



## 目 录

一、层析柱的装填	1
1. 装填前的准备工作	1
a. 装填的一般考虑	1
b. 小颗粒的去除	1
c. 缓冲液平衡	2
d. 匀浆准备	2
2. 装填步骤	3
a. 恒流速/半恒压装填法	4
b. 可供选择的装填方法	5
3. 平衡与柱效评价	6
二、层析柱的操作	7
1. 柱层析	7
a. 分子尺寸排阻层析 (SEC)	7
b. 离子交换层析 (IEC)	8
c. 疏水反应层析 (HIC)	8
d. 亲和层析 (AFC)	8
2. 填料的清洗	9
3. 填料的保存	10
4. 灭菌/热原的去除/防腐剂的清除/柱筛板	10

## 关于 TOYOPEARL 和 TSK-GEL 5PW 的简介

TOYOPEARL 和 TSK-GEL 5PW 大孔树脂型填料应用于生物分子层析工艺，非常适合实验室和工业级大规模生产中球状蛋白、多肽、核酸以及其他生化衍生物的分​​离纯化。这种树脂型填料为改性的聚甲基丙烯酸酯，由于醚及羟基的存在使其具有亲水性的表面，并且具有了更好的耐压性能、流动特性及 pH 稳定性。

### 一、层析柱的装填



图 1. 装填所需要的装置

#### 1. 装填前的准备工作

##### a. TOYOPEARL 和 TSK-GEL 5PW 装填的一般考虑

TOYOPEARL 的装填压力最好为 0.5~3bar (7~45psi); TSK-GEL 5PW 的装填压力最好为 3~10bar (45~140psi)。尽管 TOYOPEARL 和 TSK-GEL 5PW 填料也可以通过重力沉降法进行装填，但这并不值得提倡。TOYOPEARL 的装填压力不应过高 (<5bar)，TSK-GEL 5PW 的装填压力不应超过 20 bar。

成功装填 TOYOPEARL 和 TSK-GEL 5PW 所需要的设备有 (参照图 1): 泵 (HPLC 或蠕动泵)、压力表、水平仪、玻璃/聚丙烯酸/PEEK 或不锈钢层析柱、储槽 (可选) 等。

##### b. 小颗粒的去除 (我们建议最好去除小颗粒)

在匀浆后的胶体中所存在的小颗粒会阻塞筛板或烧结板，最终会导致整个柱子的压降增大。通过下列过程可将匀浆后胶体中所存在的小颗粒去除。

(1) 通过一根搅拌棒或浆激烈搅拌包装容器内的树脂

填料，将其搅拌成悬浮液 (请不要使用磁力搅拌器，这会磨碎树脂填料并产生小颗粒)。一旦成为悬浮液后，立刻将需要量的悬浮液 (大概 4 体积的悬浮液=3 体积的树脂填料) 倒入某个容器内，容器的体积应不小于需要装柱填料体积的 4 倍。加入蒸馏水或者缓冲液至 4 倍填料体积，并一直保持搅拌。

举例:

5L 树脂填料 (装柱需要量) = 7~8L 悬浮液  
(65~70% 匀浆浓度)

因此，您至少需要准备 20L 的容器。

(2) 静置匀浆液 静置时间取决于容器的直径、匀浆溶剂和填料的粒径大小。TOYOPEARL 和 TSK-GEL 5PW 填料用水匀浆时，平均静置时间如下。

#### TOYOPEARL

Coarse	C 级: 100 $\mu$ m	15-30 分钟
Medium	M 级: 65 $\mu$ m	30-45 分钟
Fine	F 级: 45 $\mu$ m	45-60 分钟
Superfine	S 级: 35 $\mu$ m	60-90 分钟

#### TSK-GEL 5PW

30 $\mu$ m	90-120 分钟
20 $\mu$ m	>120 分钟

(3) 一旦填料静置完成后，小心倒出表面的悬浮液。



图 2. 倒出表面的悬浮液



图 3. 再次悬浮

(4) 加入 3 倍填料体积的蒸馏水或者缓冲液，轻轻在填料表面搅拌使其重新悬浮。请不要使用磁力搅拌器，这会磨碎树脂填料并产生小颗粒。

(5) 重复步骤 (3) 和步骤 (4) 至少 3 次以上，直到悬浮液不再浑浊。

在去除小颗粒时的最后一次步骤中可加入装填缓冲液 (参见 c. 缓冲液平衡) 进行填料的平衡，如此可节约时间。

### c. 缓冲液平衡

对于所有的 TOYOPEARL 和 TSK-GEL 树脂填料，我们建议装填时使用高离子强度的缓冲溶液。尽管这些填料可以用水装填，但相对于用同样装填方法而使用盐溶液作为缓冲液的层析柱而言，塔板数较低并且不对称性因子较高。

对于疏水层析柱用水装填时，相对于高离子强度的缓冲溶液，更容易在柱内壁形成沟槽。这些沟槽的存在非但不是必须的，更会对柱子的性能造成不良影响。当选择装填缓冲液时，最好根据经验来选择，因为根据您特定的应用而选择最优化的装填缓冲液是最为合适的。总的来说，分离纯化步骤（包括清洗和消毒步骤）中将使用到的最高离子强度的流动相，是装填缓冲液的首选。一些常见的装填缓冲液请参见表 1。

