



实验十三 离子交换柱层析纯化 碱性磷酸酶

廈門大學生命科學學院

一、目的要求

1. 学习和掌握离子交换柱层析分离蛋白质的原理与方法。
2. 通过离子交换柱层析对碱性磷酸酶进行纯化。

本次实验安排

1. 部分操作步骤及仪器的使用介绍
2. 分组，各组装柱、平衡
3. 继续介绍原理、步骤
4. 各组上样、淋洗蛋白质（仪器调节好后，可以离开吃饭，各组留一个同学观察）
5. 吃完饭加盐洗脱，收集样品，测定酶活力。
6. 整理玻璃仪器，洗柱子，回收DEAE，结束实验。

二、原理

chromatography techniques

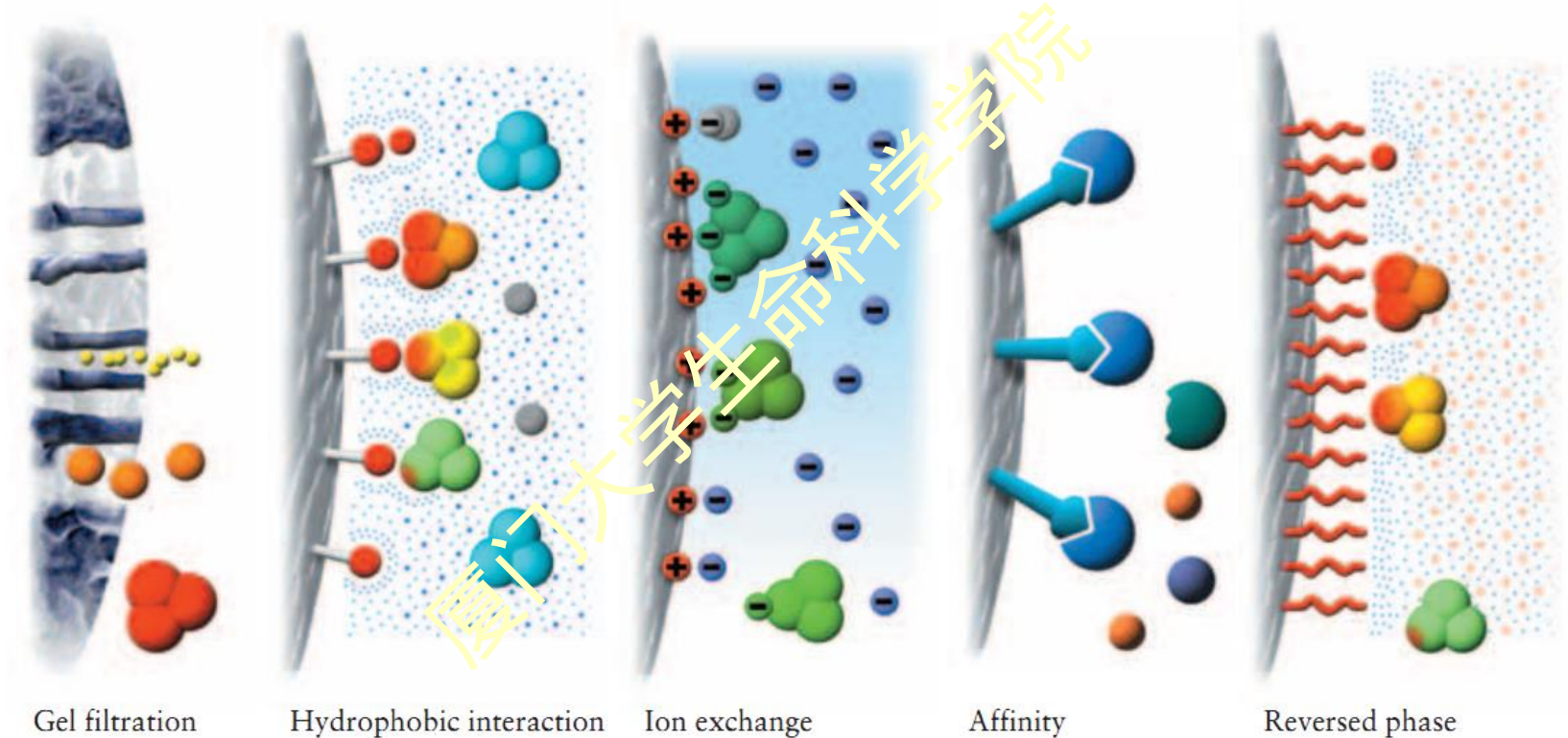


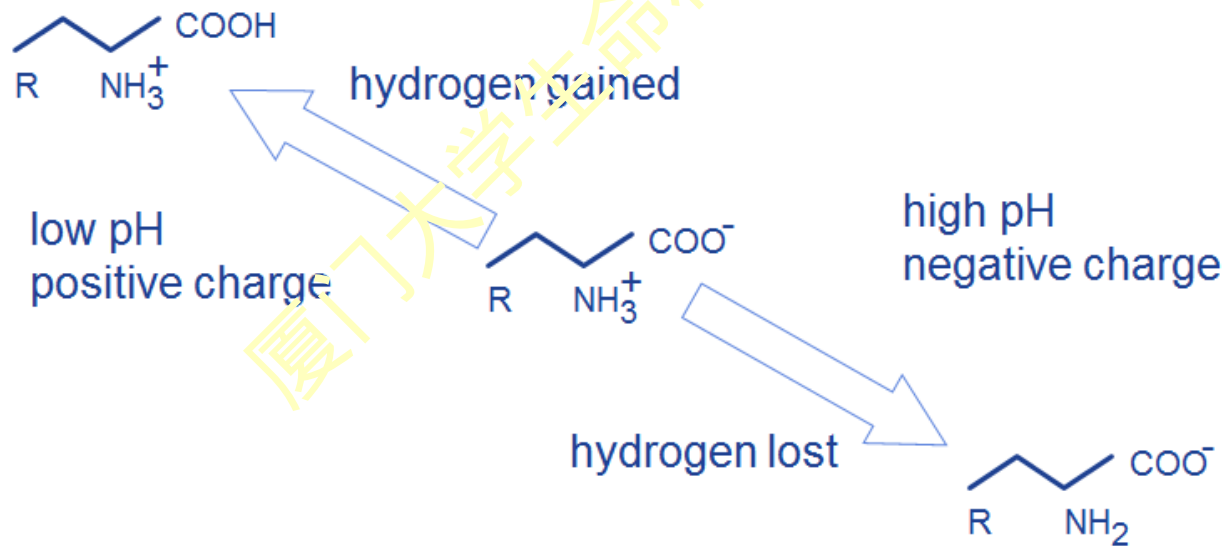
Fig. 1. Separation principles in chromatographic purification.

离子交换柱层析 Ion exchange chromatography (IEX) :

不同蛋白质由于等电点不同，在同一pH介质中所带的电荷种类数量不同，因而与离子交换剂的结合能力不同。可以通过改变洗脱液的酸碱度或盐浓度梯度，削弱其结合能力，把结合的蛋白质分别洗脱下来，达到纯化的目的。

IEX chromatography takes advantage of the fact that the relationship between net surface charge and pH is unique for a specific protein. In an IEX separation reversible interactions between charged molecules and oppositely charged IEX media are controlled in order to favor binding or elution of specific molecules and achieve separation.

