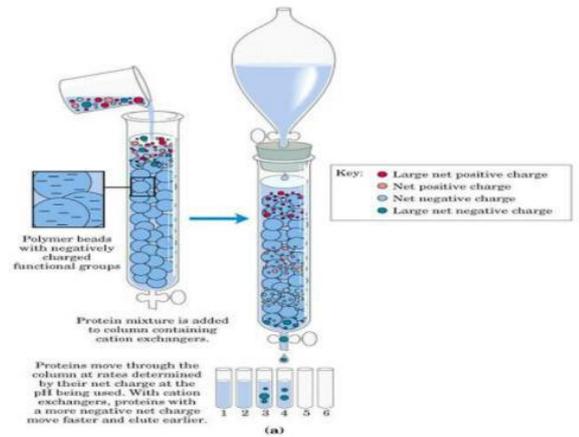


离子交换色谱的原理介绍和实际操作

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（ $<100\text{mmol/L}$ ）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。