表 1. 典型的装填缓冲溶液

分子尺寸排阻 (SEC)		
Toyopearl HW-40, HW-50, HW-55, HW-65, HW-75		0.1M Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , NaNO <sub>3</sub> 或 NaCl 溶于 50mM 磷酸盐或 Tris 缓冲液
离子交换 (IEC)		
Toyopearl DEAE, QAE, SuperQ, CM, SP, MegCap SP-550		1M NaCl 溶于 50mM 磷酸盐, Tris 或 醋酸盐缓冲液
TSK-GEL SuperQ-5PW, SP-5PW, DEAE-5PW		
疏水反应 (HIC)		
Toyopearl Ether, Phenyl, Butyl, Hexyl-650, PPG-600, Super Butyl-550		2M Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 或 NaCl 溶于 50mM 磷酸盐缓冲液
TSK-GEL Ether-5PW, Phenyl-5PW		
亲和 (AFC)		
Toyopearl AF-Epoxy-650, AF-Tresyl		0.5M NaCl 溶于 0.1M NaHCO <sub>3</sub> 或磷酸盐缓冲液
Toyopearl AF-Formyl-650, AF-Amino-650, AF-Carboxy-650		1M NaCl 溶于 100mM 磷酸盐或 NaHCO <sub>3</sub> 缓冲液
Toyopearl AF-Chelate-650, AF-Blue HC-650, AF-Red-650		0.5M NaCl 或 0.2M 甘氨酸溶于 20mM 磷酸盐或 Tris 缓冲液

### d. 匀浆准备

填料中的小颗粒被去除后，需要进行匀浆液浓度的调节。匀浆液的浓度等于静置胶体积除以匀浆后的总体积。其调节按如下步骤进行：

(1) 均匀搅拌上述步骤所得、已去除小颗粒的填料浆

液，并将其倒入一个预先准备的量筒。（参照图 4）

(2) 将浆液静置过夜 (>12 小时)，以便获得最佳装填效果。

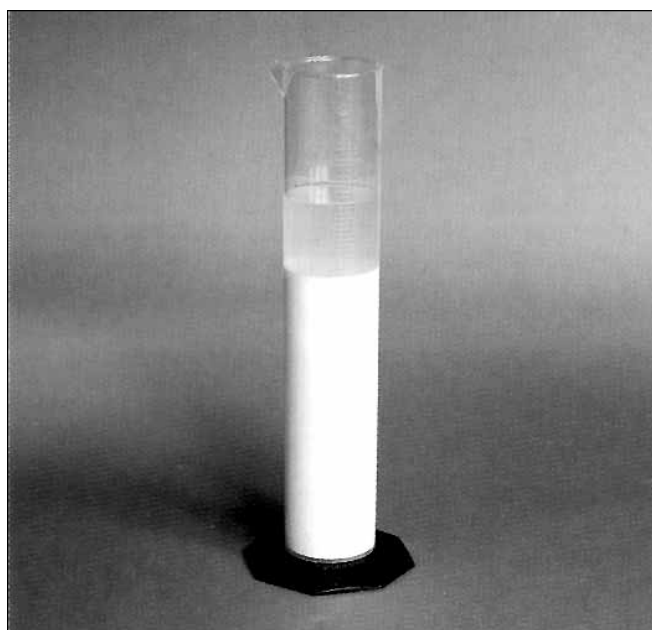


图 4. 静置中的填料浆液

(3) 对于 TOYOPEARL 树脂填料，确定静置胶体积后，加入或去除装柱缓冲液，以便将匀浆液浓度调节至 30~50%；对于 TSK-GEL 5PW 树脂填料，最常用的匀浆液浓度范围为 25~70%，并且当匀浆液浓度在 40~50% 的范围内时效果最佳。

(4) 对于装填一根给定的空柱，可按表 2 中所推荐的内容确定装柱所需的静置胶体积。

表 2. 装柱所需的静置胶体积

Toyoperal HW-40, HW-50, HW-55, HW-65, HW-75F		使用约 1.1 倍柱体积的静置胶
Toyopearl Ether-650, Phenyl-650, Butyl-650, Hexyl-650, PPG-600, Super Butyl-550, DEAE-650, SuperQ-650, CM-650, SP-650 及所有亲和填料		使用约 1.2 倍柱体积的静置胶
TSKgel DEAE-5PW, SuperQ-5PW, SP-5PW, Ether-5PW, Phenyl-5PW		
Toyopearl QAE-550C, SP-550C, Toyopearl MegCap		使用约 1.25 倍柱体积的静置胶

