

离子柱常见问题分析及解决方案

摘要：本文主要针对离子柱[纯化蛋白](#)中常见的问题进行分析，解释其原因并提出相应的解决方案。

缓冲液如何选择

用 Tris-HCl 还是 PB，选择的依据是蛋白质的稳定性和活力在哪个缓冲液中好，浓度一般 50mM，但是缓冲液应与样品缓冲液有相同的 pH 和离子强度。

洗脱采用的离子强度的大小范围应该如何确定

离子交换纯化是利用离子交换剂上的可解离基团(活性基团)对各种离子的亲和力不一样达到分离目的的一种[蛋白纯化分离](#)技术,离子强度越大，洗脱越好。具体的离子浓度范围可以很大，0.01mol/l 到 1mol/l，甚至 3.0mol/l，PH 值的范围很广。主要根据你的蛋白质的等电点。

蛋白挂在阳离子交换柱上洗脱不下来

1. 蛋白与离子柱得结合太强，换弱阳的琼脂糖凝胶介质，比如由 sp 的换成 CM。
2. 减少离子柱与样品的结合时间，防止蛋白沉在柱上。
3. 若洗不下来的是杂蛋白直接用 0.1M 氢氧化钠洗。

标签蛋白易洗脱

1. 离子交换每个梯度都洗下来目标蛋白，最大可能性是上样量过大，流速太大，建议增加清洗的体积数，减少上样量，降低上样速度。
2. 上样完洗脱前，清洗的不彻底。
3. 标签没有表达出来：
 1. 可能是因为折叠构象不正确导致标签在重折叠时没有位于蛋白质分子的表面上无法与离子柱结合。
 2. 标签在折叠时没有位于蛋白质分子的表面上。
4. 填料有问题，换填料。
5. PH、离子强度是否合适，平衡缓冲液是否应与样品缓冲液 pH、离子强度相同。

标签包涵体蛋白易洗脱

1. 蛋白质的折叠形态发生了改变隐藏了标签，而使得蛋白质无法挂柱。
 1. 因临近的空间的一个或多个氨基酸的空间位阻阻碍了标签与离子柱形成共价键。

2. 环境影响：pH，离子强度，其他蛋白质分子，缓冲溶液类型，有关影响蛋白质分子表面的试剂等。

增加所提的蛋白质样品的溶解度或还可以加大离子型、非离子型或两性离子表面活性剂的浓度或类型。

2. 柱子没平衡好，平衡缓冲液没加咪唑，平衡液 PH 不适合，缓冲液 pH 要与蛋白质 pI 差 1-2。
3. 有比邻的组氨酸的污染蛋白质与离子柱结合，通过降低洗脱液 pH 值使得标签质子化而使得污染蛋白质从层析柱上被洗脱。
4. 一些蛋白质或 DNA 与带有标签的目的蛋白发生了非特异性相互作用，可以用低浓度的去污剂(2%的 Triton X-100 或浓度不大于 0.5%SDS)洗涤样品(上样洗脱时)或增加洗脱液的盐浓度(氯化钠溶液低于 2mol/L)。
5. 填料有问题，换填料。
6. 最后可以考虑一下试剂的问题。

目的蛋白先洗脱杂蛋白被吸附

1. 更换缓冲液，可能 pH 与蛋白质 pI 较接近。
2. 填料选择不对，与蛋白结合力太弱，更换适合纯化蛋白质的填料。
3. 直接收取目的蛋白，再用其他纯化方法进一步纯化。

蛋白纯化出现沉淀

1. pH 发生变化，导致蛋白质沉淀。
2. 离子溶度过高，缓冲液的离子溶度降低。

注意事项

1. 倒入速度不要太快，以防产生泡沫和气泡。
2. 装柱的注意事项:
 1. 装柱时应注意液面不能低于树脂表面。
 2. 树脂悬浮液的温度要相对恒定或与室温接近，否则柱床体内易产生气泡而影响分离效果。
 3. 装好的柱体应该没有“纹路”、节痕和气泡，并且柱床体表面平整而均匀。否则需要重新装柱。
 4. 在装柱的同时应该将其他仪器设备（如：恒流泵等）电源接通，并按实验要求进行预热和调试。需将恒流泵流速调至 0.4ml/min。
3. 应将洗脱液放至液面与树脂相切时再上样，且样品一旦加入就应该立即开始收集流出液。（第一管，应在 4ml 处做一标记）。
4. 加样时要沿柱内壁缓慢地加入柱中，以免冲坏树脂表面，以及在柱内形成气泡，影响分离效果。

