

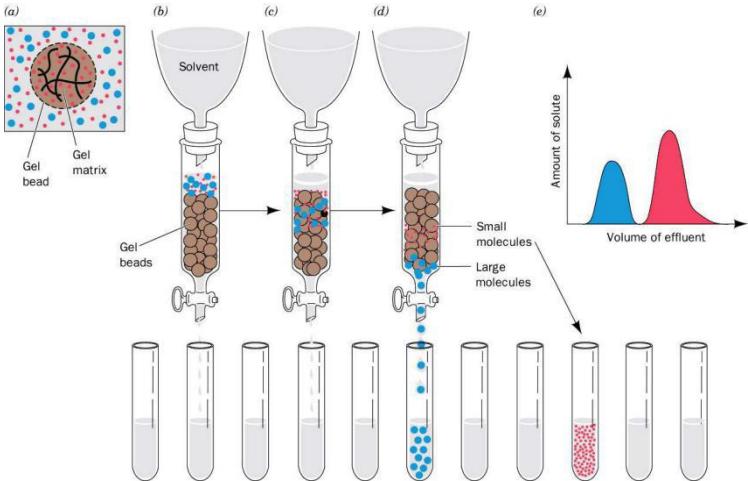
凝胶过滤色谱

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（Sephadose）、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，则可以选用 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	Sepharose 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。装住时关住柱子下口，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。

案例介绍

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

更多优质服务推荐



SingleB® mAb Discovery Service

SingleB®单B细胞快速单抗发现

德泰生物提供SingleB®单B细胞快速单抗发现服务，利用SmartFlow® FACS记忆B细胞筛选平台与DeepLight®浆细胞筛选平台，实现记忆B细胞与浆细胞的双筛选。平台适用于小鼠、兔、羊驼、人源化小鼠、绵羊等多种免疫对象，从动物免疫到获得单抗，快至29天，比传统杂交瘤技术至少节省120天。

平台优势

- 支持蛋白、多肽、细胞、病毒等**多种类型抗原免疫**
- 记忆B细胞 & 浆细胞双筛选，**保证B细胞多样性**
- 单细胞扩增阳性率高，无需刺激培养，减少多样性损失
- 重轻链天然配对，**亲和力更优**
- 高通量，周期短，单抗发现**快至29天**
- ELISA、FACS、WB、IHC等**多平台验证**

可开发单抗物种



小鼠



兔



羊驼



人源化小鼠



猪



犬

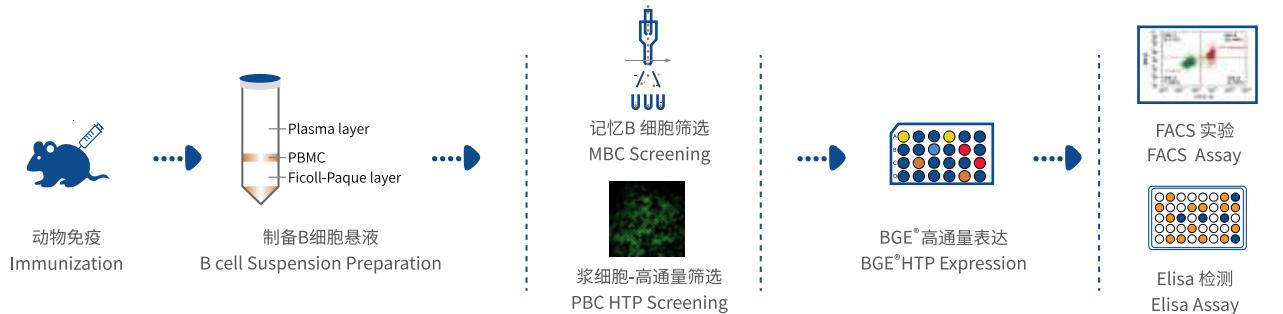


绵羊



人

服务流程





Recombinant Antibody Expression Service

重组抗体表达

德泰生物拥有完善的重组抗体表达与纯化体系、抗体多工艺质量验证体系。已交付的重组抗体项目种类包括scFv、Fab、(Fab')₂、VHH、嵌合抗体、双特异性抗体、Fc融合蛋白、全长IgG、IgM。cGMP标准的百级洁净细胞房及生物反应器用于HEK293/CHO细胞的小试及大量培养。HPLC纯度、内毒素、浓度等要求均可以根据您的下游应用进行定制。