## 可供选择的匀浆准备方法

(1) 均匀搅拌上述 c 中步骤所得、已去除小颗粒的填料浆液，并将其倒入一个预先准备的布氏漏斗或类似容器中。

(2) 使用水泵进行抽滤，直至匀浆液成为一块湿滤饼

(所有剩余的溶剂被去除)。

(3) 称取填料滤饼的大概重量 (1g 湿滤饼 $\cong$ 1mL 静置胶体)，并使用表 2 确定装柱用胶量。

(4) 将滤饼转移至一个大口杯中，加入足够量的装柱缓冲液，调节匀浆液浓度至 30~50%。

## 2. 装填步骤

表 3. TOYOPEARL 填料的装填及操作流速

填料类型		柱尺寸 (cmI.D. $\times$ L)	填料等级	装填流速 (cm/hr)	操作流速 (cm/hr) (mL/min)		
SEC	HW-40	2.2 $\times$ 60	S(30 $\mu$ m)	30-40	10-25	0.6-1.6	
			F(45 $\mu$ m)	60-80	25-50	1.6-3.2	
			C(75 $\mu$ m)	120-160	50-100	3.2-6.4	
	HW-50	2.2 $\times$ 60	S(30 $\mu$ m)	25-35	10-20	0.6-1.3	
			F(45 $\mu$ m)	50-70	25-35	1.6-2.2	
	HW-55	2.2 $\times$ 60	S(30 $\mu$ m)	25-35	10-20	0.6-1.3	
			F(45 $\mu$ m)	50-70	25-35	1.6-2.2	
	HW-65	2.2 $\times$ 60	S(30 $\mu$ m)	20-75	10-15	0.6-1.0	
			F(45 $\mu$ m)	40-150	15-30	1.0-1.9	
	HW-75	2.2 $\times$ 60	F(45 $\mu$ m)	40-150	15-30	1.0-1.9	
IEC*	DEAE-650	2.2 $\times$ 20	S(35 $\mu$ m)	400-600	45-65	3.0-4.0	
	SuperQ-650		M(65 $\mu$ m)	800-1000	80-130	5.0-8.0	
	CM-650		C(100 $\mu$ m)	800-1200	80-600	5.0-40	
	SP-650	2.2 $\times$ 20	C(100 $\mu$ m)	700-1000	80-240	5.0-15	
	SP-550						
	QAE-550						
MegCapSP-550EC	EC(100-300 $\mu$ m)	800-1200	80-500	5.0-30.0			
HIC*	Ether-650	Hexyl-650	2.2 $\times$ 20	S(35 $\mu$ m)	400-600	45-65	3.0-4.0
	Phenyl-650	PPG-600		M(65 $\mu$ m)	800-1000	80-130	5.0-8.0
	Butyl-650	Super Butyl-550		C(100 $\mu$ m)	800-1200	80-500	5.0-30.0
AFC*	AF-Amino-650	AF-Tresyl-650	2.2 $\times$ 20	M(65 $\mu$ m)	800-1000	30-130	2.0-8.0
	AF-Carboxy-650	AF-Blue-650					
	AF-Formyl-650	AF-Chelate-650					
	AF-Epoxy-650	AF-Blue HC-650					

TOYOPEARL 填料的装填，应区别于传统的软凝胶。为了获取最佳效果，请尽量在较高流速和压力下进行 TOYOPEARL 的装填。

\*并不是所有类型的填料均具有各种规格等级。

表 4. TSK-GEL 5PW 树脂填料的装填及操作流速

填料类型		柱尺寸 (cmI.D. $\times$ L)	填料等级	装填流速 (cm/hr)	操作流速 (cm/hr) (mL/min)	
SEC/ HIC	TSK-GEL 5PW	5.5 $\times$ 20	20 $\mu$ m	100-400	50-300	19.8-119
		10.8 $\times$ 20	20 $\mu$ m	100-400	50-300	76.3-458
		15.8 $\times$ 30	30 $\mu$ m	100-500	50-400	163-1307
		21 $\times$ 30	30 $\mu$ m	100-500	50-400	289-2309
		30 $\times$ 20-30(DAC*)	20-30 $\mu$ m	(N/A)	50-400	589-4712

\*DAC=Dynamic Axial Compression at applied piston pressure $\geq$ 3bar. 动态轴向压缩柱、柱塞压力 $\geq$ 3bar