更多优质服务推荐

1

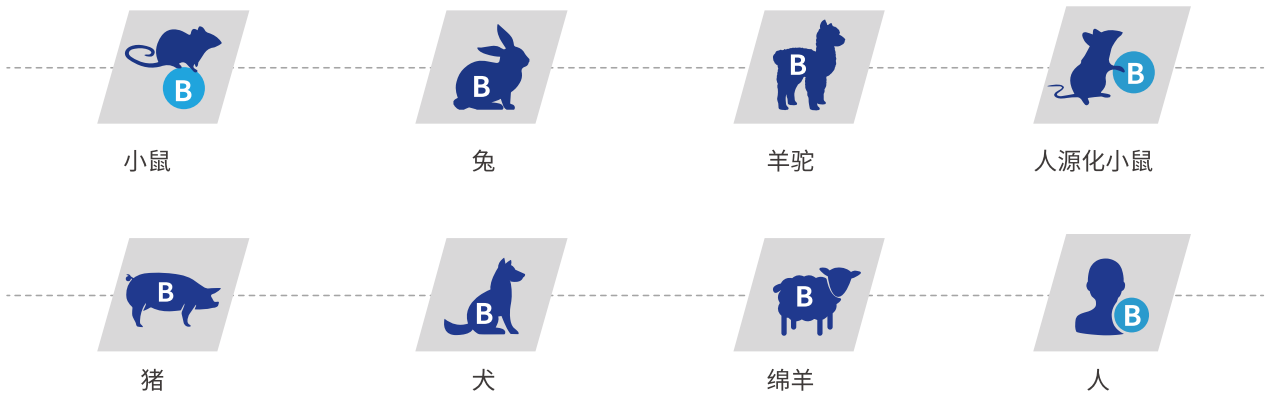
SingleB® mAb Discovery Service SingleB®单B细胞快速单抗发现

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。

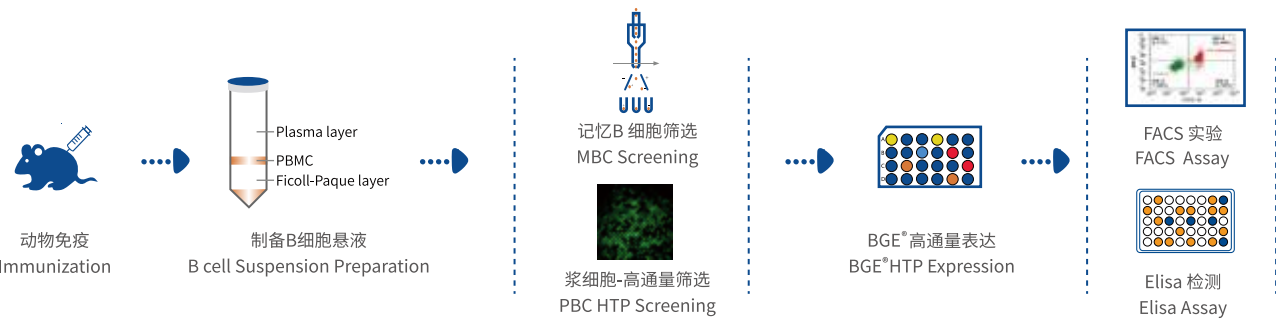
平台优势

 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



服务流程





Recombinant Antibody Expression Service

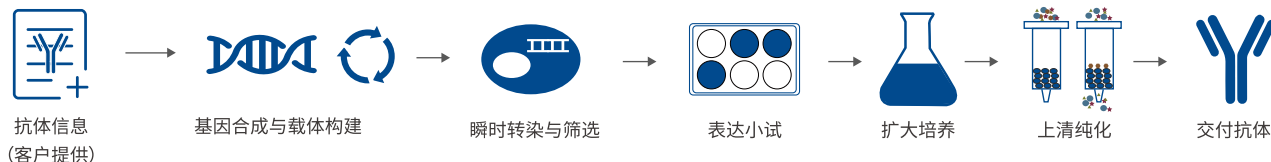
重组抗体表达

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、 $(\text{Fab}')_2$ 、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

