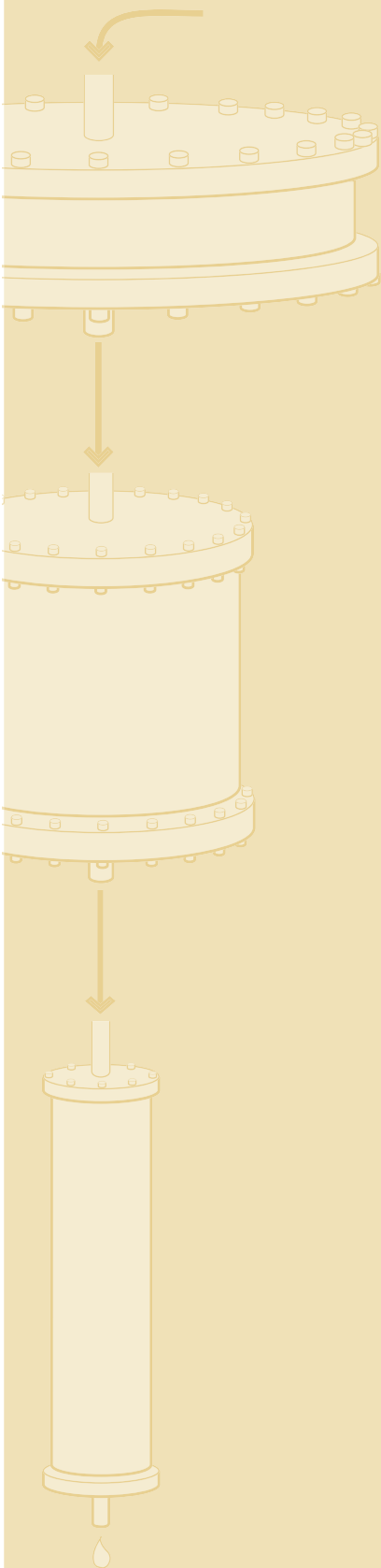


疏水相互作用填料



粒 径

疏水相互作用填料

100 μ m

Toyopearl SuperButyl-550C
Toyopearl Hexyl-650C
Toyopearl Butyl-650C
Toyopearl Phenyl-650C

65 μ m

Toyopearl Butyl-600M
Toyopearl Phenyl-600M
Toyopearl PPG-600M

35 μ m

Toyopearl Butyl-650M
Toyopearl Phenyl-650M
Toyopearl Ether-650M

30 μ m

Toyopearl Butyl-650S
Toyopearl Phenyl-650S
Toyopearl Ether-650S

20 μ m

TSKgel Phenyl-5PW (30)
TSKgel Ether-5PW (30)

10 μ m

TSKgel Phenyl-5PW (20)
TSKgel Ether-5PW (20)

TSKgel Phenyl-5PW 2mm ID x 7.5cm
TSKgel Ether-5PW 2mm ID x 7.5cm



疏水相互作用Toyopearl填料

疏水相互作用层析(HIC)是纯化生物分子工艺中一个功能强大的工具。该技术利用蛋白表面疏水区域和固定相弱疏水性基团之间的相互作用进行层析分离。HIC是离子交换和尺寸排阻层析法的很好的补充,尤其是样品中存在蛋白异构体,或目标样品与杂质的等电点或分子量相似而难以分离时使用。在亲和填料不易分辨识别位点相似的蛋白时,HIC通过选择性的差异可以在亲和层析之后使用。

HIC如何工作?

带有疏水基团的蛋白质和其他分子与反相(RPC)和HIC填料的疏水性基团结合。RPC与HIC相比有更高的表面覆盖和更多的疏水性基团。因为这个原因,在RPC分离中目标分子通常是在水溶液中被吸附,增加有机溶剂的量目标分子将被洗脱。

在HIC分离中,采用高盐缓冲溶液为流动相吸附蛋白。高盐有助于形成溶致效应(lyotropic effect),从而使蛋白质结合到疏水基团上,通过降低盐的浓度来洗脱蛋白。大多数治疗用的目标样品用低盐或无盐缓冲液都能洗脱下来。

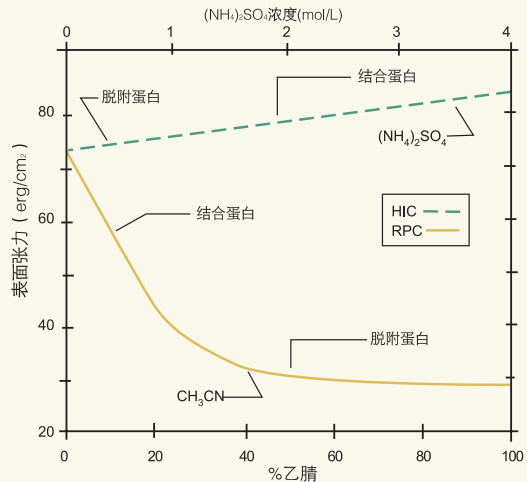
洗脱过程中,HIC所需要的能量要比RPC少。衡量这两种层析方法之间的相对结合能力的方法是,测量吸附和洗脱的表面张力。图1为HIC和RPC洗脱时系统产生的表面张力的比较。因为HIC的洗脱条件比较温和,通常能保留蛋白的生物活性。