以下描述适用于一般的装填过程。如果您使用其他设备或一次装填量超过 5L 时，请与我们的技术支持部门联系。（TOSOH 上海公司：021-6270-2810）

**a. 恒流速/半恒压装填法**

（1）如果使用储槽/罐，请将其装于层析柱上。柱子及储槽的总容积必须确保足够将匀浆液一次性注入。

（2）将柱底筛板用装填缓冲液润湿，并将缓冲液放空一部分以便赶走所有的气泡。关闭柱出口，并在柱底部留出 1~2cm 高的缓冲液。（参照图 5）

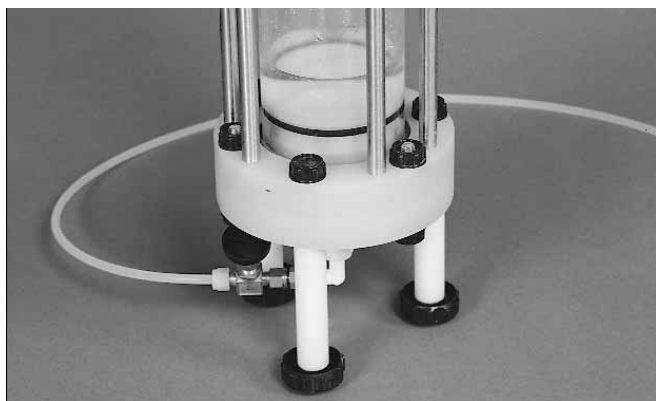


图 5. 柱底筛板的浸润等

（3）再次将浆液搅拌均匀，以确保填料的均一。（参照图 6）



图 6. 填料浆液的再悬浮

（4）小心将匀浆液倒入层析柱中，并注意避免倒入时产生气泡。（参照图 7）

（5）将匀浆液倒入后，用喷壶清洗层析柱的内壁。

（6）立即将进样分配器放置于匀浆液表面。注意在分配器与溶液间不应有气泡存在。（参照图 8）

（7）打开层析柱出口，开启泵。最初，应让缓冲液缓慢流过层析柱。

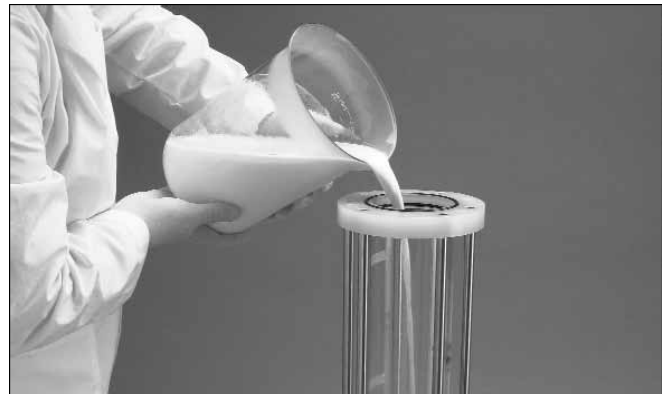


图 7. 小心将匀浆液倒入层析柱中



图 8. 将进样分配器放置于匀浆液表面并准备开启泵

（8a. 恒流速装填法）缓慢增加至最终流速，这可以避免液压对于所形成的柱床的冲击，也可以避免柱床形成的不均匀。流速可以阶段性地增大，增加量取决于层析柱的柱尺寸和目标流速。表 5 中列举了部分例子。

表 5. 恒流速装填法中流速的增加量举例

柱尺寸 (I.D.×L)	填料类型	目标流速 (mL/min)	增加量 (mL/min)	保持时间 (min)
2.2cm×60cm	HW-55S	2	0.5	0.5
9cm×30cm	QAE-550C	300	50	2
25cm×30cm	DEAE-650M	2000	400	3

（8b. 半恒压装填法）缓慢增加至目标压力，这可以避免液压对于所形成的柱床的冲击，也可以避免柱床形成的不均匀。可以通过手动操作减少流速来获得形成柱床所需要的稳定压力。对于 TOYOPEARL 树脂填



料而言，最合适的装填压力约为 3bar (44psi)。

(9) 当柱床最终形成后，关闭泵，并关闭层析柱出口。

(10) 装填中，如需要使用储槽/罐时，应保证柱床形成于层析柱的低端部分。使用吸液管或泵，利用虹吸原理将储槽/罐中的悬浮液吸除。最后，移走上层的储槽/罐以及配套的密封圈。

(11) 小心将进样分配器置于柱中，离柱床约 2~3cm，同时避免将空气带入层析柱中。(参照图 9)

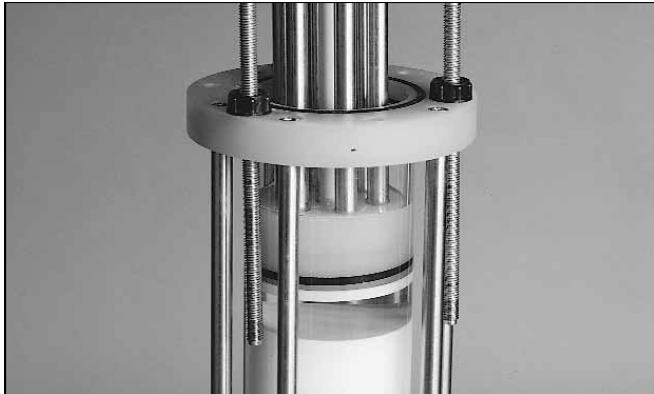


图 9. 小心将进样分配器置于柱中

(12) 确保分配器就位后，参照步骤 8 开启泵，并同时打开层析柱的出口。(参照图 10)



图 10. 打开层析柱的出口并开启泵

(13) 柱床将进一步被压缩。当压缩完成并且压力稳定后，停泵并关闭层析柱出口。

(14) 小心松开分配器密封圈，小心将分配器降至柱床表面。在移动分配器时，一定注意不要扰动柱床。最终，分配器应直接接触柱床。(参照图 11)

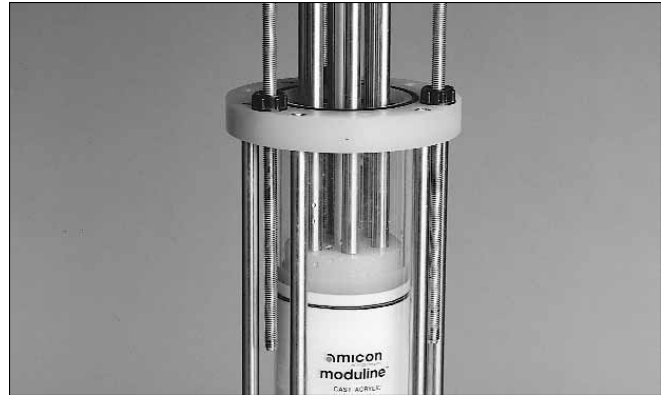


图 11. 小心将分配器降至柱床表面

(15) 重复步骤 12~14，直到柱床无法被进一步压缩。最终，柱床与分配器间的距离应小于 0.5cm。这可能需要重复上述步骤 2~3 次，直到柱床稳定。

(16) 层析柱装填完毕后，准备进行柱效的评价。(参见下文)

#### b. 可供选择的装填方法

由于受硬件所限，有时可能没有储槽/罐来进行 TOYOPEARL 填料的装填。以下方法适用于没有储槽/罐时的装填。

(1) 调节浆液浓度至 50%，从顶部轻轻搅动浆液使其重新悬浮。注意不要使用磁力搅拌器！

(2) 如图 12 所示，将一蠕动泵连接至层析柱底部出口。(参照图 12)

