

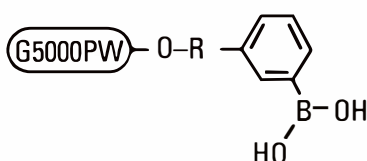
TSKgel 亲和色谱柱

TSKgel亲和色谱柱系列包括三种特异性基团的固定相（Boronate-5PW, Chelate-5PW和Heparin-5PW），以及一种化学活性官能团的固定相（Tresyl-5PW）。所有分析型TSKgel亲和色谱柱都是以TSKgel G5000PW刚性树脂为基体，颗粒粒径10 μm。该树脂是一种亲水性介质，孔径为100 nm，蛋白质排阻界限值估计为一百万道尔顿，并在pH 2-9的范围内具有优异的稳定性。

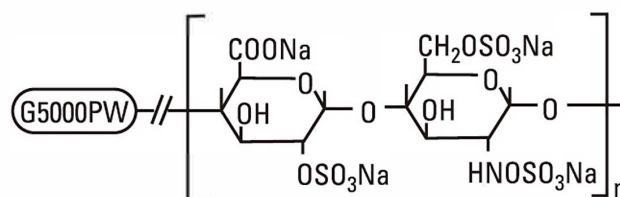
官能团的结构如图1所示。特异性配体的选择是通过样品和键合相之间的预期相互作用决定的。表1列出了每种TSKgel亲和色谱柱的典型应用。

图1：TSKgel亲和色谱柱官能团的结构

TSKgel Boronate-5PW

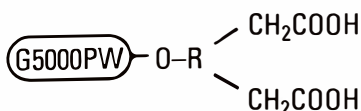


TSKgel Heparin-5PW



Approximate Ligand Density: 5 g/L

TSKgel Chelate-5PW



TSKgel Tresyl-5PW

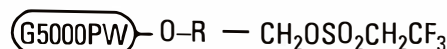


表1：TSKgel亲和色谱柱的应用

特异性基团官能团	应用
TSK gelBoronate-5PW	碳水化合物，核酸，核苷，核苷酸，儿茶酚胺
TSK gelChelate-5PW	免疫球蛋白，转铁蛋白凝集素，乳蛋白，膜蛋白，肽
TSK gelHeparin-5PWa	凝血因子：抗凝血酶III，因子VII，因子IX，等， 抗肝素蛋白质；糖蛋白，内切糖苷酶，透明质酸酶， 脂肪酶，生长因子，RNA聚合酶，其他核酸结合蛋白
活性官能团	应用
TSK gelTresyl-5PW	糖蛋白，抗原

TSKgel Boronate-5PW 亲和色谱柱

TSKgel Boronate-5PW 色谱柱是将间氨基苯硼酸酯耦合到 TSKgel G5000PW 聚合物基质上制备而成的。这种耦合使官能团能够在碱性 pH 条件下形成四面体硼酸盐阴离子。该种阴离子结构可与在碳水化合物、含碳水化合物的化合物、儿茶酚胺等中发现的 1,2 顺式二醇基团相结合。硼酸根阴离子和 1,2 顺式二醇基团之间的相互作用在镁离子的存在下增强，并受到含胺缓冲液的抑制。TSKgel Boronate-5PW 基质的吸附发生在碱性缓冲液中，例如 HEPES 和吗啉，而解吸发生在碳水化合物或含胺流动相中，例如山梨糖醇或三羟甲基氨基甲烷。

属性及应用：

表2列出了TSKgel Boronate-5PW色谱柱的属性和规格。TSKgel Boronate-5PW色谱柱的应用包括核酸、核苷、核苷酸、儿茶酚胺和含有1,2顺式二醇官能团的其它生物分子的分析。

