
NW Rose HP IEX 系列

离子交换层析介质

产品使用说明书

NW Rose HP 系列

离子交换层析介质

离子交换层析 (Ion Exchange Chromatography, IEC) 是现代生物技术中使用最广泛的一类纯化方法, 从二十世纪六十年代起应用到生物分子的分离领域, 一直在分离纯化生物分子方面起着重要作用。NW Rose HP 系列高分辨率离子交换层析介质是在 NW Rose HP 系列离子交换系列优化的高分辨率的层析介质; 优化了微球的粒径以及配基密度, 适用于生物分子分离纯化工艺中的中度纯化步骤。

HP (High Performance) 系列离子交换介质是有三部分组成:

- 1) 交联的网状基架, 该基架具有多孔、亲水、化学稳定性好的特点;
- 2) 固定在基架上的功能基团, 它是荷电基团, 决定了离子交换层析介质的性质;
- 3) 与功能基团带相反电荷的离子 (可称为平衡离子), 该离子可以逆的与功能基团相结合。

NW Rose HP (High Performance) 系列离子交换层析介质优化了粒径, 50-60 μm , 颗粒分散更均一。在不降低分辨率的基础上, 减小了操作中的反压。

NW Rose HP 系列离子交换层析介质有以下特点:

- 高动态载量和良好的流速特性
- 更稳定的化学和物理稳定性, 方便放大
- 重复性高, 分辨率高
- 简单的在位清洗和消毒
- 实验室以及工业层析柱装柱

NW Rose CM HP, NW Rose DEAE HP 为客户定制层析介质。

NW Rose HP 系列离子交换层析介质包括以下几类:

- 强阴离子交换层析介质: NW Rose Q HP
- 弱阴离子交换层析介质: NW Rose DEAE HP
- 强阳离子交换层析介质: NW Rose SP HP
- 弱阳离子交换层析介质: NW Rose CM HP

表 1. NW Rose HP 系列离子交换层析介质技术参数表。

产品名称	NW Rose Q HP	NW Rose DEAE HP	NW Rose SP HP	NW Rose CM HP
外观	20%保存的凝胶匀浆			
骨架	高度交联的琼脂糖			
功能基团	$-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	$-(\text{CH}_2)_2\text{N}^+\text{H}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$	$-(\text{CH}_2)_3\text{SO}_3^-$	$-\text{O}-\text{CH}_2\text{COO}^-$
颗粒大小*	50 μm			
离子载量	140~200 $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}\text{Cl}^-$	100~140 $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}\text{Cl}^-$	140~200 $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}\text{H}^+$	80~120 $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}\text{H}^+$
耐压	0.3 MPa			
建议流速	150-200 cm/h			
最大流速	400 cm/h (0.1 MPa XK26/30 柱高 15 cm 25 °C)			
工作 pH 范围	2~12	2~12	4-13	4-13
化学稳定性	常见水相溶液, 1M NaOH、6M 盐酸胍、30%异丙醇、70%乙醇			
pH 稳定性	2~14 (短期)			
载量	不同蛋白差别很大, 每毫升介质结合几毫克到一百多毫克都是正常范围			

*颗粒为 D,50

层析介质使用前处理

1. 建议使用的层析柱类型：
按照应用领域选择层析柱：大生物分子分离纯化一般选用柱高 10-20cm 的层析柱。
2. NW Rose HP IEX 琼脂糖系列凝胶处理
- 2.1 根据层析柱的体积计算需要的 NW Rose HP 量
层析柱体积=层析柱底面积×柱高
层析介质用量 (mL 或 L) = (柱体积×1.15)
层析介质匀浆用量 (mL 或 L) =层析介质用量/层析介质匀浆浓度

注意：

- 使用的缓冲液或水需要脱气处理(如果是注射用水，可以不用脱气)。
- 一般原包装的匀浆浓度为 75%左右。如果不确定匀浆浓度，可以将层析介质匀浆倒入量筒中，过夜后（一般 12-20 小时），计算层析介质自然沉降体积。
- 原包装 IEX NW Rose HP 是在 20%乙醇中保存，使用砂芯漏斗（G2 或 G3 型号），负压抽滤的方式，更换装柱缓冲液（装柱缓冲液一般使用含有 0.15-0.5 M NaCl 的缓冲液，水，或平衡缓冲液），更换 3 次。搅拌时不要用力过度。
- 如果需要高压灭菌，可以在 121°C，20 min 高压灭菌。
- 在凝胶溶胀过程中不要使用磁力搅拌子搅拌，使用磁力搅拌子会导致介质颗粒破裂。

