良好的范围之内，

同时缓冲液中要含有一定的盐 (NaCl) ，对蛋白质起稳定和保护作用。洗脱过程中始终保持一定的操作压，流速不可过高，保持在 0.5~3.0mL/min 即可。

案列介绍

AKTA 凝胶过滤色谱分离蛋白质

材料

色谱介质：Sephacryl S-200，蛋白质分离范围 (5~250) ×103

色谱柱：XK16/60 预装柱

色谱设备：AKTA Explorer

混合样品：含单克隆抗体，分子量 180000；牛血清白蛋白 (68000) ，溶菌酶 (14000)

NaOH 0.5 mol/L

NaCl 200 mmol/L

PB 20 mmol/L

PH7.0 缓冲液

方法

1. 凝胶除菌处理：超纯水冲洗柱子后，用 0.5mol/L NaOH 正向冲洗柱，流速 3mL/min，冲洗 3 柱体积
2. 平衡：NaOH 处理完毕后，用超纯水冲洗 2 柱体积，接着用含 200mmol/L NaCl 和 20mmol/L PB 的 7.0PH 缓冲液冲洗 5~10 倍柱体积
3. 上样：平衡完毕后，选择样品泵进行上样，上样流速 3mL/min，上样体积为 1mL
4. 洗脱：上样结束后，用平衡缓冲液进行洗脱
5. 清洗与保存

纯化结束后，用 0.5mol/L NaOH 反向冲洗 2 柱体积，冲洗时间 30~60min，冲洗结束后，用超纯水正向冲洗 5 柱体积，再用 20%乙醇冲洗 3 柱体积，然后拆下柱子，两端封死，低温保存。

问题分析和解决方案

1、色谱分离前如何净化样品

- 在色谱分离前，对样品进行离心和过滤，离心能除去大部分块状物，如果离心后样品仍不清澈，可用滤膜过滤。由醋酸纤维薄膜或 PVDF 材料制成的滤膜能够非特异性的结合少量蛋白。

2、溶液交换不彻底

- 严格控制上样体积，上样体积不超过柱体积 30%。
- 若样品溶液体积较多，可以分多次上样，注意每次上样时间间隔，可根据电导色谱峰确定下一次上样时间。

3、分辨率不高

- 提高装柱质量，使色谱柱装填匀实；
- 提高柱床高度；
- 控制上样体积，最大上样体积不超过柱床体积 5%；
- 控制样品黏度与洗脱溶液黏度保持一致；
- 根据样品特点选择合适的洗脱溶液，调节洗脱溶液的离子强度或亲水性；
- 选择合适的凝胶柱（如何选择请参照上文）

4、色谱峰对称性差

- 1) 提高装柱质量，装柱匀实——若柱装的太松，容易引起拖尾，装的太紧，会引起前沿；
- 柱较脏，再生色谱柱

5、峰出现的原因及解决方法

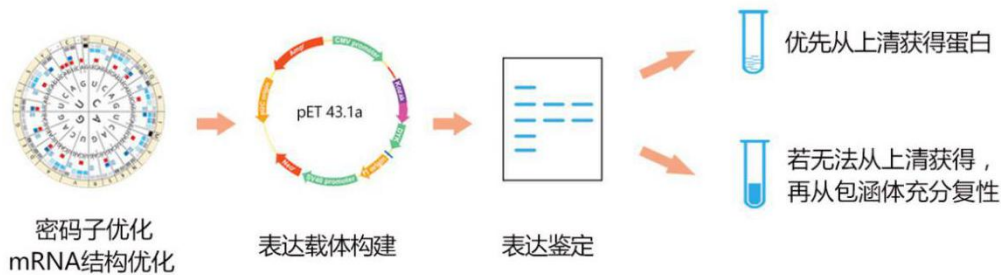
- 柱床松动，重新装柱或反向冲洗柱
- 柱筛板堵塞，超声清洗筛板
- 柱干裂，重新装柱

南京德泰生物 -- 专注蛋白与抗体

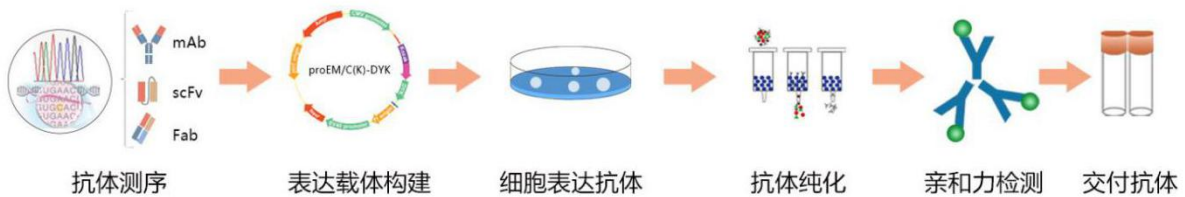
一、蛋白表达（哺乳动物细胞表达）蛋白被细胞充分修饰，活性有保障



二、蛋白表达（大肠杆菌表达）成功率>95%，不成功不收费，成功有保障



三、重组抗体表达 若想改造一个抗体，可以试试重组表达



四、稳定细胞系构建 研究级细胞系构建 & 高表达细胞株开发

