



Hydroxyapatite (CHT I , CHT II)

目录

1. 产品介绍.....	1
2. 纯化流程.....	1
3. 填料的清洗和存储.....	3
4. 订购信息及相关产品.....	4

1. 产品介绍

羟基磷灰石介质 (Hydroxyapatite, CHT) 是下游纯化中一种独特的复合模式刚性填料, 具有离子交换与金属亲和两种结合方式, 拥有其他填料所不具备的特殊分离能力。可以通过钙离子捕获目的蛋白, 也可以通过磷酸根去捕获带正电的基团。羟基磷灰石介质由无机物在高温下烧结制成, 不含任何动植物成分。该介质可以应用于不同类型单克隆和多克隆抗体、双抗及抗体片段、重组蛋白、疫苗、酶、核酸、病毒颗粒等各类生物大分子的纯化。天地人和公司拥有 CHT I 和 CHT II 两种类型的产品, 每种类型提供三种粒径的选择, 具体性能见表 1。CHT I 适用于酸性蛋白纯化, CHT II 因其孔径更大, 更适合于 IgM、病毒、VLP、质粒等大颗粒生物分子 (>400KD) 的纯化。羟基磷灰石介质强大的功能, 使其可以胜任捕获至精纯的任一阶段。

表 1. Hydroxyapatite 产品性能

产品型号	CHT I	CHT II
孔径	50-70 nm	70-90 nm
动态载量	> 25 mg lysozyme/g CHT	> 12.5 mg lysozyme/g CHT
官能团	Ca ²⁺ 、PO ₄ ³⁻ 、-OH	
微球平均粒径	20 μm、40 μm、60 μm	
振实密度	0.6-0.8 g/ml	
推荐流速	50-1000 cm/h	
pH 稳定性	6.5-14, 可在 1 M NaOH 中存储 1 年以上	
试剂耐受	1 M NaOH, 6 M 尿素, 8 M 盐酸胍, 乙醇, 甲醇, 100%乙腈	
消毒	1-2 M NaOH	
再生	0.4 M 磷酸钠缓冲液, pH 7-7.5; 1 M 磷酸三钠缓冲液, pH 11-12; 如需更高磷酸盐浓度, 可采用 0.4 -1 M 磷酸钾缓冲液	
高压灭菌	121℃, 20 min	
最大压力	100 bar (1500 psi)	
存储条件*	0.1 M NaOH, 室温	

*开封前请在密封、干燥、室温 (4-20℃) 下以干粉形态保存, 此处为开封后的存储条件。

2. 纯化流程

2.1 层析柱装填

2.1.1 装柱缓冲液

可以使用 pH 6.5 或以上的含磷酸盐的溶液, 或高 pH 溶液, 推荐试剂如下:

- 20 mM 磷酸盐, 150 mM NaCl, pH 6.8-8.0
- 0.1 M NaOH

2.1.2 称重

计算装填所需层析介质的重量: CHT 层析介质用量=柱体×振实密度, 称重所需重量的介质;

以 20 ml 装填体积为例, 振实密度为 0.71, 所需干填料量为: 20 ml × 0.71 g/ml=14.2 g。

2.1.3 实验室规模操作步骤如下:

- 1) 称取所需重量的介质, 用塑料搅拌棒将介质悬浮于 3.5 倍体积的装柱缓冲液中, 形成匀浆液;
- 2) 静置使填料中的空气分离出来;
- 3) 将层析空柱用夹具夹好后, 调平层析空柱;
- 4) 浸润底部筛板, 预留 1-2 cm 的装柱缓冲液, 关闭层析柱出口;





- 5) 用塑料搅拌棒将填料再次悬浮，然后沿着柱壁倒入层析柱延长管中；
- 6) 打开层析柱底部出口，开启泵，使其在设定的流速（600-1000 cm/h）下进行。应使用至少为预期运行流速的 2 倍流速装柱；
- 7) 关闭层析柱出口，移除延长管，插入适配器，使其刚好接触到介质的表面；
- 8) 连接层析系统，打开层析柱出口，用 250 cm/h 的流速继续平衡 3-5 个柱体积；
- 9) 将适配器调节至刚好接触到平衡后的介质表面；