(3) 确保层析柱水平并已适于装填。

(4) 当泵向上工作时，将缓冲液向下加入至层析柱中，直到大约 50% 柱高为止，停泵。

(5) 当泵以期望的流速向下工作时，慢慢向层析柱中加入均匀的浆液。注意将浆液沿着层析柱壁倒入，以避免产生气泡。

(6) 当柱床基本形成、缓冲液高出柱床大约 2~3cm 时，停泵并关闭层析柱的出口。

(7) 轻轻地用装有缓冲液的喷壶冲洗层析柱的内壁。

(8) 小心将进样分配器放入层析柱，并使得分配器刚好接触到缓冲液表面。

(9) 当分配器就位后，将泵放置于柱前。注意排除管路中的空气。

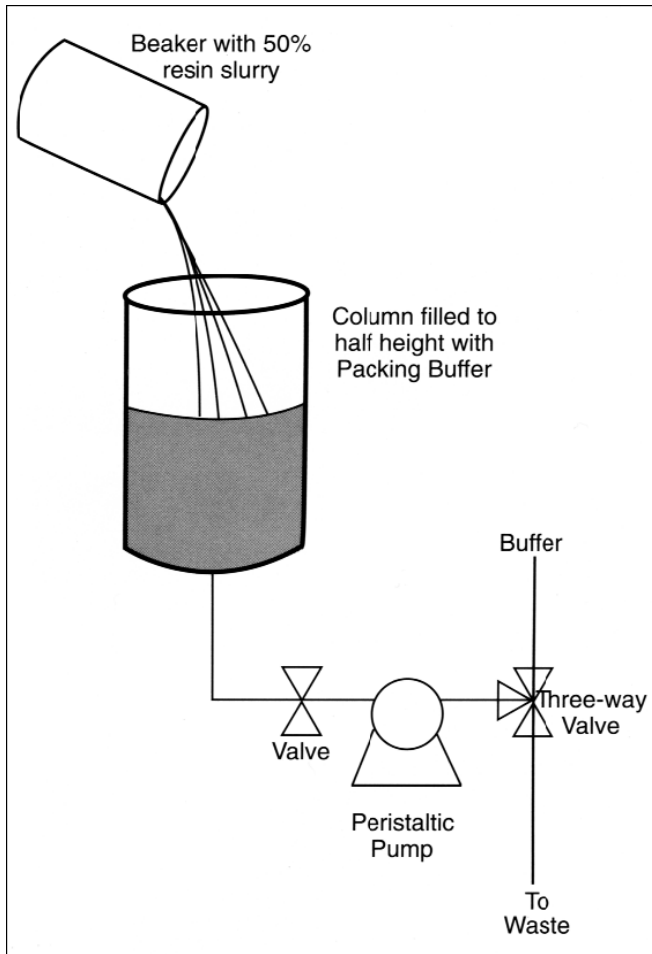


图 12. 将一蠕动泵连接至层析柱底部出口

(10) 开启泵并以低流速运行，同时打开层析柱底部的出口。

(11) 缓慢将流速增加至目标流速，这可以避免液压对于所形成的柱床的冲击，也可以避免柱床形成的不均匀。流速可以较先前装填时增加数毫升/分钟。流速具体的增加量，取决于层析柱的柱尺寸和目标流速。表 6 中列举了部分例子。

表 6. 可供选择的装填法中流速的增加量举例

柱尺寸 (I.D.×L)	填料类型	目标流速 (mL/min)	增加量 (mL/min)	保持时间 (min)
2.2×60	HW-55S	2	0.5	0.5
9×30	QAE-550C	300	50	2
25×30	DEAE-650M	2000	400	3

I.D.: cm; L: cm

(12) 当柱床稳定后，关闭泵，并关闭层析柱出口。

(13) 小心松开分配器密封圈，小心将分配器降至柱床表面。在移动分配器时，一定要注意不要扰动柱床。

(14) 重复步骤 10~13，直到柱床无法被进一步压缩，

柱床与分配器间的距离应小于 0.5cm。

(15) 层析柱装填完毕后，准备进行柱效的评价。(参见下文)

### 3. 平衡与柱效评价

对于 TOYOPEARL 填料：柱子的装填一旦完成后，首先用 5~10 倍柱体积的低离子强度缓冲液平衡柱床。测试装柱的效果，可以选用低分子量、无保留的样品（如：丙酮、维生素 B12 或氯化钠）（进样量：0.25~1%柱体积）。如图 13 所示，确定柱子的塔板数及不对称性因子。按上述填装步骤装填的层析柱，在线性流速为 50~250cm/hr（取决于填料粒径大小）时，最小的柱塔板数如表 7 所示、不对称性因子必须在 0.8~1.4 之间。

表 7. TOYOPEARL 填料装填柱最小塔板数（丙酮样品）

模式	柱内 (cm)	S 级 (p/米)	F 级 (p/米)	M 级 (p/米)	C 级 (p/米)
SEC	2.2	5000	3500	-	3000
	5.5	5000	3300	-	-
	10.8	5000	2500	-	-
	21	4000	2200	-	1500
	31	-	2000	-	1200
	40	-	1800	-	1000
IEC	2.2	6000	-	4000	2000
	5.5	6000	-	4000	-
	10.8	6000	-	4000	-
	21	4000	-	2600	2000
	31	-	-	2000	1000
	40	-	-	1500	750
HIC	2.2	6000	-	4000	2000
	5.5	6000	-	4000	-
	10.8	6000	-	4000	-
	21	4000	-	2600	2000
	31	-	-	2000	1000
	40	-	-	1500	750
AFC	2.2	-	-	4000	-
	5.5	-	-	4000	-
	10.8	-	-	4000	-
	21	-	-	2600	-
	31	-	-	2000	-
	40	-	-	1500	-