服务优势



服务流程

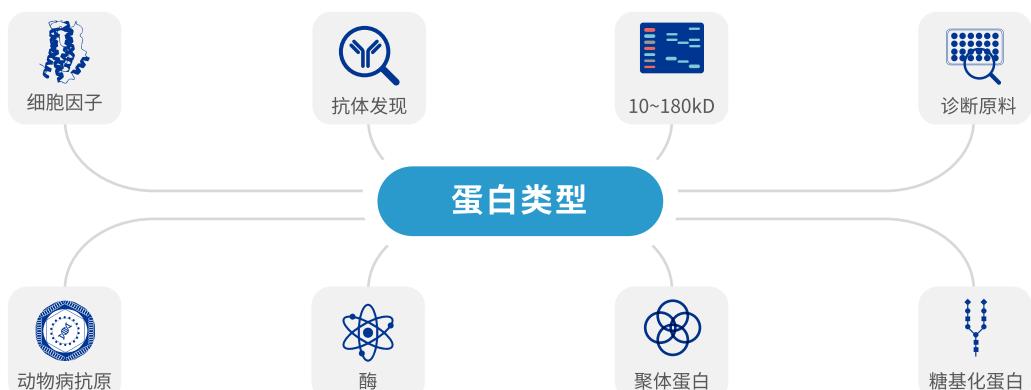


Recombinant Protein Expression Service

重组蛋白表达

原核蛋白表达系统、哺乳动物细胞蛋白表达系统

德泰生物拥有完善的原核蛋白表达与纯化体系和哺乳动物细胞蛋白表达与纯化体系。基于细胞因子、酶、诊断原料蛋白的工业化需求，我们配备了发酵设备并推出了大规模发酵制备服务；我们还配备了cGMP标准的百级洁净细胞房及生物反应器，用于HEK293/CHO等真核细胞的小试及大量培养。



4

Hybridoma Antibody Gene Sequencing Service

杂交瘤抗体基因测序

德泰生物拥有mRNA全长测序平台和Failsafe®假基因排除技术，能够提供快速、可靠的杂交瘤抗体基因测序服务。

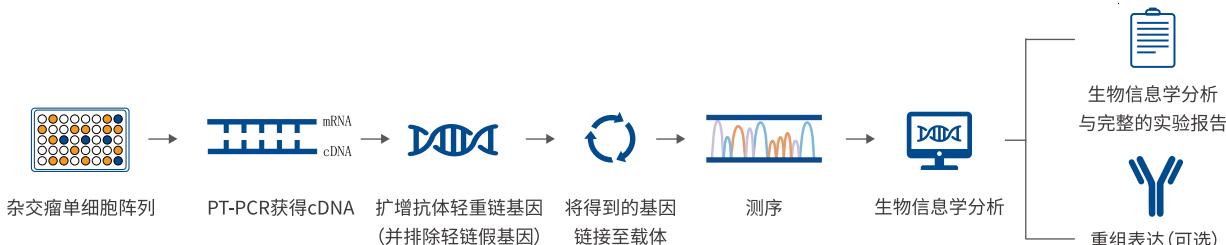
应用场景

- 抗体序列保护：获取抗体基因序列后可通过专利对CDR区进行保护。
- 生产方式备份：杂交瘤存在退化转阴风险，抗体序列可通过基因工程方式轻松转化为抗体样品。
- 抗体工程改造：获得的抗体序列可用于抗体人源化、双特异性抗体等抗体工程改造。

