
NW Rose Plus HP 系列

离子交换层析介质

产品使用说明书

文件编号：NM-A-DF-0306

版本号：A2



NW Rose Plus HP 系列

离子交换层析介质

离子交换层析技术 (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。

作为新一代琼脂糖离子交换层析介质，NW Rose Plus HP 采用全新的琼脂糖微球，通过对微球孔径和粒径进行优化后偶联离子配基制成，介质具有高流速、高刚性、高分辨率的特征。

在层析中，介颗粒大小影响到生物分子纯化的分辨率，颗粒越小，分辨率越高；但是颗粒小也是造成高反压的重要因素之一。NW Rose Plus HP 系列层析介质选用 50 μm 粒径高流速、高刚性琼脂糖微球，既提高了分辨率，也降低小粒径对大规模生产的影响。

NW Rose Plus HP 系列离子交换层析介质有以下特点：

- 高动态载量
- 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
- 简单的在位清洗和消毒
- 同时满足实验室及工业放大使用需求

NW Rose Plus HP 系列离子交换层析介质有两款产品：

NW Rose Plus SP HP 阳离子交换层析介质及 NW Rose Plus Q HP 阴离子交换层析介质。

表 1. NW Rose Plus 系列离子交换层析介质技术参数表。

产品型号	NW Rose Plus Q HP	NW Rose Plus SP HP
分离原理	强阴离子交换	强阳离子交换
基质	高流速、高刚性琼脂糖微球	
粒径	50 μm	
配基	季胺根	磺酸基
离子载量	0.14-0.18 $\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ (H^+)	0.12-0.17 $\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ (Cl^-)
最大耐压	0.5 MPa	
CIP 在位清洗	0.5 M NaOH	
最大流速	600 cm/h (0.1MPa, XK16/40 层析柱, 柱高 20 cm, 25°C)	
pH 稳定性	2-12 (工作), 2-14 (CIP)	
化学稳定性	常见水相溶液, 1 M NaOH、6 M 盐酸胍、30%异丙醇、70%乙醇	
使用温度	4-40°C	
存储条件	20%乙醇, 4-30 °C	

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 10-20 cm 的层析柱。

2. 层析介质处理。

2.1 根据层析柱的体积计算需要的层析介质的量

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。
- 原包装层析介质是在 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 0.15-0.5M 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%~75%左右匀浆，搅匀备用。

注意：装柱过程中，凝胶温度过高可能会损坏层析柱。

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 1 cm 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 2.5 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：

$$HETP=L/N$$

$$N=5.54(VR/Wh)^2$$

其中：VR=保留体积

Wh=半高峰宽

L=柱高

N=理论塔板数

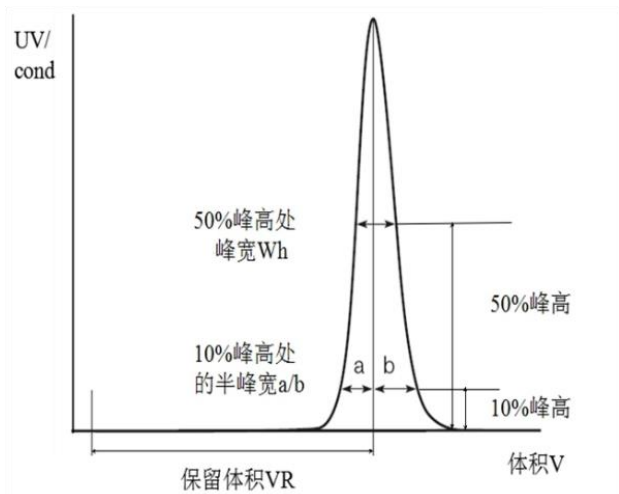
VR 和 Wh 的单位应一致；

$$As=b/a$$

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：

- 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。
- 组份分离时，柱效要求不高。

层析方法

NW Rose Plus HP 离子交换层析介质主要用于捕获后的中度纯化或精细纯化。

- 离子交换层析介质是按照生物分子的电荷差异分离的，在使用前要熟知目标样品的等电点或带电荷的状态。
- 按照目标分子的稳定性等性质选择缓冲液，确定 pH，一般阳离子低于等电点 1 个 pH，阴离子高于等电点 1 个 pH。
- 使用 10-20cm 柱高的实验室柱做预实验。
- 根据预实验的结果分析，优化实验条件。

