

# 蛋白质纯化系统AKTApurifier

1. 碱性磷酸酶的凝胶过滤柱层析
2. 牛血清白蛋白（BSA）的脱盐实验

杨春燕

20171213

# 碱性磷酸酶的凝胶过滤柱层析

# 实验目的

1. 通过凝胶过滤柱层析对碱性磷酸酶进行进一步纯化
2. 学习并掌握凝胶过滤柱层析分离蛋白质的原理和方法
3. 利用凝胶过滤柱层析实验了解并掌握蛋白纯化系统操作

# 实验材料及试剂

- 材料

- 凝胶柱：superdex200 10/300GL（GE预装柱）
- 蛋白样品：碱性磷酸酶DEAE 含0.25M NaCl洗脱液（要做过滤处理，小滤器）

- 试剂

- 含0.1M NaCl的Tris缓冲液（10mM Tris7.5, 100mM NaCl）
- 缓冲液需经0.45 $\mu$ M滤膜**过滤后备用**



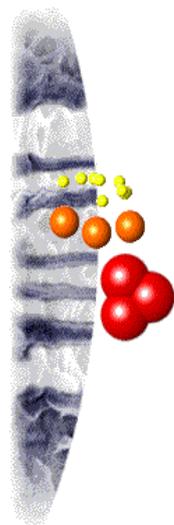
# 实验原理

- 层析原理
- 层析系统介绍

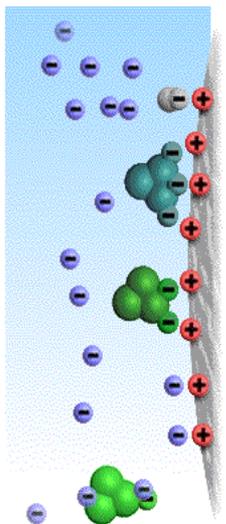
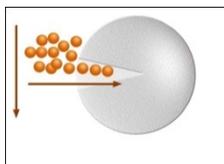


# 层析原理

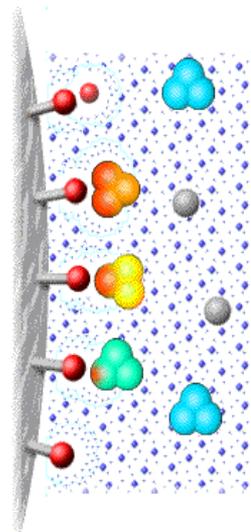
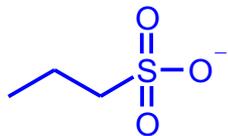
——根据生物分子与填料的相互作用原理不同分成五个类型



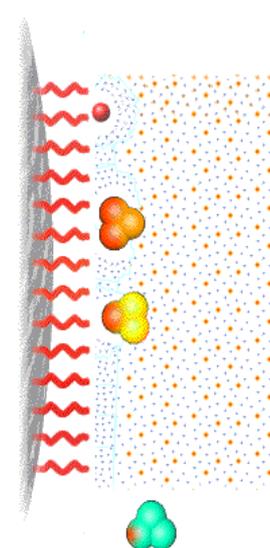
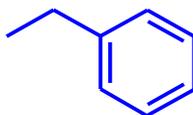
Gel Filtration  
凝胶过滤（分子筛）



