



# CM Beads 6FF

## 目录

|                   |   |
|-------------------|---|
| 1. 产品介绍.....      | 1 |
| 2. 纯化流程.....      | 1 |
| 3. 填料清洗与保存.....   | 2 |
| 4. 问题及解决方案.....   | 3 |
| 5. 订购信息及相关产品..... | 3 |

## 1. 产品介绍

离子交换填料广泛用于生物制药和生物工程下游蛋白质、核酸及多肽的分离纯化。主要包括强酸性阳离子交换填料、弱酸性阳离子交换填料、强碱性阴离子交换填料和弱碱性阴离子交换填料四种。离子交换填料均以高交联的 6%琼脂糖为介质，可耐受较高的流速及更高的化学稳定性，适合实验室及工业大规模纯化。

**CM Beads 6FF** 是一种弱阳离子交换填料，离子交换基团为  $-O-CH_2COO^-$ ，性能见表 1。

表 1. CM Beads 6FF 产品性能

| 性能      | 指标                                     |
|---------|----------------------------------------|
| 基质      | 高度交联的 6%琼脂糖微球                          |
| 离子交换类型  | 弱阳离子                                   |
| 离子载量    | 约 0.09-0.13 mmol H <sup>+</sup> /ml 介质 |
| 粒径      | 45-165 μm                              |
| 压力流速*   | 300-600 cm/h                           |
| 最大压力    | 0.3 MPa, 3 bar                         |
| pH 稳定范围 | 4-13                                   |
| 储存缓冲液   | 20%乙醇                                  |
| 储存温度    | 4-30℃                                  |

\*: 层析柱 50x500mm, 柱高 15cm, 25℃去离子水在 0.1 MPa 时的线性流速。

## 2. 纯化流程

### 2.1 缓冲液的准备

所用水和缓冲液在使用之前建议用 0.22 μm 或 0.45 μm 滤膜过滤。

所使用的平衡液和洗脱液，根据不同离子交换填料自行选择。基本原则是低盐上样，高盐洗脱。

### 2.2 样品准备

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，提高蛋白纯化效率和防止堵塞柱子。

### 2.3 介质装填

#### 2.3.1 重力柱的装填

- 1) 取合适规格的重力层析柱，装入下垫片，加入适量纯水润洗柱管和垫片，关闭下出口。
- 2) 将 **CM Beads 6FF** 混合均匀，用枪头吸取适量浆液加入至重力柱中（介质实际体积占悬液的一半），打开下出口流干保护液。
- 3) 加入适量纯水冲洗介质，待柱管中液体重力流干后，关闭下出口。
- 4) 装入润洗后的上垫片，确保垫片与填料之前没有空隙，且保持水平。
- 5) 装填好的重力柱可以直接加入平衡液进行平衡，暂不使用时则加入保护液，4-30℃保存。

