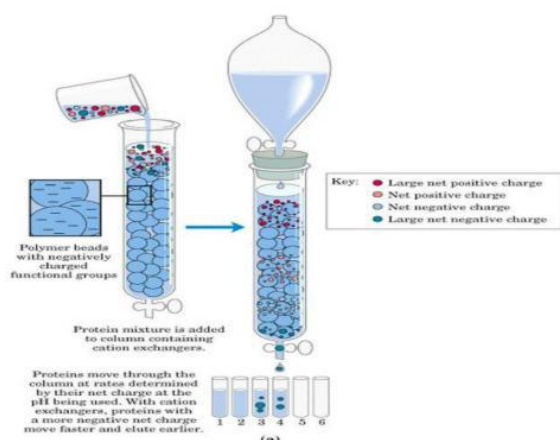


离子交换色谱的原理介绍和实际操作

离子交换色谱是蛋白纯化技术中常用的一种纯化方法，其原理是指被分离物质所带的电荷可与离子交换剂所带的相反电荷结合，这种带电分子与固定相之间的结合作用是可逆的，在改变 pH 或者用逐渐增加离子强度的缓冲液洗脱时，离子交换剂上结合的物质可与洗脱液中的离子发生交换而被洗脱到溶液中。由于不同物质的电荷不同，其与离子交换剂的结合能力也不同，所以被洗脱到溶液中的顺序也不同，从而被分离出来。

离子交换剂是由不溶于水的网状结构高分子聚合物骨架构成，骨架上有许多共价结合的带电基团，如果侧链是带正电基团，就可与带负离子相结合，称为阴离子交换剂，吸附带负电蛋白质。如果侧链是带负电的基团，则称为阳离子交换剂。强离子交换树脂在宽 pH 范围内保持离子化，而弱离子交换树脂只在窄 pH 值内离子化。



类型	名称	英文符号
阴离子交换剂	二乙基氨乙基	AE
	季氨基乙基	QAE
	季氨基	Q
	三乙基氨乙基	TEAE
阳离子交换剂	氨乙基	AE
	羧甲基	CM
	磺丙基	SP
	磺甲基	S
	磷酸基	P

绝大多数重组蛋白纯化都要用到离子交换。离子交换色谱的基础是高分辨率，可以直接放大规模应用在工业上，柱再生容易，还可以使蛋白浓缩。大多数蛋白质的静电荷是负值，因此阴离子交换色谱的应用最为广泛。

实验设计

介质的选择

离子交换介质首先要考虑目的分子的大小，因为目的分子会影响其接近介质上的带电功能集团，因此也会影响介质对目的分子的动力载量，从而影响其分离。

对于大多数纯化步骤来说，建议从开始的阶段使用强离子交换柱，可在摸索方法的过程中有一个宽的 pH 范围。对于已知等电点的蛋白质，可根据其等电点来选择。而未知等电点的蛋白质，在实际操作中常采用这样的方法，先选择一个阴离子交换剂，再选择一个中性的 pH 缓冲液，将蛋白质样品透析至 pH7.0，然后过阴离子交换柱。根据过柱后的结果确定下一个使用的缓冲液 pH。

流动相的选择

离子交换色谱的流动相必需是有一定离子强度的并对 pH 有一定缓冲能力的溶液。为了避免目的蛋白失活，使用缓冲液可稳定流动相的 pH，使之在色谱过程中不发生明显变化，同时可稳定目的分子上的电荷量，保证色谱结果的重要性。

选择缓冲液一般按照以下原则：阳离子交换剂应选用阴离子缓冲液，可用柠檬酸盐、磷酸盐、醋酸盐、甘氨酸盐等；阴离子交换剂应选用阳离子缓冲液，可用烷基胺、Tris、氨基乙醇胺、乙二胺、咪唑等；起始缓冲液的浓度应尽可能低（<100mmol/L）这样可以使色谱柱上更多的吸附分离物质；缓冲液应不含会影响被分离物质活性和溶解度成分，洗脱时尽量不采用 pH 梯度洗脱。

色谱柱的选择

离子交换色谱通常选用粗短柱，即高径比小的色谱柱。典型的离子交换柱高度在 5~20cm，高径比一般小于 5。如果需要增加离子交换剂的体积，只能从增加柱的直径而不能增加其高度。如果是连续梯度洗脱，可以适当增加柱的长度。