Effect of pH on charge

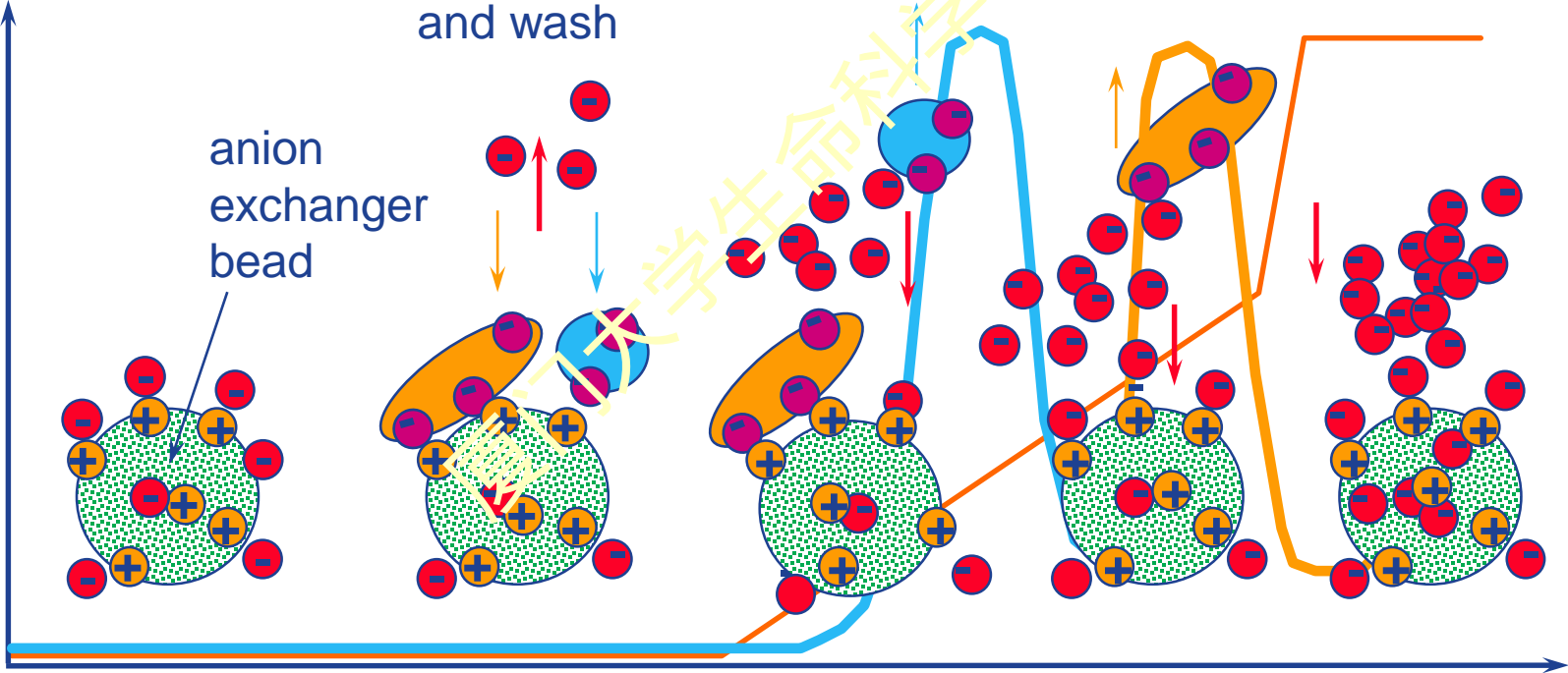


equilibration

sample application and wash

elution

regeneration



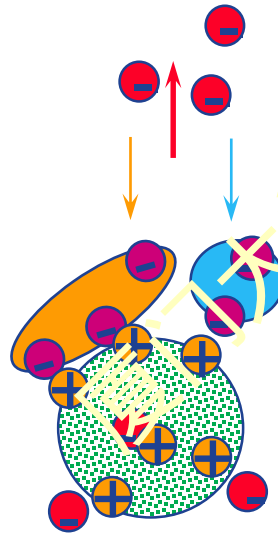
anion exchanger bead

equilibration



廈門大學生命科學學院

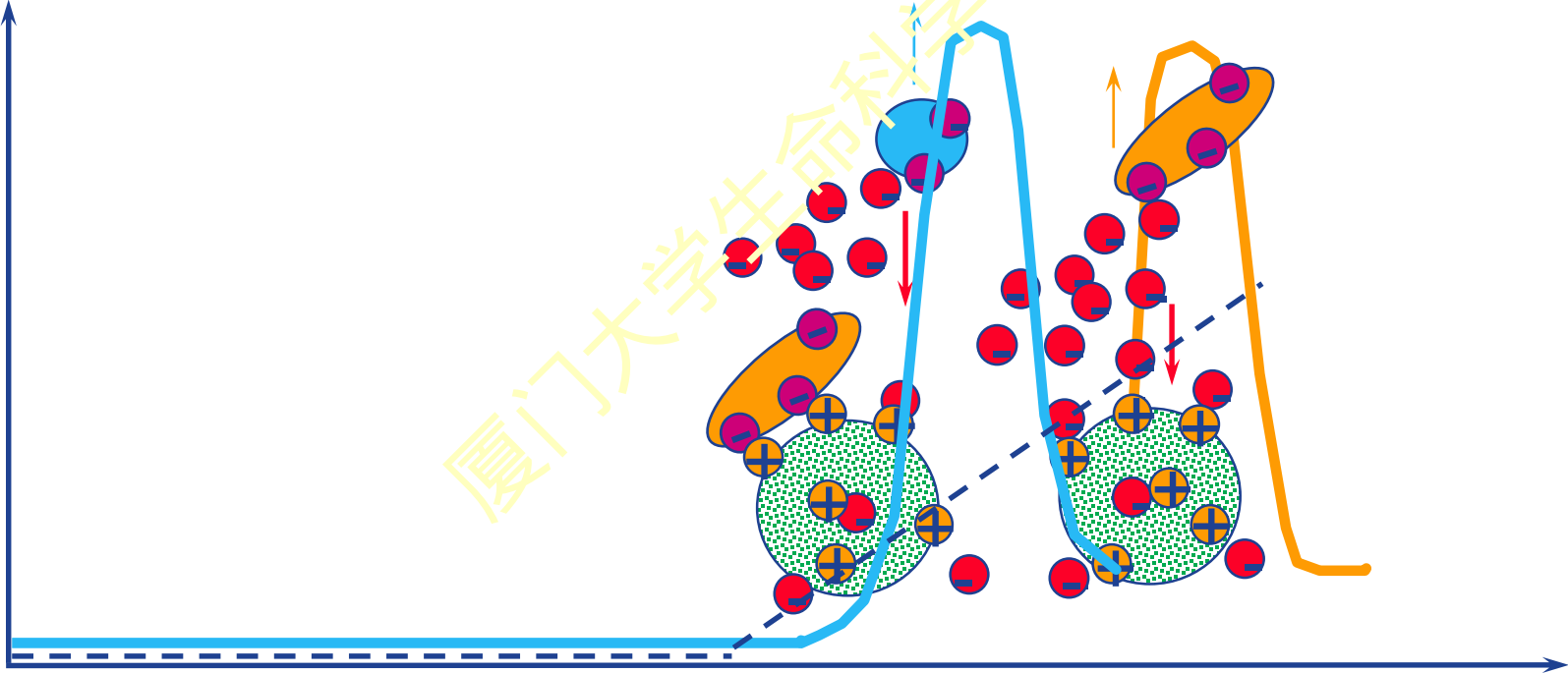
sample
application
and wash



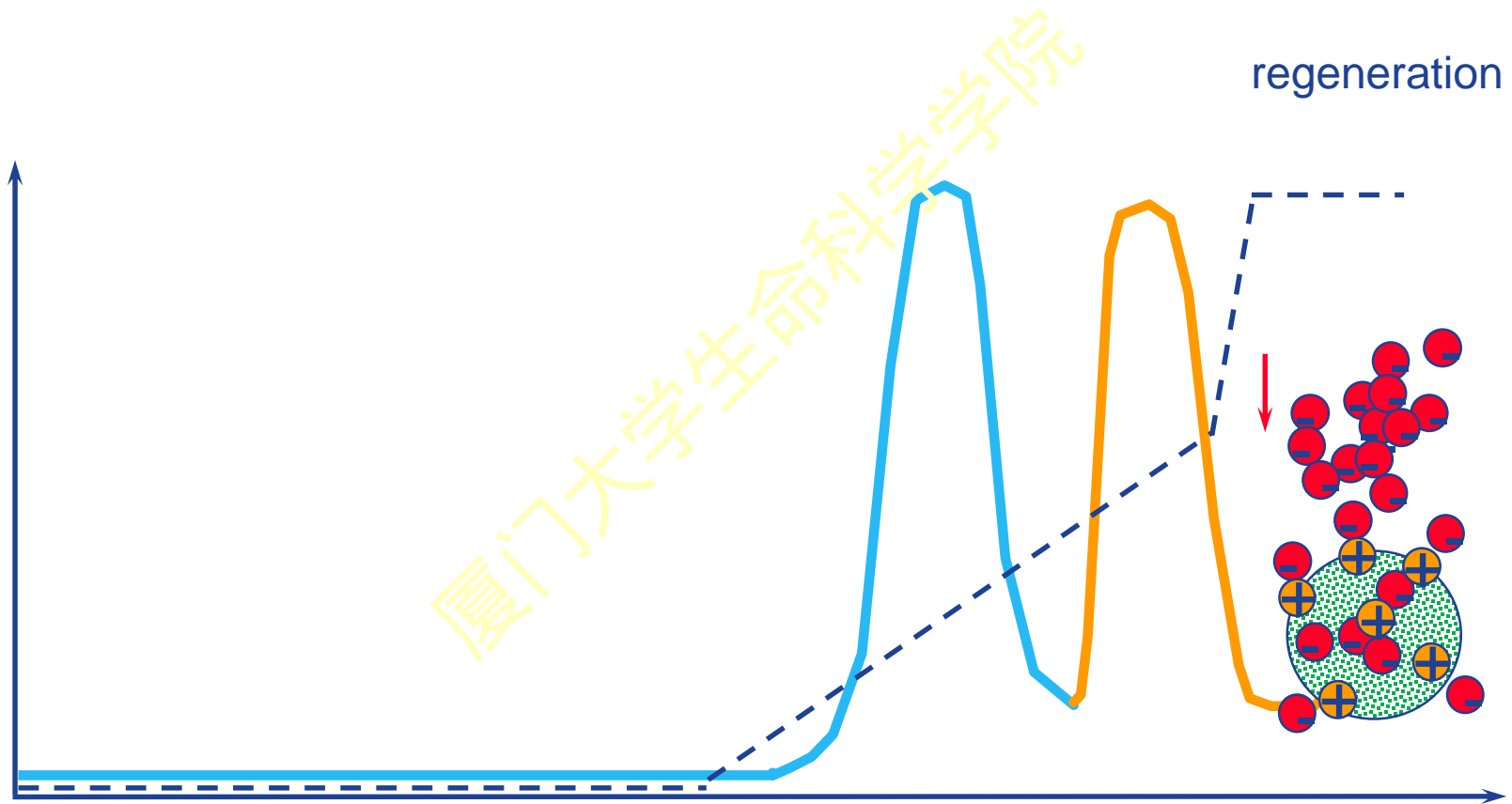
生命科学学院

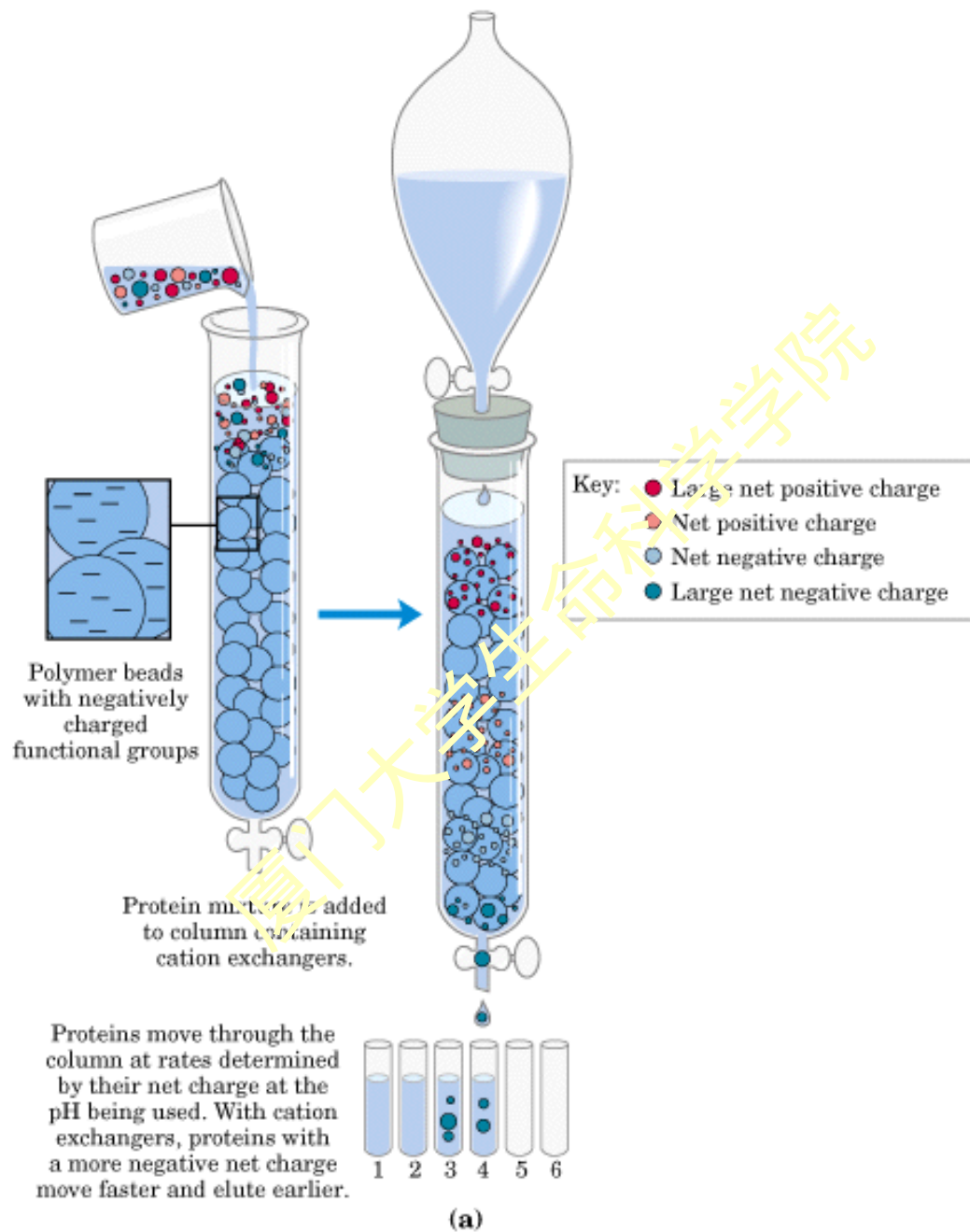
廈門大學生命科學學院

elution



What happens in ion exchange?





离子交换剂的类型：

阳离子交换剂Cation exchanger（带负电，吸附带正电的蛋白质）：

CM(羧甲基)-纤维素或琼脂糖，SP，S

阴离子交换剂Anion exchanger（带正电，吸附带负电的蛋白质）：

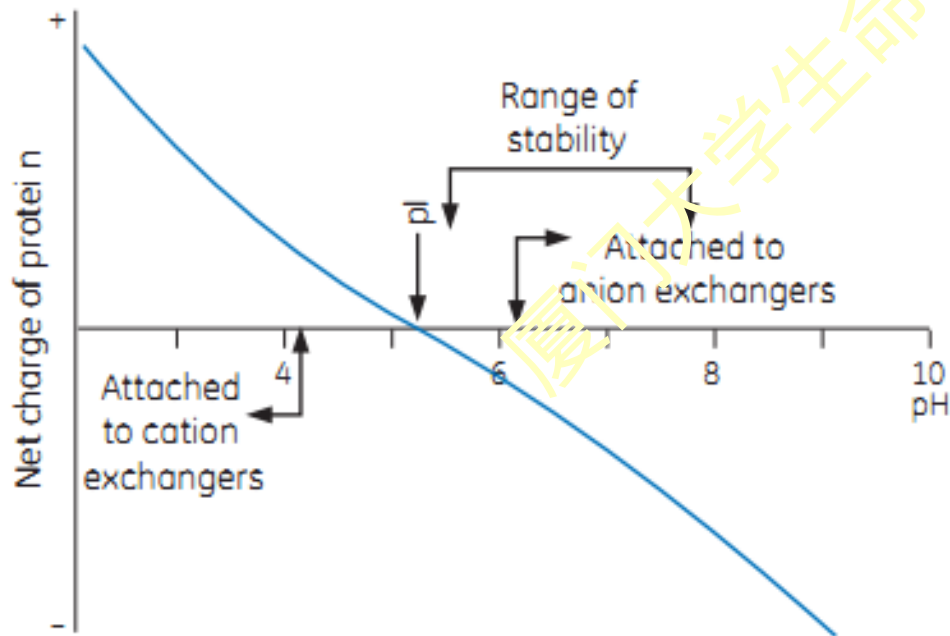
DEAE(二乙氨基乙基)-纤维素或琼脂糖，QAE，Q

Table 1.2. Functional groups used on ion exchangers

Anion exchangers		Functional group
Quaternary ammonium (Q)	strong	$-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$
Diethylaminoethyl (DEAE)*	weak	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_2\text{-CH}_3)_2$
Diethylaminopropyl (ANX)*	weak	$-\text{CH}_2-\text{CHOH}-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_2\text{-CH}_3)_2$