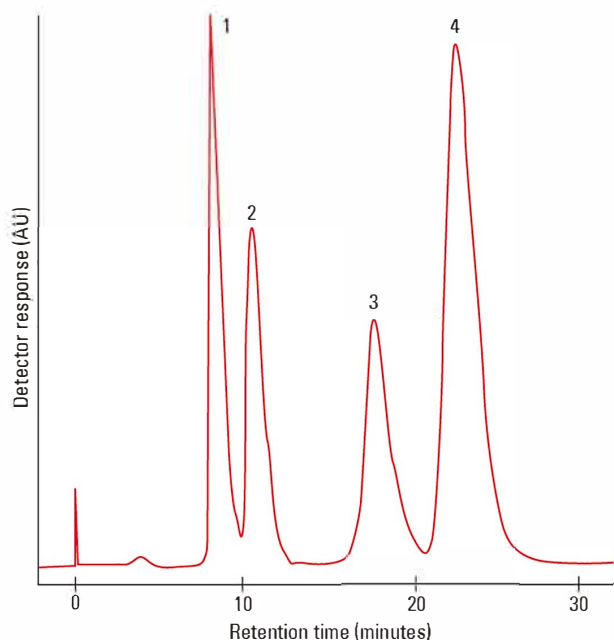
表2: 产品属性与规格

属性	参数
孔径(平均值)	100 nm
排阻界限(估计值)	< 1.0 x 10 ⁷ Da球状蛋白
吸附容量	40 mmol/L (山梨糖醇)
粒径	10 μm
pH值范围	2.0-9.0
官能团	间-氨基苯硼酸

核苷

核苷是由 β-糖苷键与核糖或脱氧核糖结合而成的核碱基（通常简称为碱基）构成的糖基胺。核苷包括胞苷、尿苷、腺苷、鸟苷、胸苷和肌苷。图2显示了TSKgel Boronate-5PW色谱柱使用等度流动相对核苷进行选择分离。

图2: 核苷的等度分离



色谱柱: TSKgel Boronate-5PW (10 μm, 7.5 mm ID x 7.5 cm)

流动相: 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液, pH 8.0

流速: 1.0 mL/min

检测: UV (280 nm)

样品: 1. 胞苷

2. 尿苷

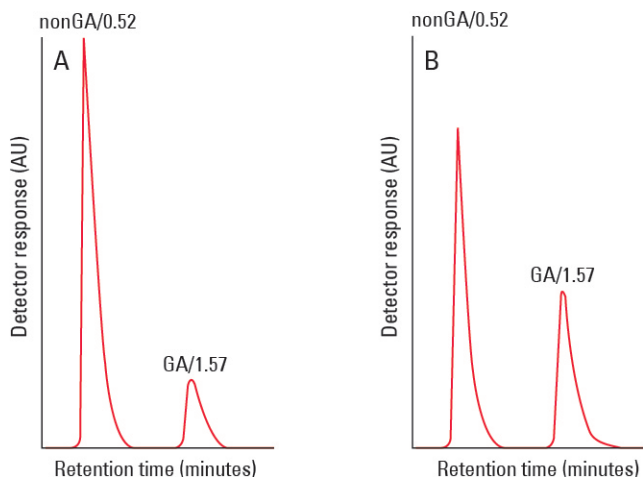
3. 鸟苷

4. 腺苷

糖化血清白蛋白

使用TSKgel Boronate-5PW色谱柱在4分钟内快速分析人血清中的糖化（糖基化的）和非糖化（非糖基化）的蛋白质。糖化血清白蛋白数量为糖尿病患者短期血糖控制提供了有用的信息。图3分别为正常成人和糖尿病患者的混合血清样品的色谱图。非糖化的和糖化的白蛋白在0.52和1.57分钟洗脱得到了尖峰，并得到了很好的分离。

图3: 糖化血清白蛋白的分析



色 谱 柱: TSKgel Boronate-5PW (10 μ m, 4.6 mm ID x 10 cm)

流 动 相: 50 mmol/L 甘氨酸-NaOH 缓冲液, pH 7.5,
200 mmol/L 氯化镁和 0.05% 叠氮化钠与山梨糖醇
从 0 分步梯度增加到 200 mmol/L

流 速: 0.8 mL/min

温 度: 37 $^{\circ}$ C

进 样 量: 1 使用起始洗脱液平衡 2min 后, 进样 1 μ L。

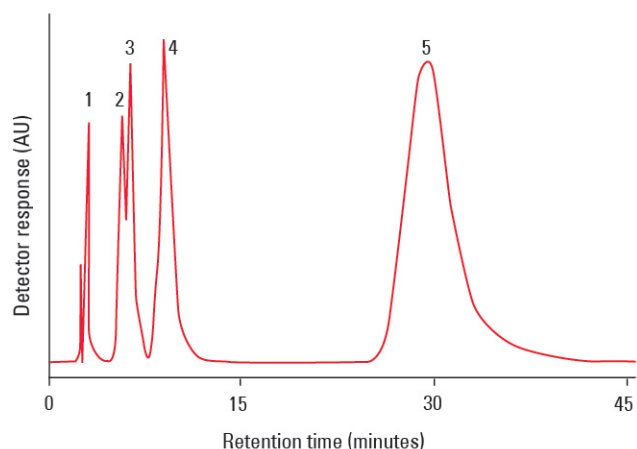
送入起始洗脱液 1min 洗脱未结合的未糖化的蛋白质。然后送入含有山梨糖醇的洗脱液 1 分钟以洗脱结合在色谱柱上的糖化蛋白质。