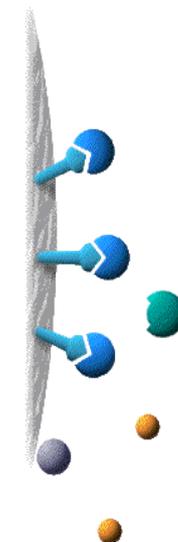
Ion Exchange  
离子交换



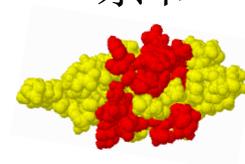
Hydrophobic interaction  
疏水层析



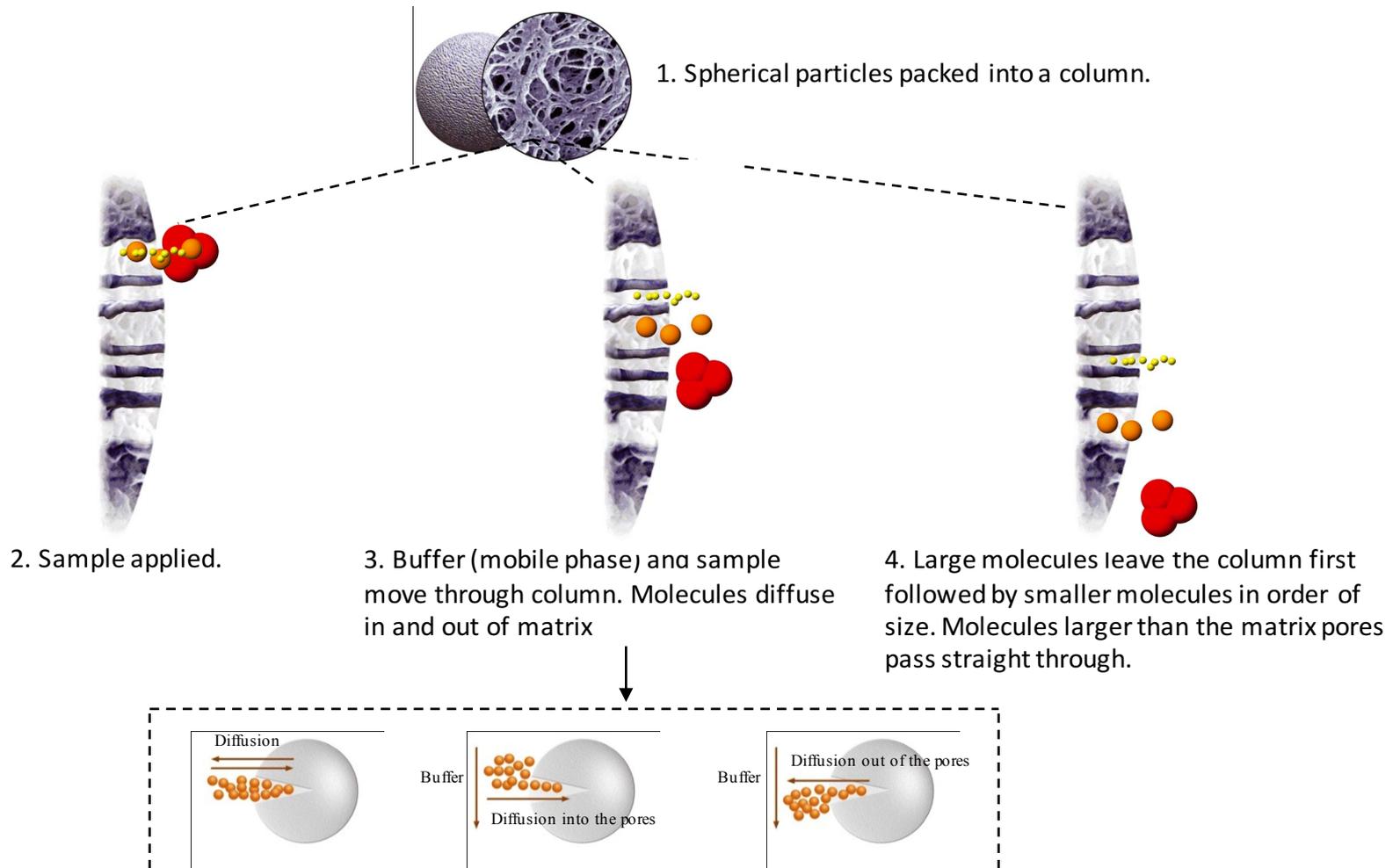
Reversed phase  
反相



Affinity  
亲和



# 凝胶过滤层析

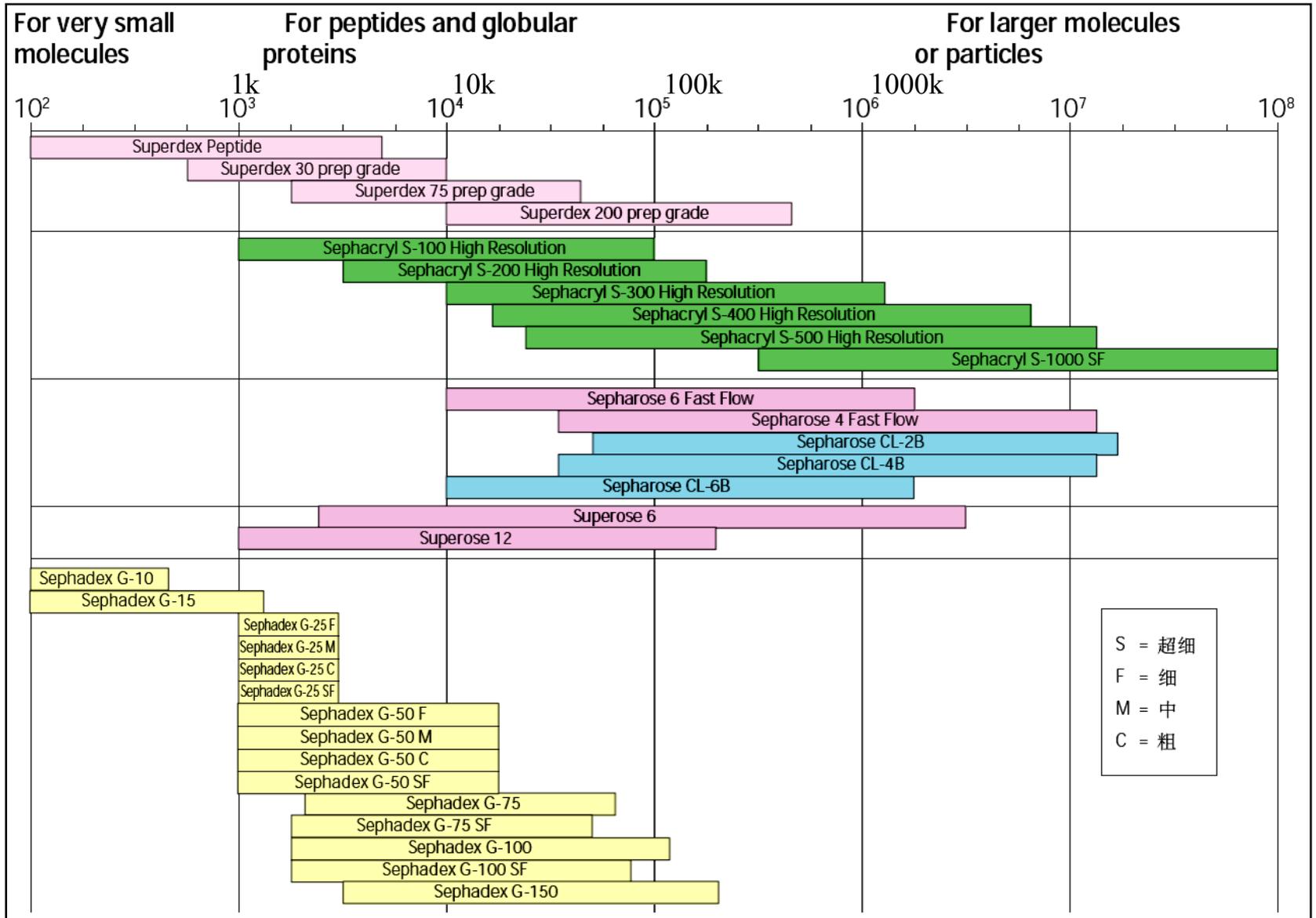


根据分子的大小不同来分离的，大分子由于进入不到填料孔径内，走的路径短所以先从层析柱中流出来，小分子相反。

# 凝胶过滤层析

- 凝胶过滤层析(gel filtration chromatography)法又称为排阻层析或分子筛方法，主要是根据蛋白质的大小和形状，即蛋白质的质量进行分离和纯化。层析柱中的填料是某些惰性的多孔网状结构物质，多是交联的聚糖（如葡聚糖或琼脂糖）类物质，使蛋白质中的物质**按分子大小的不同**进行分离。也叫做分子排阻层析或者分子筛。
- 一般是大分子先流出来，小分子后流出来。

# 不同填料有特定的分离范围



# Superdex200

## Column data

Matrix	Composite of cross-linked agarose and <b>dextran</b>	
Bed dimensions	10 × 300–310 mm	
Bed volume	Approximately 24 ml	
Column efficiency, N/M	>30 000 m <sup>-1</sup>	
Average Particle Size	13 µm	
pH stability range		
regular use	3–12	
cleaning	1–14	
Temperature		
operating	+4 to +40 °C	
storage	+4 to +30 °C	
	<b>Superdex 75</b>	<b>Superdex 200</b>
Exclusion limit, M <sub>r</sub> , globular proteins	Approx. 1x10 <sup>5</sup>	Approx. 1.3x10 <sup>6</sup>
Optimum separation range		
globular proteins, M <sub>r</sub>	3 000–70 000	10 000–600 000
dextrans	500–30 000	1000–100 000
Flow rate (water at room temperature)		
recommended	0.5–1.0 ml/min	0.25–0.75 ml/min
maximum	1.5 ml/min	1 ml/min
Pressure over column		
maximum	1.8 MPa, 18 bar, 261 psi	1.5 MPa, 15 bar, 218 psi

## Column Superdex 200 10/300 GL

Sample:

1. Thyroglobulin (M<sub>r</sub> 669 000) 5 mg/ml
2. Ferritin (M<sub>r</sub> 440 000) 0.4 mg/ml
3. BSA (M<sub>r</sub> 67 000) 8 mg/ml
4. B-lactoglobulin (M<sub>r</sub> 35 000) 2.5 mg/ml
5. Ribonuclease A (M<sub>r</sub> 13 700) 5 mg/ml
6. Cytochrome C (M<sub>r</sub> 13 600) 1.5 mg/ml
7. Aprotinin (M<sub>r</sub> 6 512) 2 mg/ml
8. Vitamin B12 (M<sub>r</sub> 1 355) 0.1 mg/ml

Sample volume: 500 µl  
 Eluent: 0.05 M phosphate buffer, 0.15 M NaCl, pH 7.0  
 Flow rate: 0.4 ml/min, room temperature  
 Detection: 0.5 AUFS, 280 nm

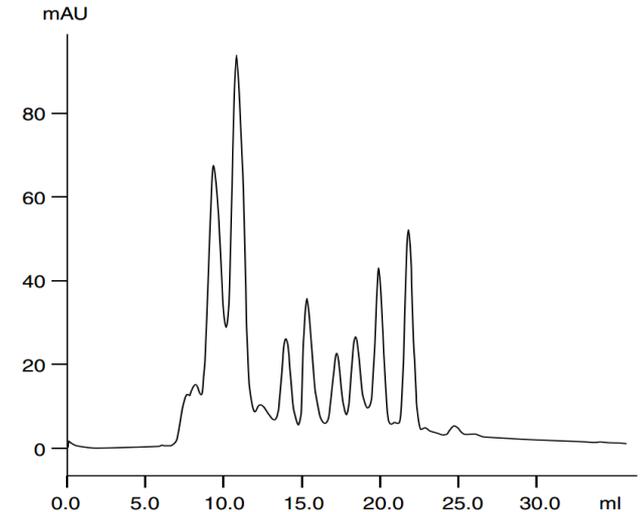
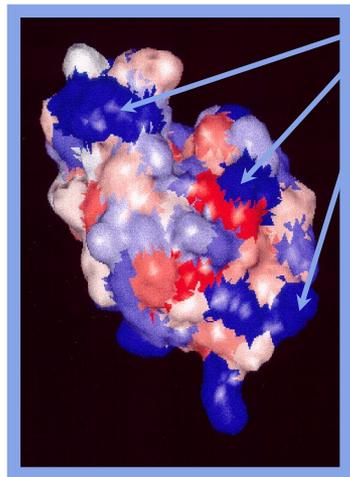


Fig. 3. Typical chromatogram from a function test of Superdex 200 10/300 GL.

# 离子交换层析 (IEX)

- 离子交换层析是一种吸附层析,根据带电荷的分子和层析填料上相反电荷之间可逆的相互作用进行分离.
- 离子交换层析是基于分子之间电荷的差异进行分离.

