

HIGH QUALITY & EXPERT

慧德易电子期刊

H&E Electronic Journal

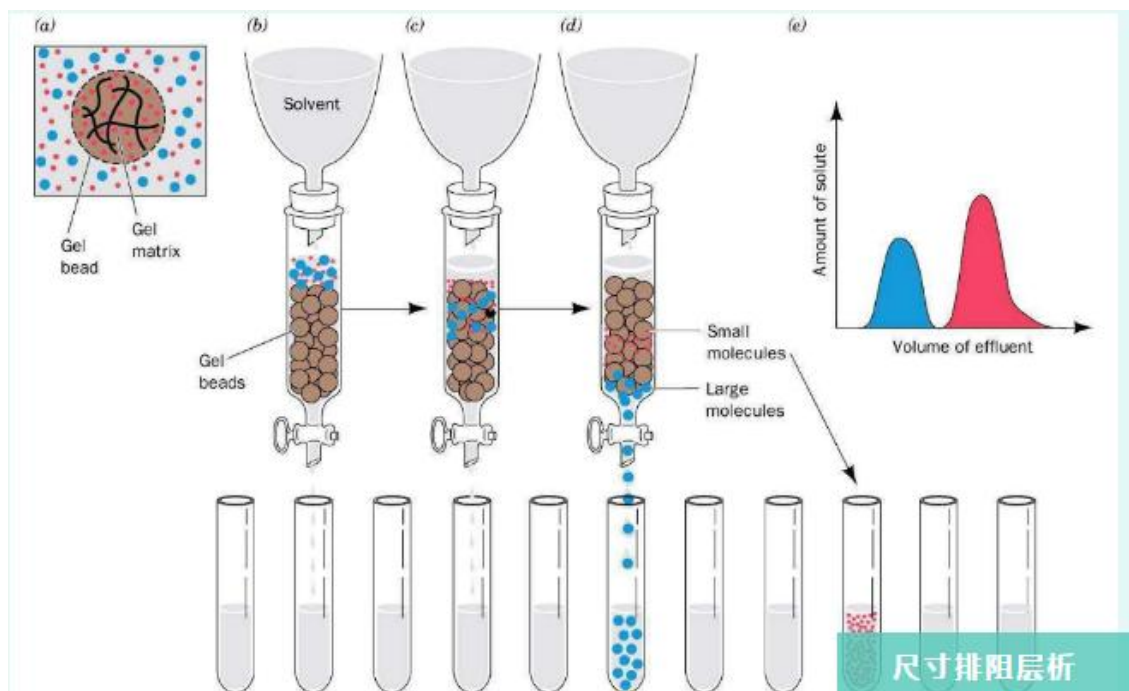
第 129 期

蛋白纯化问题解决方案，助力您顺利实验



2020年5月

第 129 期 蛋白纯化问题解决方案，助力您顺利实验



前处理

凝胶分离模式主要是靠分子量大小差异来达到分离的目的，前处理就显得尤为重要。主要方式为对样品进行离心和过滤，离心可以除去大部分块状物，再用针式滤器进行过滤即可。

溶液交换量

控制上样体积，以不超过柱床体积 30% 为宜；
关注样品溶液体积浓度，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。