如果所计算出的柱塔板数及不对称性因子与期望值有较大偏离时，请按照前文中介绍的操作步骤重新进行柱子的装填。

如果层析柱直径>40cm 时，最小塔板数将成比例降低。

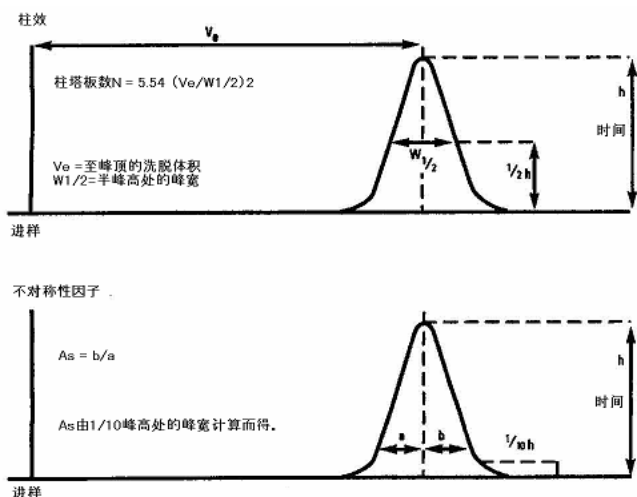


图 13. 柱塔板数及不对称性因子的计算

对于 TSK-GEL 5PW 树脂填料：粒径为 20 $\mu\text{m}$ 、30 $\mu\text{m}$  的散装 TSK-GEL 5PW 填料与 TOYOPEARL 有类似的化学性质。同时，TSK-GEL 5PW 填料具有与 TOYOPEARL 650 相似的孔径大小（1000 埃）。然而，由于 TSK-GEL 5PW 树脂填料的交联度更高，这使得 TSK-GEL 5PW 填料与 TOYOPEARL 填料相比，可在更高压力下使用。事实上，从表 8 中的数据可以看出，当使用动态轴向压缩柱（DAC）、并在等于或大于 3bar 的压力下进行 TSK-GEL 5PW 填料的装填时，可以填装得更好，并且柱效更高。实际操作中，TSK-GEL 5PW 填料一般在 3~10bar 的压力下使用，但如果硬件条件允许可保证操作安全的话，TSK-GEL 5PW 填料甚至可以在 15~20bar 的压力条件下使用。

表 8. TSK-GEL 5PW 填料装填柱最小塔板数（丙酮样品）

模式	装填法	装填缓冲液	柱内径 (cm)	20 $\mu\text{m}$ 级 (p/米)	30 $\mu\text{m}$ 级 (p/米)
IEC	传统法	水	5.5	1500	-
	传统法	水	10.8	1500	-
	传统法	水	15.8	-	1200
	传统法	水	21	-	1000
	DAC*	高盐**	20-30	10000	7000
HIC	传统法	水	5.5	1500	-
	传统法	水	10.8	1500	-
	传统法	水	15.8	-	1200
	传统法	水	21	-	1000
	DAC*	高盐**	20-30	10000	7000

\*DAC=Dynamic Axial Compression at applied piston pressure $\geq$ 3bar. 动态轴向压缩柱、柱塞压力 $\geq$ 3bar

\*\*高盐:  $\geq$ 0.5M NaCl

柱效评价中常见问题及原因请参见表 9。

表 9. 装柱的常见问题及原因

$A_s < 0.8$	$A_s > 1.4$
装柱过度 装柱压力过高 柱床坍塌	装柱时柱床未被压实、压紧 柱头或柱底的筛板发生阻塞 柱头处有空隙 层析柱死体积内有空气 进样技术不高
理论塔板高度过高	理论塔板高度过低
进样或检测器距离层析柱过远 进样量过大 柱子没有被有效地装填	样品与填料上所键合的官能团或胶体间发生作用而被保留

## 二、层析柱的操作

### 1. 柱层析

#### a. 分子尺寸排阻层析（SEC）

使用合适的、5~10 倍柱体积的缓冲溶液进行柱床的充分平衡（参照表 1）。使用 TOYOPEARL HW 填料装填柱时，一般是在等浓度、中等离子强度的盐溶液条件下进行操作的。进样量一般为 1~3% 的柱床体积。如果样品的保留时间短于或长于预期值，则有必要进行流动相的调整。（参照表 10）

表 10. 实际操作中的可能现象及原因/解决方法

现象	原因/解决方法
保留时间 < 预期值	样品部分或全部从柱中排出，确定样品的分子量，如有必要的话需要更换更高排阻界限的填料。  阴离子分子样品会因为与胶体发生分子排斥作用而被排出柱子，可考虑增加流动相的离子强度。
保留时间 > 预期值	阳离子分子样品会因离子吸引而被吸附，可考虑增加流动相的离子强度。  疏水性分子样品会因为与胶体间发生疏水相互作用而被吸附，可考虑减少流动相的离子强度或在流动相中添加少量（10~20%）的有机溶剂（如：甲醇、乙醇或乙腈）。



## b. 离子交换层析 (IEC)

使用适当的、5~10 倍柱体积的缓冲液进行柱子的平衡 (参照表 11)。洗脱时, 通过增强盐的浓度或改变洗脱液的 pH 值来实现。

表 11. 常见缓冲液及其缓冲范围

树脂类型	缓冲液	缓冲范围
阳离子交换体	醋酸	4.8-5.2
	柠檬酸	4.2-5.2
	MES	5.5-6.7
	磷酸	6.7-7.6
	HEPES	7.6-8.2
阴离子交换体	L-组氨酸	5.5-6.0
	咪唑	6.6-7.1
	三乙醇胺	7.3-7.7
	Tris-Cl	7.5-8.0
	二乙醇胺	8.4-8.8

