

CM Starose 6 High Performance

产 品 说 明 书

CM Starose 6 High Performance

【产品简介】

离子交换层析 (Ion Exchange Chromatography, IEC) 是应用最为广泛的一种蛋白纯化方法, 广泛用于粗纯捕获、中度纯化、精细纯化等各个生物大分子下游纯化工艺阶段。在特定环境 pH 下, 根据分子自身性质的不同, 不同的分子在此条件下带电荷的种类、数量及电荷的分布情况不同, 表现出与离子交换层析介质在结合强度上的差异, 在离子交换层析介质上按结合力由弱到强的顺序被洗脱下来而得以分离。

CM Starose 6 High Performance 介质基质为星谱生物第一代微球 Starose。Starose 基球为 6% 高交联度琼脂糖微球, 生物相容性好, 非特异性吸附极低, 同时物理/化学稳定性高, 易于清洗消毒。Starose 基球粒径分布均一, 内部呈多孔道结构, 有效的增大了比表面积, 同时基球偶联强阳离子配基 CM, 实现了 CM Starose 6 High Performance 介质应用过程中的高载量和高分辨率。

CM Starose 6 High Performance 离子交换层析介质具有以下特点:

1. 高动态结合载量
2. 高分辨率
3. 易于从实验室小试到工业生产规模工艺放大
4. 产品批次间稳定性高

【性能参数】

基质	6%高交联琼脂糖
粒径分布	25-45 μm
平均粒径	34 μm
离子交换类型	弱阳离子
离子交换容量	0.15-0.23 mmol/ml gel
最大耐压	0.3 MPa
pH 稳定性	4-13 (工作; 长期); 3-14 (再生、清洗和消毒; 短期)
化学稳定性	常规水相缓冲液, 8 M 尿素, 6 M 盐酸胍, 1 M 氢氧化钠等
储存条件	20%乙醇, 4-30 $^{\circ}\text{C}$

【实验建议】

1. 装填层析柱

1.1 介质清洗

方法一: 取 CM Starose 6 High Performance 介质, 转移至 G3 砂芯漏斗中抽滤, 加入去离子水搅拌、洗涤、抽干, 重复洗涤抽干 3 次, 最后抽干 20 min。将介质用去离子水重悬, 超声 30 min 去除气泡, 超声过程中轻轻搅拌介质。

方法二: 取 CM Starose 6 High Performance 介质, 静止, 待介质完全沉淀后, 弃去上清

液，加入与介质等体积或更多去离子水搅拌、清洗，静止，弃去上清液，重复清洗 3 次待用。

1.2 层析柱介质装填

1.2.1 检查仪器设备稳定性

取待装填层析柱，检查装柱器、层析柱上下适配器和柱管的完整性，包括胶圈是否缺失或损坏、连接软管是否通畅完整、接头状态、筛板是否丢失、筛网是否破损、玻璃柱是否有裂痕等，检查层析系统是否存在背景压力。

1.2.2 固定层析柱

确认层析柱和层析系统无误后，用去离子水清洗层析柱（如有需要可超声清洗），将层析柱下端适配器连接到层析系统，排出适配器内气泡，再连接到层析柱管下端，并保留约 1 cm 高度的装柱液（防止加入填料时柱底部产生气泡），将装柱器连接到柱管上端，固定层析柱垂直于桌面摆正。

1.3 第一步 恒流装柱

- 1) 装柱前将所有材料控制在相同温度（室温或 4 °C）。
- 2) 用玻璃棒搅拌将介质重悬，搅拌过程不可使用磁力搅拌器等剧烈搅拌方式，同时过程中不可用玻璃棒敲打烧杯内壁，以防介质因外力受损。将重悬后的介质一次性倒入层析柱中，倒入过程中使用玻璃棒轻靠层析柱内壁进行引流，防止倒入过程中产生气泡。
- 3) 将介质倒入层析柱后，快速连接装柱器上端，并打开层析系统泵，流速范围 30-60 cm/h，待介质胶面稳定。稳定后，取下装柱器，将层析柱适配器上端连接至层析系统，并排出内部气泡，插入层析柱中，在距离胶面上端 1-2 cm 处固定。

1.4 第二步 恒压装柱

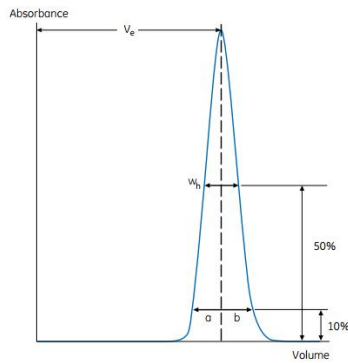
将层析系统设置为 0.1 MPa 恒压装柱，时间 1 h，用 Marker 笔记录最终胶面位置。恒压装柱结束后，将层析柱下端封死，断层层析柱上端与系统连接，轻松上端适配器密封胶圈，将上适配器下压至胶面下 2 mm 处，拧紧密封圈，静止层析柱 10 min，装柱结束。