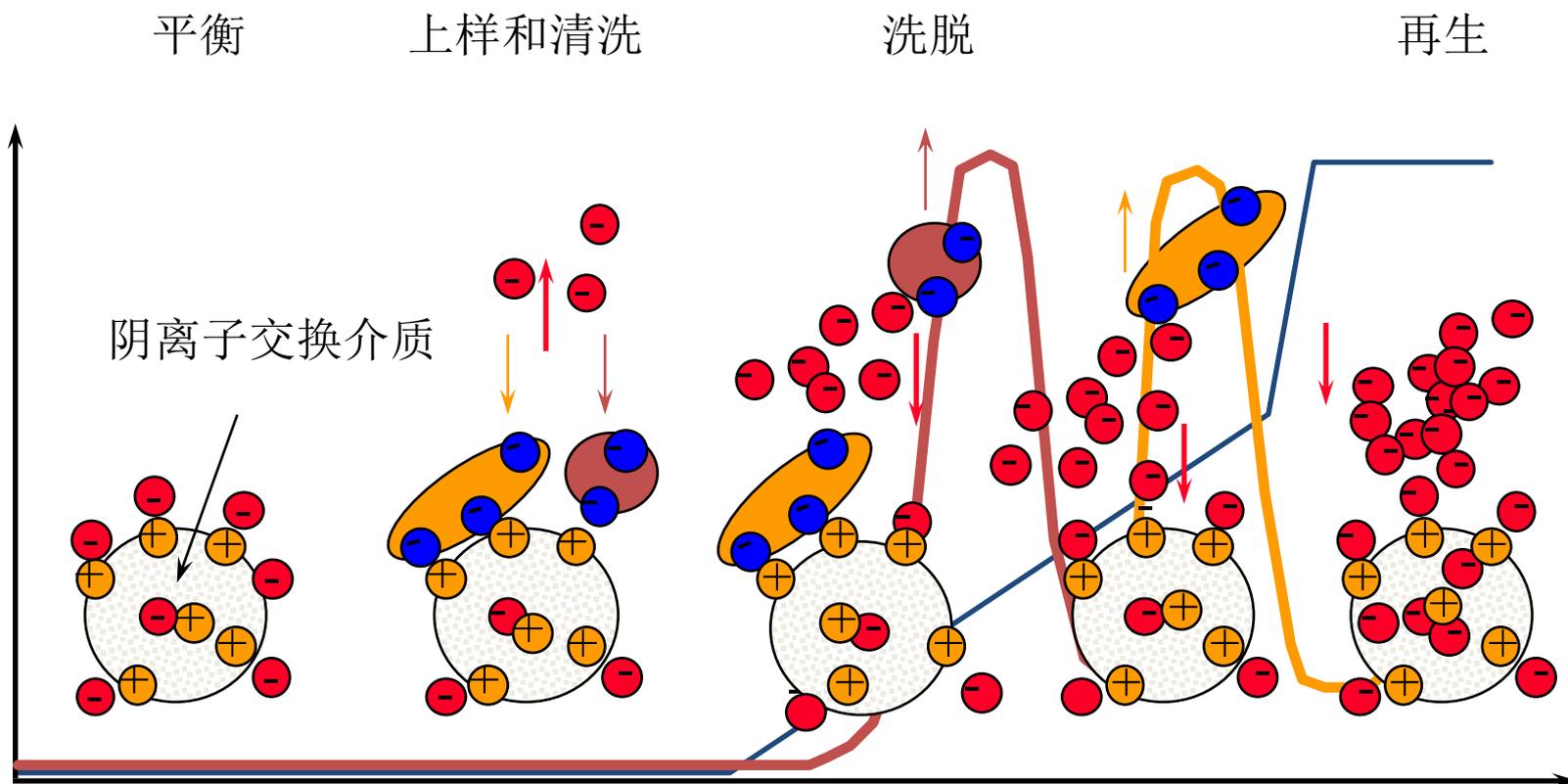


带电荷的表面

- 生物大分子如蛋白质的表面是带有电荷的
- 净电荷是正的或负的
- 净电荷随pH改变

# 离子交换的原理

——生物大分子和填料相互结合，在一定的条件下又可以解离。



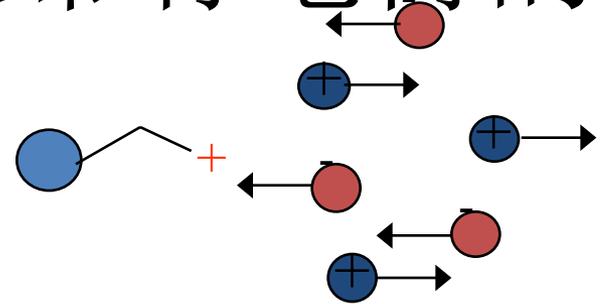
# 离子交换填料上也是带有电荷的

- 阴离子交换填料

- ✓ 阴离子带负电荷

- ✓ 阴离子交换剂是带正电荷的配基，结合带负电荷的分子，替换样品溶液中的阴离子

- ✓ 最常见的配基有 **Q, DEAE, ANX**

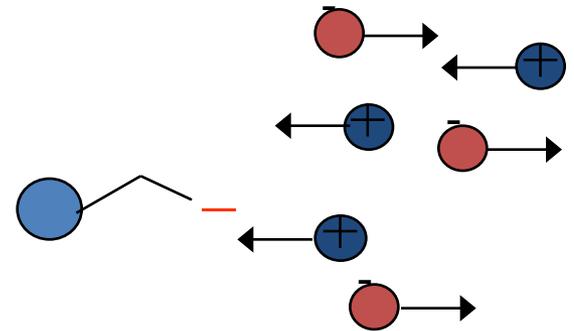


- 阳离子交换填料

- ✓ 阳离子带正电荷

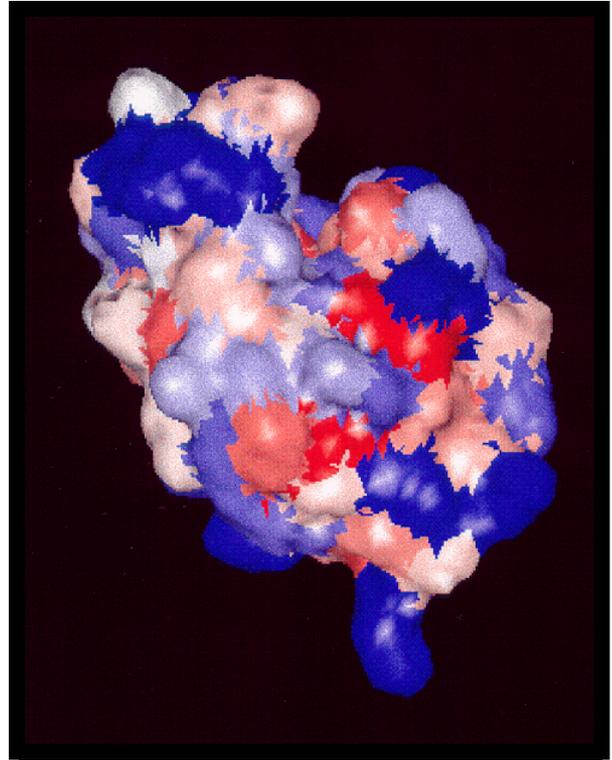
- ✓ 阳离子交换剂是带负电荷的配基，结合带正电荷的分子，替换样品溶液中的阳离子

- ✓ 最常见的配基有 **S, SP, CM**

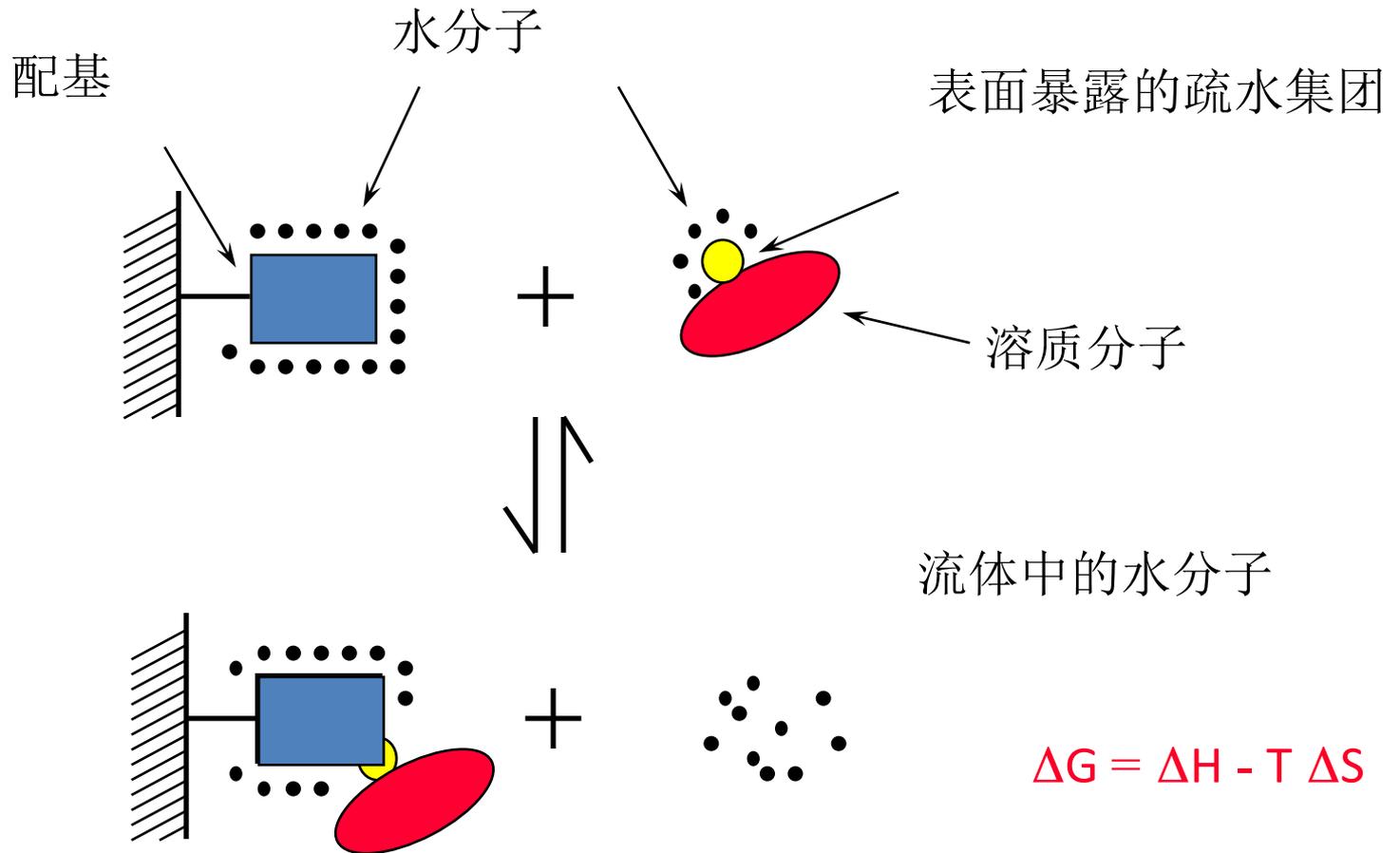


# 什么是疏水层析?

- 疏水层析是一种液相吸附层系，它是依据生物分子之间的疏水性的差别来进行分离的。
- 组成蛋白质的氨基酸有的是疏水性质的，所以蛋白质上具有一些疏水区域。



将疏水性的化学集团偶联到填料上，这种填料就可以和蛋白质以疏水作用相互结合

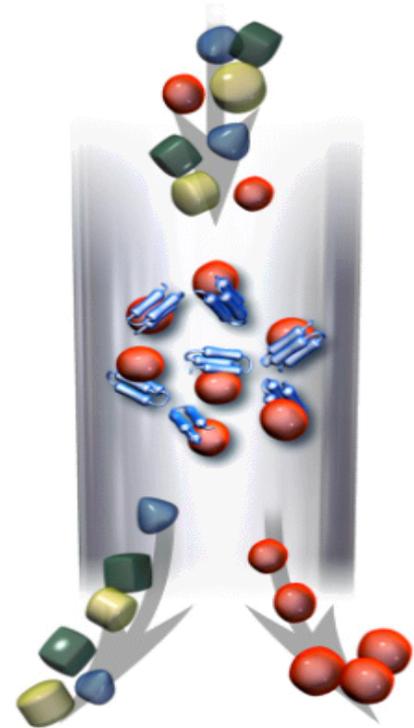
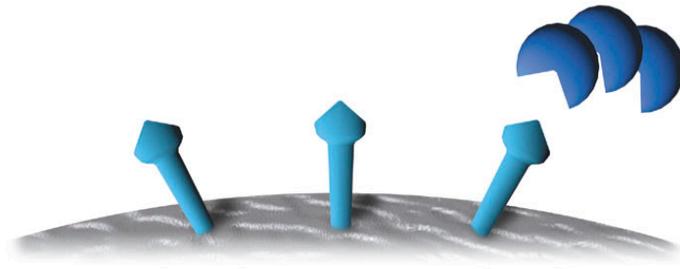


# 什么是亲和层析?

- 亲和层析是一种通过生物分子之间的特异性的相互作用来分离物质的层析方法.如酶和底物、抗原与抗体的非常专一的相互作用。将配基固定在填料上，就可以结合相应的生物分子，再采用合适的方法使之解离。

## 亲和层析的用途:

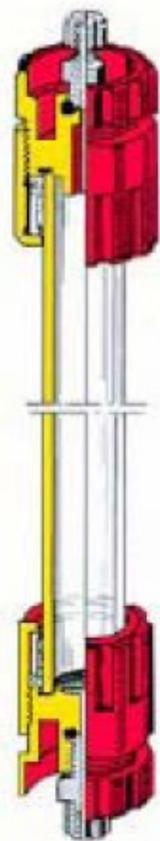
- 带有标签的蛋白
- 酶
- 单克隆和多克隆抗体
- DNA结合蛋白 .....