#### 2.3.2 中压层析柱的装填

**CM Beads 6FF** 被广泛应用于工业纯化，因此，涉及到各种中低压色谱层析柱的填装，下面介绍填装层析柱的方法。

装柱前根据层析柱直径计算柱子底面积，根据所需装柱高度计算所需介质体积，公式如下：

$$V = 1.15\pi r^2 h$$

V: 所需介质体积 ml

1.15: 压缩系数

r: 柱管半径 cm

h: 装填高度 cm





**注意:** 所取悬液体积应为介质体积的两倍, 因为介质体积只占悬液总体积的一半, 另一半为保护液。

- 1) 用去离子水冲洗层析柱底筛板与接头, 确保柱底筛板上无气泡, 关闭柱底出口, 并在柱底部留出 1-2 cm 的去离子水。
- 2) 将介质悬浮起来, 小心的将浆液连续地倒入层析柱中。用玻璃棒沿着柱壁倒入浆液可减少气泡的产生。
- 3) 如果使用储液器, 应立即在层析柱和储液器中加满水, 将进样分配器放置于浆液表面, 连接至泵上, 避免在分配器或进样管中产生气泡。
- 4) 打开层析柱底部出口, 开启泵, 使其在设定的流速下进行。最初应让缓冲液缓慢流过层析柱, 然后缓慢增加至最终流速, 这样可避免液压对所形成柱床的冲击, 也可以避免柱床形成的不均匀。如果达不到推荐的压力或流速, 可以用你所使用泵的最大流速, 这样也可以得到一个很好的装填效果。(注意: 在随后的色谱程序中, 不要超过最大装柱流速的 75%) 当柱床高度稳定后, 在最后的装柱流速下至少再上 3 倍柱床体积的去离子水。标上柱床高度。
- 5) 关闭泵, 关闭层析柱出口。
- 6) 如果使用储液器, 去除储液器, 将分配器置于层析柱中。
- 7) 将分配器推向柱子至标记的柱床高度处。允许装柱液进入分配器, 锁紧分配器接头。
- 8) 将装填好的层析柱连接至泵或色谱系统中, 开始平衡。如果需要可以重新调整分配器。

## 2.4 样品纯化流程

### 2.4.1 孵育法纯化

- 1) 根据纯化的样品量, 取适量 **CM Beads 6FF** 加入离心管中, 1000 rpm 离心 1 min, 吸弃上清; 也可加入重力柱中, 流干保护液。
- 2) 向离心管中加入 5 倍介质体积的平衡液清洗介质, 1000 rpm 离心 1 min, 吸弃上清; 如使用重力柱, 则直接在重力柱中清洗, 直接重力流干平衡液; 重复两次以上。
- 3) 加入样品, 封闭离心管或重力柱管, 4℃振荡孵育 2-4 h 或者 37℃孵育 30 min-2 h。
- 4) 孵育结束后, 1000 rpm 离心 1 min, 吸弃上清, 或过滤收集介质, 上清保留作为流穿, 用于电泳鉴定。
- 5) 用 5 倍介质体积的洗杂液清洗介质, 1000 rpm 离心 1 min 或重力柱管过滤, 去除上清 (注意不要吸到介质), 重复 3-5 次, 中间建议更换新离心管。
- 6) 加入 3-5 倍柱体积的洗脱液进行洗脱, 室温孵育 10-15 min, 1000 rpm 离心 1 min 或重力柱管收集洗脱液, 可重复 2-3 次。

### 2.4.2 重力柱法纯化

- 1) 将装填好的 **CM Beads 6FF** 重力柱用 5 倍柱体积平衡液进行平衡, 使填料处于与目的蛋白相同的缓冲液体系下, 重复 2-3 次。
- 2) 将样品加到平衡好的重力柱中, 样品保留时间至少 2 min, 保证样品和介质充分接触, 收集流出液, 可以反复上样增加结合效率。
- 3) 用 10-15 倍柱体积的洗杂液进行洗杂, 去除非特异性吸附的杂蛋白, 收集洗杂液。
- 4) 使用 5-10 倍柱体积的洗脱液洗脱, 分段收集, 每一个柱体积收集一管, 分别检测, 既可以保证所有结合的目的蛋白被洗脱, 又可以得到高纯度和高浓度的蛋白。

### 2.4.3 中压层析柱法纯化

**CM Beads 6FF** 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。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。上样量不要超过柱子的结合能力。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) 用洗杂液冲洗柱子, 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) 用洗脱液采用一步法或线性梯度洗脱。一步洗脱中, 通常 5 倍柱体积洗脱液就足够了。梯度洗脱可以用一个小的梯度, 例如 20 倍柱体积或更多, 来分离不同结合强度的蛋白质。

## 2.5 SDS-PAGE 检测

将使用纯化产品得到的样品 (包括流出组分、洗杂组分和洗脱组分) 以及原始样品使用 SDS-PAGE 检测纯化效果。

## 3. 填料清洗与保存

### 3.1 常规清洗

离子交换填料每次使用后可以 1 M NaCl 甚至更高离子强度溶液或高 pH 溶液清洗, 然后用至少 5 倍柱体积的平衡液进行平衡, 至离子强度或 pH 值稳定。

