



# Phmac 60 Q(M)

## 目录

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

## 1. 产品介绍

离子交换层析是根据生物分子表面电荷（种类、数目和分布）差异实现对不同生物分子的分离的方法。Smart-Lifesciences 新一代离子交换层析介质 **Phmac 60 Q(M)**是以聚甲基丙烯酸酯为基质，该基质经过表面亲水改性后再键合离子交换基团，同时具备了对生物活性大分子良好的相容性和优秀的物理及化学稳定性，极大地提高了纯化效率。设计孔径广泛用重组蛋白、抗体、酶、多糖、核酸、病毒等大生物分子的纯化。

**Phmac 60 Q(M)** 离子交换介质具有以下优点：

- 刚性强，更适合放大生产；
- 填料装填压缩系数和溶胀系数小，稳定性高；
- 高强度的基质，可以使用更快的流速和更高的柱床，纯化效率提高；
- 耐受氢氧化钠清洗再生，延长柱子使用寿命，降低生产成本。

表 1 Phmac 60 Q(M) 技术参数

| 填料名称     | Phmac 60 Q(M)                                                                      |
|----------|------------------------------------------------------------------------------------|
| 离子交换类型   | 强阴离子交换                                                                             |
| 基质       | 聚甲基丙烯酸酯                                                                            |
| 平均粒径     | ~60 $\mu\text{m}$                                                                  |
| 离子载量     | 0.15-0.25 mmol/ml                                                                  |
| 动态载量     | $\geq 80$ mg BSA/ml 介质                                                             |
| 官能团      | -N <sup>+</sup> (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>                                    |
| 最大耐压     | 0.5 MPa                                                                            |
| CIP 在位清洗 | 0.5 M NaOH                                                                         |
| 推荐流速     | 150-750 cm/h                                                                       |
| pH 稳定性   | 2-12                                                                               |
| 化学稳定性    | 所有常用缓冲液，1M 醋酸，1M 氢氧化钠，1M 盐酸，70%乙醇，30%异丙醇，30%乙腈，1%SDS，6M 盐酸胍，8M 尿素等常用有机溶剂；避免接触强氧化剂。 |
| 储存缓冲液    | 20%乙醇                                                                              |
| 储存温度     | 4-30℃                                                                              |

注：其他粒径、孔径和离子载量的微球可进行定制。

## 2. 纯化流程

### 2.1 层析柱装填

**Phmac 60 Q(M)** 产品存储于 20%乙醇中，推荐装填系数为 1.05。**Phmac 60 Q(M)** 产品是高机械强度“硬胶”，既可装低压柱也可装中高压柱，比较合适的柱子筛板型号为 10-23  $\mu\text{m}$ 。

#### 2.1.1 装柱缓冲液

可以使用 0.4 M NaCl 或纯水。

#### 2.1.2 介质匀浆液的准备





### 2.1.2.1 倾析法小颗粒去除（以 500 ml 填料为例）

- 1) 将 500 mL 的填料倒入 3000 mL 的烧杯中（烧杯的体积应为填料体积的 6 倍）；
- 2) 向烧杯中添加 2000 mL 的 0.4 M NaCl 或纯水（约为填料体积的 4 倍），搅拌并静置；

**注：**Phmac 60 Q(M) 需要静置的时间约为 45-60 分钟。

- 3) 一旦填料静置完成后，小心倒出表面的悬浮液（含小颗粒）；
- 4) 将步骤 2) 和 3) 重复 3 次或以上。

### 2.1.2.2 匀浆液的配制

将所需的介质匀浆用倾析法（第 2.1.2.1 节）清除填料中的小颗粒后，补加装柱液定容至目标柱体积的 1.67-2 倍匀浆浓度（50%-60%）。装填层析柱时可以使用重力沉降法，但是采用流速压力法或动态轴向压缩法，装填效果会更好。