提高分辨率

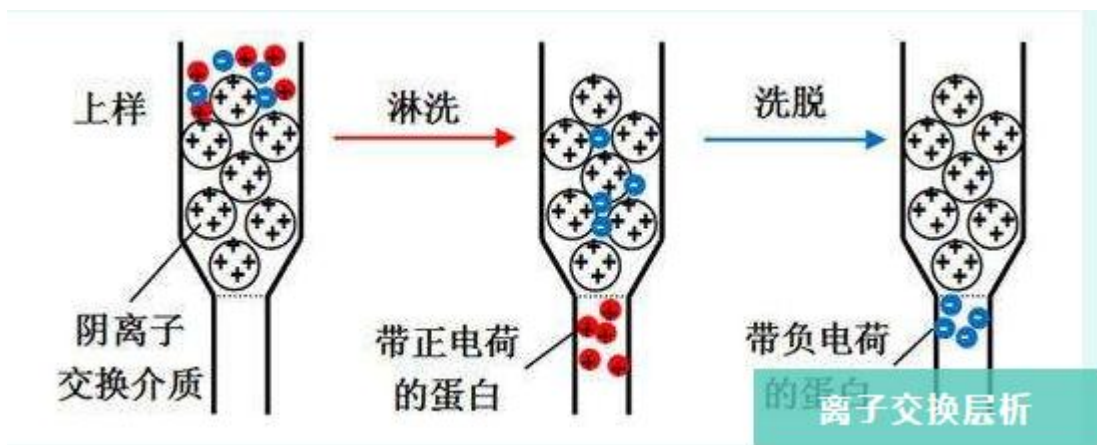
1. 保证填料装填匀实；
2. 增加柱床高度；
3. 控制上样体积，以不超过柱床体积 5% 为宜；
4. 关注样品黏度和取代溶液黏度是否保持一致；
5. 根据样品特点选择更优的取代溶液，优化取代溶液的离子强度和亲水性；

优化对称性

1. 保证填料装填匀实，拖尾 → 填料较松 | 适当增加装柱压力，前沿反之；
2. 使用太久柱料脏了 → 填料再生。

出现肩峰

1. 柱床：重新装柱或反冲；
2. 筛板：超声清洗筛板；



前处理

凝胶分离模式主要是靠分子量大小差异来达到分离的目的，前处理就显得尤为重要。主要方式为对样品进行离心和过滤，离心可以除去大部分块状物，再用针式滤器进行过滤即可。

溶液交换量

控制上样体积，以不超过柱床体积 30% 为宜；

关注样品溶液体积浓度，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。

提高分辨率

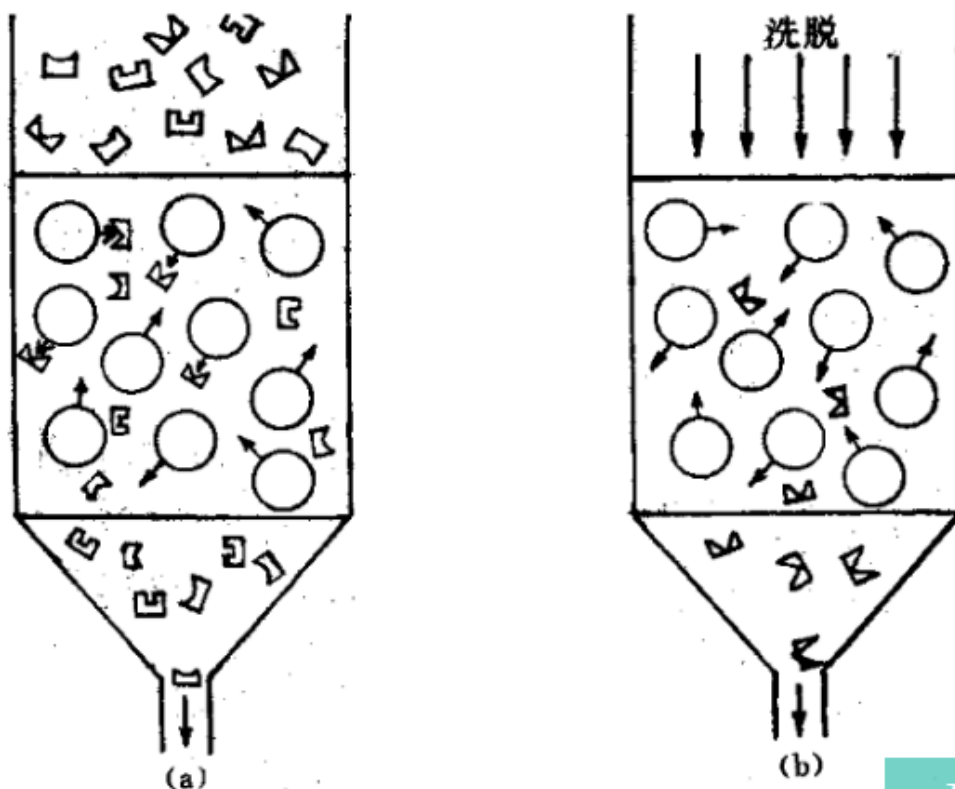
1. 保证填料装填匀实；
2. 增加柱床高度；
3. 控制上样体积，以不超过柱床体积 5% 为宜；
4. 关注样品黏度和取代溶液黏度是否保持一致；
5. 根据样品特点选择更优的取代溶液，优化取代溶液的离子强度和亲水性；