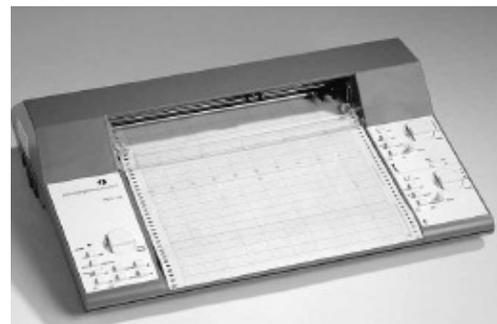
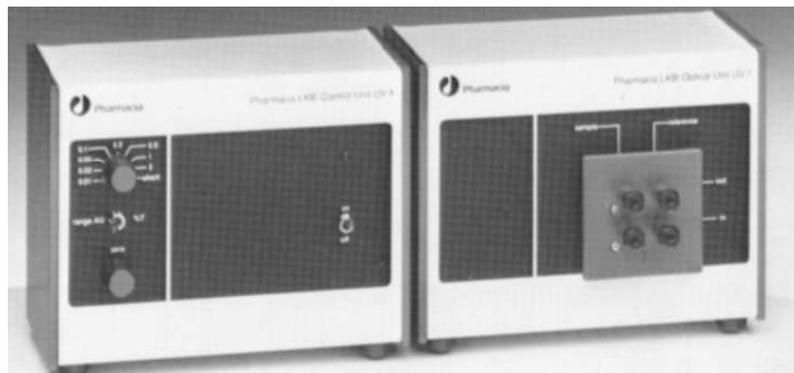
# 层析系统



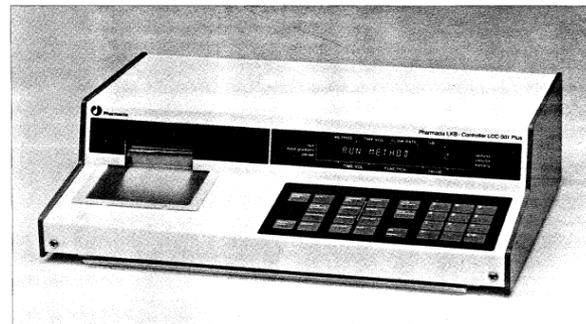
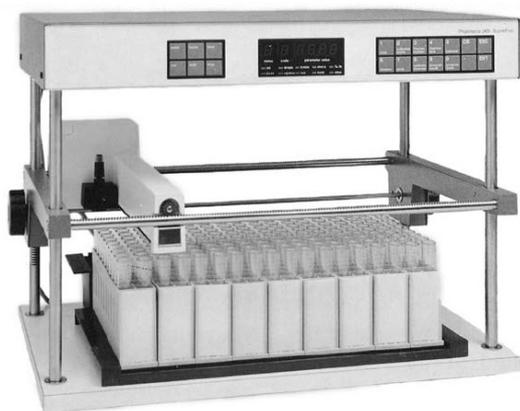
层析设备是逐渐发展的，以往做层析设备需要用到多种设备，如泵、检测器、记录仪等，AKTApurifier将各种设备整合到了一起，通过软件来控制层析过程。



C 空柱



Liquid Chromatography Controller  
LCC-501 Plus



# AKTApurifier



# 液体输送系统-柱塞泵

流速范围：  
10ul/min~100ml/min

最高压力：20MP

 Pump P-901 和 Pump P-903

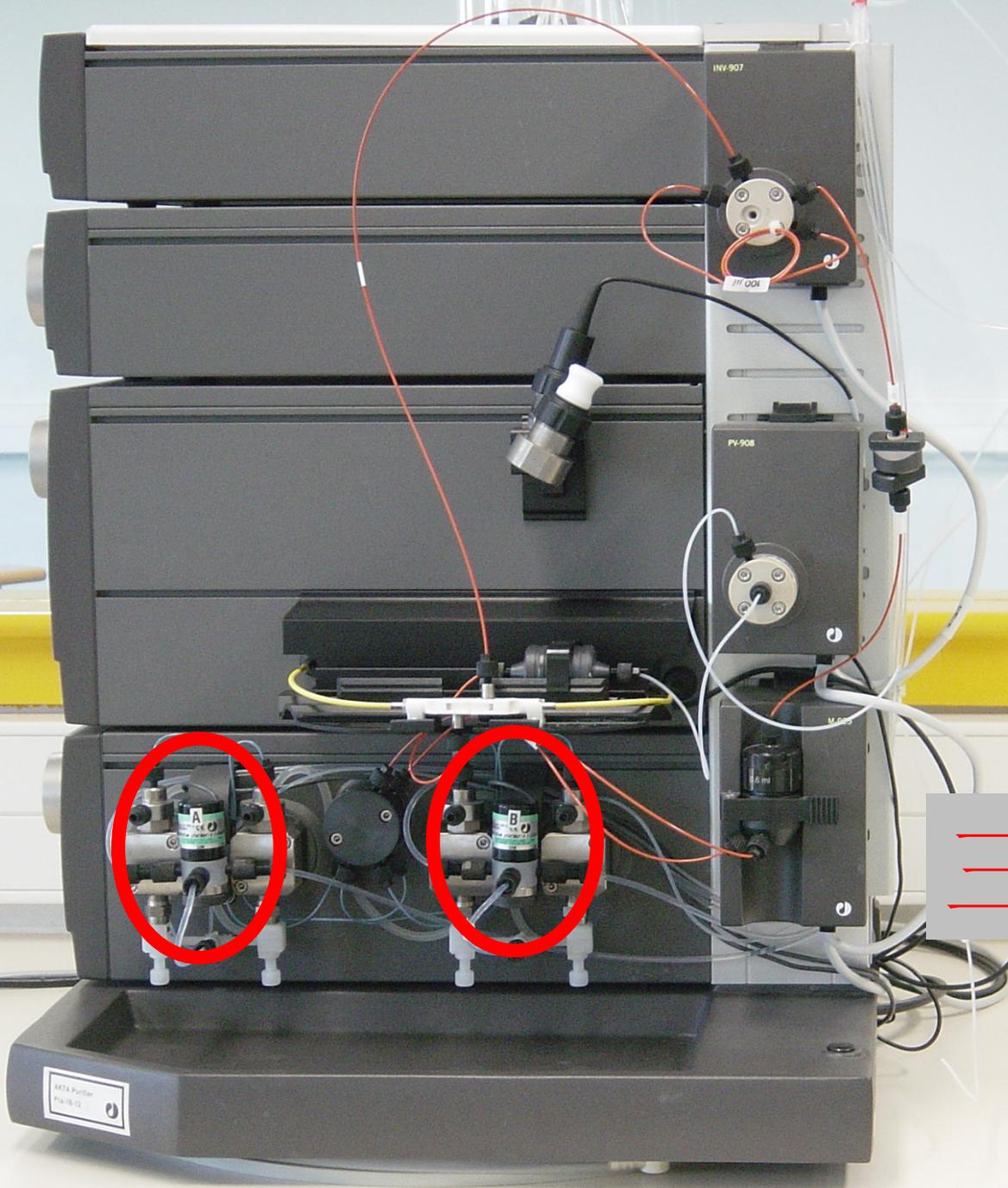


# 检测系统-紫外检测器

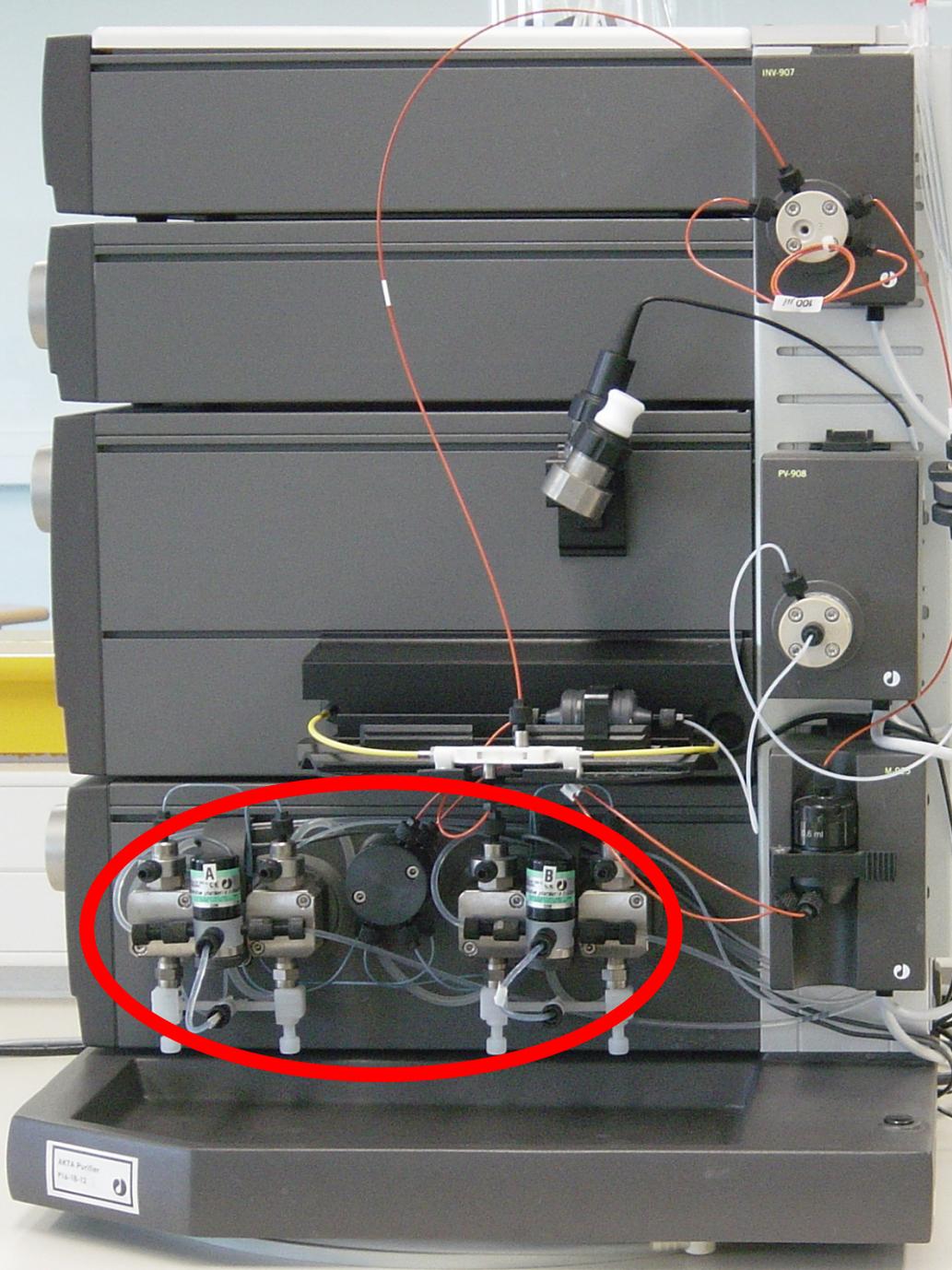
- 紫外吸光值
  - 190nm~700nm
  - 同时检测三个波长
  - 氙灯
- 电导
- pH

