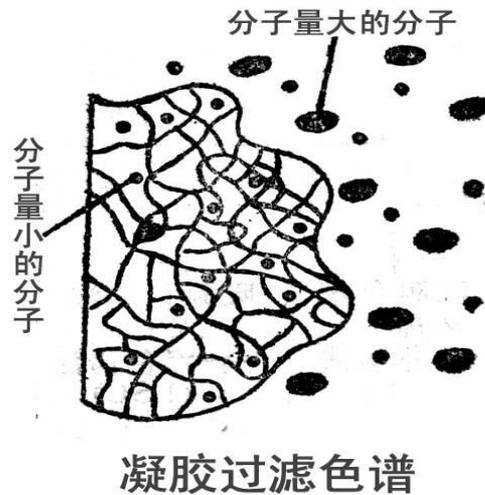


凝胶过滤色谱及填料

北京韦氏博慧色谱科技有限公司 韦新桂

一、凝胶过滤

凝胶过滤色谱 (Gel filtration Chromatography) 是利用凝胶过滤色谱填料的网状结构根据分子量大小不同进行分离的一种方法。它的分离原理是把分子量大小不同的样品上样到色谱柱中, 分子量大的分子不能通过扩散进入凝胶填料内部, 而与流动相一起先流出色谱柱。较小的分子可通过部分孔道、更小的分子可通过任意孔道扩散进入填料内部。这种颗粒内部扩散的结果, 使小分子向柱下的移动减慢, 从而样品根据分子大小的不同依次顺序从柱内流出达到分离的目的。凝胶象分子筛一样, 将大小不同的分子进行分离, 因此凝胶过滤又叫分子筛色谱或称尺寸排阻色谱 (Size-exclusion Chromatography)。



凝胶过滤具有许多优点: 填料为不带电荷的惰性物质, 不与溶质分子作用, 因此分离条件温和, 蛋白质收率高, 重现性好; 工作范围广, 分离分子量的覆盖面大, 可分离从几百到数百万分子量的分子; 设备简单、易于操作, 周期短, 每次分离之后不需再生故而可连续使用, 有的已连续应用几百次甚至达千次。这些优点使凝胶过滤已成为一种通用的分离方法, 在生化产品的制备技术中已获广泛应用。

凝胶过滤主要有脱盐与分级分离两大用途。脱盐是分离大小两类不同的分子即无机盐与生物大分子的; 分级是将分子大小相近的物质分开, 通常为大分子间的分离。目前凝胶过滤不但用于实验室, 在大规模生产中也能承担重任, 30min 内可处理 500L 样品。脱盐工艺中凝胶填料体积通常为样品体积的 4~5 倍, 流速可达 600cm/h 左右。用于分级分离时必须选用孔径适当、分离范围与样品分子大小相适应的凝胶, 上样量少, 仅为床体积的 5%~10%, 因此这种分离常用于经过浓缩后的样品。柱的加长可提高分离效果, 但对操作不利。在大规模分离中采用“叠式柱”(Stack system), 将几个不高的柱叠加起来, 其易于操作, 流速为同样体积常规柱的 4~5 倍, 且不影响分离效果。

二、凝胶填料应具备的条件

凝胶过滤是生物化学中应用最广泛的分离纯化技术之一, 它具有设备简单、易于操作、活性物质回收率高、重现性好等优点。凝胶过滤填料的性能是获取上述优点的基本保证, 凝胶填料应具备以下条件。

北京韦氏博慧色谱科技有限公司 北京经济技术开发区同济中路甲 7 号 B 座 931 室
邮政编码: 100176 TEL: 010-67804548 13911415318 FAX: 010-67804548

第一，填料本身为惰性物质，在应用过程中它不与溶质、溶剂发生任何作用。

第二，应尽量减少填料内含的带电离子基团，以减少非特异吸附性，提高蛋白质的收率。但由于绝大部分的多糖类骨架中都或多或少地含有一些带电基团（如梭基）等，这些基团在低离子强度时对带电荷的溶质发生作用，将带正电的物质滞留产生非特异吸附。对大多数分子而言，采用离子强度大于 0.02mol/L 的缓冲液即可消除这种效应。