样 品: 混合血清; A. 正常成人 B. 糖尿病患者

儿茶酚胺

儿茶酚胺是应急激素，由肾上腺释放应对压力。它们被称为儿茶酚胺，是因为它们含有儿茶酚基团并且从氨基酸酪氨酸衍生。图4中使用TSKgel Boronate-5PW色谱柱对儿茶酚胺的分析谱图。

图4: 儿茶酚胺的分析



色 谱 柱: TSKgel Boronate-5PW (10 μ m, 7.5 mm ID x 7.5 cm)

流 动 相: 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液, pH 6.5

流 速: 1.0 mL/min

检 测: UV (280 nm)

样 品: 1. 酪氨酸

2. 去甲变肾上腺素

3. 变肾上腺素

4. 多巴

5. 肾上腺素

TSKgel Chelate-5PW 亲和色谱柱

TSKgel Chelate-5PW 色谱柱是将亚氨基二乙酸 (IDA) 基团共价键合到 G5000PW 聚合物基质上。在亲和色谱法之前，将金属离子例如 Zn^{2+} 、 Ni^{2+} 或 Cu^{2+} ，螯合到 IDA 基团上。所选择的金属离子结合在 IDA 基团上的三个配位点。因此，目标分子可以紧密地结合在金属离子的三个游离结合位点。由于结合的金属离子浓度很高 (每 mL 凝胶为 20 μmol 金属离子)，TSKgel Chelate-5PW 色谱柱对于目标分子有很高的结合力。

肽和蛋白质中的组氨酸残基在中性 pH 条件下通常会吸附到这些螯合离子上。使用含有咪唑或甘氨酸的缓冲液进行蛋白质解吸。成功利用这种保留机制的关键是选择合适的金属离子和洗脱缓冲液。 Cu^{2+} 与蛋白质的相互作用更加强烈， Zn^{2+} 通常能提高分辨率。使用 Zn^{2+} 时，色谱柱为饱和载量，而结合较强的 Cu^{2+} 的载量大约为总量的一半。蛋白质的洗脱通常通过梯度增加咪唑或甘氨酸浓度或梯度降低 pH 值来进行。甘氨酸 (HEPES 缓冲液中) 是一种强洗脱液，也可以解吸金属离子，因此有必要在每次分析结束后对色谱柱进行再生。咪唑 (磷酸盐缓冲液中) 是一种弱洗脱液，有必要在色谱柱运行多次以后再生。

属性及应用:

表3列出了TSKgel Chelate-5PW色谱柱的属性和规格。TSKgel Chelate-5PW色谱柱的应用包括外源凝集素、血清蛋白 (如免疫球蛋白和转铁蛋白)、乳蛋白、膜蛋白和肽的分析。

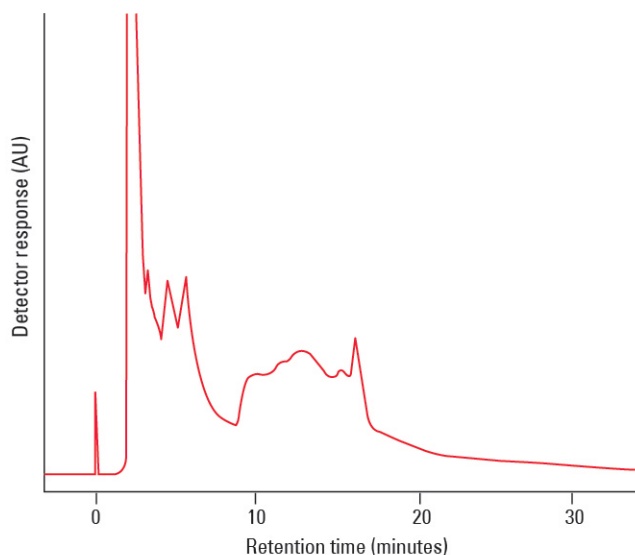
表3: 产品属性与规格

属性	参数
孔径(平均值)	100 nm
排阻界限(估计值)	$< 1.0 \times 10^7$ Da球状蛋白
配体浓度	20 mmol树脂
粒径	10 μm 和13 μm
pH值范围	2.0-12.0
官能团	亚氨基二乙酸