Monitor UV-900





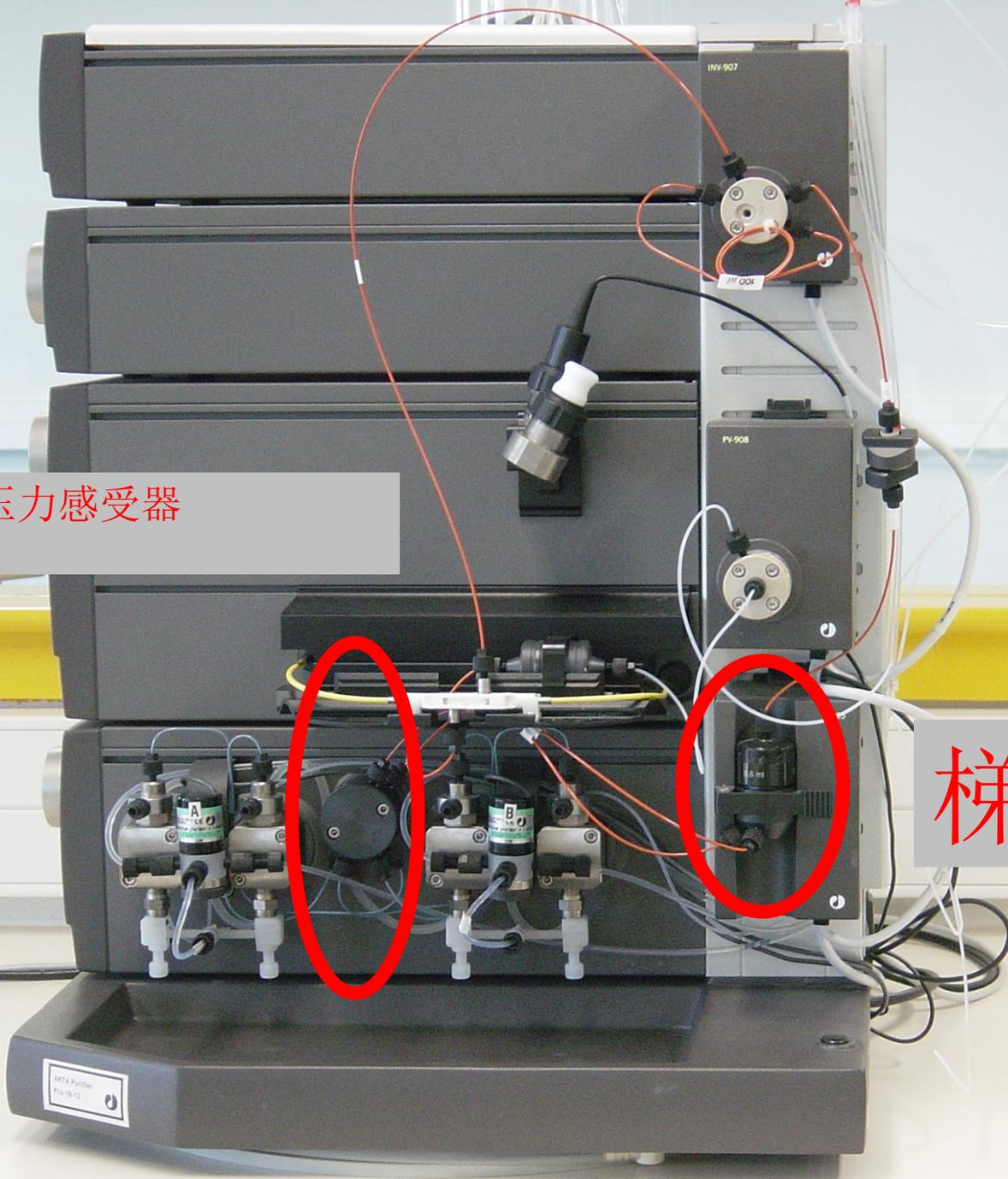
三通阀

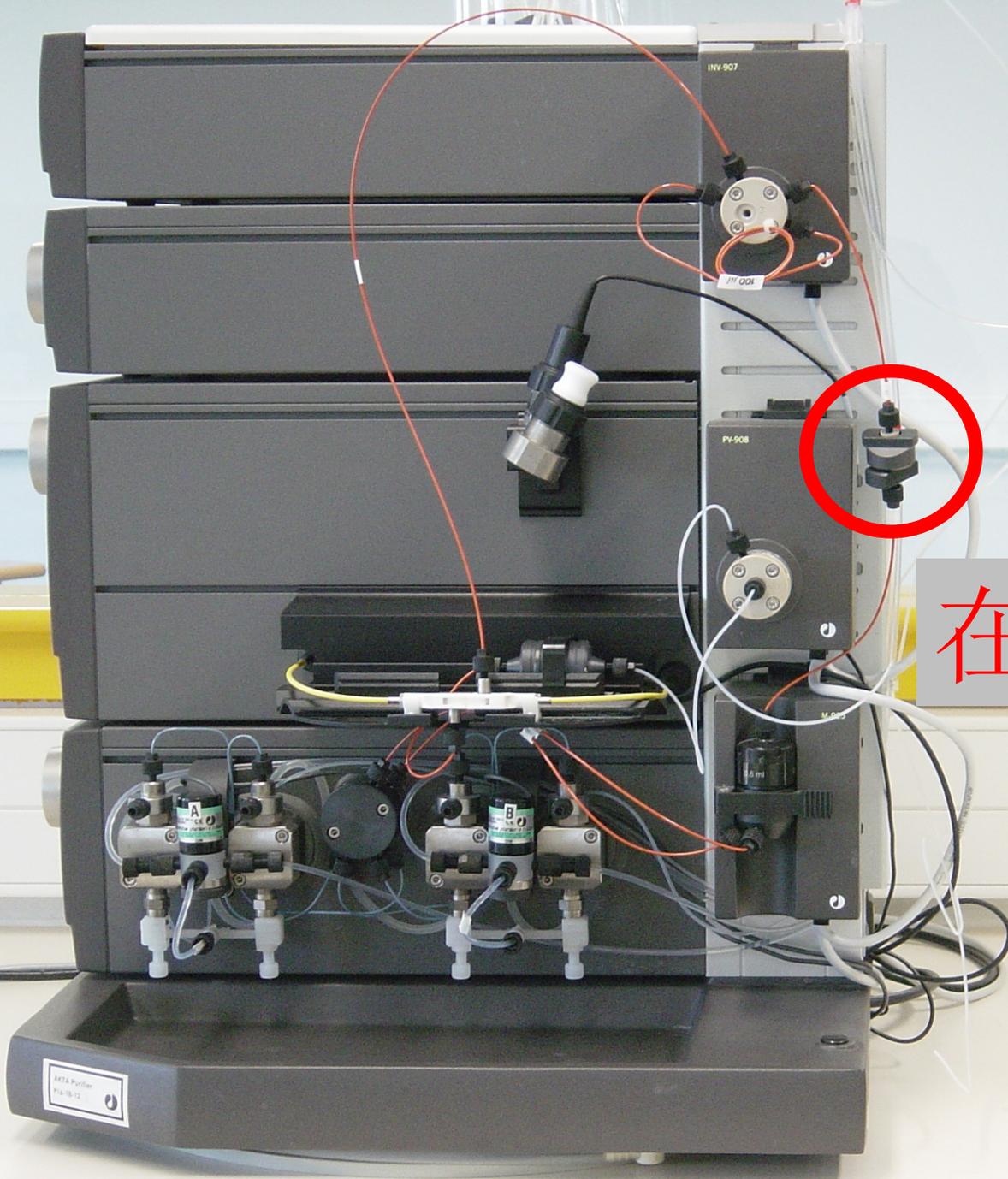


系统泵  
双泵，四泵头

压力感受器

梯度混合器

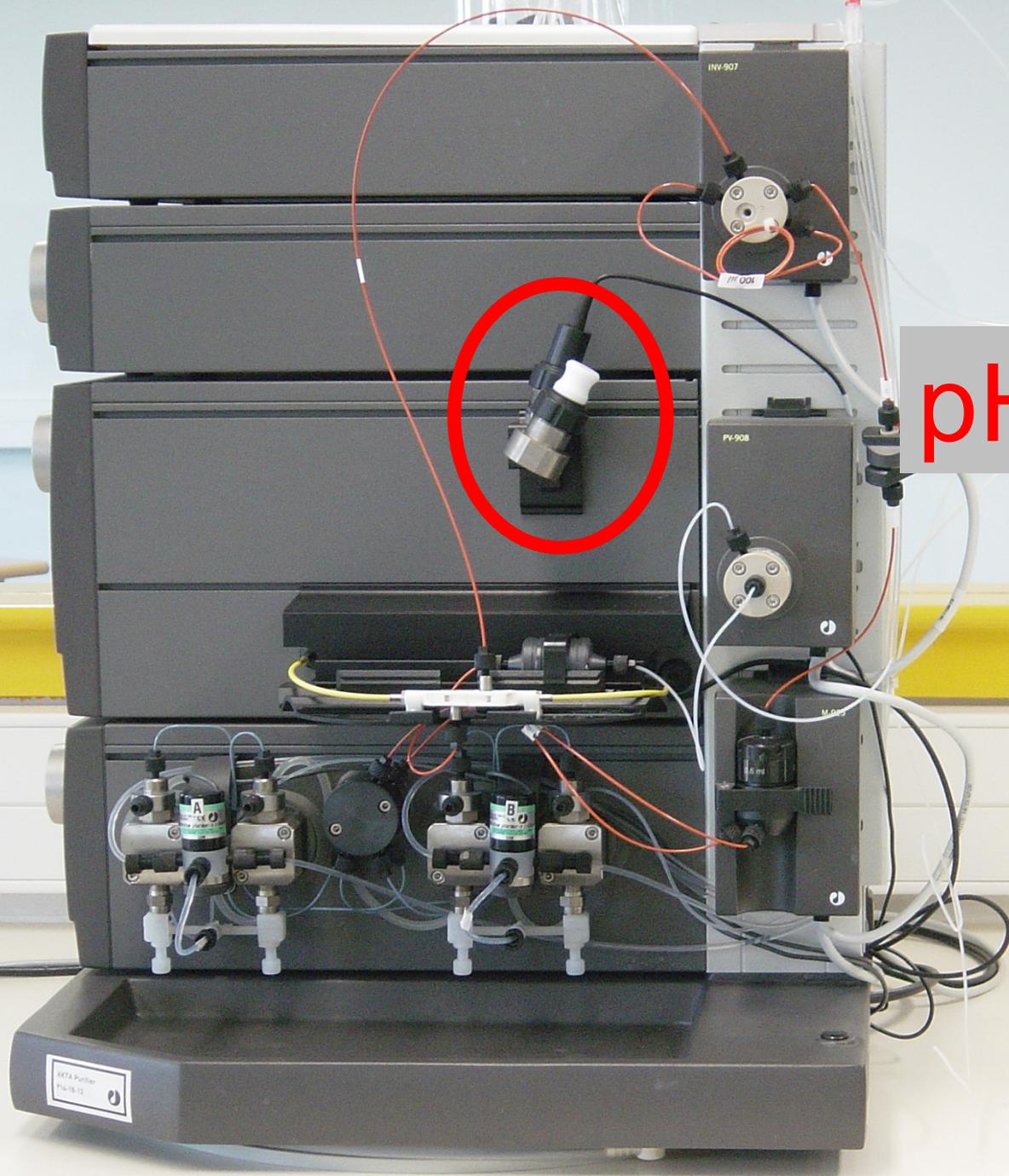




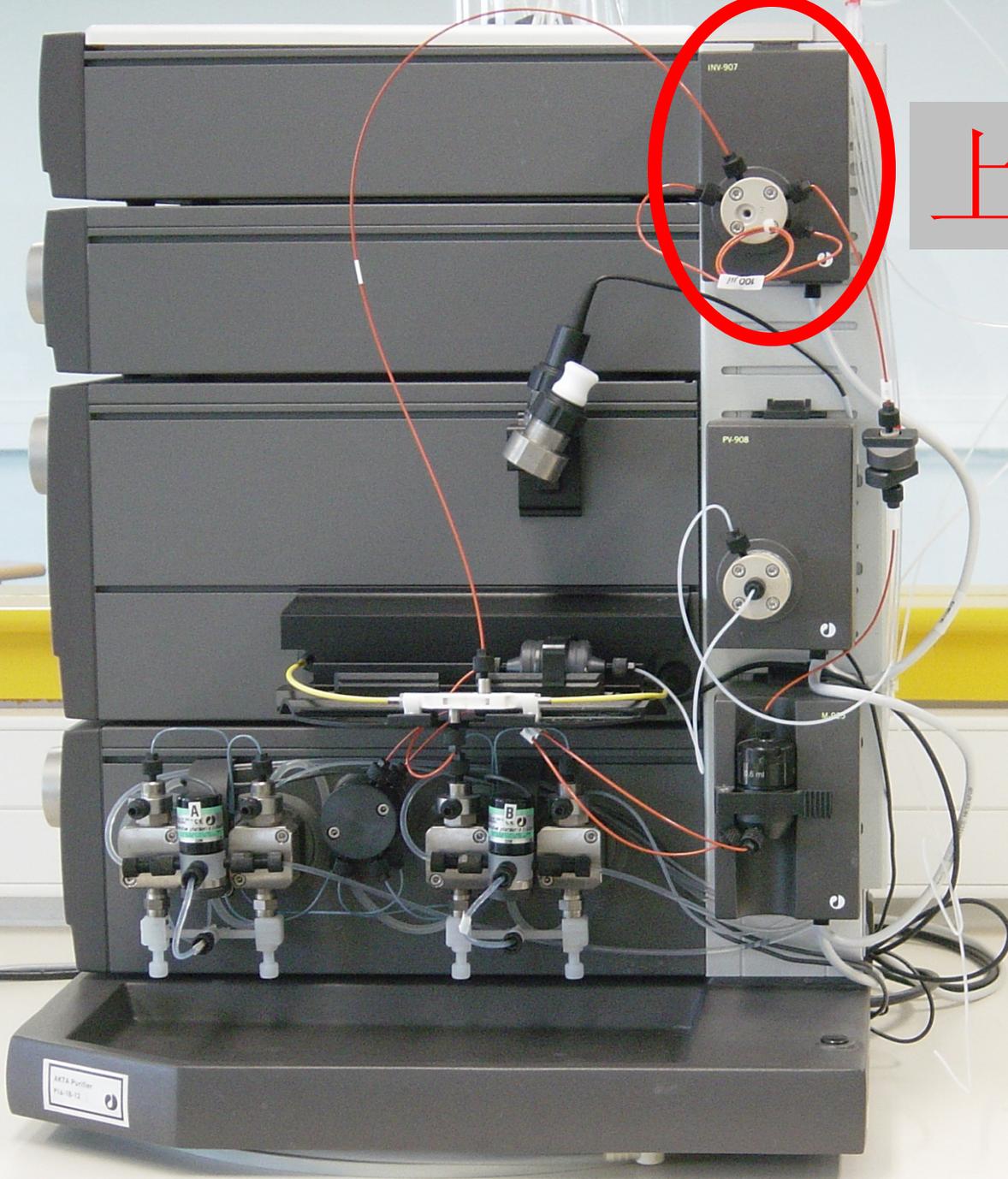
在位过滤器

# pH流动池

从电导流动池出来到达pH流动池可以演示pH探头的使用方法

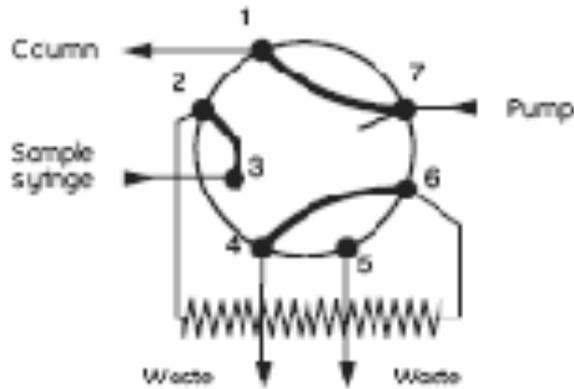


上样阀

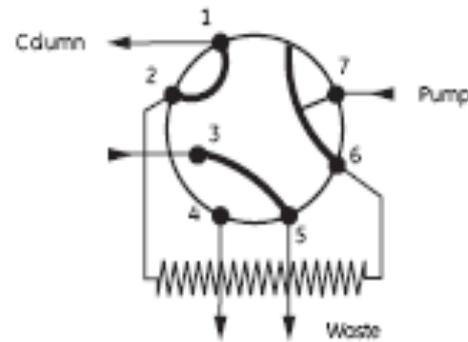


# 上样阀的三种状态

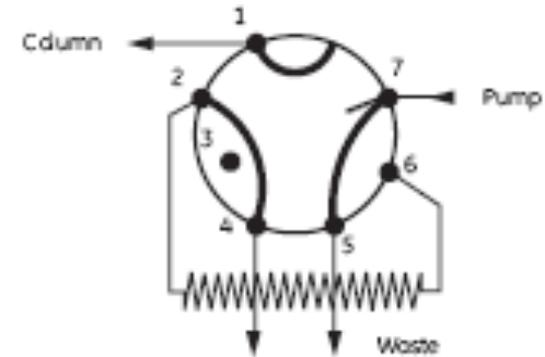
LOAD, position 1



INJECT, position 2



WASTE, position 3

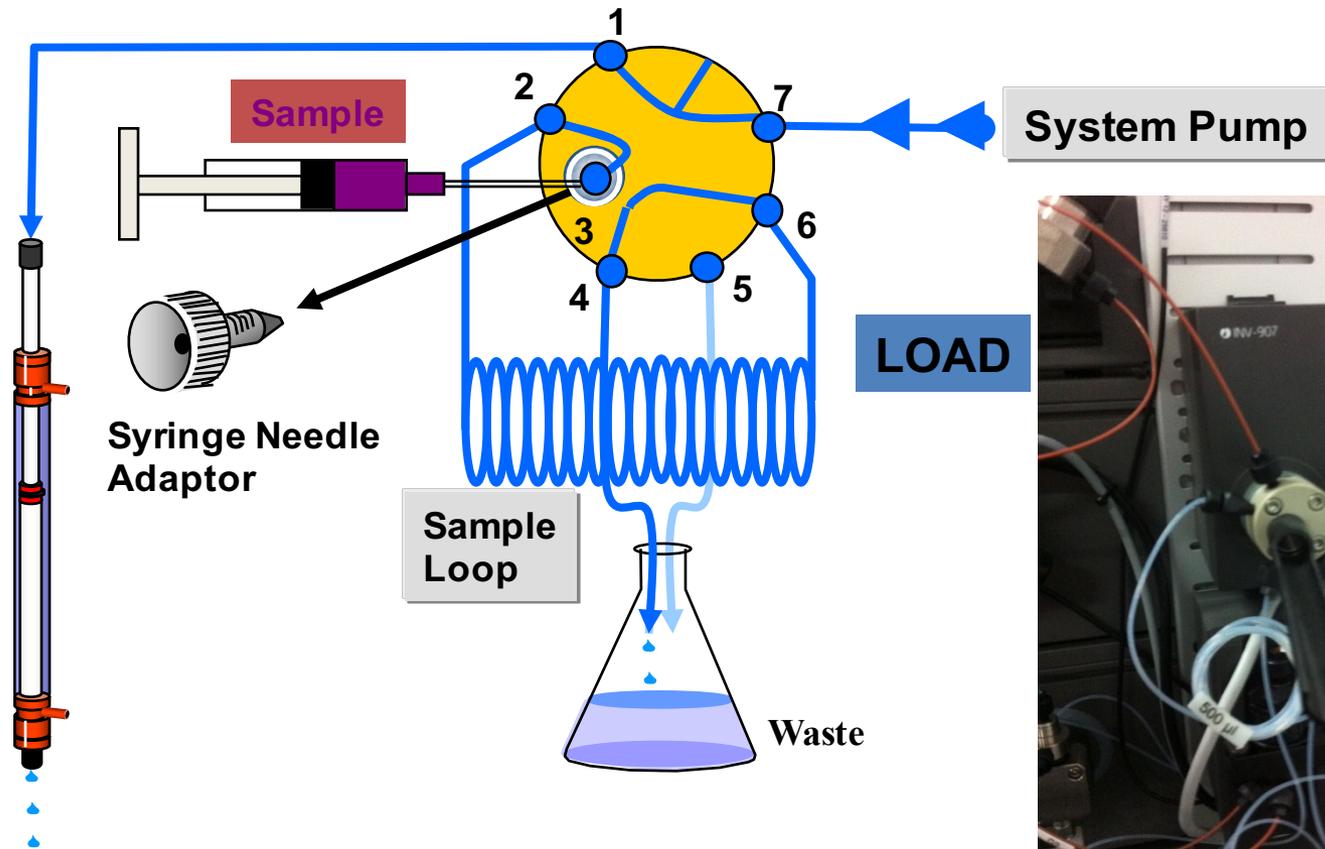


除了使用样品环上样外根据不样品体积还可以采用其他的上样方式如：

- Sample loop: 0.01~5ml
- Superloop: 1ml~150ml
- Sample pump: 0.5~1L
- System pump: >50ml

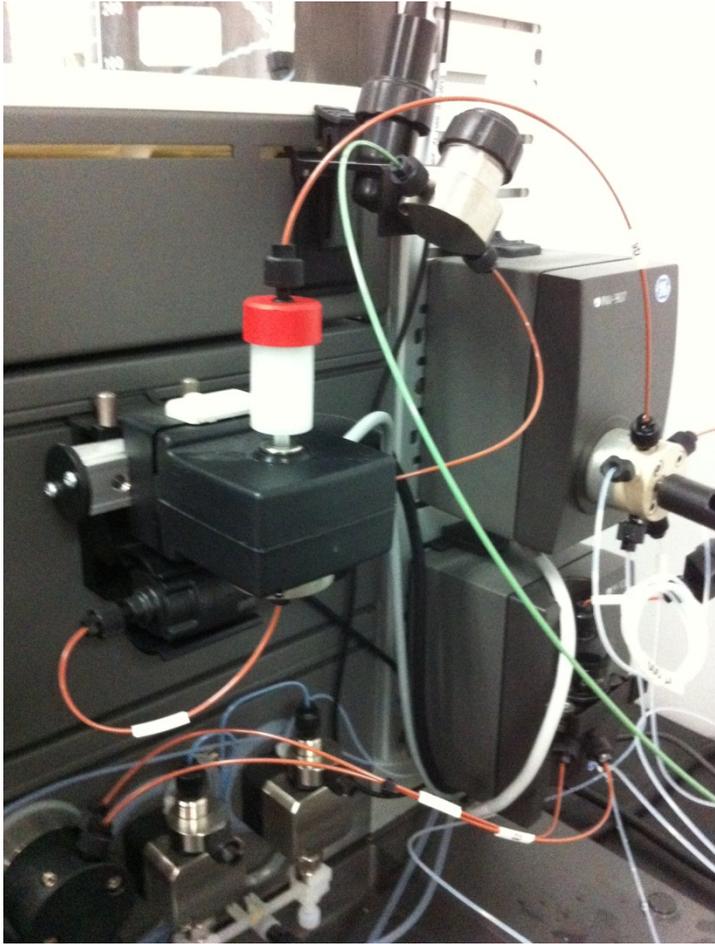


上样阀是个7通阀，阀芯上的通路决定了液体的流向，有三种状态：load, inject, waste



**Load** 状态下的通路为从泵过来的液体通过7到1到柱子。样品环接在2和6之间  
这时如果将样品从3号打进去就会打到2号进入样品环充满整个样品环后从4号流出  
也可以将loop换成super loop，位置还是接在2、6之间

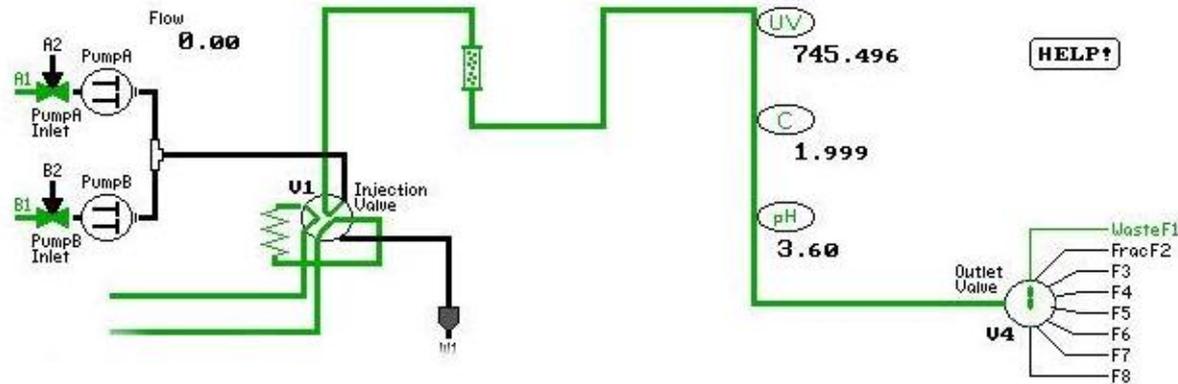