第三，填料内孔径大小要分布均匀，即孔径分布较窄，在分级分离中这点尤为重要。

第四，凝胶珠粒大小均匀，即粒径分布窄。为提高柱效，根据实验目的及条件选用适合的粒径。细粒径分辨率高但流速慢，粗粒径适用于高流速、低压色谱及间歇操作。

第五，填料要具有优良的物理化学稳定性及较高的机械强度以增加使用寿命。

凝胶过滤填料在各种分离填料中占有特殊的地位。由于它有上述优点、能满足生化分离的基本要求，将其经化学改性可衍生出种类繁多的色谱填料，可以制备各种离子交换剂及缓冲离子交换剂，可以制备疏水色谱填料及螯合填料，可以作为亲和色谱吸附剂的载体。因此可认为凝胶过滤填料是各种色谱填料的母体，所以研制新的凝胶过滤填料、提高改进这类填料的性能有广泛的意义。

三、凝胶过滤填料的种类

凝胶过滤填料的骨架主要分为天然多糖类及合成大分子两大类。

1. 多糖类骨架的填料

多糖类主要为纤维素、葡聚糖及琼脂糖等。以天然多糖为母体的凝胶过滤填料是“经典”的分离生物大分子的材料。这类填料具有亲水性及与生物大分子的相容性，可允许生物大分子透过而不发生变性。这类填料原多为软基质，压力降大，不易操作。近年来合成工艺不断改进，生产出刚性、半刚性的骨架，出现了适用于高流速且具有高分辨率的新产品以满足生产规模的需求。除单一的多糖骨架外还出现了琼脂糖与葡聚糖接枝而成的复合凝胶 Superdex 高效过滤填料。新一代填料的出现，提高了生产效率，从小规模过滤发展成为工业生产应用。这类以多糖为骨架的填料虽然“古老”，但由于性能不断改进，老产品更新换代，进一步发挥了其“活力”，故仍是目前生化分离中应用最广、数量最多的凝胶过滤填料。

2. 合成大分子骨架的填料

吸取多糖类骨架亲水性优点，克服其易受微生物侵蚀的缺点，开展了合成有机大分子骨架的研究，选用高亲水性单体经共聚反应并控制孔结构出现了一些合成骨架的填料。除应用多年的聚丙烯酰胺类之外，80 年代还出现了聚乙烯醇系及含羟甲基胺类的新型填料，且已商品化。

3. 由天然大分子与合成高聚物构成混合骨架的填料。

这种骨架既可增加填料的刚性，又使填料具有与生物大分子的相容性，这是第三类骨架。表 9-2 列出主要凝胶过滤填料的牌号及骨架结构。

表 9-2 凝胶过滤介质主要产品牌号及骨架结构

牌 号	骨架类型	生产单位	备 注
Sephadex	葡聚糖	Pharmacia(瑞典)	衍生物: Sephadex LH 系 Sephacorb HP 系
Sepharose	琼脂糖	Pharmacia	主要系列: Sepharose Sepharose CL Sepharose High performance Sepharose FF (离子交换剂系) Superose
Bio-Gel A	琼脂糖	Bio Rad(美)	
Superdex	琼脂糖-葡聚糖	Pharmacia	
Bio-Gel. P	聚丙烯酰胺	Bio Rad	
Sephacryl	葡聚糖-聚丙烯酰胺	Pharmacia	改进产品: Sephacryl HR 系
Ultrogel	琼脂糖-聚丙烯酰胺	Pharmacia	
Trisacryl	聚羟甲基酰胺类	Pharmacia	
Fupergit C	聚丙烯酰胺系	德 国	骨架内还有环氧基
Toyopearl	聚乙烯醇系	Toso Hass (美日联合企业)	
Bio-Beads S-X	聚苯乙烯系	Bio Rad	