**注：**在装柱匀浆液的准备过程中，尽量避免碾压摩擦介质，不可用磁力搅拌或挤压式蠕动泵，机械搅拌时桨叶不可离器壁太近，另外层析介质如需重新装柱，也须按上述步骤（第 2.1.2.1-2 节）来准备装柱匀浆液。

### 2.1.3 实验室规模的层析柱装柱：

- 1) 将层析空柱用夹具夹好后，调平层析空柱；
- 2) 浸润底部筛板，预留 1-2 cm 的装柱缓冲液，关闭层析柱出口；
- 3) 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；
- 4) 装柱设备连接装柱器或者层析柱上柱头，打开层析柱底部出口，开启泵，用装柱液为流动相开始装柱（刚开始流出液有可能观察到一些浑浊现象，随着装柱进行 1-2 个柱体积之后会变澄清）；
- 5) 待柱床高度稳定后，出口连接层析系统，使其在设定的流速（150-750 cm/h）下进行（应使用至少为预期运行流速的 2 倍流速装柱），或使压强达到 0.5 MPa，压力恒定后再稳定 20 min；
- 6) 关闭层析柱出口，移除延长管，安装层析柱适配器，将其调节至胶面以下 2-3 mm 位置即可。

### 2.1.4 柱效评价

- 1) 装好的色谱柱按下表进行柱效测试；

|      |                                   |
|------|-----------------------------------|
| 样品   | 0.8 M NaCl/1%丙酮                   |
| 上样量  | 1%柱体积                             |
| 洗脱液  | 0.4 M NaCl/水                      |
| 线性流速 | 60-100 cm/h                       |
| 检测   | 电导检测仪/UV280                       |
| 合格标准 | As: 0.8-1.5; Plates (N/m) : >3000 |

- 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

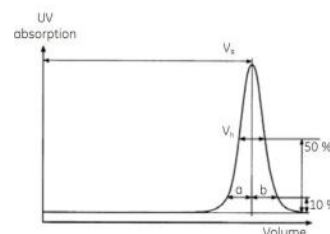
L=柱高

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；



## 2.2 层析方法

### 2.2.1 缓冲液的准备

所用水和缓冲液在使用之前建议用 0.22  $\mu$ m 或 0.45  $\mu$ m 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。

### 2.2.2 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  $\mu$ m 或 0.45  $\mu$ m 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，该方法有利于样品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. 填料清洗与保存

### 3.1 常规清洗

离子交换填料每次使用后可以用 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 0.2-0.5 M NaOH 溶液进行清洗，然后立即用 5 倍柱体积的 PBS，pH7.4 清洗。

**去除一些疏水性吸附造成的非特异性吸附物质**

方案一：使用 50%乙醇或者 30%异丙醇清洗 5-10 个柱体积，接触时间为 10-15min 可以去除此类污染物。然后，再使用 10 倍柱体积的去离子水清洗。

方案二：使用含有 0.1-0.5%非离子去污剂的 0.1 M 醋酸溶液，接触时间为 1-2 h。去污剂处理后，需要使用 70%的乙醇清洗 5 个柱体积，以彻底去除去污剂。最后使用 10 倍柱体积的去离子水清洗。

**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，pH7.4 清洗。

### 3.3 填料储存

- 1) 使用过的层析介质或预装柱再生清洗后，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 2-30℃ 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。
- 2) 未使用的层析介质或预装柱，防止乙醇挥发以及微生物生长，建议 3 个月更换一次 20%乙醇。

## 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    | 流速过高              | 降低流速                                                               |
|           | 填料被堵塞             | 按照第3部分进行填料清洗。<br>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                                                             |
| 多次使用后载量降低 | 杂质吸附在柱子上，影响目的蛋白结合 | 按照第3部分进行填料清洗。                                                      |





## 5. 订购信息及相关产品

| 名称            | 货号       | 规格     |
|---------------|----------|--------|
| Phmac 60 Q(M) | SI104005 | 5 ml   |
|               | SI104025 | 25 ml  |
|               | SI104100 | 100 ml |
|               | SI104500 | 500 ml |
|               | SI10401L | 1 L    |
|               | SI10410L | 10 L   |