如果目标蛋白在柱中无吸附, 可以用酸或碱溶液活化离子交换树脂。如果活化后还不能吸附目标蛋白, 可以改变平衡缓冲液的 pH 值以增强蛋白与离子交换体之间的电荷作用, 或者降低缓冲液中盐的浓度。

## c. 疏水反应层析 (HIC)

使用适当的、含高浓度 (一般来说: 1M~3M) 中性盐溶液的缓冲液平衡层析柱 (参照表 12)。高离子强度的缓冲液可以增强蛋白与树脂填料间的疏水相互作用, 有利于目标蛋白的吸附。在进样前, 可使用最初的流动相过一次层析柱, 并起到平衡的作用。

表 12. 疏水反应层析中常用中性盐

盐 (按强度递减序排列)	评述
柠檬酸钠盐	会导致很强的紫外吸收, 易于滋生微生物
硫酸铵	pH 值高于 8 时不稳定, 低紫外吸收, 抗微生物生长, HIC 中最常用盐
硫酸钠	溶解度低 (25°C: 1.5M)
氯化钠	便宜, 卤盐会腐蚀不锈钢
氯化钾	卤盐会腐蚀不锈钢

通过降低流动相中盐的浓度可以将被吸附的蛋白洗脱下来。疏水作用弱的蛋白会较疏水作用强的蛋白先被

洗脱下来, 即使在高盐浓度下也可实现这一点。如果目标蛋白无法通过降低盐浓度实现洗脱, 可以在洗脱液中加入小比例的有机溶剂或非离子性表面活性剂, 也可以改变洗脱液的 pH 值或者降低洗脱温度。如何选择有机溶剂、表面活性剂或离液剂, 请参照表 13。

表 13. 疏水反应层析中使用的流动相添加剂

有机添加剂	表面活性剂	离液剂
乙醇	Triton X-100	盐酸胍
甲醇	辛基葡萄糖苷	氯化四乙胺
异丙醇	Tween 20	尿素
正丁醇	SDS	硫氰酸钾
乙腈	CHAPS	
乙二醇	Emulgen 911	
	CTAB	
	Lubrol PX	

如果样品不稳定, 首先应考虑增加柱平衡时间, 可使用初始洗脱液、额外增加 3~10 倍柱体积的柱平衡操作。如果目标蛋白未被柱吸附, 可考虑提高初始洗脱液的盐浓度, 或者调节缓冲液的 pH 值以接近蛋白的等电点。

## d. 亲和层析 (AFC)

TOYOPEARL 亲和层析树脂均为特殊的配体填料 (如: 螯合、红或蓝密胆碱等), 树脂表面经过化学处理可以吸附特定的配体。

客户还可以与 TOSOH 公司联系, 定制所需要的、吸附特定样品的亲和层析树脂填料。

### 平衡

对于 AF Red、AF Blue-HC 及螯合型亲和树脂填料, 应使用合适的、3~5 倍柱体积的初始缓冲液进行柱子的平衡 (如: 磷酸盐、含少量或不含盐的 Tris 溶液)。对于染色型亲和树脂填料, 由于其在储存过程中会释放少量的键合染料, 因此使用前必须进行染色型亲和层析柱的清洗。对于一根新装填的柱子, 可使用 1M 的氯化钠或氯化钾溶液进行清洗; 对于一根已使用过的柱子, 可使用 2M 的氯化钾或 4M 的尿素进行清洗。平衡一个已使用过的或新装填的染色型亲和层析柱, 可使用合适的初始缓冲液 (如: 20mM、pH7.5 的磷酸盐) 来完成。

### 进样和洗脱

进样后，首先用 3~5 倍柱体积的初始缓冲液冲洗层析柱，以去除未发生吸附的不纯物质/杂质；然后进行目标样品的洗脱。通常，亲和层析的洗脱方式有两种：非特异性洗脱和特异性洗脱。

非特异性洗脱一般是指通过提高洗脱液的盐浓度，将蛋白洗脱下来。使用 2M 的氯化钠或 3M 的氯化钾，可以将绝大多数蛋白洗脱下来。未能被洗脱下来的蛋白可以选用下列推荐的洗脱液：

选择 1: 2M 的 KCl 或 3M 的 NaCl

选择 2: 1%Triton X-100/1M NaSCN/75%乙二醇/4M 尿素或 0.1MNaOH/4.2M 硫酸铵（饱和的）

对于特异性洗脱，是指酶可以被包含其培养基或辅酶溶液洗脱下来。培养基或辅酶的浓度低于 10mM，就足以进行洗脱操作。

## 2. 填料的清洗

TOYOPEARL 和 TSK-GEL 5PW 树脂填料可以在层析柱内或卸柱后完成清洗。清洗方法和持续时间取决于污染的程度。一般来讲，清洗时至少需要使用 3 倍柱体积的清洗溶液。

### 分子尺寸排阻层析（SEC）树脂填料

大多数情况下，可以使用蒸馏水清洗填料，以除去吸附蛋白。对于一些结合得比较紧密的污染物质，可使用下列方法进行填料的清洗。

#### 离子键合型污染物

对于键合力适中的物质，0.5~1M 的盐水溶液就可以用于清洗填料了。对于键合很强的物质，使用 0.1~0.5M 的氢氧化钠或 0.1~0.5M 的盐酸或硫酸溶液比较合适。无论如何，一定不要使用硝酸溶液清洗 TOYOPEARL 树脂填料！硝酸会和 TOYOPEARL 填料发生强烈的化学反应！