五种不同疏水相互作用填料及其选择性

我们提供5种具有不同疏水性和选择性的HIC填料。Toyopearl HIC填料的疏水性弱到强的顺序为:乙醚(Ether),聚丙二醇(PPG),苯基(Phenyl),丁基(Butyl),己基(Hexyl)(图2)

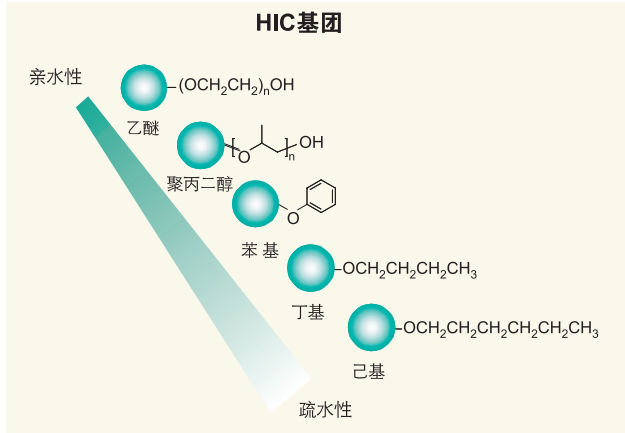
图 1

HIC和RPC水溶液的表面张力



模式	梯度(典型)	表面张力(erg/cm²)
HIC	1.8 – 0 mol/L (NH ₄) ₂ SO ₄ /缓冲液	4
RPC	10 – 50% ACN/0.1% TFA	23

图 2



特性

亲水性聚合物填料



良好的机械稳定性



优点

- pH 1-13强大的化学稳定性
- 温度范围4°C-60°C, 在121°C高压灭菌
- 与有机溶剂兼容
- 在广泛的盐浓度内保持填料量固定
- 蛋白的非特异性吸附低
- 优良的蛋白质回收率

- 在大规模生产中有良好的流动性
- 可从TSKgel HIC HPLC色谱柱直接放大大规模生产中

能够找到与治疗用目标分子的疏水性适合的疏水填料是整个HIC纯化工艺中的关键。疏水性太强的填料可能会导致蛋白的不可逆结合或使蛋白活性损失。表I和II为Toyopearl HIC填料的典型的质量回收率和生物活性回收率的数据。

最佳的HIC工艺步骤将可以平衡高动态吸附载量，适当的选择性，良好的质量回收率和生物活性回收率。

Toyopearl填料的广泛选择性可以满足开发人员在疏水极限条件下优化蛋白质的分离。高保留的Toyopearl Hexyl(己基)型和Toyopearl Butyl(丁基)型填料用于分离亲水性蛋白。这两种填料要在低盐环境下进行分离。

Toyopearl Ether(乙醚)型填料用于纯化强疏水性分子，如某些单克隆抗体和膜蛋白。这些蛋白质可能不可逆的结合到其他更强疏水性填料上。

Toyopearl PPG(聚丙二醇)-型和Toyopearl Phenyl(苯基)型填料补充了Toyopearl HIC家族的基团类型，为分离中等范围的疏水蛋白质提供了选择方案。

表 I

蛋白的高质量回收率(%)

	Toyopearl HIC填料		
	Ether -650M	Phenyl -650M	Butyl -650M
牛血清白蛋白	84	62	76
α -胰凝乳蛋白酶原	96	88*	90
细胞色素C	—	81*	87*
IgG	91	—	—
α -乳白蛋白	90	—	—
溶菌酶	94	92	85
卵白蛋白	83	88	73
核糖核酸酶A	—	72*	82*

层析方法：200mL样品中含有蛋白质200mg，负载到7.5mm内径x7.5cm柱，用1.8mol/L(*1.5mol/L)到0.0mol/L硫酸铵，0.1mol/L磷酸钠缓冲液(pH 7.0)梯度洗脱60分钟。UV@280nm和25℃时的质量回收率。

表 II

蛋白活性回收率

Toyopearl HIC 填料	蛋白	%活性 回收率
Phenyl-650	光敏色素	79
Butyl-650	嗜盐蛋白酶	85
Butyl-650	聚(3-羟基丁酸)解聚酶	88
Butyl-650	酰基转移酶解聚酶	82
Butyl-650	脱氢酶	81

Toyoscreen层析工艺开发用筛选柱

我们提供1ml和5ml多种HIC填料Toyoscreen层析工艺开发用筛选柱。Toyoscreen筛选柱为不同填料对目标样品的保留和回收率提供一个方便的筛选方式。可以连接多个柱子进一步分离。请参阅本节末尾的订购信息，如需这些产品的详细信息，请联系我们。