单克隆抗体

图5为使用螯合有 Zn^{2+} 的TSKgel Chelate-5PW色谱柱纯化培养上清液中的单克隆抗体 (mAb)。该图显示，通过pH梯度洗脱，mAb (IgG₁)在32分钟左右被洗脱并很好地与其他杂质分离。

图5: 单克隆抗体的纯化



色谱柱: **TSKgel Chelate-5PW (Zn^{2+})**,
(10 μm , 7.5 mm ID X 7.5 cm)

流动相: A: 20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, + 0.5 mol/L NaCl
B: A + 200 mmol/L 甘氨酸

梯度: 30 min (A→B), 线性

流速: 1.0 mL/min

检测: UV (280 nm)

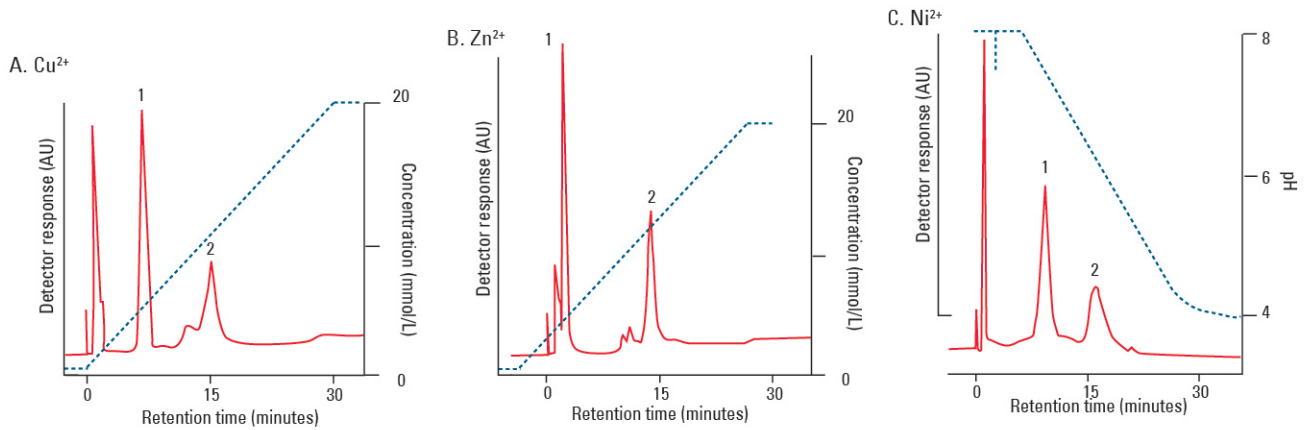
温度: 25 °C

样品: 抗 HLA-A, B, C (IgG₁),
NS-1 培养上清液

标准蛋白质

图6比较了整合有Zn²⁺、Cu²⁺和Ni²⁺的TSKgel Chelate-5PW色谱柱对两种球状蛋白的保留行为和峰形。

图6: 核糖核酸酶A和转铁蛋白的分析



色谱柱: TSKgel Chelate-5PW (10 μm, 5 mm ID x 5 cm, 玻璃)

金属离子: A: Cu²⁺ B: Zn²⁺ C: Ni²⁺, 均为饱和状态

流动相: A和B: 30 min 内含有 0.5 mol/L NaCl 的 20 mmol/L HEPES-NaOH 缓冲液中咪唑从 1 mmol/L 线性梯度增加到 20 mmol/L, pH 8.0

C: 30min 内在 0.5 mol/L NaCl 中 pH 8.0 的 20 mmol/L HEPES-MES- 乙酸线性 pH 梯度减少为 pH 4.0 的 20 mmol/L HEPES-MES- 乙酸