由于有时候酸会引起蛋白的聚集现象，因此首先应考虑使用碱溶液进行蛋白的去除。

#### 疏水性键合污染物

使用 10~20%的醇（如：乙醇、甲醇或异丙醇）可去除疏水性吸附物。一些溶剂，如乙腈和丙酮也可以使用。但需要牢记的是，有机溶剂有时候会引起蛋白聚集现象的发生。

在使用完任何酸、碱或有机溶剂清洗后，务必用蒸馏水做最后的清洗。

### 离子交换层析（IEC）树脂填料

对于中等的污染，使用 0.5~1M 的氯化钠进行清洗，然后用初始缓冲液进行平衡。

对于严重的污染，可使用 0.1~0.5M 的氢氧化钠清洗，然后用 0.1~0.5M 的氯化钠清洗，最后用初始缓冲液进行平衡。

对于 DEAE 型和 QAE 型树脂填料来讲，极度污染情况下，可使用 0.1~0.5M 的氢氧化钠、蒸馏水、0.1~0.5M 的盐酸、0.1~0.5M 的氯化钠依次进行冲洗，最后用初始缓冲液进行平衡。

最后的冲洗可选用高浓度盐溶液，以保证填料上正确的对抗离子的存在。

### 疏水反应层析（HIC）树脂填料

大多数情况下，可以使用蒸馏水清洗填料，以除去柱中残留的蛋白。对于一些结合得比较紧密的污染物质，可使用下列方法进行填料的清洗。

#### 离子键合型污染物

对于键合力适中的物质，0.5~1M 的盐水溶液就可以用于清洗填料了。对于键合很强的物质，使用 0.1~0.5M 的氢氧化钠或合适的酸（如：盐酸或硫酸溶液）可进行清洗。无论如何，一定不要使用硝酸溶液清洗 TOYOPEARL 及 TSK-GEL 5PW 树脂填料！硝酸会和 TOYOPEARL 及 TSK-GEL 5PW 填料发生强烈的化学反应！

由于有时候酸会引起蛋白的聚集现象，因此首先应考虑使用碱溶液进行蛋白的去除。

#### 疏水性键合污染物

使用 10~20%的醇（如：乙醇、甲醇或异丙醇）可去除疏水性吸附物。一些溶剂，如乙腈和丙酮也可以使用。但需要牢记的是，有机溶剂有时候会引起蛋白聚集现象的发生。另外，非离子性表面活性剂也可以用于清洗操作。

在使用完任何酸、碱或有机溶剂清洗后，务必用蒸馏水做最后的清洗。

### 亲和层析（AFC）树脂填料

高浓度的中性盐、离液剂或表面活性剂（参照表 12、

13) 可用作初步的清洗。然后用 2 倍柱体积、0.5M 的氢氧化钠可将柱中残留的蛋白洗掉，最后用蒸馏水进行清洗。注意：对于 AF-Heparin 型亲和填料来讲，只有在重度污染情况下才可使用氢氧化钠溶液进行清洗。

### 3. 填料的保存

#### 分子尺寸排阻层析 (SEC) / 离子交换层析 (IEC) / 疏水反应层析 (HIC) 树脂填料

装填好的柱子或已使用过的散装填料应保存在含有抑菌剂 (如：20% 的乙醇) 的蒸馏水溶液中，并最好在 4~25°C 下储存。

#### 亲和层析 (AFC) 树脂填料

装填好的柱子或已使用过的散装填料应保存在含有抑菌剂 (如：20% 的乙醇) 的 1M、中性氯化钠或氯化钾溶液中，并最好在 4~10°C 下储存。

对于 AF Formyl-650M 填料来讲，装填好的柱子或已使用过的散装填料应保存在含有 1% Gluteraldehyde 的 1M、中性氯化钠或氯化钾溶液中，并最好在 4~10°C 下储存。

请注意染色型亲和层析树脂填料会在储存过程中释放少量的染料，因此每次使用前务必进行填料的清洗以除去释放出来的染料。

### 4. 灭菌/热原的去除/防腐剂的清除/柱筛板

#### a. 灭菌

TOYOPEARL 和 TSK-GEL 5PW 树脂填料，可在高压、121°C 下灭菌 20 分钟，而不必担心影响填料的性能。另外，装填好的柱子可暴露在 200ppm 的次氯酸钠溶液中长达 12 小时，而不必担心影响填料的性能。

#### b. 热原的去除

TOYOPEARL 和 TSK-GEL 5PW 树脂填料，可在 pH2~12 的范围内使用。然而，短时间 (<12 小时) 暴露在更高 pH 值溶液中 (如：0.5N NaOH) 以去除热原物质也是可以接受的。使用 0.5N 的 NaOH 处理 4 个小时，然后再用 3 倍柱体积的缓冲液平衡，可以将典型的内毒素水平降低 4 个数量级。

#### c. 防腐剂的清除

TOYOPEARL 和 TSK-GEL 5PW 树脂填料，在运输过程中使用了 20% 的乙醇 (部分亲和填料除外)。在对填

料进行预处理时，便可降低乙醇的浓度。

#### d. 柱筛板

与压力相关联的问题，往往都是由于柱筛板发生阻塞现象而引起的。取下柱筛板，按照层析柱制造商所提供的方法进行筛板的彻底清洗 (可参照 TOSOH 公司所提供的其他资料)。如果问题仍然存在，可考虑更换柱筛板。

我们推荐您使用网状筛板，以取代多孔的特氟纶、聚乙烯或不锈钢筛板。