

GE ÄKTA™ avant 25 蛋白液相色谱系统纯化蛋白

Protein Purification with GE ÄKTATM avant 25 Liquid Chromatography System

赵晓波, 陈庆峰, 欧阳亦聃*

作物遗传改良国家重点实验室, 华中农业大学, 武汉

*通讯作者邮箱: diana1983941@mail.hzau.edu.cn

引用格式: 赵晓波, 陈庆峰, 欧阳亦聃. (2018). GE ÄKTA™ avant 25 蛋白液相色谱系统纯化蛋白. *Bio-101* e1010128. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010128.

How to cite: Zhao, X. B., Chen, Q. F. and Ouyang, Y. D. (2018). Protein purification with GE ÄKTATM avant 25 liquid chromatography system. *Bio-101* e1010128. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010128. (in Chinese)

实验原理: ÄKTA™ avant 25 蛋白液相色谱系统是 GE Healthcare 开发的新一代适合现代工艺、并且实现了实验条件智能优化的快速蛋白纯化设备。该系统是基于中低压液相色谱原理, 配用高压输液泵, 采用高灵敏检测器、梯度洗脱装置、自动收集装置和电脑控制等发展起来的现代液相色谱。使用该系统并和相应的纯化用层析柱(预装或自填)一起, 利用凝胶过滤、离子交换、疏水、亲和、反向等层析技术, 得到高纯度的生物分子。该系统专门用来分离蛋白质、多肽及多核苷酸, 主要应用于蛋白、有机化合物的分离纯化。优点是比 HPLC 操作过程简单、费时少、重复性好, 缺点是仪器及层析柱价格较昂贵。

实验目的: 开发或优化生物大分子的纯化方法, 纯化人工合成或者表达的多肽、核酸、抗体、疫苗、抗生素等生物大分子, 用于结构或功能的研究。

关键词: 蛋白纯化, ÄKTA™ avant 25, 蛋白液相色谱系统

材料与试剂

1. 离心管
2. 22 μm 滤膜 (上海生工)
3. 20%乙醇: 国产分析纯配制
4. ddH₂O

5. Binding buffer 和 Elution buffer

注：根据纯化所用的方法及纯化柱类型不同，选用进口试剂或者高质量国产分析纯的试剂，使用 ddH₂O 配制。

仪器设备

1. ÄKTA™ avant 25 蛋白液相色谱系统 (GE Healthcare, 美国)

ÄKTA™ avant 25 蛋白液相色谱系统主要参数：

- 1) 系统泵流速：0.001-25 ml/min，压力范围：0-20 MPa (200bar, 2900 psi)
- 2) 样品泵流速：0.01-25 ml/min，压力范围：0-10 MPa (100bar, 1450 psi)
- 3) 紫外可见检测器波长范围：全波长检测器，190-700 nm，压力：0-2 MPa
- 4) 电导检测器检测范围：0.01-999.99 msec/cm
- 5) 温度检测器温度范围：0-99 °C
- 6) pH 检测器检测范围：0-14 (有效使用范围 2-12)

2. 抽滤器 (Nalgen)

3. 超声仪 (国产)

4. 离心机

实验步骤

1. 在使用 ÄKTA™ avant 25 蛋白液相色谱系统前，必须经过专门的培训，了解纯化仪的基本操作和结构 ([附件 1: ÄKTA™ avant 25 蛋白液相色谱系统简要说明](#))。

注：ÄKTA™ avant 25 蛋白液相色谱系统须由经过培训的操作人员操作使用，或在操作人员的指导下使用。

2. 根据样品性质、纯化目的及后续研究内容确定纯化方法，在 GE 公司购买对应的预装层析柱，或者购买填料及空柱自行装填。
3. 仔细阅读 GE 公司 ÄKTA™ avant 25 蛋白液相色谱系统及操作软件 Unicorn 6.1 中文说明书 ([附件 2](#))，根据确定的纯化方法选择性阅读 GE 公司编撰的蛋白纯化 ([附件 3](#))、离子交换色谱及色谱聚焦原理和方法 ([附件 4](#))、凝胶过滤原理和方法等手册([附件 5](#))。

4. 根据纯化预装柱说明书，配制纯化所需的 **Buffer** 以及试剂栏中所列的试剂，根据采用的方法，可能需要对样品进行离心澄清、抽滤、冻干浓缩及透析除盐等处理。
5. 打开 ÄKTA™ avant 25 及与系统连接的电脑电源，打开 Unicorn 6.1 操作软件。
6. 将预装层析柱连接到层析柱位阀对应的进出口上。
7. 将溶液选择阀(常用 A1 和 B1)浸没在对应的 **Buffer**、ddH₂O 或者 20%乙醇中。
8. 在 Unicorn 6.1 软件界面中的 **Method Editor** 中选择 **System CIP**，根据需要对样品阀、柱位阀等使用 ddH₂O 及 **Buffer** 进行清洗。
9. 在 Unicorn 6.1 软件界面中的 **Method Editor** 中选择对应的方法及预装层析柱的型号，系统会自动设定部分参数，按照预装层析柱的说明设定层析柱位置、流速，根据需要编辑方法，包括流速、平衡体积、洗脱方式 (梯度或者线性)、洗脱体积、UV 检测波长(蛋白一般用 280 nm)等，具体和采用的方法有关，保存编辑好的方法。
10. 根据采用的方法和后续实验，选择适当的收集洗脱样品方法(按照洗脱峰收集或者定体积收集一次)，按照收集体积选择合适的收集器架子，将用于收集的离心管放在收集器架子上，关好收集器门后系统会自动识别收集器架子的类别和位置。
11. 样品上样采用的方法根据纯化方法的不同而不同，可以使用样品泵、上样环等来进行自动或手动上样。
12. 将溶液选择阀 (A1 和 B1) 浸没在对应的 **Buffer** 中，在 Unicorn 6.1 软件界面中的 **System Control** 模块中打开前面保存的方法，选择结果保存的文件夹及层析柱，点击运行符号开始运行。
13. 一般会经过层析柱平衡---上样---样品结合---样品洗脱---层析柱平衡等步骤。在 Unicorn 6.1 软件界面会根据步骤形成如下的蛋白峰图 (见图 1) (包括蛋白浓度、柱压强、电导率、pH、洗脱样品收集管编号等)。