流速: 0.8 mL/min

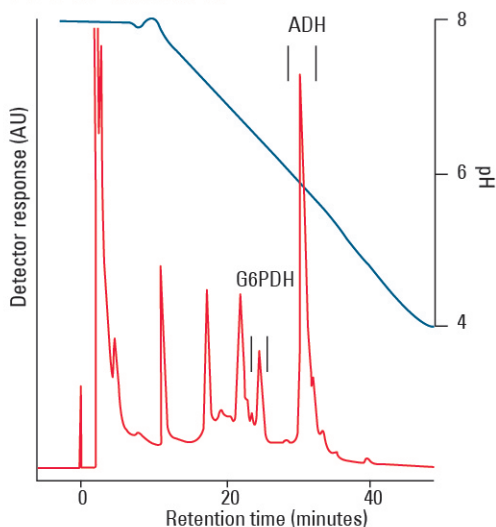
检测: UV (280 nm)

样品: 1. 核糖核酸酶 A (牛) 2. 转铁蛋白 (人)

酵母酶

在图7中, 使用TSKgel Chelate-5PW色谱柱回收酵母酶得到了较高的活性和回收率。

图7: 酵母酶的分析



色谱柱: TSKgel Chelate-5PW (10 μm, 8 mm ID x 7.5 cm, 玻璃)

金属离子: 饱和 Zn²⁺

流动相: 40 min 内在 0.5 mol/L NaCl 中从 pH 8.0 的 20 mmol/L HEPES-MES- 乙酸线性 pH 梯度改变为 pH 4.0 的 20 mmol/L HEPES-MES- 乙酸

流速: 1.0 mL/min

检测: UV (280 nm)

回收: G6PDH*: 90%, 以及 ADH*: 97% 的酶活性酶活性

样品: 浓缩酵母酶

纯化: G6PDH: 8.7 倍, 以及 ADH: 3.9 倍

*G6PDH: 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶

*ADH: 乙醇脱氢酶

TSKgel Heparin-5PW 亲和色谱柱

TSKgel Heparin-5PW 色谱柱是通过将来自猪肠粘膜的肝素固定到 G5000PW 聚合物基质上。肝素是分子量为 1.6×10^4 Da 的多糖，由 D- 葡糖胺和 D- 葡糖醛酸通过 $\alpha-1, 4-$ 糖苷键连接构成的多聚体。结合的肝素与蛋白质通过以下两种方式相互作用：

- 在一个位点，O- 硫酸根和 N- 硫酸基的酸性使 TSKgel Heparin-5PW 变成具有与 TSKgel SP-5PW 强阳离子交换树脂的洗脱强度相似的阳离子交换树脂，但对碱性蛋白具有不同的选择性。肝素将该色谱柱的有效 pH 值范围降到了 5.5-9.0 之间。
- 在另一个位点，肝素作为特异性亲和配体发生相互作用，例如作为组织中的抗凝血剂，肝素通过与凝血酶原和纤维蛋白原相互作用而防止凝血酶和纤维蛋白的形成。

属性及应用：

表4列出了TSKgel Heparin-5PW色谱柱的属性。TSKgel Heparin-5PW色谱柱的典型应用包括凝血因子（例如抗凝血酶III，因子VII，因子IX等），和抗肝素蛋白（例如糖蛋白，内切糖苷酶，透明质酸酶）的分离。TSKgel Heparin-5PW 色谱柱也用于分离脂肪酶、生长因子、RNA聚合酶和其他核酸结合蛋白。

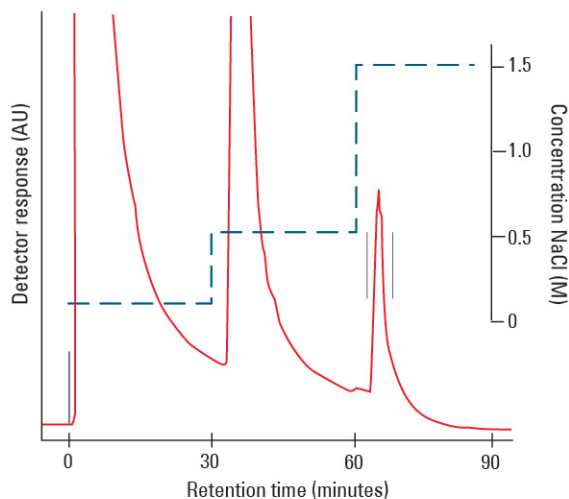
表4：产品属性与规格

属性	参数
孔径(平均值)	100 nm
排阻界限(估值)	$< 1.0 \times 10^7$ Da球状蛋白
对抗凝血酶III的吸附容量	大于1.8 g/L
粒径	10 μ m
pH值范围	5.5-9.0
官能团	肝素