案例介绍

离子交换是蛋白纯化中的重要手段，即可以用于捕获阶段，也可以用于精纯阶段。

预处理和装柱

1. 将超纯水与沉降胶按 1:3 比例悬浮，轻轻搅匀；

2. 将色谱柱固定到设备支架上，链接出口管道，从柱底端进口反向泵入超纯水，排除管道及筛板中的气泡，停泵，然后从出口端放出部分超纯水，保留 1~2cm 高度超纯水，封死出口端，然后正向冲洗进口端管道和适配器，排除筛板和管道中气泡；
3. 通过玻璃棒引流将悬浮胶导入色谱柱，在柱上端补充部分超纯水，搅匀，装上适配器；
4. 将柱出口端与色谱设备连接，以 0.2MPa 恒压装柱，装填至恒定的柱床高度，标记柱床胶面位置，关闭泵，松开适配器，降低适配器至胶面下 2mm 处，继续装填，待柱床高度稳定后，标记柱床胶面位置，降低适配器至柱上标记柱床位置下 2mm。固定适配器，继续装填 2~3 柱体积；
5. 确定柱体积，测量柱高，计算柱体积及记录装柱时的最大流速；
6. 选择最佳线速，用 0.5mol/L NaOH 冲洗柱，冲洗 3~5 体积；
7. 接着用超纯水冲柱，冲洗 10 柱体积，至 pH 显示接近超纯水 pH。

柱的平衡

20mmol/L 磷酸盐缓冲液，pH6.5，用 10 柱体积平衡缓冲液平衡柱子，直至 pH 及电导率监控显示与平衡缓冲液的 pH 及电导一致。

加样

根据柱体积及装柱的最大流速确定上样流速，上样流速不超过装柱最大流速的 75%，同时，上样流速也要尽可能低，保证样品和介质充分发生作用。

洗脱

上样结束后，用平衡缓冲液冲洗 1~2 柱体积，使 UV280 响应信号重新回到基线。

之后用含有 0.5mol/L NaCl 的溶液洗脱，冲洗 2~3 柱体积，收集色谱峰。

常见问题分析

一、纯化后样品纯度不高怎么办？

1. 若目标蛋白和杂蛋白等电点差异较大，目标蛋白通过穿透步骤获得，通过调节起始缓冲液 pH，使目标蛋白与填料之间的静电作用更强；

若目标蛋白和杂蛋白等电点差异较小，目标蛋白通过洗脱步骤获得，过调节起始缓冲液 pH，使目标蛋白与填料之间的静电作用更强；再调节洗脱溶液的离子强度和 pH，使目标蛋白与杂蛋白逐渐分离；

选择合适的离子交换填料及粒径；

柱没有经过起始缓冲液的充分平衡；

降低洗脱流速；

调整样品溶液黏度。

二、纯化后的蛋白收率较低怎么办？

调整样品 pH，使样品 pH 与起始缓冲液 pH 保持一致；

改变洗脱模式，如将线性梯度模式改变为阶段性梯度洗脱；

改变洗脱方法，如将 pH 洗脱方法改为盐梯度洗脱方法；

改变洗脱强度。

三、样品过于粘稠怎么处理？

样品过于粘稠可能是由于含有的蛋白太多，或者含有大分子量的核酸分子，通常有以下解决方法：

增加裂解前稀释细胞所用体积；

增加裂解时间，直至黏度下降，或者增加 DNase 和 Mg^{2+} 的剂量；

增加机械裂解细胞的效率；

降低上样流速。

更多优质服务推荐

1

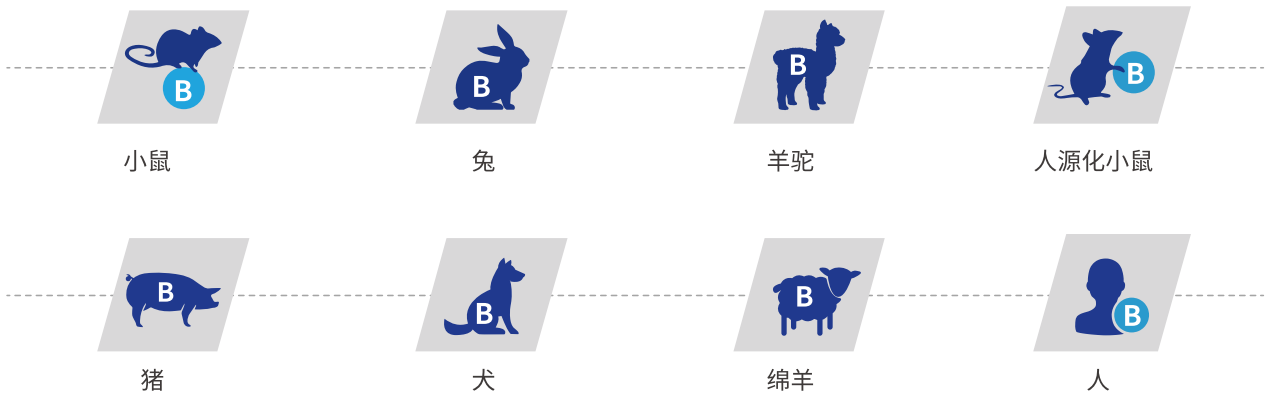
SingleB® mAb Discovery Service SingleB®单B细胞快速单抗发现