# 柱位阀



# 样品收集器



# 流路介绍



## 系统流路图

# 仪器操作

Unicorn Software



# Unicorn软件界面



# 系统控制窗口

The screenshot displays the 'System Control 1 - System 1' software interface. At the top, the title bar shows the method name and result path. Below the title bar is a menu bar (File, View, Manual, System, Help) and a toolbar with icons for Run, Hold, Pause, Continue, End, and other functions. A 'Run Data' panel provides a summary of system parameters: Instruments (Ready), Connection (YES), Run Status (Pause), Acc. Volume (0.00 ml), Block Volume (0.00 ml), Acc. Time (0.02 min), Block Time (0.00 min), Flow (10.000 ml/min), Pressure (0.21 MPa), UV (-1149.087 mAU), Conc (0.0 %B), TubeNumber (Waste), and V1\_Inject (Waste). The main area features a 'Curves' plot showing UV (blue line) and Conc (green line) over time (0.00 to 1.00 ml). A 'System 1 Pump Instructions' dialog box is open, showing instructions for PumpA and PumpB, with parameters set to 'On'. Below the plot is a 'Flow Scheme' diagram showing the flow path from PumpA and PumpB through an injection valve (V1) and a detector. The flow rate is 10.00 ml/min. The detector shows UV at -1149.087 and Conc at 1.396. A 'Logbook' panel at the bottom shows a list of executed commands, including '0.00 ml User default in control of the run' and '0.00 ml PumpWashBasic On, On (Manual)'. The Windows taskbar at the bottom shows the system time as 16:20.

工具栏Toolbar

运行数据Run Data

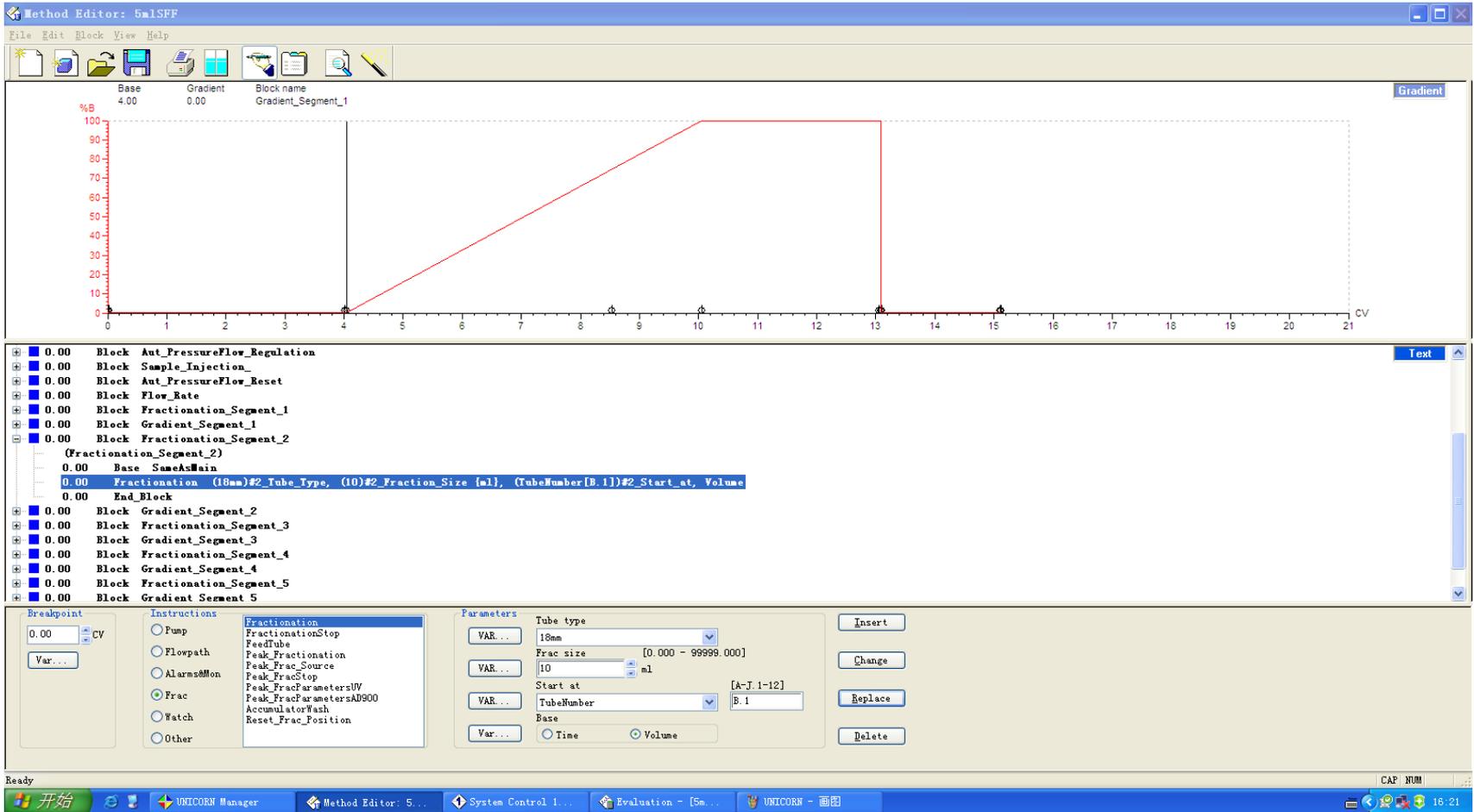
运行时各种检测曲线Curves

流路图Flow Scheme

执行过的命令在Logbook中

对设备的手动控制，层析过程的检测

# 方法编辑窗口



编辑一个全自动运行的方法，让AKTA全自动运行

# 结果处理窗口



层析结果分析和处理，包括积分、输出报告、以及曲线的处理

# 实验操作



## 准备缓冲液、样品和层析柱

- 样品：碱性磷酸酶（上样量100ul）
- 缓冲液：含0.1M NaCl的Tris缓冲液
- 层析柱：Superdex200 10/300GL
- \*\*所有的工作溶液和样品必须经过0.45μm的滤膜过滤，以防堵塞层析柱