第四节凝胶过滤填料的主要品种

一、葡聚糖系

牌号 Sephadex 系列

1.结构

Sephadex 是以氯代环氧丙烷进行交联的葡聚糖珠状凝胶。交联程度影响凝胶的孔结构。依据孔径不同形成 G 型凝胶的系列产品, 表 43 列出葡聚糖凝胶的型号及基本性能, G 后数字越大表示孔径越大, 排阻极限亦越大。

2.性能

(1) 溶胀性 Sephadex 系列均以干态供应, 使用前必须在过量的溶剂中充分溶胀, 沸水浴可加速溶胀, 但要避免剧烈搅拌以防破碎。该系在有机溶剂中及在水中的溶胀程度不同。

(2) 化学稳定性 Sephadex 系列均稳定性好, 但不能耐酸和氧化剂。尤其是刚性差, 容易收缩, 很难适应现在生物技术的快速且精细分离。

该系性能参见表 9-3。

表 9-3 Sephadex 型号及主要性能

型号	干态粒径 μm	分级范围		适用 pH 范围	溶胀体积 ml/g(干)	溶胀时间, h		水力学性能	应用情况	
		球蛋白	葡聚糖			20℃	90℃			
G10	40~120	700	700	2~13	2~3	3	1	K: 19 流速服从 Darcy 定律 K 为比渗透率	(1)适用于脱盐 (2)适用于肽及小分子分离	
G15	40~120	1500	1500	2~13	2.5~3.5	3	1			
G25	粗 100~300 中 50~150 细 20~80 超细 10~40	1000~5000	100~5000	2~13	4~6	3	1			
G50	粗 100~300 中 50~150 细 20~80 超细 10~40	1500~30000	500~10000	2~10	9~11	3	1	400 145 36 13.5		
G75	40~120 超细 10~40	3000~80000 3000~70000	1000~50000	2~10	12~15	24	3	最大操作压力 kPa	最大流速 ^① ml/min ml/cm ² ·h	适用于蛋白质分离
G100	40~100 超细 10~40	4000~150000 4000~100000	1000~100000	2~10	15~20	72	5	15.69 9.41	6.4 1.5 4.2	77 18 50
G150	40~100 超细 10~40	5000~300000 5000~150000	1000~150000	2~10	20~30 18~22	72	5	3.53	1.0 1.9	12 23
G200	40~100 超细 10~40	5000~600000 5000~250000	1000~200000 1000~150000	2~10	30~40 20~25	72	5	1.57	0.5 1.0	6 12
LH-20	基本性能同 G25。适用于脂类、甾类、脂肪酸、激素、维生素等分离。适用 pH 范围 2~13									
LH-60	基本性能同 G50。应用同上。有较高排阻极限。适用 pH 范围 2~10									
Sephasorb HP Ultrafine	排阻极限、分级范围同 G25。适用 pH 范围 2~13									

二、琼脂糖系

琼脂糖系凝胶都是由经过纯化的琼脂糖制备的，其中仅含有极少的带电基因。利用琼脂糖热溶液冷却时可凝胶化的特点，可较方便地制成珠状物。在凝胶过程中由单独的多糖链先形成双螺旋，然后聚集成胶束（如图 9-2 所示）。胶束之间产生了孔，孔的大小取决于胶束的多少，即琼脂糖的浓度。采用不同浓度的琼脂糖溶液，成球后可得到不同孔径的珠状凝胶。琼脂糖系凝胶有两种牌号，分述如下。

1 • Bio-Gel A 系

Bio-Gel A 系是美国 Bio-Rad 公司的产品，为非交联琼脂糖凝胶，受热时凝胶解体，使用温度范围 2~30℃，适用 PH 范围 4~13，其主要性能见表 9-4。

2 • Sepharose 系

Sepharose 系是目前生化分离专用填料中型号最多、应用最广的大家族。其合成工艺不断改进，换代产品不断出现，性能日益完善。表 9-5 列出 Sepharose 系品种及性能。