人血浆中的抗凝血酶III

肝素与抗凝血酶结合后引起抗凝血酶构象改变，通过增加其反应位点环的柔性可使其活化。活化抗凝血酶然后使凝血酶和其他参与血液凝固的蛋白酶（最显著的是因子Xa）失活。图8所示为人血浆中抗凝血酶的分步梯度纯化，显示了 TSKgel Heparin-5PW 色谱柱的亲和特性。

图8：人血浆中抗凝血酶III的分离



色谱柱：TSKgel Heparin-5PW (10 μ m, 7.5 mm ID x 7.5 cm)

流动相：0.15 mol/L NaCl + 0.02 mol/L Tris-HCl, pH 7.5, 然后在 30 min 内以分步梯度的方式增加 0.5 mol/L NaCl, 最后在 60 min 内以分步梯度的方式增加 1.5 mol/L NaCl

流速：1.0 mL/min

检测：UV (280 nm)

回收：从垂直线之间收集的馏分定量回收抗凝血酶 III 活性

样品：人血浆, 0.5 mL

TSKgel Tresyl-5PW 亲和色谱柱

不同于其他 TSKgel 亲和色谱柱，TSKgel Tresyl-5PW 色谱柱键合有 2,2,2-三氟乙烷磺酰基活性基团，并且需要用户选择含有氨基、硫醇、苯酚、或咪唑基团的配体活化。得到的结构实际上是一种定制的亲体和配体，其具有优异的 pH 稳定性和最小的配体脱落。TSKgel Tresyl-5PW 容易与氨基或巯基反应形成稳定的共价烷基胺或硫醚。

TSKgel Tresyl-5PW 色谱柱的主要应用包括根据要纯化的抗原选择合适的抗体耦合到固定相上。pH 值大于 7.5 条件下的抗体耦合率在 90% 以上，并且 pH 值为 7.5 时发生最大结合。当抗体浓度每升亲和树脂小于 2-3 g 时，抗原最有效地吸附到抗体配体。为了提高结合能力，应该为耦合反应添加更多抗体。然而，较高浓度的抗体会导致空间位阻，从而降低色谱柱的结合能力。一般情况下，抗体附着到 TSKgel Tresyl-5PW 色谱柱所需的时间与抗体浓度成正比。少量抗体需要大约 2 个小时完成交联反应，而在 10 g/L 的浓度下，完全附着抗体则可能需要 6-7 小时。

属性及应用：

表5列出了TSKgel Tresyl-5PW色谱柱的属性。TSKgel Tresyl-5PW色谱柱的应用实例包括对伴刀豆球蛋白A（一种结合到糖蛋白的脂蛋白凝集素），大量抗体，和酶等配体的结合。

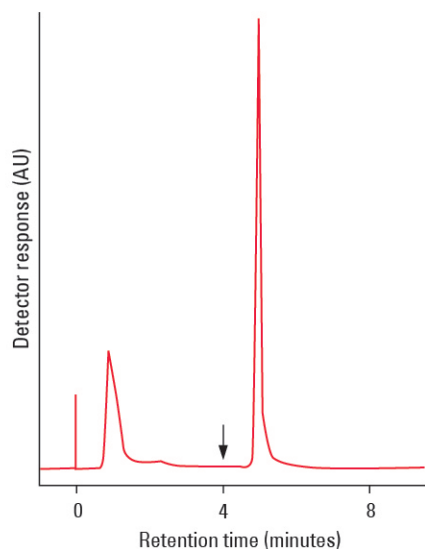
表5：产品属性与规格

属性	参数
孔径(平均值)	100 nm
粒径(平均值)	10 μm
pH值范围	2.0 - 12.0
配体浓度	每升树脂约为20 mmol
吸附容量	大于60 mg/L (与大豆胰蛋白酶抑制剂的耦合能力)
排阻界限(估值)	<1.0 x 10 ⁷ Da 球状蛋白
活性基团	三氟乙基磺酰