Cation exchangers		Functional group
Sulfopropyl (SP)	strong	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SO}_3^-$
Methyl sulfonate (S)	strong	$-\text{CH}_2-\text{SO}_3^-$
Carboxymethyl (CM)	weak	$-\text{CH}_2-\text{COO}^-$

Anion or cation exchanger

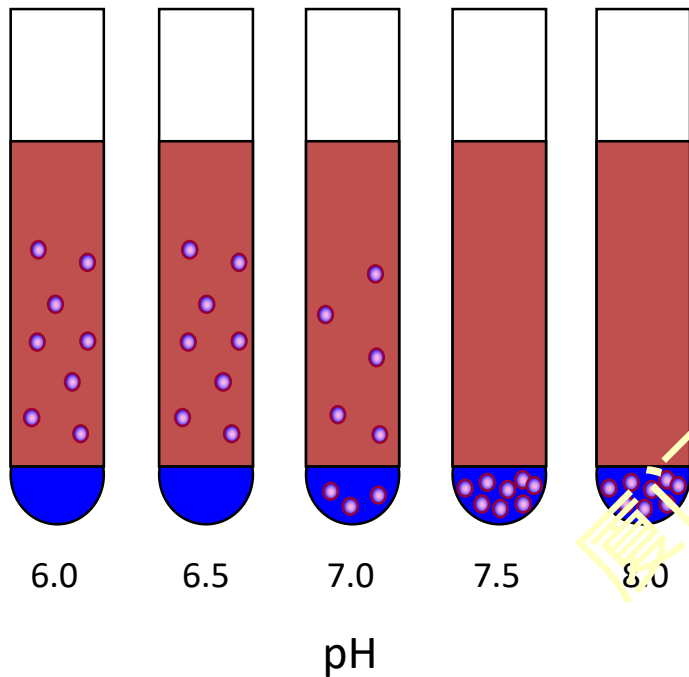
- 👉 If sample components are most stable below their pI , use a cation exchanger.
- 👉 If sample components are most stable above their pI , use an anion exchanger.
- 👉 If stability is high over a wide pH range on both sides of the pI , use either type of ion exchanger.



Anion exchanger

Fig 2.3. Considerations when selecting a suitable IEX medium.

Test tube method to determine the initial pH



1. put 1 ml anion exchanger into several tubes

2. add buffers with different pH's

3. add sample, mix

4. analyse the supernatants for the protein of interest

- Here the target binds completely at
- pH 7.5 and above

- Conclusion:

- anion exchanger, initial pH 7.5

Target Protein pI?