(1) Sepharose Sepharose 是该系中最早的产品，为非交联结构，因此不能高压灭菌，仅用于 2~40℃。根据琼脂糖含量不同有 3 种型号，含量为 2%、4%、6%的分别命名为 2B、4B 及 6B。

(2) Sepharose CL Sepharose CL 是琼脂糖珠体与 2, 3-二溴丙醇反应后具有共价交联键的产物。交联结构大大提高了珠体的热稳定性及物理化学稳定性，对孔结构无明显影响。交联后凝胶在还原条件下经碱水解以去除硫酸根，减少带电基因，因此这类填料的非特异吸附性比其母体更小。这种凝胶在中性条件下可经 120℃ 消毒，其色谱性能不变。其对应于原母体的命名为 CL-2B、CL-4B 及 CL-6B。Sepharose CL 除用于凝胶过滤外，还广泛用作离子交换剂及亲和吸附剂的母体。

(3) Superose 由珠状琼脂糖经两次交联而制备的新型凝胶为 Superose。琼脂糖先与含双环氧基及多环氧基的混合长链交联剂进行第一阶段交联，然后再与含双功能基的短链交联剂进行第二次交联得到产品。经两次交联后大大提高了填料的刚性，并进一步增强了其物理化学稳定性。用 0.1 mol/L HCl 及 0.1mol/L NaOH 在 40℃ 处理两周，色谱性能无明显变化，还可经受 70% 甲酸及 30% 乙睛处理。

Superose 是适用于高流速的高效凝胶过滤填料，有 Superose 6 及 Superose12 两种型号，

其中含琼脂糖分别为 6%及 12%。10 μ m 的细颗粒以预装柱出售，可用于 HPLC，其制各级可用于快速分离。该产品还衍生出 Protein A Superose、Protein G Superose 及螯合填料。