伴刀豆球蛋白 A 上的过氧化物酶

伴刀豆球蛋白A是一种结合到过氧化物酶等糖蛋白上的脂蛋白凝集素。TSKgel Tresyl-5PW是通过将伴刀豆球蛋白A结合到树脂上来活化。图9是使用耦合有伴刀豆球蛋白A配体的TSKgel Tresyl-5PW色谱柱纯化过氧化物酶的色谱图。

图9：过氧化物酶的纯化

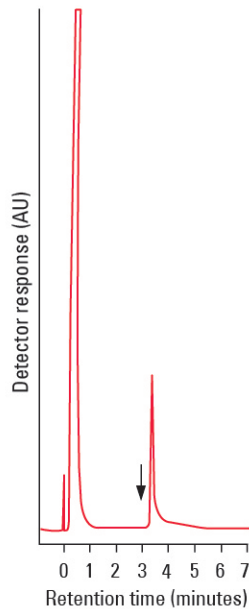


色 谱 柱：TSKgel Tresyl-5PW (10 μm, 6 mm ID x 4 cm) 采用伴刀豆球蛋白 A 修饰
结 合：0.05 mol/L 醋酸盐缓冲液 (pH 5.0) + 0.5 mol/L NaCl, 以及 CaCl₂、MnCl₂ 和 MgCl₂ 各为 1 mmol/L
流 动 相：4 min 内 (见图上箭头) 结合缓冲液中 α-甲基-D-葡萄糖苷分步梯度形式增加到 25 mmol/L
流 速：1.0 mL/min
检 测：UV (403 nm)
样 品：过氧化物酶粗品, 0.5 mg
清洗步骤：使用溶解水清洗 TSKgel Tresyl-5PW
配体溶液：将 40 mg 伴刀豆球蛋白 A 溶解于含有 0.5 mol/L NaCl 的 10 mL 0.1 mol/L NaHCO₃ (pH 8.0) 中
耦合步骤：在 25°C 以 0.2 mL/min 的流速使用色谱柱在夜间回收配体溶液
阻断步骤：在 25°C 以 1.0 mL/min 的流速使用 0.1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0) 阻断三氟乙基磺酰残基

人转铁蛋白

人转铁蛋白是一种用于运输铁离子的血浆蛋白。当载有铁的人转铁蛋白遇到细胞表面上的转铁蛋白受体时，便与其结合，然后被送到囊泡的细胞中。该细胞将会酸化囊泡，使人转铁蛋白（TF）释放出它的铁离子。图10为使用固定了抗人转铁蛋白抗体的TSKgel Tresyl-5PW色谱柱对人转铁蛋白进行纯化。

图10: 人转铁蛋白的纯化



色谱柱: TSKgel Tresyl-5PW (10 μ m, 6 mm ID x 10 cm)

流动相: 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液, pH 7.4, 脉冲法洗脱采用 0.1 mol/L 柠檬酸盐缓冲液, pH 1.6

流速: 1.0 mL/min

检测: UV (280 nm)

进样量: 20 μ L

样品: 人血清转铁蛋白

产品一览表

TSKgel 亲和色谱柱

货号	产品描述	基质	柱身材质	内径 (mm)	长度 (cm)
14449	TSKgel Boronate-5PW, 玻璃, 10 μ m, 100 nm	聚合物	玻璃	5	5
13066	TSKgel Boronate-5PW, 10 μ m, 100 nm	聚合物	不锈钢	7.5	7.5
14440	TSKgel Chelate-5PW, 玻璃, 10 μ m, 100 nm	聚合物	玻璃	5	5
08645	TSKgel Chelate-5PW, 10 μ m, 100 nm	聚合物	不锈钢	7.5	7.5
08646	TSKgel Chelate-5PW, 13 μ m, 100 nm	聚合物	不锈钢	21.5	21.5
14443	TSKgel Heparin-5PW, 玻璃, 10 μ m, 100 nm	聚合物	玻璃	5	5
14444	TSKgel Heparin-5PW, 玻璃, 10 μ m, 100 nm	聚合物	玻璃	8	8
13064	TSKgel Heparin-5PW, 10 μ m, 100 nm	聚合物	不锈钢	7.5	7.5
14455	TSKgel Tresyl-5PW, 10 μ m, 100 nm	聚合物	不锈钢	6	6
14456	TSKgel Tresyl-5PW, 10 μ m, 100 nm	聚合物	不锈钢	7.5	7.5
16208	TSKgel Tresyl-5PW, 补充胶, 10 μ m, 2 g	聚合物	—	—	—