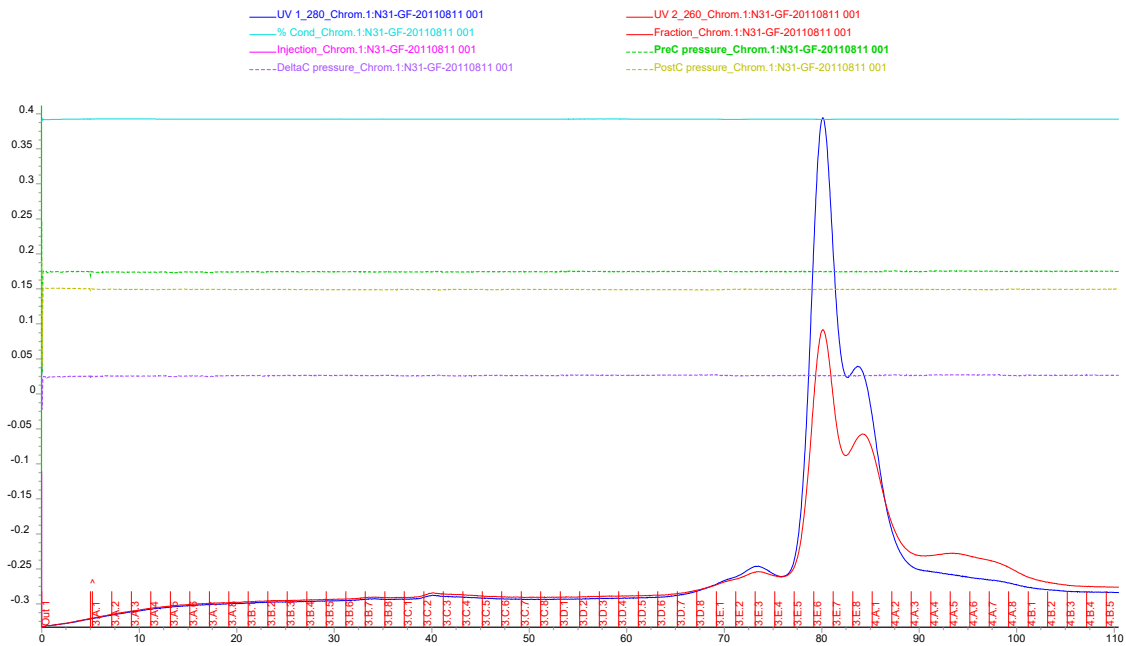


图 1. ÄKTA™ avant 25 蛋白液相色谱系统蛋白纯化峰图示意图

14. 洗脱的样品会自动收集。洗脱完成后，可以根据蛋白峰图选择需要的收集管内的样品进行保留，注意在收集管上注明编号。
15. 在 Unicorn 6.1 软件界面中的 Method Editor 中编辑 Column CIP 方法，按照预装层析柱的说明对层析柱进行“平衡---清洗---ddH₂O 清洗---20%乙醇保存”的方法运行，最终层析柱充满 20%乙醇，保存于 4 °C。
16. 对本系统也运行“清洗---ddH₂O 清洗---20%乙醇保存”的方法，最终让整个系统充满 20%乙醇用于保存，防止细菌等微生物生长。
17. 将收集器中的收集管全部拿出，关闭系统电源，退出软件，关闭电脑。
18. 利用 SDS-PAGE 及 Western blot 等方法来检测分析分离效果。

注意事项

1. 所用的试剂盒样品必须经过 22 μm 的滤膜抽滤，以免堵塞层析柱。
2. 当需要大量纯化或者分离成分较复杂的样品，或者需要比较高纯度的蛋白进行下一步实验时，才考虑使用该纯化系统，小量分离比如小量原核表达蛋白的亲和纯化以及其他对蛋白纯度要求不高的实验应考虑常规方法，如使用重力流、离心法或者注射器纯化。

3. 一般上样、结合、洗脱的过程中流速不能超过层析柱能承受的流速，注意监控层析柱的柱压，多次运行后的层析柱要及时按照说明清洗以免影响分离能力。
4. 该系统可以无人值守自动运行，但是要注意通过流速、运行时间计算所需 **Buffer** 的体积，保证提供的 **Buffer** 够用。
5. 本系统洗脱样品为自动收集，但是要注意洗脱体积不能大于每管收集量与管数的乘积。
6. 如果纯化过程中需要用不同 pH 的 **Elution buffer** 洗脱，才需要安装 pH 计。