服务优势

- 极速体验：测序5天，表达5天，全程高通量
- 细胞需求少：只需1~5个细胞，可以接收孔板样品
- 保证测序结果准确：采用Failsafe®假基因排除技术，可排除κ轻链假基因
- 测序范围广：可测小鼠、大鼠、兔、羊等物种的IgM和IgG的所有亚型
- 一站式服务：德泰生物拥有丰富经验，可提供表达验证服务

服务流程



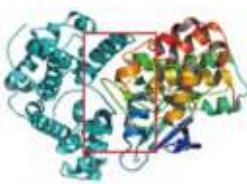
5

Biomolecular Interaction Analysis Service

分子间相互作用检测

德泰生物提供的分子间相互作用检测服务基于表面等离子共振(SPR)平台及生物膜干涉技术(BLI)平台，能够实现对分子间亲和力的定量和定性分析。与传统的GST pull down, 免疫共沉淀, 酵母双杂交等相比，具有更高的灵敏度、检测通量及较低的样品要求等优点。

检测范围



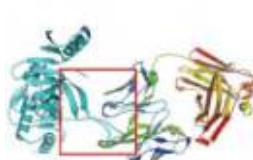
蛋白和蛋白



蛋白和小分子



蛋白和抗体



蛋白和抗体Fab片段

检测范围包括蛋白-蛋白、抗体-抗原、抗体片段-抗原、蛋白-抗体、蛋白-小分子、抗体-多肽、蛋白-DNA、DNA-DNA间的相互作用。



Antibody Humanization Service

抗体人源化

德泰生物人源化改造服务基于人工智能之深度学习算法,通过构建抗体结构模型、CDR移植与回复突变、识别关键氨基酸及人源化运算,获得人源化程度高且突变能低的抗体序列。

服务优势



重链和轻链同时参与优化



改造后的抗体人源化程度>90%



人源化抗体的亲和力与初始抗体相当



可进行多物种的抗体人源化

服务流程

- ① Antibody sequence confirmation
- ② Human germline acceptor selection
- ③ CDR grafting
- ④ Back mutation
- ⑤ Mutation energy ranking
- ⑥ Antibody expression
- ⑦ Affinity ranking



Stable Cell Line Development Service

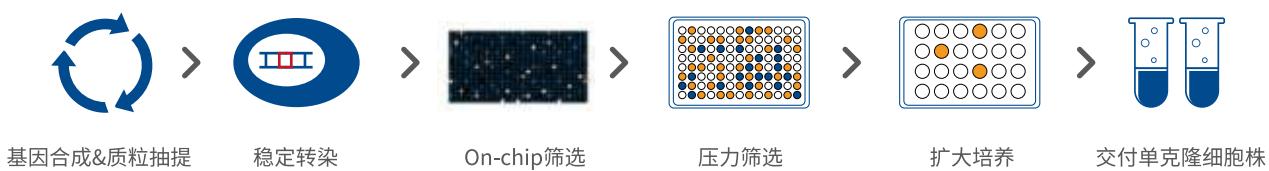
生产型稳转细胞株构建

德泰生物提供高表达哺乳动物稳定细胞株构建服务,筛选过程使用先进的可视化DeepLight®单克隆细胞筛选平台,较传统筛选流程快近100天,大大缩短了稳定细胞株的开发周期。

DeepLight®细胞筛选平台的优势

	有限稀释法筛选	DeepLight® On-chip筛选
筛选时间	8周	1天
细胞分离效率	低	高
筛选通量	低	高
单细胞水平筛选	否	是

服务流程



服务优势



更快的筛选速度

从DNA到细胞株
较传统方法快近100天

百k级筛选通量

一次筛选640k细胞
优选高表达细胞株

可视化筛选结果

先进DeepLight®平台
高表达细胞株实时成像

稳定高产

可稳定转代50代
重组单抗可达5 g/L