2.2 将准备好的层析介质配置成 50%左右匀浆，搅匀备用。

注意：装柱过程中，凝胶温度过高可能会使层析柱损坏。

装柱

请参考层析柱使用手册（不同公司生产的层析柱，使用方法不同，操作不当可能会损坏层析柱和层析介质。装柱缓冲液一般使用水或平衡缓冲液。注意层析柱筛网孔径，在 15-20 μm 最佳。

- a) 调整层析柱处于竖直状态。
- b) 层析柱底膜排气，层析柱底部保留 1cm 装柱缓冲液。
- c) 加装装柱器，一般装柱高度超过层析柱的 2/3 时，需要加装装柱器。
- d) 将搅匀后的胶悬液一次性缓慢倒入层析柱内，注意不要带入气泡，倒入后用搅胶棒搅拌均匀。
- e) 层析柱柱头连接，注意柱头与系统或蠕动泵之间加压力表（工业规模层析柱需要），将层析柱头膜排气。
- f) 将层析柱头插入层析柱，使层析柱头底膜接触到液面，除去液面与层析柱头膜间的气泡。

- g) 连接系统或蠕动泵，调整流速，控制压力，不要超过 3 bar。
- h) 随着流速，层析介质界面逐渐下降。待层析介质界面稳定后（30 min 内层析界面不再下降），标记界面位置。
- i) 停泵，卸下装柱器（如果需要）。将柱头下降至层析介质界面（标记位置再下 0.5 cm）。
- j) 按照停泵前流速继续压胶 20-30 min。如果层析介质界面稳定，装柱完成。

柱效评价

1. 柱效测定
可以采用丙酮或者 NaCl 作为指示剂，按照下表配制指示剂溶液和流动相。

表 2.柱效测试条件。

样品	1.0% (v/v) 丙酮水溶液	2 M NaCl (溶于水)
样品体积	1.0%柱体积	1.0%柱体积
流动相	水	0.4 M NaCl 水溶液
流速	30 cm/h	30 cm/h
检测器	UV 280 nm	电导率

2. 计算柱效：
根据 UV 或者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），公式如下：

$$\text{HETP} = L/N$$
$$N = 5.54(VR/Wh)^2$$

其中：VR=保留体积

Wh=半高峰宽

L=柱高

N=理论塔板数

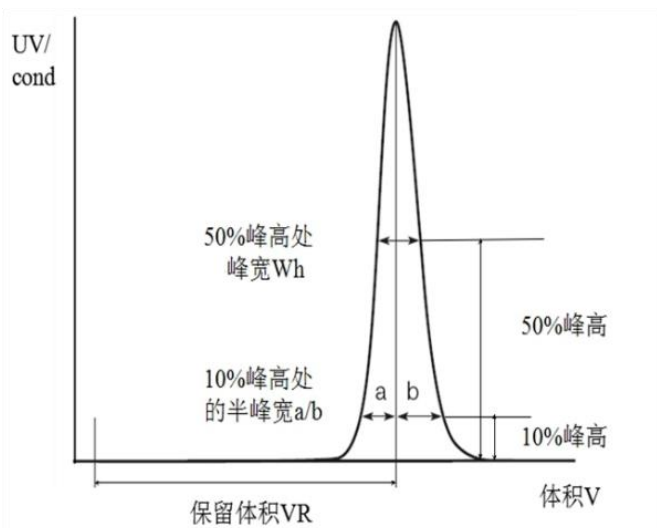
VR 和 Wh 的单位应一致；

$$As = b/a$$

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



3. 结果评价

由以上公式计算出的 HETP 的数值若小于三倍溶胀后的介质平均颗粒大小且非对称因子在 0.8~1.8 则判定为合格。对于不理想的柱效需要分析原因并重新装柱。

对于不同应用领域，所需要的柱效不同：

- a) 当纯化分离需要高分辨率时，柱效要求较高，HETP 在 2-4 倍的介质平均颗粒。
- b) 组份分离时，柱效要求不高。

层析介质清洗和再生

随着层析介质的使用次数增加，污染物在层析柱上积累也在不断增加，定期的在位清洗能防止污染物的累积，保持稳定的工作状态。根据介质的污染程度确定在位清洗的频率（如果污染严重建议每次使用之后都应该进行

在位清洗来保证结果重复性）。对于不同类型的杂质和污染物建议清洗条件如下：

1. 先用 2 个柱体积的 2 M NaCl 冲洗掉结合比较紧的蛋白或选择 1 M NaAc, pH 3 通过改变 pH 来去除结合较强的蛋白。
2. 对于强疏水性蛋白、沉淀蛋白的去除：先用 2-3 CV 1 M NaOH 清洗，然后立即用 5-10 CV 纯水冲洗。
3. 脂蛋白和脂类物质的去除：先用 5-10 CV 的 70%乙醇或 30%异丙醇清洗，后用 5-10 CV 纯水冲洗。