本公司的凝胶过滤系列填料颗粒均匀，没有死吸附，机械强度好，品种齐全，是做凝胶过滤和亲和色谱不错的选择。此外填料的孔径可按客户要求定制，具体规格等见下表。

韦氏博慧公司的凝胶过滤色谱填料

货号	产品名称	规格	特性及应用
CS-G01-01	琼脂糖凝胶 4B FF	100ml	用于大分子蛋白、超螺旋 DNA、病毒纯化等生物大分的分离纯化。包括已经这些样品的除盐等。分离范围 6x10 ⁴ -20x10 ⁶
CS-G01-02	类似 Sepharose 4 F.F.	500ml	
CS-G01-03		1 L	
CS-G01-04		5 L	
CS-G02-01	琼脂糖凝胶 6B FF	100ml	用于大分子蛋白、超螺旋 DNA、病毒纯化等生物大分的分离纯化。包括已经这些样品的除盐等。分离范围 1x10 ⁴ -4x10 ⁶
CS-G02-02	类似 Sepharose 6 F.F.	500ml	
CS-G02-03		1 L	
CS-G02-04		5 L	
CS-G02F-01	琼脂糖凝胶 6B HP	100ml	用于大分子蛋白、超螺旋 DNA、病毒纯化等生物大分的分离纯化。包括已经这些样品的除盐等。分离范围 1x10 ⁴ -4x10 ⁶
CS-G02F-02	类似 Superose 6 22-45 μ m 高度交联琼脂糖凝胶。	500ml	
CS-G02F-03		1 L	
CS-G02F-04		5 L	
CS-G04-01	琼葡糖凝胶 G15 FF	25ml	最新型凝胶过滤填料，颗粒比 sephadex 的均匀，刚性好，不收缩，在 300cm/h 流速下有高的分辨率。分离范围 100-1500
CS-G04-02	类似 Superdex 系列,应用和 sephadex G 15 相同	100ml	
CS-G04-03		500ml	
CS-G04-04		1 L	
CS-G05-01	琼葡糖凝胶 G25 FF	25ml	最新型凝胶过滤填料，颗粒比 sephadex 的均匀，刚性好，在 300cm/h 流速仍有高分辨率。分离范围 1000-5000，可用于除盐。
CS-G05-02	类似 Superdex 系列,应用和 sephadex G 25 相同	100ml	
CS-G05-03		500ml	
CS-G05-04		1 L	
CS-G06-01	琼葡糖凝胶 G50 FF	25ml	最新型凝胶过滤填料，颗粒比 sephadex 的均匀，刚性好，不收缩，在 300cm/h 流速下有高的分辨率。分离范围 1000-30000
CS-G06-02	类似 Superdex 系列,应用和 sephadex G 50 相同	100ml	
CS-G06-03		500ml	
CS-G06-04		1 L	
CS-G07-01	琼葡糖凝胶 G75 FF	25ml	最新型凝胶过滤填料，颗粒比 sephadex 的均匀，刚性好，不收缩，在 300cm/h 流速下有高的分辨率。分离范围 3000-100000
CS-G07-02	类似 Superdex 系列,应用和 sephadex G 75 相同	100ml	
CS-G07-03		500ml	
CS-G07-04		1 L	
CS-G08-01	琼葡糖凝胶 G100 FF	25ml	最新型凝胶过滤填料，颗粒比 sephadex 的均匀，刚性好，不收缩，在 300cm/h 流速下有高的分辨率。分离范围 4000-160000
CS-G08-02	类似 Superdex 系列,应用和 sephadex G100 相同	100ml	
CS-G08-03		500ml	
CS-G08-04		1 L	
CS-G09-01	琼葡糖凝胶 G150 FF	25ml	最新型凝胶过滤填料，颗粒比 sephadex 的均匀，刚性好，不收缩，在 300cm/h 流速下有高的分辨率。分离范围 5000-300000
CS-G09-02	类似 Superdex 系列,应用和 sephadex G150 相同	100ml	
CS-G09-03		500ml	

CS-G09-04		1 L	
CS-G10-01	琼葡糖凝胶 G200 FF	25ml	最新型凝胶过滤填料, 颗粒比 sephadex 的均匀, 刚性好, 不收缩, 在 300cm/h 流速下有高的分辨率。分离范围 5000-600000
CS-G10-02	类似 Superdex 系列, 应用和 sephadex G200 相同	100ml	
CS-G10-03		500ml	
CS-G10-04		1 L	
	以下填料平均粒径 34um		
CS-G05F-01	琼葡糖凝胶 G25 HP	25ml	最新型凝胶过滤填料, 颗粒比 sephadex 的均匀, 刚性好, 不收缩, 在 100cm/h 流速下有高的分辨率。分离范围 1000-5000
CS-G05F-02	类似 Superdex 系列, 应用和 sephadex G 25 相同	100ml	
CS-G05F-03		500ml	
CS-G05F-04		1 L	
CS-G06F-01	琼葡糖凝胶 G50 HP	25ml	最新型凝胶过滤填料, 颗粒比 sephadex 的均匀, 刚性好, 不收缩, 在 100cm/h 流速下有高的分辨率。分离范围 1000-30000
CS-G06F-02	类似 Superdex 系列, 应用和 sephadex G 50 相同	100ml	
CS-G06F-03		500ml	
CS-G06F-04		1 L	
CS-G07F-01	琼葡糖凝胶 G75 HP	25ml	最新型凝胶过滤填料, 颗粒比 sephadex 的均匀, 刚性好, 不收缩, 在 100cm/h 流速下有高的分辨率。分离范围 3000-100000
CS-G07F-02	类似 Superdex 系列, 应用和 sephadex G 75 相同	100ml	
CS-G07F-03		500ml	
CS-G07F-04		1 L	
CS-G08F-01	琼葡糖凝胶 G100 HP	25ml	最新型凝胶过滤填料, 颗粒比 sephadex 的均匀, 刚性好, 不收缩, 在 100cm/h 流速下有高的分辨率。分离范围 4000-160000
CS-G08F-02	类似 Superdex 系列, 应用和 sephadex G100 相同	100ml	
CS-G08F-03		500ml	
CS-G08F-04		1 L	
CS-G09F-01	琼葡糖凝胶 G150 HP	25ml	最新型凝胶过滤填料, 颗粒比 sephadex 的均匀, 刚性好, 不收缩, 在 100cm/h 流速下有高的分辨率。分离范围 5000-300000
CS-G09F-02	类似 Superdex 系列, 应用和 sephadex G150 相同	100ml	
CS-G09F-03		500ml	
CS-G09F-04		1 L	
CS-G10F-01	琼葡糖凝胶 G200 HP	25ml	最新型凝胶过滤填料, 颗粒比 sephadex 的均匀, 刚性好, 不收缩, 在 100cm/h 流速下有高的分辨率。分离范围 5000-600000
CS-G10F-02	类似 Superdex 系列, 应用和 sephadex G200 相同	100ml	
CS-G10F-03		500ml	
CS-G10F-04		1 L	