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。

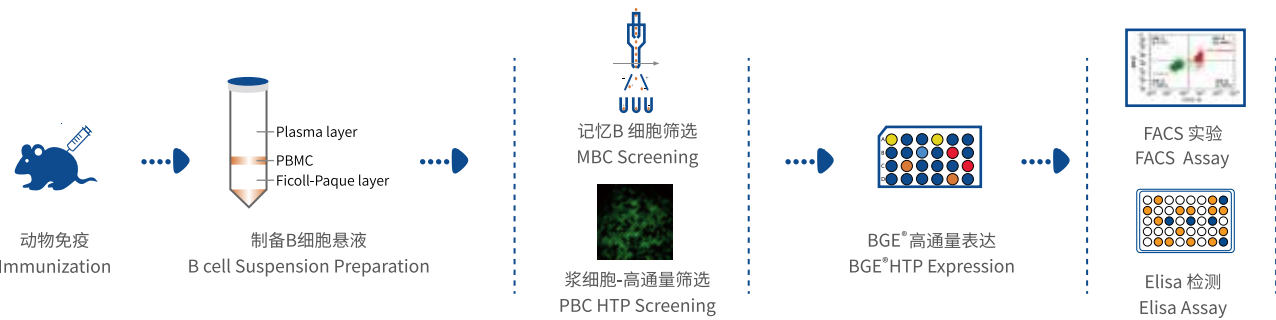
平台优势

 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

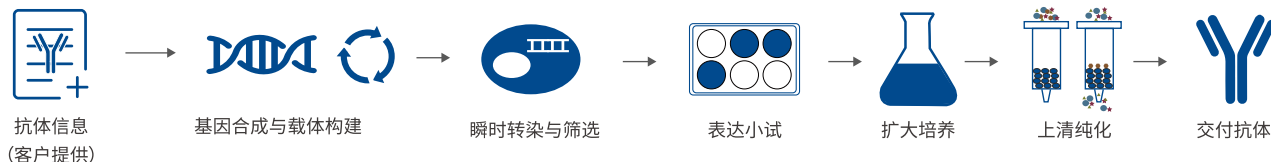
重组抗体表达

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

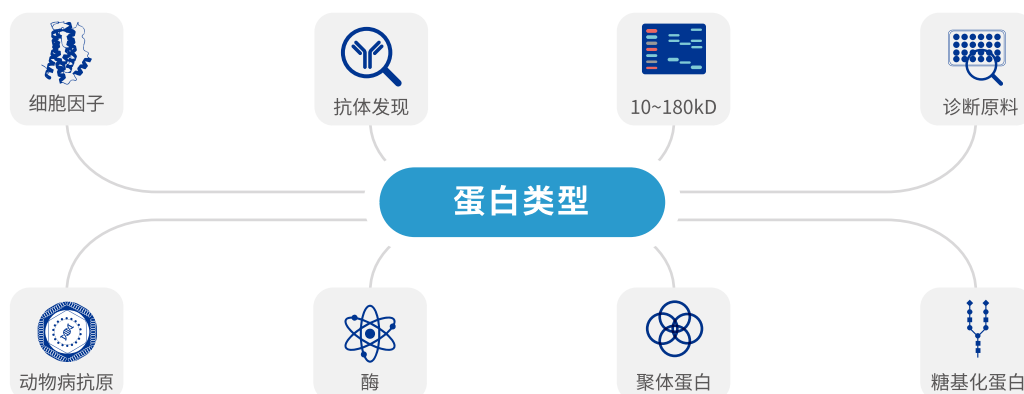


Recombinant Protein Expression Service

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。

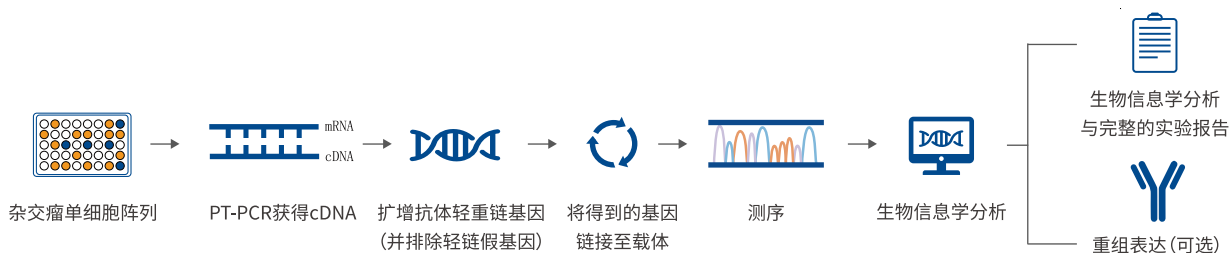
应用场景

- 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

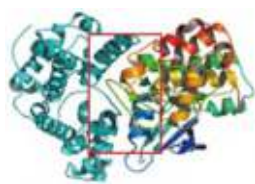


5 Biomolecular Interaction Analysis Service

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



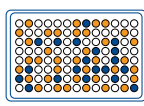
基因合成&质粒抽提



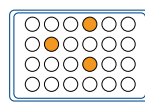
稳定转染



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