1.5 柱效检测

方法一	丙酮检测方法	
	平衡液	去离子水
	样品	1%丙酮水溶液，上样 1%柱体积
	流速	30 cm/h
	检测器	紫外吸收 UV 280 nm
方法二	氯化钠检测方法	
	平衡液	0.4 M NaCl 溶液
	样品	0.8 M NaCl 溶液，上样 1%柱体积
	流速	30 cm/h
	检测器	电导率

计算柱效：

根据理论塔板高度 (Height equivalent to a theoretical plate, HETP)、理论塔板数 (Number of Theoretical Plates, N) 和非对称因子 (Asymmetry factor, As) 可有效的评价层析柱的性能。



柱效按式 (1) 计算:

$$N = 5.54 \left(\frac{V_R}{W_{h/2}} \right)^2 \dots \dots \dots (1.1)$$

式中:

N ——理论塔板数

V_R ——进样点到色谱峰极大点的距离, 单位为毫米 (mm)

$W_{h/2}$ ——半高峰宽, 单位为毫米 (mm)

$$HETP = \frac{L}{N} \dots \dots \dots (1.2)$$

式中:

HETP ——理论踏板高度

L ——柱高, 单位为厘米 (cm)

N ——理论塔板数

$$As = \frac{b}{a} \dots \dots \dots (1.3)$$

式中:

As ——非对称因子

a ——峰高为 10%时所对应的左半峰宽, 单位为毫米 (mm)

b ——峰高为 10%时所对应的右半峰宽, 单位为毫米 (mm)

2. 样品准备

2.1 样品溶液需离心后, 经 0.22 或 0.45 μm 滤膜过滤, 去除细小颗粒物, 防止堵塞层析柱和层析系统。

2.2 样品缓冲液 pH 值和电导率值与平衡缓冲液保持一致或接近。

3. 平衡

3.1 推荐平衡缓冲液: 10-50 mM 乙酸钠缓冲液, pH < pI (目的蛋白); (优化: 根据样品稳定条件可调整缓冲液成分, 溶液 pH 值小于目的蛋白 pI, 则目的蛋白于介质结合, 溶液 pH 值大于目的蛋白 pI, 则目的蛋白流穿)。

3.2 流速: 90-120 cm/h。

3.3 用平衡缓冲液平衡层析柱 5 CV (通常 3-5 CV), 当流出液的 pH 和电导率与平衡缓冲液相同时, 表明层析柱完全平衡。

4. 上样

4.1 将预处理好的样品泵入层析柱, 流速 90-100 cm/h。

4.2 慢流速可获得更好的分离效果, 但会增加操作时间。

5. 淋洗

上样结束后，用平衡缓冲液继续冲洗层析柱，直至紫外吸收值接近基线或平稳。

6. 洗脱

6.1 高盐洗脱

建议使用线性梯度洗脱确定洗脱条件，线性梯度洗脱条件为：0-100%洗脱缓冲液（10-50 mM 乙酸钠缓冲液，0.5-1 M 氯化钠， $\text{pH} < \text{pI}$ ），10-20 CV。

6.2 高 pH 洗脱

调节洗脱缓冲液 pH 值高于目的蛋白的等电点，可使目的蛋白从离子交换介质上解吸附并被洗脱。

7. 再生

建议每次纯化过程结束后，均用含有 1-2 M NaCl（或其它无机盐）的缓冲液进行冲洗层析柱，去除残留蛋白及杂质，最后再用平衡缓冲液冲洗 5-10 CV，完成再生。

8. 在线清洗

当层析柱工作时反压明显增大，即表明介质需要进行在线清洗。根据杂质与层析介质相互作用的方式不同，可采取不同的清洗策略。

8.1 去除离子结合蛋白

2 M NaCl，清洗 1-3 CV。

8.2 去除弱疏水结合蛋白、沉淀蛋白、脂蛋白

1 M NaOH 溶液，正/反向清洗 1-2 CV，直至杂质流出。

8.3 去除强疏水结合蛋白、脂蛋白、脂质

70%乙醇或 30%的异丙醇，正/反向清洗 2-5 CV。

清洗后，均用纯水清洗 5-10 CV。再根据实验计划进行结合缓冲液平衡或保存处理。

注：使用高浓度有机溶剂清洗液时，应逐步增加有机溶剂浓度，避免层析柱中产生气泡。

9. 消毒

用 0.5-1.0 M NaOH 清洗层析柱，保留时间 1-2 h。

10. 保存

10.1 未开封的介质可以储存在 4-30 °C 环境中。

10.2 使用过的介质需用 20%乙醇进行置换，储存在 4-8 °C 环境中。