7.0-7.5

产品编号 DFF100 | CAS号 57407-08-6 | SIGMA

DEAE-Sepharose®

Fast Flow

价格与库存

货号与规格	库存	价格 (RMB)	数量		
DFF100-50ML	✓ 需要从国外调货, 预计到货时间 2015.12.18	1,729.26	<input type="text" value="0"/>	★	i
DFF100-100ML	✓ 需要从国外调货, 预计到货时间 2015.12.18	2,881.71	<input type="text" value="0"/>	★	i
DFF100-500ML	✓ 需要从国外调货, 预计到货时间 2015.12.24	10,734.75	<input type="text" value="0"/>	★	i

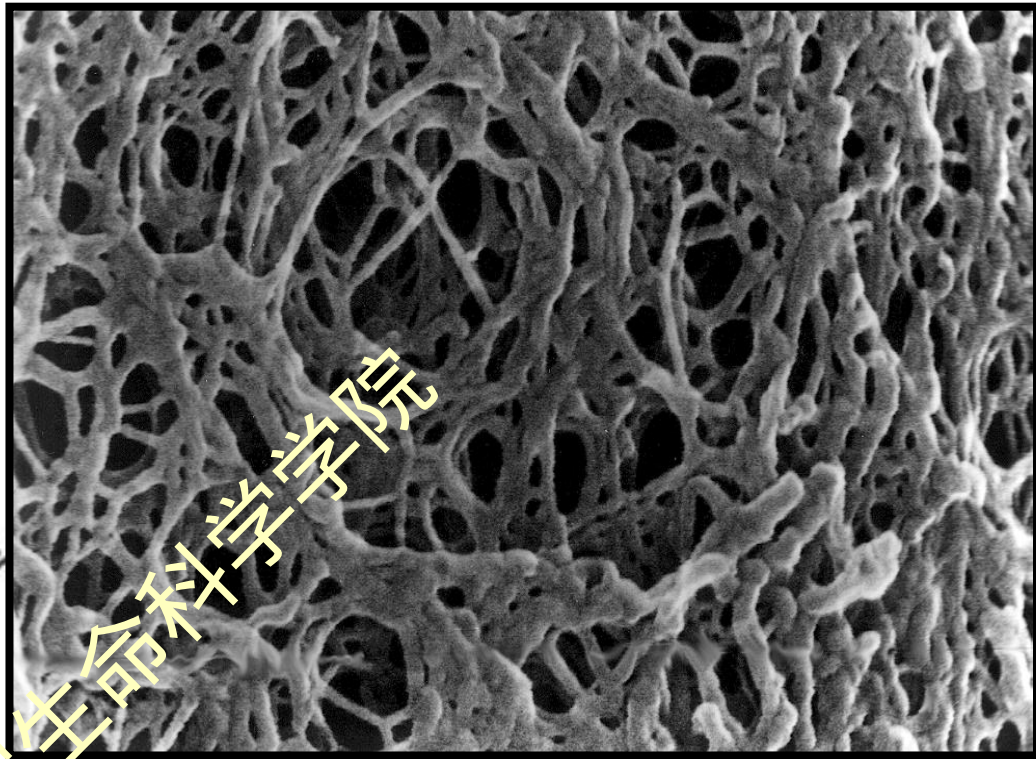
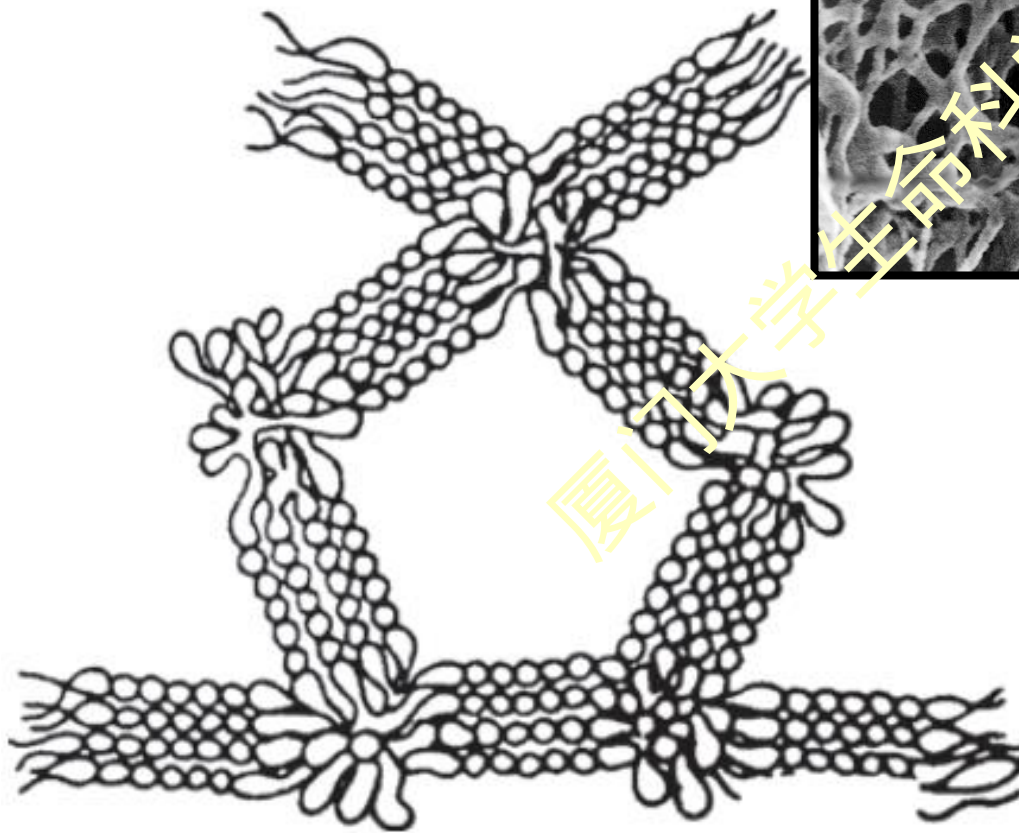


Fig 1.14. Structure of cross-linked agarose media (Sepharose).

优点：高选择性，高容量，可以浓缩样品，较高回收率（80%）

基本方法：

- A.选择合适的离子交换剂和柱子
- B.（DEAE纤维素溶胀，活化，）转型，装柱，平衡
- C.上样吸附（样品要先脱盐）
- D.淋洗去不吸附的蛋白质
- E.改变离子强度或pH值洗脱，收集
- F.离子交换剂再生，保存

洗脱

阶段梯度洗脱 Step elution

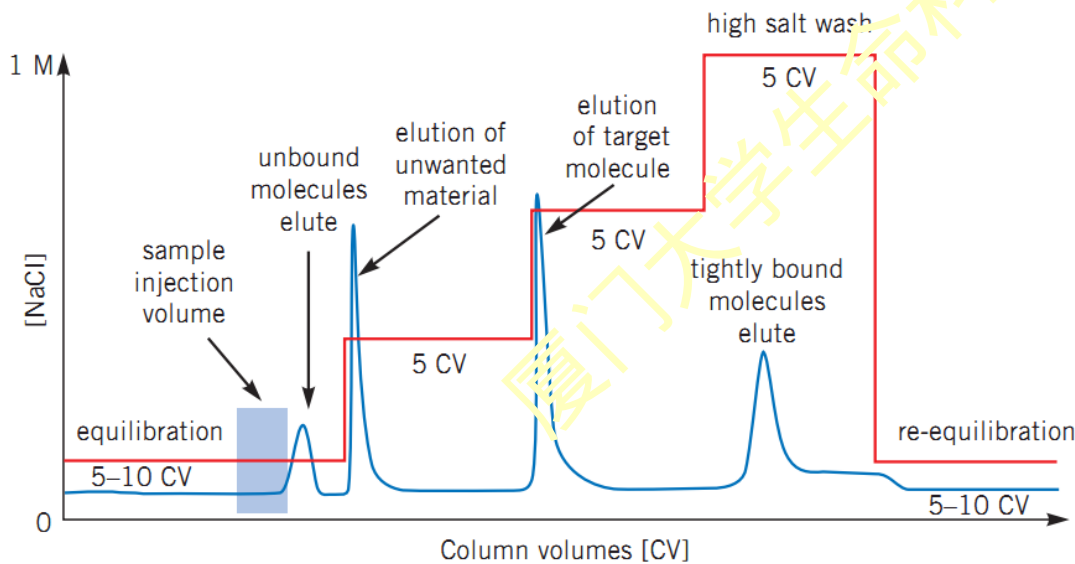
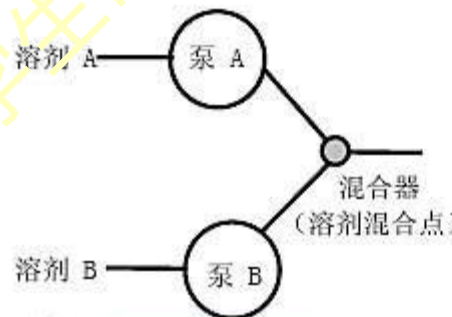
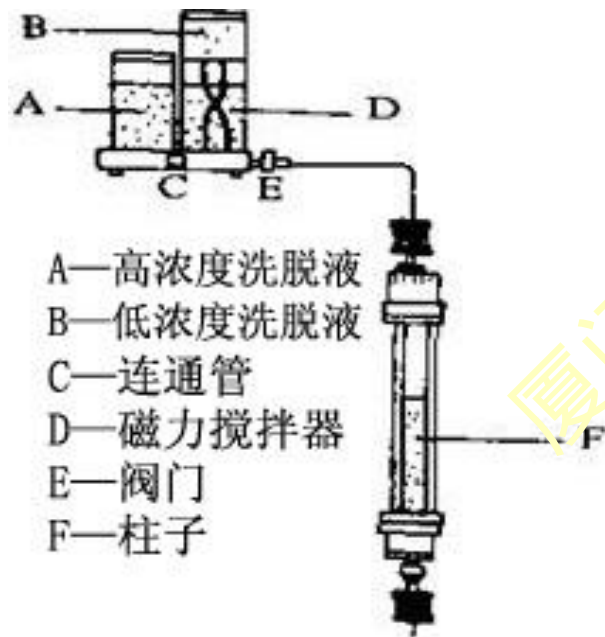
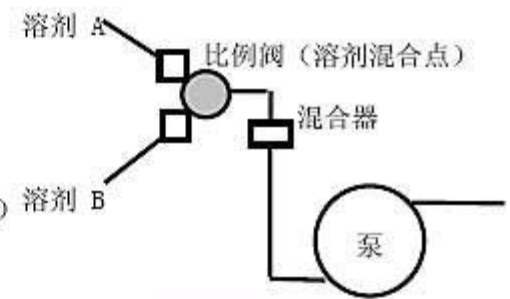


Fig. 10b. Typical IEX separation using step elution (25–30 column volumes).