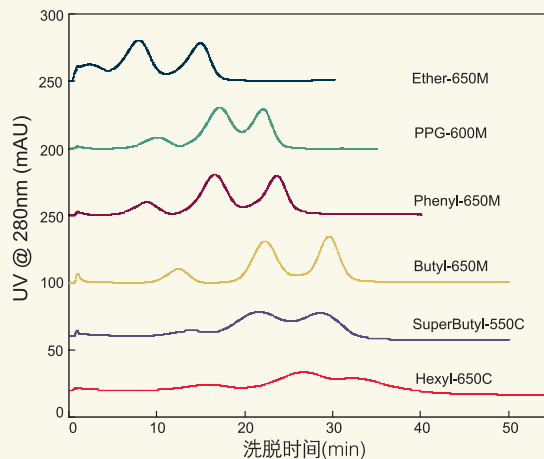
图3为采用Toyoscreen HIC筛选柱测定的标准蛋白的保留时间和选择性数据。

盐类型的影响

除了基团的疏水性，洗脱液盐类型也影响HIC的选择性。图4显示了盐类型对不同的蛋白质分辨率的影响。

图 3

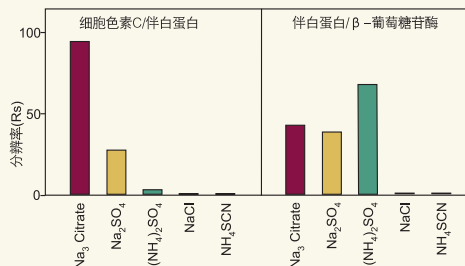
Toyopearl HIC筛选填料—蛋白标准品



填料：如图所示
柱尺寸：Toyoscreen(1mL), 6.4mm ID x 3.0cm
流动相：缓冲液A：0.1mol/L磷酸缓冲液+1.8mol/L硫酸，pH7.0
缓冲液B：0.1mol/L磷酸缓冲液，pH7.0
梯度：从缓冲液A到缓冲液B，线性梯度洗脱30分钟
流速：16cm/hr(1mL/min)
检测器：UV@280nm
样品：核糖核酸酶A，溶菌酶， α -胰凝乳蛋白酶原1mg/mL
进样量：50 μ L

图 4

盐类型对分辨率的影响



填料：Toyopearl Butyl-650M
柱尺寸：4.1mm ID x 4cm
流动相：缓冲液A：20mmol/L磷酸缓冲液，1.0mol/L指定盐，pH 7.0
缓冲液B：缓冲液A含1.0mol/L指定盐
流速：484cm/hr(1mL/min)
检测器：UV@280nm

J. Fausnaugh, L. Kennedy and F. Regnier, J. Chromatography 317, 141 (1984)

图5为霍夫梅斯特离子效应(Hofmeister lyotropic salt)排列次序,即阴离子和阳离子促进蛋白质沉淀的排列次序。左侧离子被称为“lytropic”,而右边的离子被称为“Chaotropic”。在高盐的环境下因为疏水作用增加,Lytropic盐会沉淀或“盐析”蛋白,而在高盐的环境下,Chaotropic盐将促进蛋白质变性。图5表明,不同盐使每种填料产生多种吸附和洗脱的选择性。HIC的这种特征为优化工艺步骤提供更多的参数。

图 5

霍夫梅斯特离子效应排列次序 (Hofmeister lyotropic salt series)

阴离子

$\text{SO}_4^{2-} > \text{HPO}_4^{2-} > \text{CH}_3\text{COO}^- > \text{卤化物} > \text{NO}_3^- > \text{ClO}_4^- > \text{SCN}^-$

阳离子

$(\text{CH}_3)_4\text{N}^+ > \text{NH}_4^+ > \text{K}^+ > \text{Na}^+ > \text{Cs}^+ > \text{Li}^+ > \text{Mg}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Ba}^{2+}$

HIC中最常用的盐类是硫酸铵和硫酸钠。也常用氯化钠。

粒径优化

Toyopearl和TSKgel PW型填料都是甲基丙烯酸为基质的产品(见图6或请参阅尺寸排阻填料部分获得更详细的信息),可以提供各种不同的粒径:

100μm	Toyopearl C级填料	捕获
65μm	Toyopearl M级填料	中间纯化
35μm	Toyopearl S级填料	中间纯化/抛光精制
30和20μm	TSKgel PW型填料	高分辨率

某些情况下可采用10μm粒径的分析柱,与制备用填料具有相同选择性。

图7列出了不同基团和不同粒径的HIC制备用填料。该图也描绘了捕获,中间纯化,抛光精制步骤所用到的粒径。

图 6

疏水相互作用(HIC)填料为甲基丙烯酸基质

孔径(Å)	50	125	400-500	750	1000	>1000	>1700
填料							
Toyopearl HW-型:	40	50	55	60	65	75	80
TSKgel PW-型:	G1000	G2000	G4000		G5000	G6000	