三、聚丙烯酰胺系

Bio-Gel P 是丙烯酸胺与 N, N'-亚甲基双丙烯酸胺共聚而成的亲水性凝胶, 其中含有极少的游离电荷, 羧基含量 < 3.0 pmol/g 干胶, 因此非特异吸附性很小。这类合成高聚物结构稳定、不受微生物侵蚀, 120°C 消毒 30min 性能不变。改变交联剂用量可控制不同孔径得到不同排阻极限的系列产品 (见表 9-6), 但是它们刚性差, 流速慢, 现在很少用。

表 9-6 Bio-Gel P(聚丙烯酰胺类凝胶)

牌 号	粒 径 范 围 (湿) (目) μm		分 离 范 围 Daltons	湿 床 体 积 ml/g(干)	流 速 范 围 线速度, cm/h	应 用
P-2	细 超细	200~400 ~400	40~80 <40	100~1 800	3.5	10~15 5~10
P-4	中 细 超细	100~200 200~400 ~400	80~150 40~80 <40	800~4 000	5	15~20 10~15 5~10
P-6	粗 中 细 超细	50~100 100~200 200~400 ~400	150~300 80~150 40~80 <40	1 000~6 000	7	20~25 15~20 10~15 5~10
P-10	粗 中 细 超细	50~100 100~200 200~400 ~400	150~300 80~150 40~80 <40	1 500~20 000	9	20~25 15~20 10~15 5~10
P-30	粗 细 超细	50~100 100~200 ~400	150~300 80~150 <80	2 500~40 000	11	20~25 7~13 5~10
P-60	粗 细 超细	50~100 100~200 ~400	150~300 80~150 <80	3 000~60 000	14	10~15 4~6 2~5
P-100	粗 细 超细	50~100 100~200 ~400	150~300 80~150 <80	5 000~100 000	15	10~15 4~6 2~5
P-200	粗 细 超细	50~100 100~200 ~400	150~300 80~150 <80	30 000~200 000	25	10~15 3~6 2~5
P-300	粗	50~100	150~300	60 000~400 000	30	2~4