2.1.4 生产规模操作步骤如下：

- 1) 每升柱体积称取 710 g 介质干粉，用塑料搅拌棒将介质悬浮于 1.82 L 装柱缓冲液，制备 50% (V/V) 匀浆液；
- 2) 使用桨叶或顶置叶轮搅拌，保持填料悬浮（不能使用产生剪切力的搅拌装置）；
- 3) 关闭层析柱的排水口，用倾析法或隔膜泵将匀浆液注入层析柱，将顶部适配器安装到层析柱中，5 min 后待介质沉降，顶部出现上清后，缓慢降低适配器排除顶部空气，并用装柱缓冲液清洗适配器上的流动收集器和入口线路；
- 4) 以 200-300 cm/h 的流速运行 2 个柱体积，待介质面不再下沉后，调低适配器，使介质固定位板和层析柱顶端留有 1-5 mm 距离。应使用至少为预期运行流速的 1.5 倍流速装柱，可用较低的流速（约 60 cm/h）长时间运行层析柱，去除柱床中的空气。切勿将适配器降至介质柱床中，造成 CHT 颗粒不可逆的损伤；

2.1.5 柱效评价

- 1) 装好的色谱柱按下表进行柱效测试；

样品	0.1-1% 丙酮
上样量	1% 柱体积
洗脱液	水
线性流速	60-100 cm/h
检测	UV280

- 2) 柱效计算；

3) 根据 UV 或电导率曲线计算理论塔板高度 (HETP)、理论塔板数 (N) 和非对称因子 (As)，公式： $HETP=L/N$ ， $N=5.54(VR/Vh)^2$ ；
其中：VR=保留体积

Vh=半高峰宽

L=柱高

N=理论塔板数

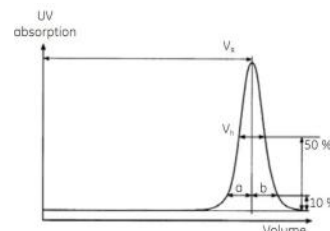
Ve 和 Vh 的单位应一致；

$As=a/b$

其中：a=在 10% 峰高处的第一个半峰宽，b=在 10% 峰高处的第二个半峰宽；

- 4) 结果评价

由上述公式计算出的 HETP 的数值若在介质平均颗粒直径的 2-4 倍，且非对称因子在 0.8-1.8 则判定为合格。



2.2 层析方法

2.2.1 不同样品纯化试剂推荐

步骤	抗体纯化试剂	核酸纯化试剂
冲洗	去离子水	去离子水
平衡	400 mM PB, pH 6.5 10 mM PB, 4-8 ppm Ca^{2+} , pH 6.5 (可提高 Ca^{2+} 浓度提高介质稳定性)	400 mM PB, pH 7.0 10 mM PB, 1 mM EDTA, pH 7.0 (注意：EDTA 会缩短介质的使用寿命)
上样	10 mM PB, 4-8 ppm Ca^{2+} , pH 6.5	样品中不含非醋酸盐碱性裂解物
淋洗	10 mM PB, 4-8 ppm Ca^{2+} , pH 6.5	10 mM PB, 1 mM EDTA, pH 7.0
洗脱	10 mM PB, 15 ppm Ca^{2+} , 0-2 M NaCl (线性洗脱)，pH 6.5 (如未出现洗脱峰，可提高磷酸盐浓度)	0-400 mM PB (线性洗脱)，1 mM EDTA, pH 7.0
清洗	400 mM PB, pH 7.0-7.5 去离子水	N/A (注：这是一个单循环的纯化步骤，更多的循环使用需进行方法开发)





步骤	病毒纯化试剂	酸性蛋白纯化试剂
冲洗	600 mM PB, pH 7.2	去离子水
平衡	10 mM PB, pH 7.2	400 mM PB, pH 6.7 5 mM PB, 12-20 ppm Ca^{2+} , 50-100 mM NaCl, pH 6.7 (可提高 Ca^{2+} 浓度提高介质稳定性)
上样	10 mM PB, pH 7.2	5 mM PB, 12-20 ppm Ca^{2+} , 50-100 mM NaCl, pH 6.7
淋洗	10 mM PB, pH 7.2	5 mM PB, 12-20 ppm Ca^{2+} , 50-100 mM NaCl, pH 6.7
洗脱	10-600 mM PB (线性洗脱)	从 5 mM PB, 12-20 ppm Ca^{2+} , 50-100 mM NaCl, pH 6.7 到 120 mM PB, 50-100 mM NaCl, pH 6.7
清洗	600 mM PB, pH 7.2 800 mM 磷酸钾, pH 7-7.5	400 mM PB, pH 6.7 去离子水