← 增加孔比表面积

图 7

层析步骤	粒径	孔径(Å)	填料
捕获	100μm	500	Toyopearl SuperButyl-550C
		1000	Toyopearl Hexyl-650C
		1000	Toyopearl Butyl-650C
		1000	Toyopearl Phenyl-650C
中间纯化	65μm	750	Toyopearl Butyl-600M
		750	Toyopearl Phenyl-600M
		750	Toyopearl PPG-600M
	65μm	1000	Toyopearl Butyl-650M
		1000	Toyopearl Phenyl-650M
		1000	Toyopearl Ether-650M
抛光精制	35μm	1000	Toyopearl Butyl-650S
		1000	Toyopearl Phenyl-650S
		1000	Toyopearl Ether-650S
	30μm	1000	TSKgel Phenyl-5PW (30)
		1000	TSKgel Ether-5PW (30)
	20μm	1000	TSKgel Phenyl-5PW (20)
		1000	TSKgel Ether-5PW (20)
品质管理(QC)	10μm		TSKgel Phenyl-5PW 2mm IDx7.5cm TSKgel Ether-5PW 2mm IDx7.5cm

纯化产物

大多数的填料有对应的相同选择性的HPLC柱。

机械稳定性

Toyopearl和TSKgel HIC填料的半刚性聚合物骨架允许高流速下使用，可实现产量和生产力的最大化。Toyopearl填料可在最大3bar的压力下运行，TSKgel PW型填料可在最大20bar的压力下运行。图8为不同粒径大小的Toyopearl Phenyl-650填料的压力-流速特性。这些填料适合在固定床和动态轴向压缩柱使用。

化学稳定性

由于填料是聚合物材质的，所以可在广泛的pH条件和离子强度下使用。此外，填料表面羟基化处理减少了非特异性蛋白的吸附。

孔径优化

多数Toyopearl HIC填料以尺寸排阻填料为基体，其中Toyopearl HW-65(平均孔径1000Å)是蛋白分离中最基本使用的孔径。但是对某个特定蛋白质也可以进行Toyopearl填料的孔径和比表面积的优化。比表面积的增加可以提高某个特定的治疗用目标样品的动态吸附载量(DBC)。因此我们开发了两款具有较高动态吸附载量的比较专业的HIC填料。

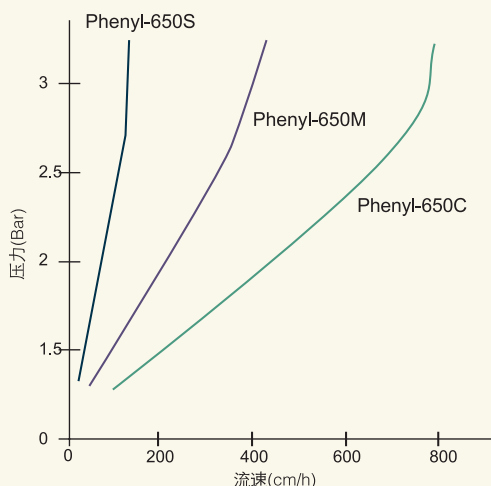
Toyopearl层析填料的高动态吸附载量

分离单克隆抗体的最佳孔径为750Å。Toyopearl HW-60就是特制的具有此孔径大小的填料。

我们提供三种以Toyopearl HW-60为基体的HIC产品：聚乙二醇(PPG)，苯基(Phenyl)和丁基(Butyl)。图9为Toyopearl 600M系列和Toyopearl Phenyl-650M填料的动态吸附载量(DBC)的比较数据。图10为Toyopearl Butyl-600M，Toyopearl PPG-600M和Toyopearl Phenyl-600M填料的分离选择性比较。

图 8

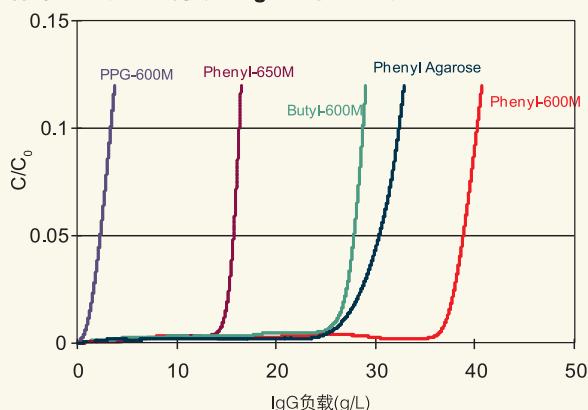
各种粒径的Toyopearl Phenyl-650填料的压力-流速曲线



填 料: Toyopearl Phenyl-650S, M, C
柱尺寸: 25mm ID x 25cm
流动相: 2.0mol/L(NH₄)₂SO₄
流 速: 如图所示