- 连续梯度洗脱 Linear gradient elution



A 高压梯度



B 低压梯度

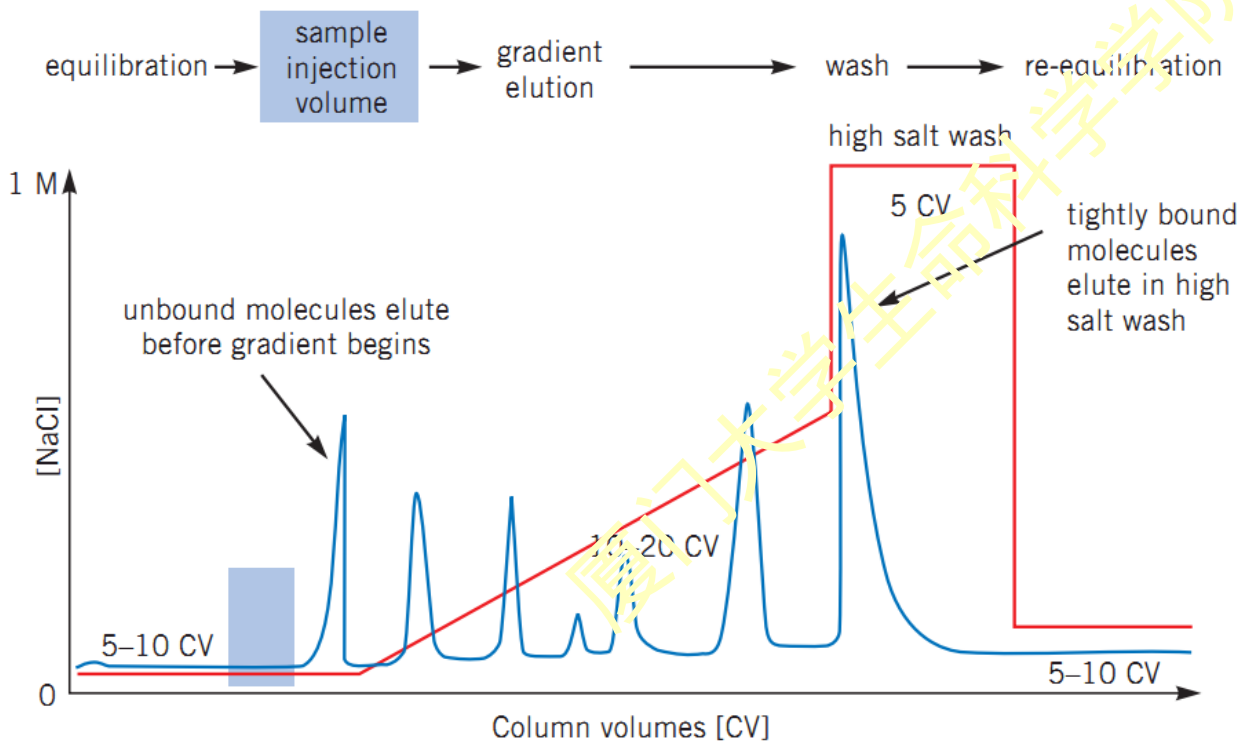
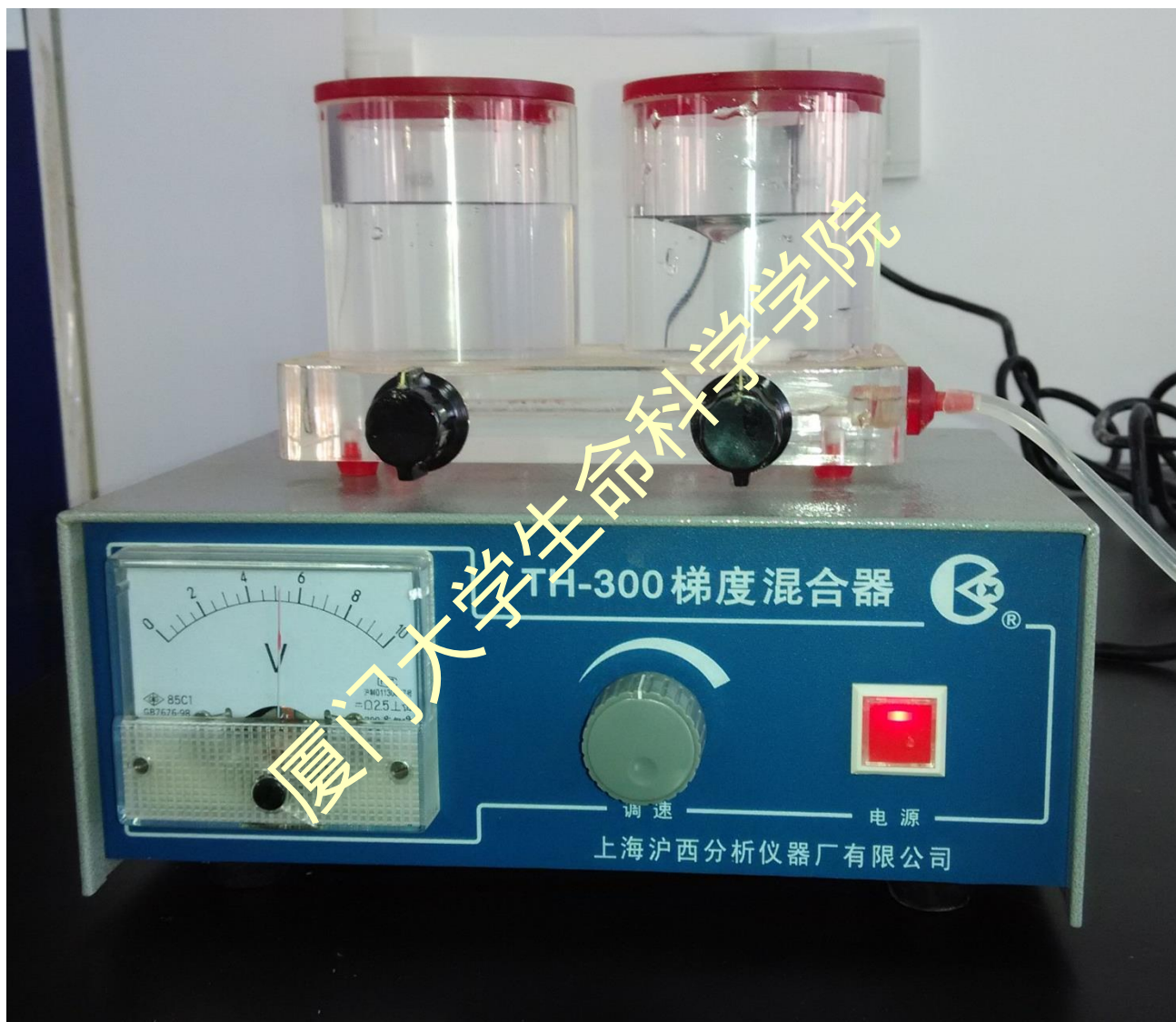
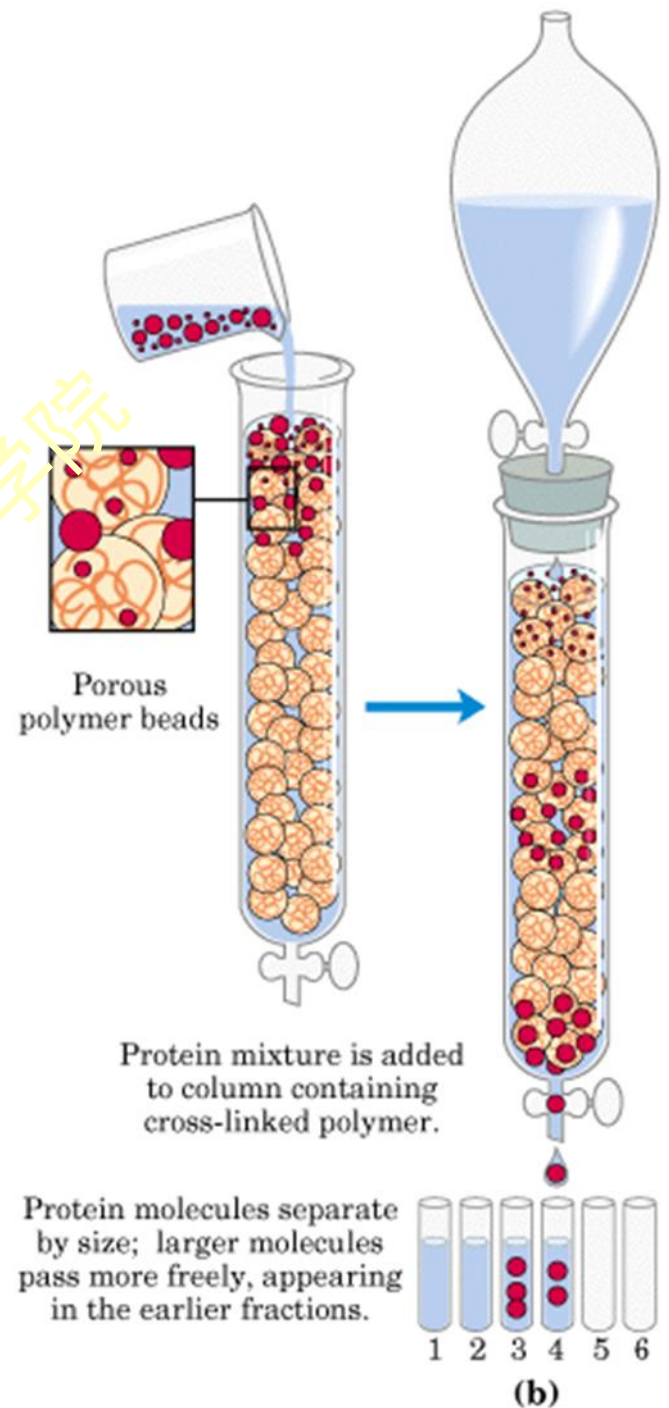


Fig. 10a. Typical high resolution IEX separation using linear gradient elution (25–45 column volumes).