2.2.2 样品准备

上样之前确保样品溶液有合适的离子强度和 pH 值, 样品可以用平衡或洗杂液进行透析或稀释。样品在上样前建议离心或用 0.22 μm 或 0.45 μm 滤膜过滤, 减少杂质, 调高蛋白纯化效率和防止堵塞柱子。

2.2.3 层析柱法纯化

介质装填好后, 可以用各种常规的中低压色谱系统。

- 1) 将泵管道中注满去离子水。去掉上塞子, 将层析柱连接至色谱系统中, 打开下出口, 将预装柱接到色谱系统中, 并旋紧。
- 2) 用 3-5 倍柱体积的去离子水冲洗出储存缓冲液。
- 3) 使用至少 5 倍柱床体积的平衡液平衡色谱柱。
- 4) 利用泵或样品环上样 (上样量不要超过介质载量的 80%)。注: 样品的粘度增加使得即使上样体积很少, 也会导致层析柱很大的反压, 大量的样品体积也可能造成很大的反压, 使得进样器更难使用。
- 5) 用淋洗液冲洗柱子, 直到紫外吸收达到一个稳定的基线 (一般至少 10-15 个柱体积)。
- 6) 线性洗脱: 0-100% 洗脱液洗脱至少 20 个柱体积, 收集洗脱液, 即目的蛋白组分。
等度洗脱: 洗脱液洗脱至少 15 个柱体积, 首次测试后, 后续放大纯化, 可使用 5-10 倍柱体积的选定盐浓度洗脱液洗脱, 该方法有利于抗体在一个比较集中的浓度洗脱, 从而减少洗脱液的使用和循环纯化时间。
- 7) 洗脱结束后, 使用 5-10 倍柱体积的清洗缓冲液对介质进行清洗, 去除结合较强的杂质。

3. 填料的清洗和储存

3.1 清洗与再生

层析介质在使用一段时间后柱效可能下降, 分离效果下降, 可采用下面的流程进行清洗和再生。

- 1) 用平衡液冲洗 2 个柱体积;
- 2) 用 400 mM 磷酸盐冲洗 3-5 个柱体积 (如需更高浓度磷酸盐去除结合紧密的杂质, 考虑到磷酸钠溶解度和溶解速度, 可使用磷酸钾; 也可以使用含 5 mM 磷酸盐的 1-2 M KCl/NaCl、8 M 尿素或 6 M 盐酸胍、pH 6.5-7.5 下进行清洗);
- 3) 用小于 20 mM 磷酸盐冲洗 1-2 个柱体积;
- 4) 用 1.0 M NaOH 冲洗 1-2 个柱体积;
- 5) 用平衡液冲洗 4 个柱体积。

3.2 灭菌

介质可采用 1.0 M NaOH 处理 60 min 或在磷酸缓冲液 (pH 7) 中 121 $^{\circ}\text{C}$, 20 min 进行灭菌。

3.3 长期储存

未开封的干粉装介质可在干燥和密封条件下于室温保存五年。已开封的介质如需长期储存, 建议使用 0.1 M NaOH 溶液, 在室温条件下, 阴凉、密闭存放, 避免阳光直射。

不建议使用叠氮化物或含氯化物的抗菌剂保存填料。





4. 订购信息及相关产品

名称	货号	规格
Hydroxyapatite 60 (CHT I 60)	SA111005	5 g
	SA111020	20 g
	SA111100	100 g
	SA111500	500 g
	SA1111KG	1 kg
Hydroxyapatite 60 (CHT II 60)	SA112005	5 g
	SA112020	20 g
	SA112100	100 g
	SA112500	500 g
	SA1121KG	1 kg
Hydroxyapatite 40 (CHT I 40)	SA106005	5 g
	SA106020	20 g
	SA106100	100 g
	SA106500	500 g
	SA1061KG	1 kg
Hydroxyapatite 40 (CHT II 40)	SA107005	5 g
	SA107020	20 g
	SA107100	100 g
	SA107500	500 g
	SA1071KG	1 kg
Hydroxyapatite 20 (CHT I 20)	SA113005	5 g
	SA113020	20 g
	SA113100	100 g
	SA113500	500 g
	SA1131KG	1 kg
Hydroxyapatite 20 (CHT II 20)	SA114005	5 g
	SA114020	20 g
	SA114100	100 g
	SA114500	500 g
	SA1141KG	1 kg