图 9

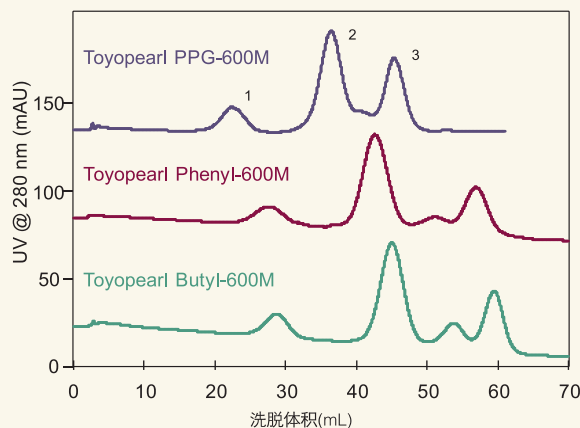
各种HIC填料分离多克隆IgG的穿透曲线



填 料: Toyopearl PPG-600M
Toyopearl Phenyl-650M
Toyopearl Butyl-600M
Toyopearl Phenyl-600M
同类竞争产品Phenyl Agarose
柱尺寸: 7.8mm ID x 20cm
流动相: 0.1mol/L磷酸缓冲液, pH 7.0+0.8mol/L(NH₄)₂SO₄
流 速: 300cm/hr(2.4mL/min)
检测器: UV@280nm
温 度: 25℃
样 品: 1.0g/L多克隆IgG
以10%穿透率计算DBC

图 10

Toyopearl 600M系列填料的比较



填 料: Toyopearl PPG-600M
Toyopearl Phenyl-600M
Toyopearl Butyl-600M
柱尺寸: 7.5mm ID x 7.5cm
流动相: 缓冲液A: 1.8mol/L(NH₄)₂SO₄+0.1mol/L磷酸缓冲液, pH 7.0
缓冲液B: 0.1mol/L磷酸缓冲液, pH 7.0
流 速: 136cm/hr(1.0mL/min)
梯 度: 从缓冲液A到缓冲液B, 60分钟线性梯度洗脱
检测器: UV@280nm
温 度: 环境温度
样 品: 1g/L核糖核酸酶A(1), 溶菌酶(2), α-胰凝乳蛋白酶原(3)
进样量: 100μL