- 凝胶过滤层析：
也称分子筛层析、
排阻层析。是利用
具有网状结构的凝
胶的分子筛作用，
根据被分离物质
的分子大小不同
来进行分离。



三、试剂与器材

1. 试剂

DEAE-sephrose, 0.01 mol/L Tris-HCl 缓冲液pH 7.5, 含 0.25 mol/L、0.5 mol/L NaCl 的0.01 mol/L Tris-HCl 缓冲液pH 7.5, 蛋白浓度测定试剂, 测定碱性磷酸酶活力试剂, 牡蛎碱性磷酸酶粗酶

2. 器材

层析柱, 核酸蛋白质检测仪, 记录仪, 自动部分收集器, 超级恒温水浴锅

722分光光度计, 移液器

四、仪器的使用—核酸蛋白检测仪及 部分收集器的操作方法

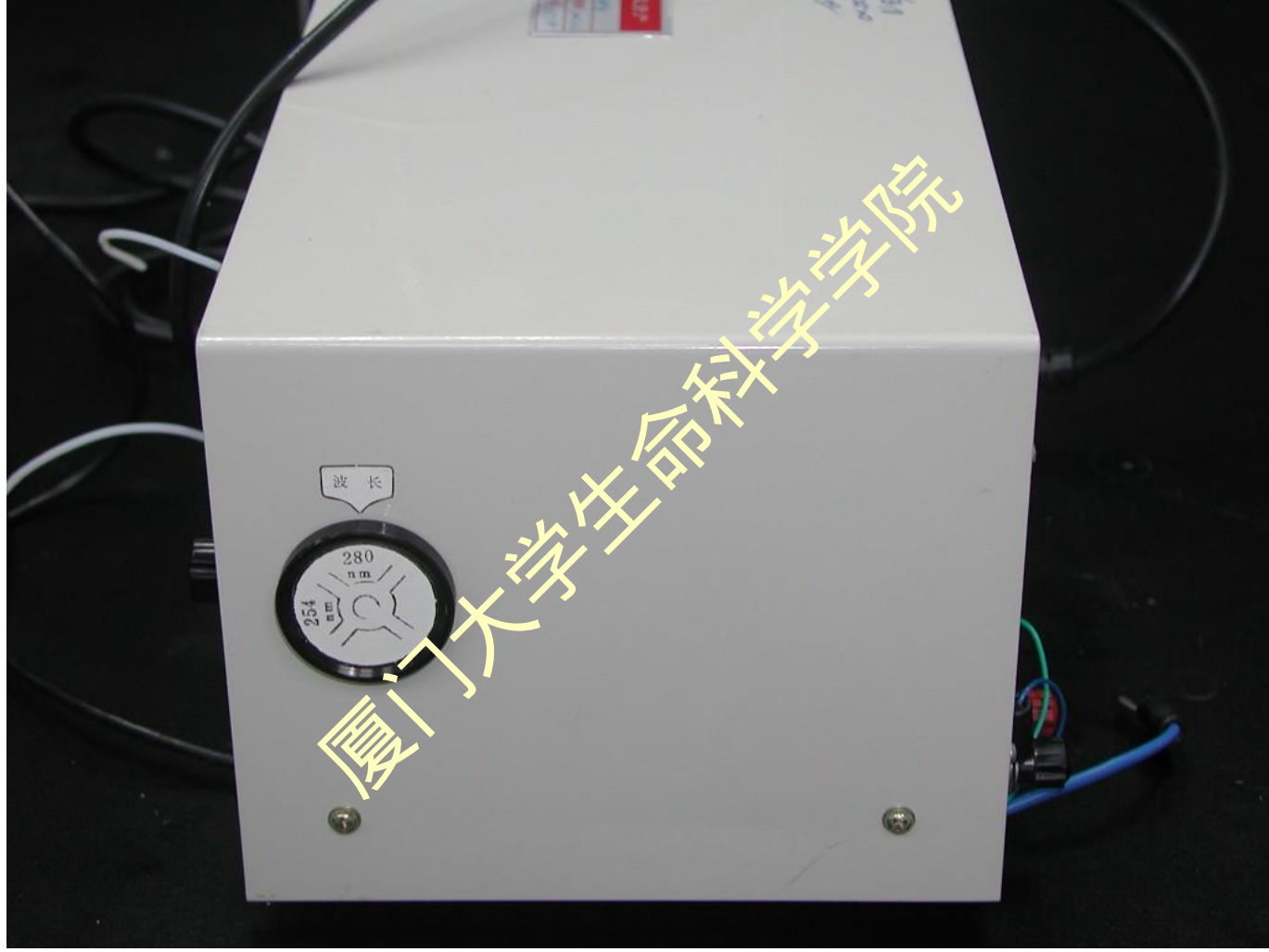
厦门大学生命科学学院

核酸蛋白检测仪操作方法(预热10-20min)

1. 在仪器使用前，首先检查检测器，电源和记录仪三部份电路连接是否正确，插上电源插头。接凝胶柱时，“下进上出”。
2. 将检测仪波长旋钮旋到所需波长刻度上。检测蛋白质280nm
3. 把量程旋钮拔到100%T档。旋转“光量”，调100。
4. 灵敏度设置到1A, 旋转“调零”，调0。
5. 测试完毕，必须切断电源，并用蒸馏水清洗样品池和尼龙管。

核酸蛋白检测仪





无纸记录仪使用说明

1. 每台记录仪可以接2台蛋白监测仪。通道1：红色；通道2：绿色。
2. “系统组态”，修改时间为手表的实际实际时间。“总貌”可以进一步核实时间是否修改成功。
3. “通道组态”，小数点位数123.45，量程设置为199
4. “系统组态”，数据转储拷贝数据。

无纸记录仪

MR	7.2%	18/11/12 10:51:57					
01	CH01	4.99	mV	HH	H	L	LL
02	CH02	3.27	mV	HH	H	L	LL
03	CH03	2.4	mV	HH	H	L	LL
04	CH04	7.6	mV	HH	H	L	LL
05	*NO*						
06	*NO*						
07	*NO*						
08	*NO*						
09	*NO*						
10	*NO*						
11	*NO*						
12	*NO*						
13	*NO*						
14	*NO*						
15	*NO*						
16	*NO*						

报警输出 01 02 03 04 05 06 07 08 09 10 11 12

数显 棒图 曲线 菜单



MP 7.2%

18/11/12 10:52:37

实时

0.1s

通道01 通道02 通道03 通道04

- 总貌画面
- 历史曲线
- 系统组态
- 报警组态
- PID 组态
- 累积报表
- 报警记录
- 通道组态
- 累积组态
- 报警组态

6.7

HH H L LL

75

50

25

04

向上 向下 向左 向右 确定

上海生恒电子科技有限公司

系统组态

退出

记录模式	循环	记录间隔	01.0 秒
仪表地址	01	串口速率	19200
日期	17年12月04日	时间	17:00:46
数据擦除	确定	数据转储	确定
恢复默认值	确定	联机帮助	确定
亮度调节	0%	切换时间	05 秒
高级组态	确定	关屏时间	00 分钟
冷端系数	1.0000	管理密码	000000