适用于脱盐及分级分离,还广泛用于酶、糖蛋白纯化及血清蛋白、多糖、肽等分离、纯化

四、Sephacryl 系

Sephacryl 凝胶是由烯丙基葡聚糖与 N、N' 一亚甲基双丙烯酸胺经共聚而制备的一种共价交联的刚性珠体, 其规格等见下表。

表 9-7 Sephacryl 凝胶性能

型 号	分 级 范 围		DNA 排阻极限 (碱基对)	粒 径 (湿态) μm	适 用 pH 范 围	物 理 化 学 稳 定 性
	球 蛋 白	葡 聚 糖				
S-100 HR	1 000~ 100 000	—	—	25	3	(1) pH 及离子强度改变时,床体 积变化极微
S-200 HR	5 000~ 250 000	1 000~ 80 000	118	{	{	(2) pH7, 在 121℃可消毒 30min
S-300 HR	10 000~ 1.5×10^5	2 000~ 100 000	118	75	11	(3) 在 0.2mol/LNaOH、0.1 mol/LHCl、1mol/LHAc、6mol/L 盐酸胍、8mol/L 尿素、1%SDS、 2mol/LNaCl、24%乙 醇、30%丙 醇、30%乙腈及各常用缓冲溶液中 于 40℃保存 7 天,介质性能不变
S-400 HR	20 000~ 8×10^6	10 000~ 2×10^6	271			
S-500 HR	--	40 000~ 2×10^7	1078			
S-1000 SF	--	5×10^5 ~ > 10^8	20 000			(4) 贮存于 20%乙醇中,防止微 生物侵蚀

五、凝胶过滤色谱的应用

凝胶过滤色谱是重要的生物大分子纯化的手段, 但是传统的填料如葡聚糖凝胶等容

易收缩，流速慢，而且颗粒分布范围宽，分离效果不大理想，而且琼脂糖和葡聚糖混合凝胶则刚性好，无非特异吸附，颗粒分布范围狭窄，分离效果更好，而且流速更快，是目前凝胶过滤色谱理想的填料。更为奇妙的是随着技术的发展，孔径可根据目标产物而定制填料的孔径，这样可以大大节省填料及分离的时间。

凝胶过滤色谱分离通常用于除盐和分子量不同的生物大分子分离，前者最为有效，它对柱子和填料的要求都不高，流速还快，是凝胶过滤色谱最好用的方法。而后者对于分子量差别不是很大的生物大分这就要更高的柱子，更细的填料，这才有可能分开，即使如此，失败也常常难免，而且收率也不理想。如果提高分离效果，通常只能加长柱子，这样无疑会增加分离的成本和时间。

经过这些年的实践，笔者认为最好用的还是类似除盐这种方式的凝胶过滤色谱。例如一次工艺开发中一个 His 标签蛋白分子量在 7 万多，也许是聚合体或结构松散，过琼葡糖凝胶 G200 HP 或 Superdex 200 柱都是走外水体积，原来的工艺分离步骤为 4-5 步，收率只有 10% 左右，难以产业化。通过改进，先过镍琼脂糖凝胶 FF 亲和再上葡糖凝胶 G200 HP 柱子除盐及分离一些杂蛋白，这样两步就得到纯度大于 95%，收率高达 70% 左右。凝胶柱子在这里既除盐同时也分去杂蛋白，短粗柱就可以完成，上样量为柱填料的 25% 左右，极大节约了成本和时间。

另一个例子的是重组蛋白很关键而繁琐的问题就是酶切后的混合样品的分离，一个用 GST 标签表达的小分子蛋白，在酶切后有 GST 融合蛋白，GST 标签，酶，及目标产物，亲和柱上或者填料上酶切理想是得到目标蛋白及酶，但是实际还有一些标签或融合蛋白会混在样品中。最好的方法是一步完成这分离过程，为此本公司特别合成一个凝胶过滤的填料，琼葡糖凝胶 G40 HP，使其分离的上限为两万左右，这样可以使目标蛋白可进入填料的内孔，而标签，融合蛋白，酶等大分子完全进不去，先出来，然后得到的就是目标蛋白，通过这样的方法，5 升葡糖凝胶 G40 HP 的短粗柱，一次可分离 1 升多的样品。一步就可达到分离效果，处理量大，分离完全，收率好，节约了成本和时间。如果用都在分离范围内的分离方法，这柱子要用细长型，填料至少需要 20 升，也未必能分开。以上的例子再次说明凝胶过滤最好用的就是用类似除盐的方法，让目标蛋白和杂质等在不同的分离范围。这样可节省时间和成本，同时可提高分离效率和收率。过去凝胶过滤填料的孔径是很难选择的，毕竟可用的填料孔径有限，而今天凝胶填料的孔径是可控制和定制的，极大提高了凝胶过滤色谱的分离效果，是一个新的进步，一个新的起点，新的希望。