NW Rose Plus Q HP 分离纯化：

实验条件：

层析介质：NW Rose Plus Q HP

层析柱：7.7×100 mm，CV 4.65 ml

Buffer A: 25 mM Tris-HCl pH 8.5

Buffer B: 25 mM Tris-HCl +1.0 M NaCl, pH 8.5

样品：8 mg/ml BSA, 5 mg/ml 淀粉糖苷酶溶解于 Buffer A

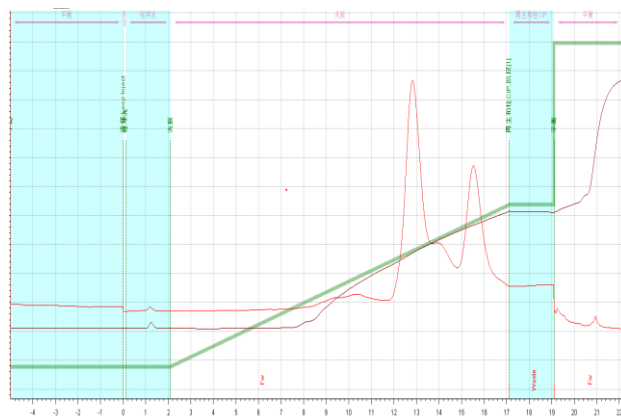


图 1. NW Rose Plus Q HP 分离纯化图。

NW Rose Plus SP HP 分离纯化：

实验条件：

层析介质：NW Rose Plus SP HP

层析柱：7.7×100 mm，CV 4.65ml

Buffer A: 20mM PB pH 6.8

Buffer B: 20mM PB +1.0 M NaCl, pH 6.8

样品：2.5 mg/ml 溶菌酶, 4 mg/ml 细胞色素 C 溶解于 Buffer A

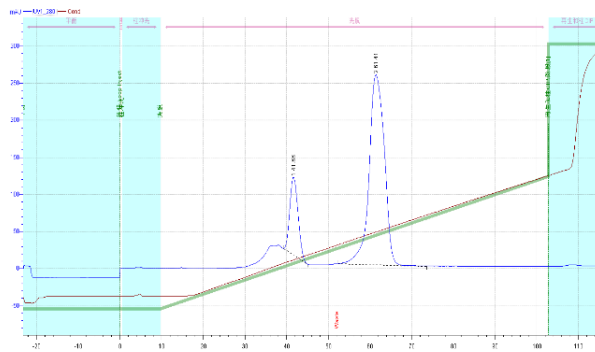


图 2. NW Rose Plus SP HP 分离纯化图。

NW Rose Plus Q HP、NW Rose Plus SP HP 在抗体研发生产中也有很高的载量。

标准蛋白的 10%	NW Rose Plus Q	NW Rose Plus SP
DBC	HP	HP
IgG, mg/ml	77.5	68.3
BSA, mg/ml	56.2	-
Lysozyme, mg/ml	-	65.2

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。

注意：70%乙醇或 30%异丙醇使用前应进行脱气处理；在位清洗过程中流速可选择 30-60 cm/h；堵塞严重的时候可以采用反向清洗。

层析介质灭菌

NW Rose Plus HP 系列离子交换层析介质可以采用 1 M 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

NW Rose Plus HP 系列离子交换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 Plus HP 系列离子交换层析介质在自然界很难降解，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 Plus HP 系列离子交换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 层析介质搅拌为匀浆后，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 Plus Q HP	25 mL	60023-547000-2025
	100 mL	60023-547000-2100
	500 mL	60023-547000-2500
	1 L	60023-547000-1001
	5 L	60023-547000-1005
	10 L	60023-547000-1010
NW Rose Plus SP HP	25 mL	60023-546800-2025
	100 mL	60023-546800-2100
	500 mL	60023-546800-2500
	1 L	60023-546800-1001
	5 L	60023-546800-1005
	10 L	60023-546800-1010

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

中文网站：www.nanomicrotech.com

总部地址：苏州工业园区百川街2号 215123

邮箱：info@nanomicrotech.com

英文网站：en.nanomicrotech.com

(本公司产品仅限科研或工业使用)

2022-苏州纳微科技股份有限公司版权所有

2022年6月第二版