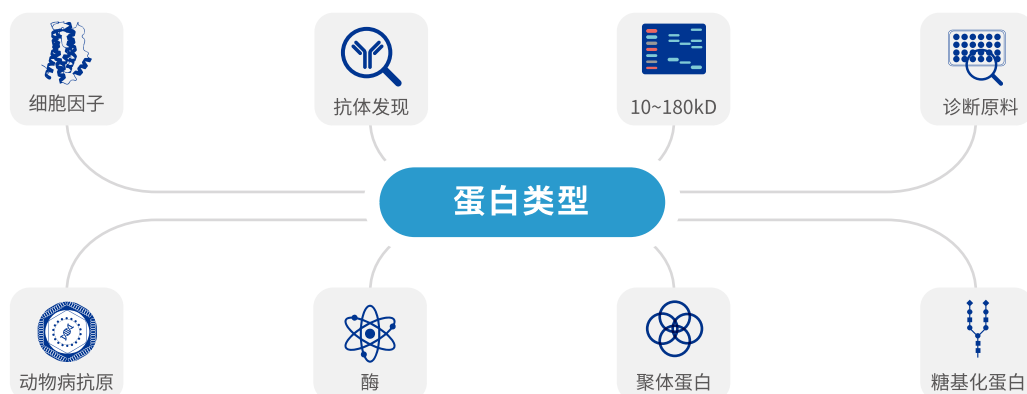


Recombinant Protein Expression Service

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。

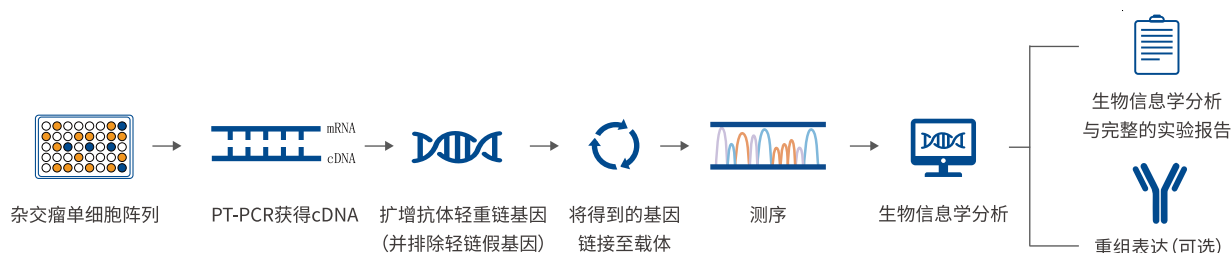
应用场景

- 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k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



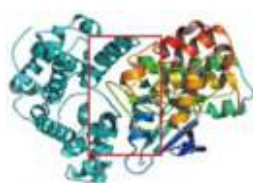
5

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。

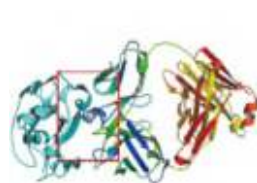
检测范围



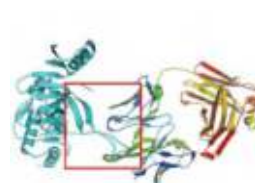
蛋白和蛋白



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



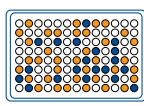
基因合成&质粒抽提



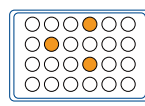
稳定转染



On-chip筛选



压力筛选



扩大培养



交付单克隆细胞株

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