图 11

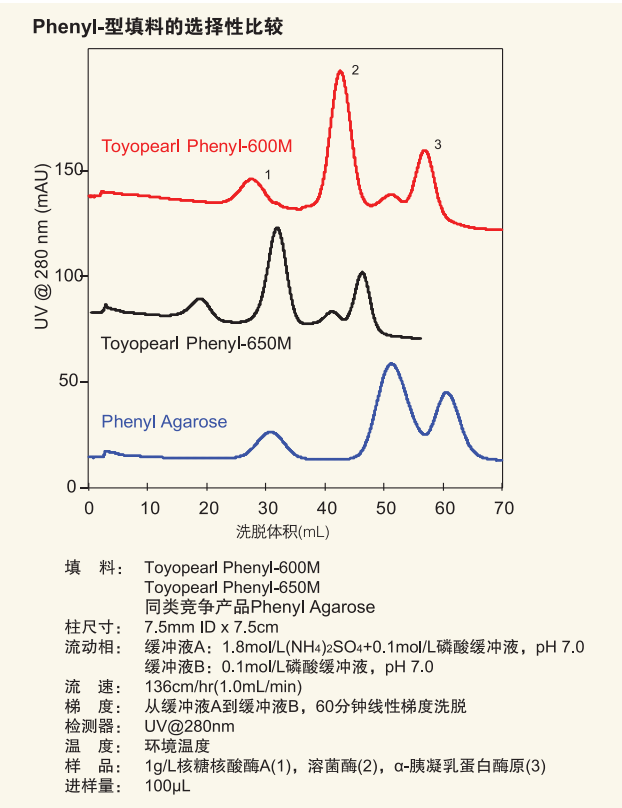


图 13

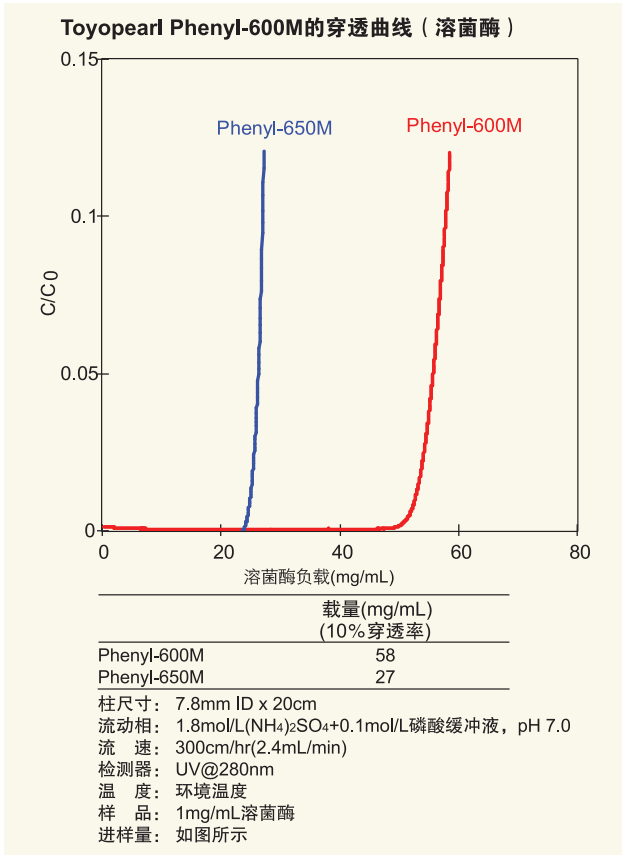


图 12

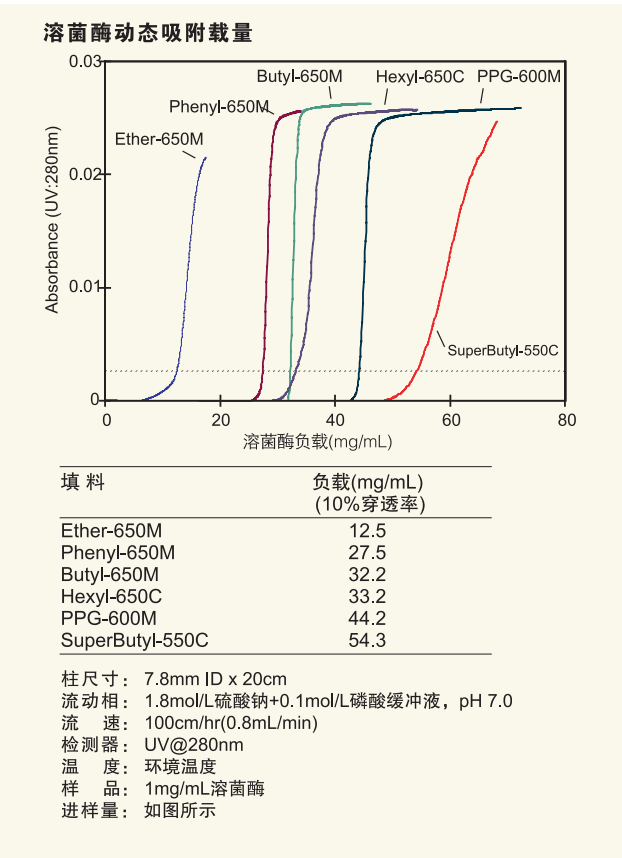


图11比较了Toyopearl Phenyl-600M, Toyopearl Phenyl-650M 填料和苯基-琼脂糖填料的选择性。

对于较小的分子如溶菌酶(12000 Da), 我们推荐使用孔径更小的Toyopearl SuperButyl-550C填料(以孔径为500Å的Toyopearl HW-55为基体)。图12为Toyopearl SuperButyl-550C与其他的Toyopearl HIC填料的DBC比较。

Toyopearl Phenyl-600M填料对溶菌酶也有较高的DBC(图13)。

Toyopearl HIC 600和550系列填料具有更小的平均孔径对特定的目标分子具有更高的动态吸附载量和不同的选择性, 这对层析工艺的经济性带来巨大的影响。

单克隆抗体

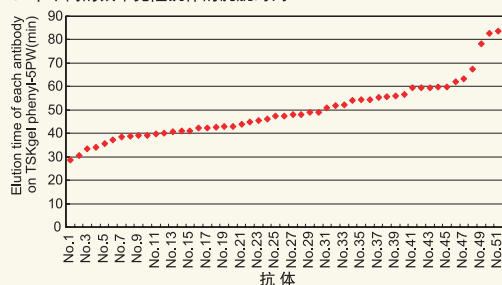
疏水相互作用层析是一种非常有效的纯化单克隆抗体的技术。图14为单克隆抗体的不同疏水性。该图用TSKgel Phenyl-5PW分析柱测量了51种不同鼠IgG的疏水性(洗脱时间来衡量)。有些IgG的洗脱时间要比其他长2-3倍, 显示了更强的疏水性。Toyopearl HIC系列有多种具有不同疏水性基团的产品(图2), 为色谱开发人员寻找适合他们的目标分子的基团提供了很好的选择范围。

疏水性极强的单克隆抗体, 如鼠抗鸡14kDa凝集素, 用疏水性稍弱的Toyopearl Ether(乙醚)型的填料纯化效果很好。图15为用10μm的半制备柱TSKgel Ether-5PW来纯化腹水中的抗体。在65μm的制备型Toyopearl Ether-650M填料上同样获得了相同的选择性。

图 14

鼠单克隆抗体疏水性多样性

51个不同的鼠单克隆抗体的洗脱时间



色谱柱: TSKgel Phenyl-5PW, 7.5mm ID x 7.5cm
 流动相: 缓冲液A: 1.8mol/L(NH₄)₂SO₄+0.1mol/L磷酸缓冲液, pH 7.0
 缓冲液B: 0.1mol/L磷酸缓冲液, pH 7.0
 流速: 136cm/hr(1.0mL/min)
 梯度: 注射后5分钟淋洗, 然后从缓冲液A到B60分钟线性梯度洗脱
 检测器: UV@280nm
 温度: 环境温度
 样品: 51种小鼠的单克隆抗体