增加 减小 前移 后移 确定

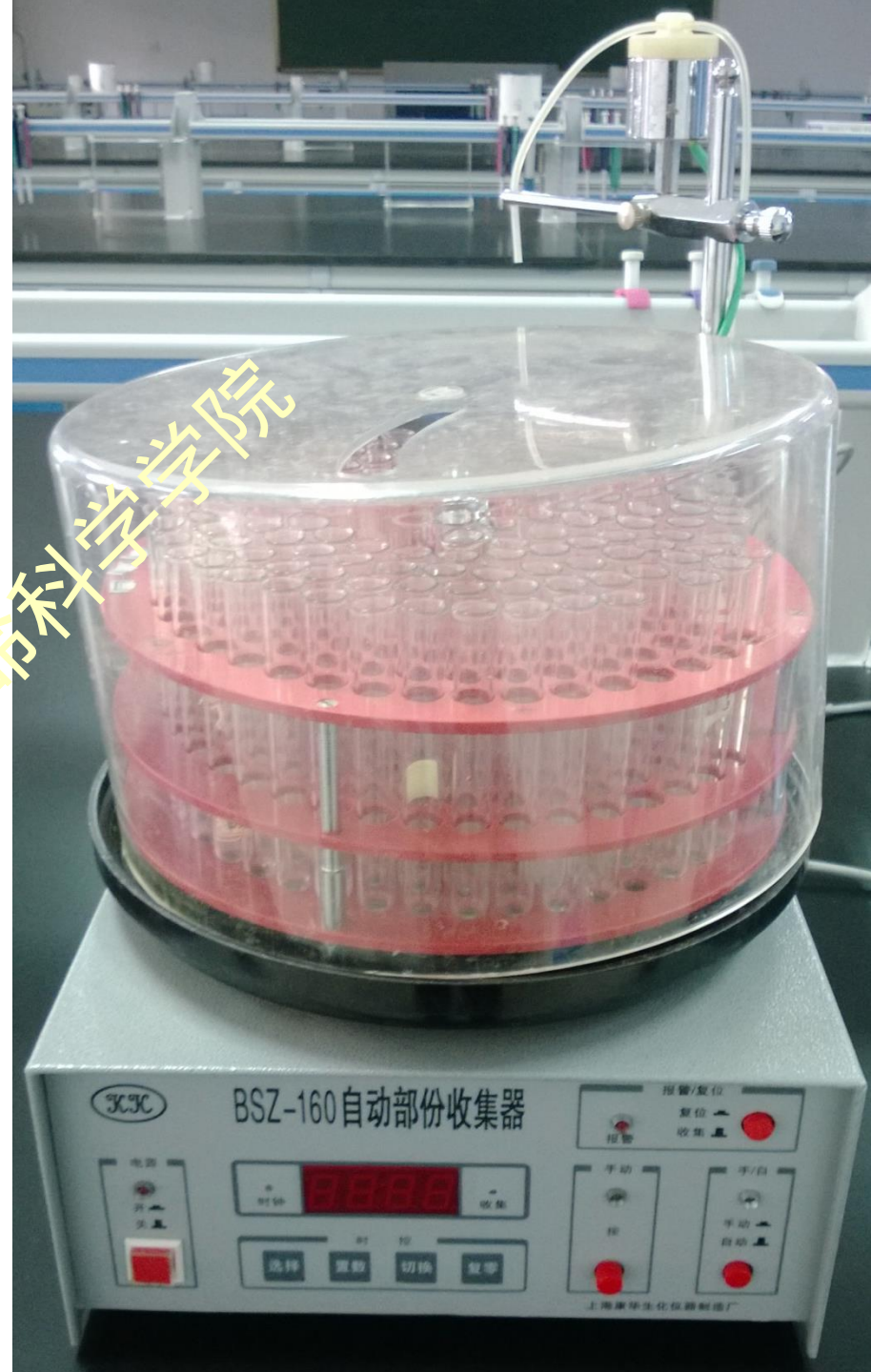


BSZ160自动部分收集器

1. 打开电源，按“复位”键，会自动复位，听到报警后，再按“复位”键，消除报警声。
2. 调到“手动”状态进行设置。
按“切换”键，选择“收集态”
按“选择”---“置数”---“选择”设置定时所需时间时间
5. 调整滴管口位置，使滴臂口对准第一根试管。
6. 选择“自动”态，即可进行收集。

BSZ160自动部分收集器

厦门大学生命科学学院



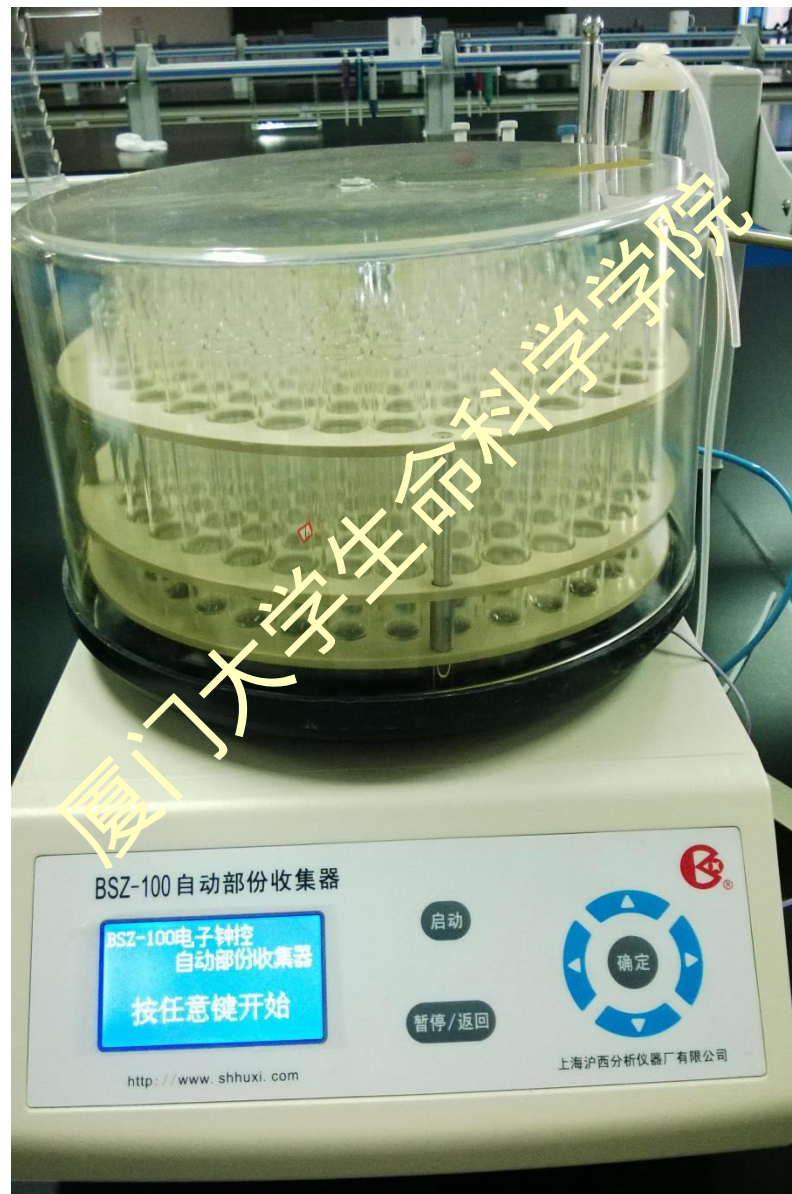
BSZ160自动部分收集器



改进型BSZ100自动部分收集器

1. 开机，按任意键进入。
2. 先选择“参数设置”，进行定时的设置，并选择“保存参数”。
3. 返回到起始状态，选择“开始运行”，进一步选择“收集状态”，最后按“启动”，开始自动部分收集。

改进型BSZ100自动部分收集器



BSZ-100 自动部份收集器

开始运行
参数设置
泵关

启动

暂停/返回



<http://www.shhuxi.com>

上海沪西分析仪器有限公司

起始管号 1
结束管号 100
收集时间 00:05:00
当前时间 11:04:07

启动

暂停/返回



BSZ-100 自动部份收集器

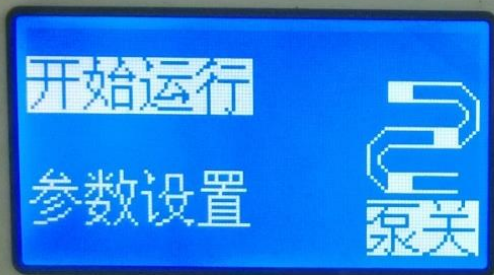
闹钟时间 00:00:00
保存参数

启动

暂停/返回

<http://www.shhuxi.com>

BSZ-100 自动部份收集器



启动

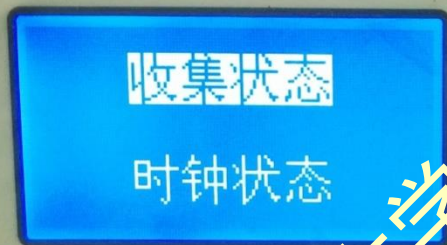
暂停/返回



<http://www.shbuxi.com>

上海沪西分析仪器厂有限公司

BSZ-100 自动部份收集器



启动

暂停/返回



<http://www.shbuxi.com>

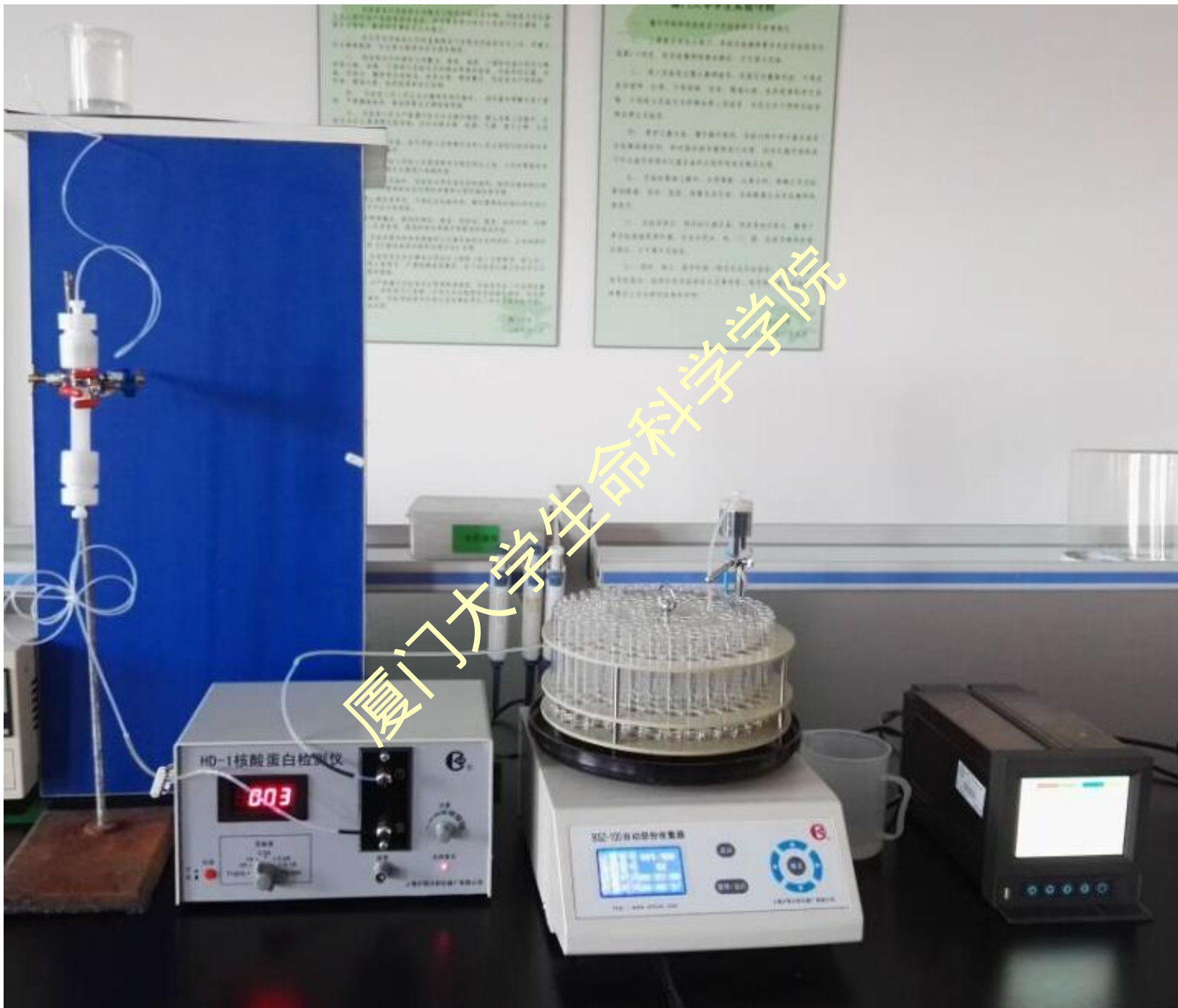
上海沪西分析仪器厂有限公司

收集状态

按启动键进入收集状态

启动

暂停/返回



四、操作方法

(一) 装柱 (2-4人一组或4-6人一组)