### 3.2 CIP (Cleaning In Place) 清洗

离子交换填料可以重复使用而无需再生, 但随着非特异性结合的蛋白的增多和蛋白的聚集, 往往造成流速和结合载量都下降, 这时可按照下面方法对填料进行清洗。





#### 去除一些沉淀或变性物质, 建议使用下面的方法

用 2 倍柱体积的 1 M NaOH 溶液进行清洗, 然后立即用 5 倍柱体积的 PBS, pH 7.4 清洗。

#### 去除一些疏水性吸附造成的非特异性吸附物质

用 3-4 倍柱体积的 70%乙醇或 3-4 倍柱体积的 1% Triton™ X-100 清洗, 然后立即用 5 倍柱体积的 PBS, pH 7.4 清洗。

#### 去除一些离子键结合物质

用 3-4 倍柱体积的 2 M NaCl 清洗, 然后立即用 5 倍柱体积的 PBS, pH 7.4 清洗。

### 3.3 填料保存

- 1) 未使用的填料储存在带盖容器中, 将盖子拧紧置于 4-30℃保存。
- 2) 使用过的填料, 先用纯水冲洗 5 倍柱体积, 再用 20%乙醇冲洗 2 倍柱体积以上, 然后将填料置于 4-30℃保存, 建议每间隔 1-2 个月用 20%乙醇冲洗 2 倍柱体积以上置换旧保护液。

## 4. 问题及解决方案

| 问题     | 原因分析     | 推荐解决方案                                              |
|--------|----------|-----------------------------------------------------|
| 柱子反压过高 | 填料被堵塞    | 按照第3部分进行填料清洗。                                       |
|        |          | 裂解液中含有微小的固体颗粒, 建议上柱前使用滤膜 (0.22或0.45 μm) 过滤, 或者离心去除。 |
| 洗脱样品较杂 | 填料重复多次使用 | 按照第3部分进行填料清洗或更换新填料                                  |
|        | 洗杂不充分    | 增加洗杂液体积, 确保填料充分平衡/洗杂                                |
|        | 样品带电性能相似 | 优化洗脱条件                                              |

## 5. 订购信息及相关产品

| 产品名称            | 货号       | 规格     |
|-----------------|----------|--------|
| Q Beads 6FF     | SI001025 | 25 ml  |
|                 | SI001100 | 100 ml |
|                 | SI001500 | 500 ml |
|                 | SI00101L | 1 L    |
|                 | SI00110L | 10 L   |
| lexCap Q 6FF    | SI001C11 | 1×1 ml |
|                 | SI001C51 | 5×1 ml |
|                 | SI001C15 | 1×5 ml |
|                 | SI001C55 | 5×5 ml |
| SP Beads 6FF    | SI003025 | 25 ml  |
|                 | SI003100 | 100 ml |
|                 | SI003500 | 500 ml |
|                 | SI00301L | 1 L    |
|                 | SI00310L | 10 L   |
| lexCap SP 6FF   | SI003C11 | 1×1 ml |
|                 | SI003C51 | 5×1 ml |
|                 | SI003C15 | 1×5ml  |
|                 | SI003C55 | 5×5 ml |
| DEAE Beads 6FF  | SI005025 | 25 ml  |
|                 | SI005100 | 100 ml |
|                 | SI005500 | 500 ml |
|                 | SI00501L | 1 L    |
|                 | SI00510L | 10 L   |
| lexCap DEAE 6FF | SI005C11 | 1×1 ml |
|                 | SI005C51 | 5×1 ml |
|                 | SI005C15 | 1×5 ml |
|                 | SI005C55 | 5×5 ml |





(续表)

|               |          |        |
|---------------|----------|--------|
| CM Beads 6FF  | SI007025 | 25 ml  |
|               | SI007100 | 100 ml |
|               | SI007500 | 500 ml |
|               | SI00701L | 1 L    |
|               | SI00710L | 10 L   |
| lexCap CM 6FF | SI007C11 | 1×1 ml |
|               | SI007C51 | 5×1 ml |
|               | SI007C15 | 1×5 ml |
|               | SI007C55 | 5×5 ml |
| lexCap Select | SI008CS  | 4×1 ml |