蛋白质凝聚体的去除

孔径较大的Toyopearl Butyl-650和Toyopearl Phenyl-650填料对分离和去除蛋白质凝聚体非常有效。1989年的Karger等人的早期工作也证明了蛋白质和大于200 kDa的蛋白质凝聚体的分离中采用HIC填料是非常有效的。

糖蛋白

Toyopearl HIC填料纯化糖蛋白时, 往往不可逆和糖基介质结合。图16为Toyopearl Butyl-650S填料纯化大分子糖蛋白。

质粒DNA纯化和内毒素的去除

Toyopearl Hexyl-650C填料已成功纯化马里兰州巴尔的摩市Cambrex公司的质粒DNA(美国专利6,953,686)。并且Toyopearl Hexyl-650C为对内毒素的去除最有效的HIC填料, 具有超过2百万EU/mL载量。此外, 能有效地去除RNA和蛋白质杂质。Toyopearl Hexyl-650C填料还能有效的分离超螺旋和开环形式的质粒DNA。

错误折叠的蛋白质的去除

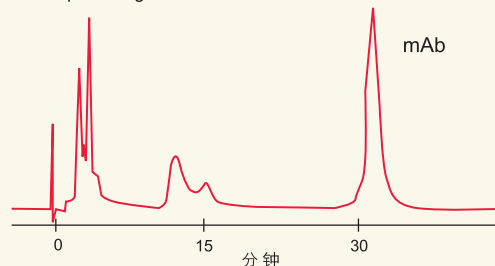
错误折叠的蛋白质要比天然蛋白疏水性强, 因此Toyopearl Butyl-650M可用于去除错误折叠的蛋白质。在许多情况下, 可采用使目标样品流穿, 错误折叠的蛋白质吸附的流穿法来进行纯化。

更多应用请访问我们网站的数据库。

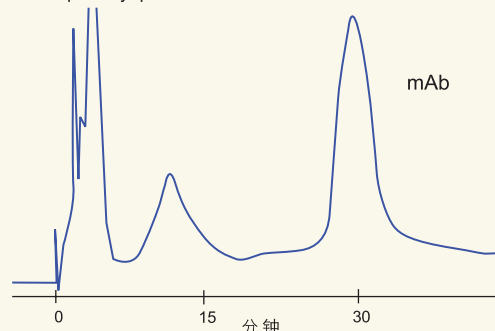
图 15

纯化腹水单克隆抗体

A. 10 μm TSKgel Ether-5PW



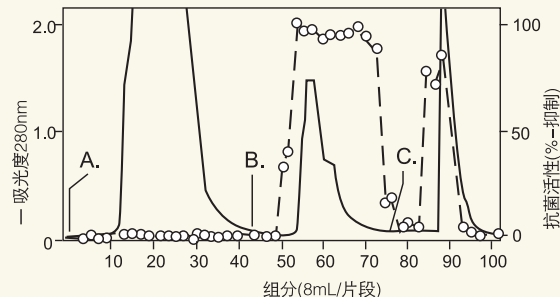
B. 65 μm Toyopearl Ether-650M



填料: A: TSKgel Ether-5PW(预装的HPLC柱)
 B: Toyopearl Ether-650M
 柱尺寸: 7.5mm ID x 7.5cm
 流动相: 缓冲液A: 1.5mol/L(NH₄)₂SO₄+0.1mol/L磷酸缓冲液, pH 7.0
 缓冲液B: 0.1mol/L磷酸缓冲液, pH 7.0
 流速: 136cm/hr(1.0mL/min)
 梯度: 从缓冲液A到缓冲液B, 线性梯度洗脱60分钟
 检测器: UV@280nm
 温度: 环境温度
 样品: A: 1.5mg/100μL抗鸡14kDa凝集素
 B: 0.76mg/50μL经稀释的腹水

图 16

Toyopearl Butyl-650S纯化大分子糖蛋白



填料: Toyopearl Butyl-650S
 柱尺寸: 22mm ID x 26cm
 流动相: 缓冲液A: 40%饱和(NH₄)₂SO₄+50mol/L磷酸缓冲液, pH 7.0
 缓冲液B: 50mol/L磷酸缓冲液, pH 7.0
 梯度: A: 上样和淋洗用100%的缓冲液A
 B: 50%缓冲液A和50%缓冲液B
 C: 100%缓冲液B
 检测器: UV@280nm
 样品: 黑斑海兔的粗蛋白