层析介质灭菌

NW Rose HP IEX 琼脂糖系列可以采用 1M NaOH 处理 0.5-1 h 以上达到灭菌和去除热原的目的。

层析介质长期储存

使用后的 NW Rose HP IEX 琼脂糖系列层析介质密闭保存储存于 20%乙醇中，为了防止乙醇挥发以及微生物生长，建议 3 个月更换一次新鲜的 20%乙醇。

销毁和回收

由于 NW Rose HP IEX 在自然界很难降解，为了保护环境建议采用焚烧处理。

问与答

如果您在使用 NW Rose HP IEX 层析产品遇到任何问题，请参考下表进行解决或联系我们。

问题 1 层析搅拌为匀浆后，会有一些细小白色的泡沫漂浮？

这种现象一般是在使用一段时间，或在介质搅拌中使用了磁力搅拌器或介质转移中使用了蠕动泵，造成介质微球破碎。或介质长时间没有使用，介质沉降过实，开始搅拌太过剧烈。

问题 2 蛋白经过离子交换后纯度不高？

离子交换的分辨率主要有几个因素决定：

- 层析介质的柱效，柱效高分辨率高。见柱效测定
- 层析介质的粒径，粒径小分辨率高；粒径大，分辨率低。
- 洗脱方式，线性洗脱分辨率高。
- 按照样品中目标与杂质的电荷差别，在试验中找到差别最大环境的 pH，选用对应的层析介质。

问题 3 纯化后我的蛋白收率很低，怎么办？

检测流穿收集样品的浓度（或活性），确认样品是否吸附到层析介质上，还是部分吸附。（样品过载，也是收率低的原因）
在再生液中检测样品，样品是否吸附很紧。（可以改变缓冲液和介质类型）
CIP 中是否有样品存在（样品沉淀在层析柱中，更改层析条件）。

问题 4 样品不吸附

样品不吸附有：

是否过载，检测流穿中的样品浓度活性；

样品的环境可能不带电或电荷与层析介质带电荷相同。

问题 5 是否可以重复上样，可以重复上样多少次？

检测纯化目的是否达到，层析介质是否被污染。一般样品澄清、无颗粒、无沉淀，分离后的样品同样澄清，此类样品可以重复上样 10-15 次。

问题 6 离子交换纯化后如何脱盐？

可以使用凝胶过滤技术脱盐，如：NW DEX G-25C，或在洗脱时采用 pH 洗脱的方式。

问题 7 层析介质变色，结块。

这种现象一般是使用过一段时间的层析介质，层析介质被样品污染，例如：样品中的色素、脂类以及核酸类物质；尝试不同的 CIP 方法解决。对于一般的样品 NW Rose 系列层析介质可以使用 300-600 次，对于样品复杂的样品可以使用 100-200 次。

问题 8 如何确定层析介质的寿命？

实验室使用：一般从层析介质的柱压，流速，颜色等简单判断介质寿命。

工业生产中：需要严格按照工艺验证的方法确定介质寿命。

订货信息

产品型号	包装	货号
NW Rose Q HP	25 mL	60022-101400-2025
	100 mL	60022-101400-2100
	500 mL	60022-101400-2500
	1 L	60022-101400-1001
	5 L	60022-101400-1005
	10 L	60022-101400-1010
NW Rose SP HP	25 mL	60022-108700-2025
	100 mL	60022-108700-2100
	500 mL	60022-108700-2500
	1 L	60022-108700-1001
	5 L	60022-108700-1005
	10 L	60022-108700-1010
NW Rose DEAE HP	25 mL	60022-101401-2025
	100 mL	60022-101401-2100
	500 mL	60022-101401-2500
	1 L	60022-101401-1001
	5 L	60022-101401-1005
	10 L	60022-101401-1010
NW Rose CM HP	25 mL	60022-101402-2025
	100 mL	60022-101402-2100
	500 mL	60022-101402-2500
	1 L	60022-101402-1001
	5 L	60022-101402-1005
	10 L	60022-101402-1010

注：可以提供 7.7 mm × 22 mm、16 mm × 25 mm、7.7 mm × 100 mm 的层析预装柱。更多规格型号或定制需求，请联系我们。

苏州纳微科技股份有限公司

全国咨询热线：400-828-1622

邮箱：info@nanomicrotech.com

(本公司产品仅限科研或工业使用)

中文网站：www.nanomicrotech.com

英文网站：en.nanomicrotech.com

2022-苏州纳微科技股份有限公司版权所有

总部地址：苏州工业园区百川街2号 215123

2022年6月第二版