## 清洗及管道准备

- 让管道内充满缓冲液
- System Control窗口中的主菜单中点击Manual，选择 Pump→Pump wash purifier，选中A管道为ON， Execute。



## 安装层析柱

- Manual里选择Pump→Flow rate，输入流速0.5mL/min， Execute。
- 将柱子连接到系统中，**注意避免气泡进入柱子**
- 平衡层析柱，至Uv数值无变化，基线走平



## 开始纯化

- 将样品推入样品环：将样品吸进注射器，**推掉气泡**，从InjectionValve的3号位推入，推好后不要取下注射器；
- 等待柱子平衡好 (UV, 电导无变化)
- 上样：在Manual里选择Flowpath→InjectionValve→Inject， Execute。



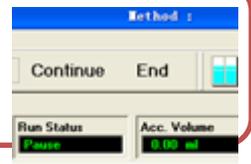
## 收集样品

- 检查收集器是否已经准备就绪
- Frac→Man\_fractionation，在fraction size中输入每管收集体积， execute。
- 结束收集：Frac→fractionation\_stop， execute。



## 结束实验

- 按工具栏中的end按钮结束实验
- 20%的乙醇冲洗系统和柱子后，拆下柱子。



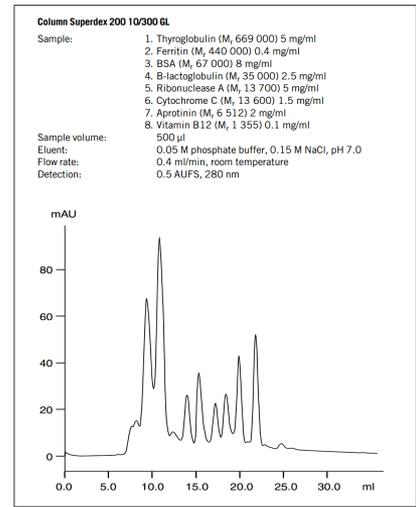
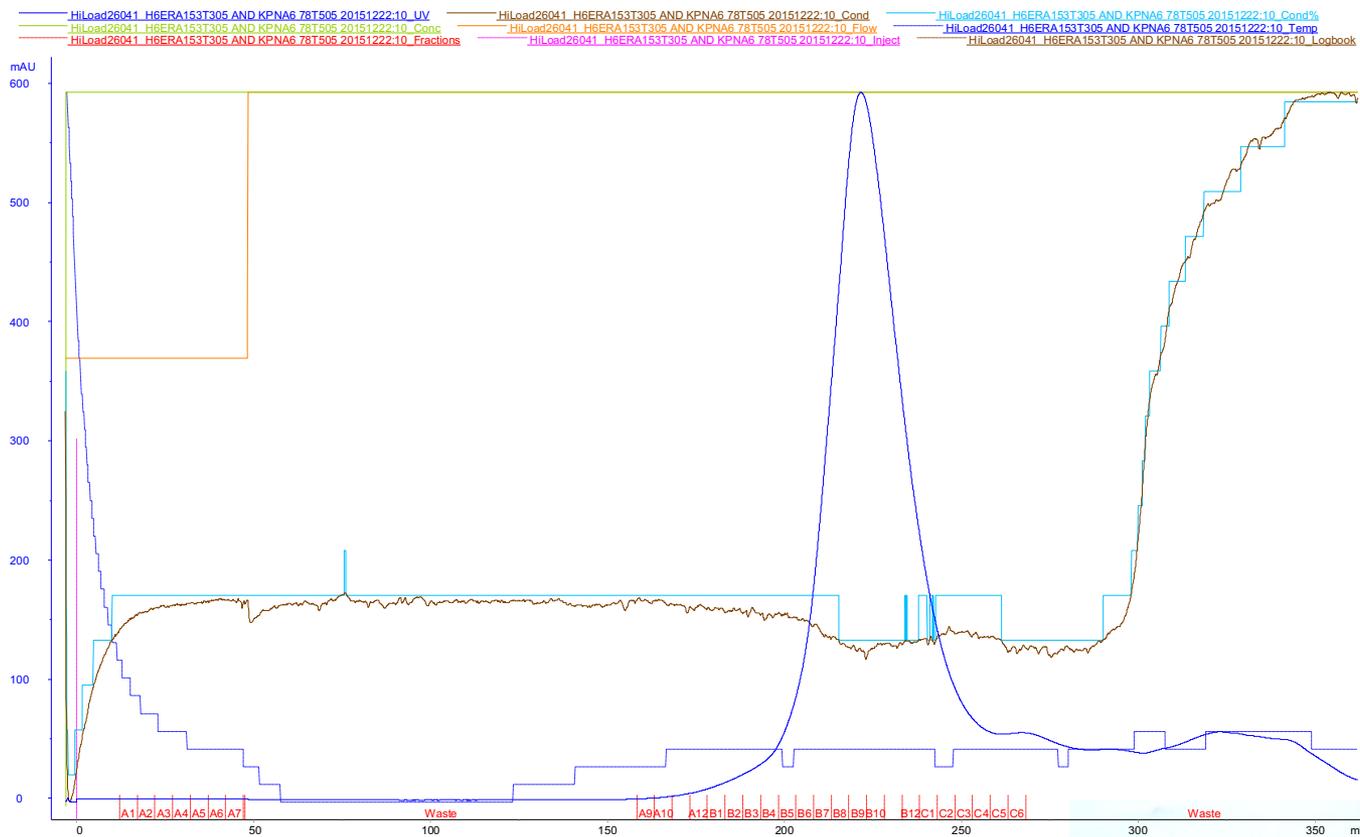
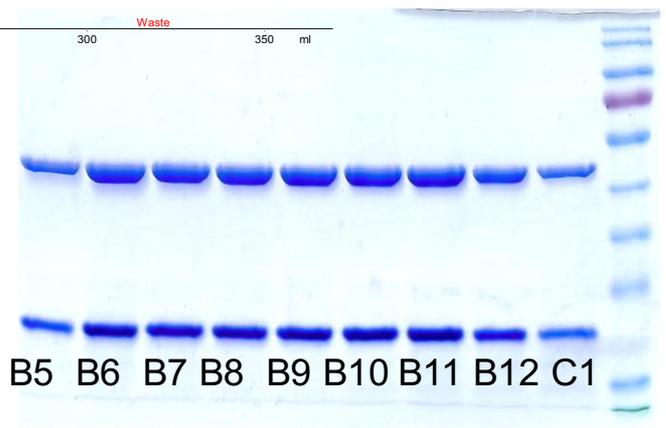


Fig. 3. Typical chromatogram from a function test of Superdex 200 10/300 GL.



# 实验结果

# 牛血清白蛋白（BSA）的脱盐实验

# 实验目的和原理

- 目的：利用脱盐实验熟悉蛋白纯化系统操作
- 原理：蛋白质是生物大分子，分子量比盐等小分子大许多倍，用凝胶过滤方法可以非常容易的将大分子蛋白质和小分子盐类分开达到脱盐的目的，可通过紫外和电导检测器监控整个层析脱盐的过程。在该实验中，蛋白质是大分子，盐离子是小分子，因此蛋白质先出来（**280nm**有特征吸收），盐离子后出来（电导值显示）



## 准备缓冲液、样品和层析柱

- 样品: 1mg/mLBSA, 0.5M NaCl溶液 2mL
- 缓冲液: 去离子水
- 层析柱: HiTrap Desalting 5 mL
- \*\*所有的工作溶液和样品必须经过0.45 $\mu$ m的滤膜过滤, 以防堵塞层析柱



## 清洗及管道准备

- 让管道内充满缓冲液
- System Control窗口中的主菜单中点击Manual, 选择 Pump→Pump wash purifier, 选中A管道为ON, Execute。



## 安装层析柱

- Manual里选择Pump→Flow rate, 输入流速0.5mL/min, Execute。
- 将柱子连接到系统中, 注意避免气泡进入柱子
- 流速升至5mL/min, 平衡层析柱



## 开始纯化

- 将样品推入样品环: 将样品吸进注射器, 推掉气泡, 从InjectionValve的3号位推入, 推好后不要取下注射器;
- 等待柱子平衡好 (UV, 电导无变化)
- 上样: 在Manual里选择Flowpath→InjectionValve→Inject, Execute。



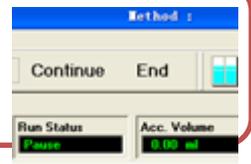
## 收集样品

- 检查收集器是否已经准备就绪
- Frac→Man\_fractionation, 在fraction size中输入每管收集体积, execute。
- 结束收集: Frac→fractionation\_stop, execute。



## 结束实验

- 按工具栏中的end按钮结束实验
- 20%的乙醇冲洗系统和柱子后, 拆下柱子。



# 实验结果