订购信息

ToyoScreen HIC层析工艺开发用筛选柱

货号	产品名称	包装
21372	ToyoScreen Ether-650M, 1mL	1mL x 6 支
21373	ToyoScreen Ether-650M, 5mL	5mL x 6 支
21374	ToyoScreen Phenyl-650M, 1mL	1mL x 6 支
21375	ToyoScreen Phenyl-650M, 5mL	5mL x 6 支
21376	ToyoScreen Butyl-650M, 1mL	1mL x 6 支
21377	ToyoScreen Butyl-650M, 5mL	5mL x 6 支
21378	ToyoScreen Hexyl-650C, 1mL	1mL x 6 支
21379	ToyoScreen Hexyl-650C, 5mL	5mL x 6 支
21494	ToyoScreen Butyl-600M, 1mL	1mL x 6 支
21495	ToyoScreen Butyl-600M, 5mL	5mL x 6 支
21380	ToyoScreen PPG-600M, 1mL	1mL x 6 支
21381	ToyoScreen PPG-600M, 5mL	5mL x 6 支
21892	ToyoScreen Phenyl-600M, 1mL	1mL x 6 支
21893	ToyoScreen Phenyl-600M, 5mL	5mL x 6 支
21382	ToyoScreen SuperButyl-550C, 1mL	1mL x 6 支
21383	ToyoScreen SuperButyl-550C, 5mL	5mL x 6 支
21398	ToyoScreen HIC Mix Pack, 1mL	1mL x 6 支 (每种1支)
21399	ToyoScreen HIC Mix Pack, 5mL	5mL x 6 支 (每种1支)

ToyoScreen 色谱柱配件

货号	产品名称	备注
21400	ToyoScreen Column Holder	
42194	ToyoScreen Holder w/ Fittings	包含 21400, 42195 和 42196 (qty. 2)
42195	Column to Column Connector	
42196	Adaptor, M6 female to 10-32 male, PEEK	
42197	Adaptor, 1/4 - 28 female to 10-32 male, PEEK	

Toyopearl LabPak

货号	产品名称	包装 (mL)	粒径 (μm)
43150	HICPAK HP (Ether, Phenyl, Butyl-650S)	3 x 25mL	35
19806	HICPAK (Ether, Phenyl, Butyl-650M)	3 x 25mL	65
43125	HICPAK C (Phenyl, Butyl, Hexyl-650C)	3 x 25mL	100

TSKgel LabPak

货号	产品名称	包装 (mL)	粒径 (μm)
43278	HICPAK PW (20) (Ether-5PW, Phenyl-5PW)	2 x 25mL	10-30
43175	HICPAK PW (30) (Ether-5PW, Phenyl-5PW)	2 x 25mL	20-40

Toyopearl HIC填料

货号	产品名称	包装 (mL)	粒径 (μm)	载量 (mg 溶菌酶/mL填料)
43151	Toyopearl Ether-650S	25	20-50	10-30
16172		100		
16174		1,000		
16176		5,000		
19805	Toyopearl Ether-650M	25	40-90	10-30
16173		100		
16175		1,000		
16177		5,000		
21301	Toyopearl PPG-600M	25	40-90	45-55
21302		100		
21303		1,000		
21304		5,000		
21305	Toyopearl Phenyl-600M	50,000	40-90	45-65
21887		25		
21888		100		
21889		1,000		
21890	Toyopearl Phenyl-650S	5,000	20-50	30-50
20891		50,000		
43152		25		
14477		100		
14784	Toyopearl Phenyl-650M	1,000	40-90	30-50
14935		5,000		
19818		25		
14478		100		
14783	Toyopearl Phenyl-650C	1,000	50-150	30-50
14943		5,000		
18364		50,000		
43126		25		
14479	Toyopearl Butyl-650S	100	20-50	30-50
14785		1,000		
14944		5,000		
43153		25		
07476	Toyopearl Butyl-650M	100	40-90	30-50
14701		1,000		
07975		5,000		
18826		50,000		
19802	Toyopearl Butyl-650C	25	50-150	30-50
07477		100		
14702		1,000		
07976		5,000		
18355	Toyopearl Butyl-600M	50,000	40-90	40-60 (g/L γ-球蛋白)
43127		25		
07478		100		
14703		1,000		
07977	Toyopearl SuperButyl-550C	5,000	50-150	52-70
22826		50,000		
21448		25		
21449		100		
21450	Toyopearl Hexyl-650C	1,000	50-150	30-50
21451		5,000		
21452		50,000		
19955		25		
19956	Toyopearl SuperButyl-550C	100	50-150	52-70
19957		1,000		
19958		5,000		
19959		50,000		
44465	Toyopearl Hexyl-650C	25	50-150	30-50
19026		100		
19027		1,000		
19028		5,000		
21973		50,000		

TSKgel HIC填料 (高分辨率)

货号	产品名称	包装 (mL)	粒 径 (μm)	吸附载量 (mg 溶菌酶/mL 填料)
43276	TSKgel Ether-5PW (20)	25	15-25	10-30
16052		250		
16053		1,000		
18437		5,000		
43176	TSKgel Ether-5PW (30)	25	20-40	10-30
16050		250		
16051		1,000		
18439		5,000		
43277	TSKgel Phenyl-5PW (20)	25	15-25	10-30
14718		250		
14719		1,000		
18438		5,000		
43177	TSKgel Phenyl-5PW (30)	25	20-40	10-30
14720		250		
14721		1000		
17210		5,000		