选择适当大小的[层析柱](#)，垂直安装在架上，注入蒸馏水检查柱子是否渗漏。夹紧柱子出水口，缓慢加入搅拌均匀的DEAE-sephrose凝胶浆液（室温），静置1-2分钟，打开出水口，流速控制在0.5-1.0 mL/min，逐步补充加入DEAE-sephrose凝胶浆液直至[柱床](#)离上端约2 cm。接上0.01 mol/L Tris-HCl pH 7.5缓冲液洗脱瓶，让其[平衡](#)10倍柱床体积缓冲液。

(二) 准备好部分收集器、核酸蛋白检测仪及记录仪

核酸蛋白检测仪 1A量程，记录仪基线水平

(三) 样品上柱

夹紧下端出水口，吸去上端平衡缓冲液，用滴管吸走柱上端的缓冲液，留下一层约1 mm液层铺盖DEAE-sephrose柱床表面。小心加入牡蛎碱性磷酸酶粗酶样品2-3mL（注意不要搅动柱床表面）（留0.3ml粗酶），打开下出口，流速控制在0.2 mL/min，使酶样品吸附在DEAE柱上。

(四) 淋洗

吸附完毕，接上0.01 mol/L Tris-HCl pH 7.5缓冲液洗脱瓶，让其淋洗约2-3倍（20-30mL）的柱床体积的缓冲液，流速控制在1 mL/min左右，除去不吸附的杂蛋白，洗至基线即可停止。

(五) 洗脱

1. 用15 mL含0.25 mol/L NaCl的0.01mol/L Tris-HCl pH 7.5缓冲液洗脱柱子，洗脱液流速0.5 mL/min左右，部分收集器收集，每管3 mL。洗至基线即可停止。
2. 用15 mL含0.5 mol/L NaCl的0.01mol/L Tris-HCl pH 7.5缓冲液洗脱柱子，洗脱液流速0.5 mL/min左右，部分收集器收集，每管3 mL。洗至基线即可停止。

（六）碱性磷酸酶活力峰收集

对部分收集器收集的洗脱液进行碱性磷酸酶活力测定。结合核酸蛋白检测仪检测的 OD_{280} 蛋白质吸收峰曲线，做出碱性磷酸酶的洗脱图谱，收集碱性磷酸酶活力峰（活力最高的那管酶冻起来，作为电泳的样品），即为经离子交换柱层析纯化的酶液。合并活力峰后进行酶活力及蛋白浓度的测定，计算比活力。

（七）拷贝无纸记录仪数据并打印

(八) 柱子清洗: 2 mol/L NaCl 20 ml清洗柱子, 除蛋白。

(九) 将柱子拆下, 回收DEAE-sephrose, 核酸蛋白检测仪的石英杯用蒸馏水冲洗干净。

廈門大學生命科學學院

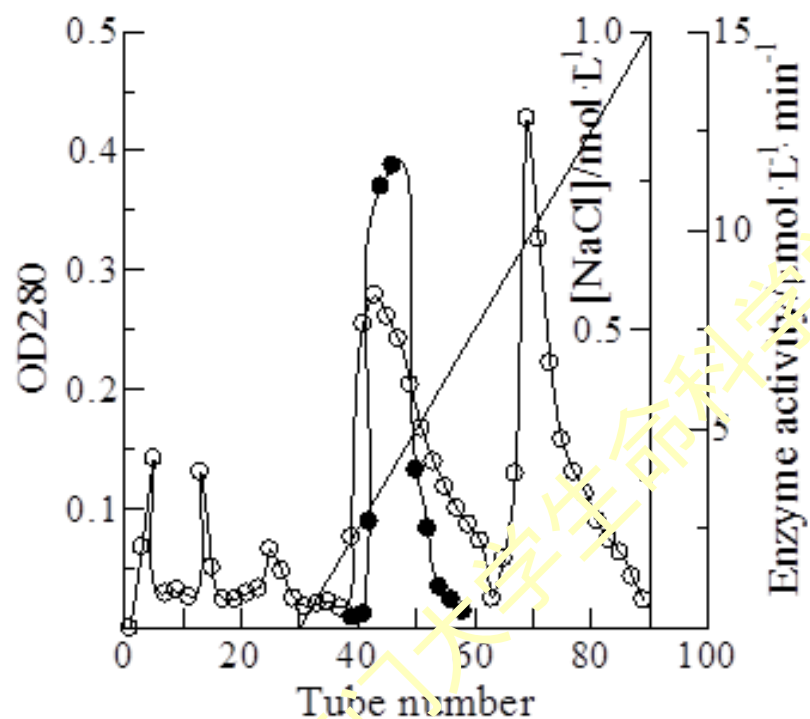


图 13 青霉 (*penicillium amagasakiense*) GOD 经 DEAE-32 离子交换柱

Fig.13 Column chromatographs of the GOD from *penicillium amagasakiense* on DEAE-cellulose (DEAE-32)

-●-酶活力, -○- 蛋白浓度, ----- NaCl 浓度梯度.

注意事项

- 柱子不能有气泡，不能漏液。
- 柱子要平衡到所需要的pH和离子强度
- 样品上柱前要脱盐，如果是酶要先测定活力
- 样品如果有沉淀，需要先10000rpm离心。
- 收集管多的话，酶活力测定可以隔管粗测，然后在有活力出现的收集管附近每管都测。
- 底物溶液配制时可以将各试剂体积乘以20，一次配制20份测活底物溶液的量。
- 测活用0.2-0.3ml酶
- 输出无纸记录仪数据前不能关机，否则就没有数据了。

思考题：

1. 本实验用到的几种仪器的用途是什么？
2. 能否将70%饱和度硫酸铵沉淀溶解酶液不经过透析，直接上离子交换层析柱来纯化酶？为什么？

下周实验：周三组AKTA蛋白纯化系统的使用（凝胶过滤）

周四五组SDS—聚丙烯酰胺凝胶垂直板电泳分离蛋白质

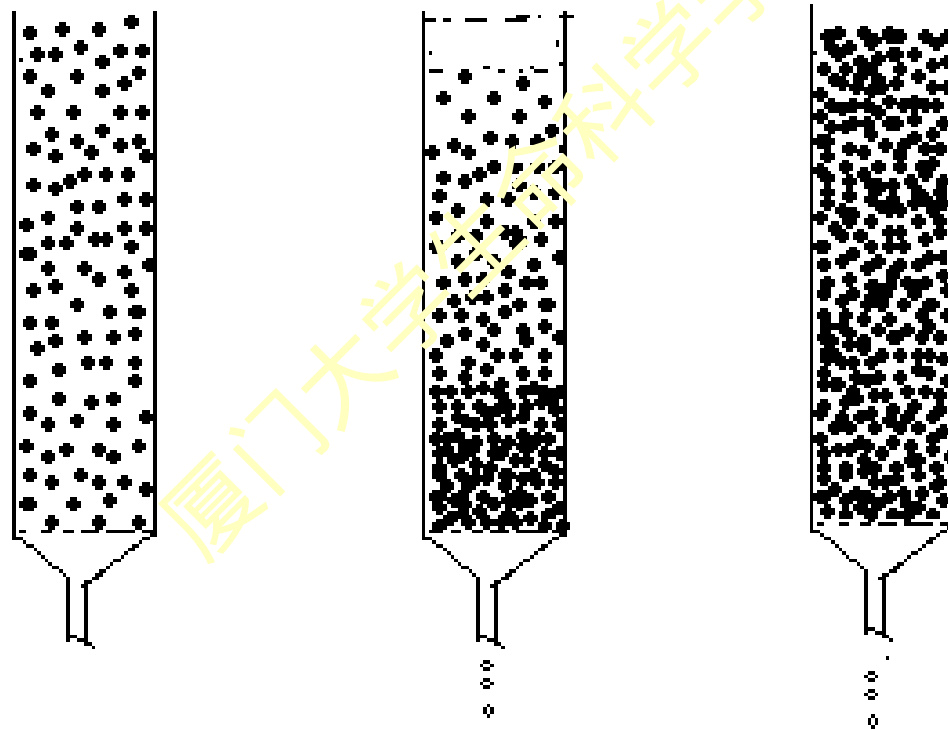
密封圈

尼龙膜

厦门大学生命科学学院

[返回](#)

装柱示意图



曲线分析

***单位数据分析

数据报表

打印

返回