优化对称性

1. 保证填料装填匀实，拖尾→填料较松 | 适当增加装柱压力，前沿反之；
2. 使用太久柱料脏了→填料再生。

出现肩峰

1. 柱床：重新装柱或反冲；
2. 筛板：超声清洗筛板；



亲和层析

蛋白质和亲和介质不结合

1. 标签未翻译或标签被包裹在结构内

需要检查质粒序列或将标签移到其他位置，标签移到其它位置仍被包裹在结构内部时，就要将标签暴露出来

2. 优化结合缓冲液及充分平衡层析柱

调整缓冲液（如金属螯合介质和 His 标签蛋白结合时 pH 应在 7.3-8.5 之间，在如肝素亲和介质和 DNA 聚合酶结合时盐浓度太高影响结合，应控制在 50mM 以下）。层析柱没平衡好，柱床体系中的环境如 pH，离子强度也会影响结合，层析上样前要充分平衡层析柱。

3. 增加结合时间

降低上样流速让蛋白和介质有充分的接触时间。

4. 更换更优层析介质

亲和介质分类，一类是特异性结合一种蛋白，另一类是特异性结合一类蛋白。（如蛋白 a 介质结合一种蛋白，而肝素介质结合一类蛋白。所以选择的时候我们一定要了解其原理。）

蛋白结合在柱子未洗脱出

1. 蛋白和介质结合力过强

增加洗脱强度（his 蛋白和镍柱结合，可以增加取代基咪唑的浓度）。

2. 蛋白聚集在层析柱上

通过调整层析过程的缓冲液增加蛋白的稳定性，改善蛋白在层析柱上的状态。

聚集在层析柱上时就要对层析柱进行 CIP 清洗。

低分辨率（洗脱后纯度低）

1. 层析过程流速的影响

调整层析过程的流速，流速影响蛋白质和介质的亲和力，层析时要选择合适的流速。

2. 柱床未充分淋洗

上样后，要对柱床进行充分的淋洗，将未和介质结合的留在介质颗粒间隙，孔内的蛋白洗出来，再洗脱。

3. 蛋白之间的非特异性结合

优化体系缓冲液（比如加入 10% 的甘油等减少蛋白之间的非特异性结合）。

4. 介质的非特异性结合

优化缓冲液，减少层析过程的非特异性结合（如 His 蛋白用金属螯合填料纯化时，可以在缓冲液中加入 300mM 的氯化钠，减少蛋白和介质的非特异性结合）。

5. 洗脱过程的影响

如肝素柱子洗脱过程中拉合适的盐梯度可以提高特异性，His 标签蛋白和金属螯合介质结合后，洗脱时拉咪唑梯度可以提高纯度。

蛋白质纯化过程中失活

1. 蛋白去折叠或聚集

优化缓冲液使其利于蛋白质保持稳定。蛋白质在介质上的高密度下容易聚集可以添加一些蛋白的增溶剂等。

2. 纯化过程中保持蛋白的活性的辅助因子被法除

如一些酶类的活性需要金属离子辅助其活性，在纯化过程中就要添加蛋白的活性辅助因子。



北京慧德易科技有限责任公司

咨询电话：010-59812370/1/2/3

公司官网：www.prep-hplc.com

邮 箱：sales@prep-hplc.com

微信公众号：北京慧德易