
NM90Agarose

复合离子交换层析介质

产品使用说明书

文件编号：NM-W-DF-0604

版本号：A3



NM90Agarose

复合离子交换层析介质

离子交换是根据生物分子表面电荷（种类、数目和分布）的差异实现对不同生物分子的分离，是生物大分子分离纯化最常用的方法。纳微科技的 NM90Agarose 复合离子系列采用高交联琼脂糖微球，微球键合了多种功能的离子基团，具有不同于传统离子交换层析介质的选择性。

NM90Agarose 的技术参数如表 1 所示。

表 1. NM90Agarose 技术参数。

产品型号	NM90Agarose HCM	NM90Agarose HAM
分离原理	复合弱阳离子交换	复合强阴离子交换
基质	琼脂糖	琼脂糖
粒径	90 μm	90 μm
配基	苯基/羧基	苯基/季胺盐
动态结合载量	~ 50 mg·mL ⁻¹ (Lys)	~ 30 mg·mL ⁻¹ (BSA)
最大耐压	0.3 MPa	0.3 MPa
CIP 在位清洗	1 M NaOH	1 M NaOH
推荐流速	150-250 cm/h	150-250 cm/h
pH 稳定性	2~12	2~12
化学稳定性	所有常用缓冲液，1 M 醋酸，1 M 氢氧化钠，1 M 盐酸，70%乙醇、30%异丙醇，30%乙醇，1%SDS，6M 盐酸胍、8 M 尿素等常用有机溶剂；避免接触强氧化剂。	所有常用缓冲液，1 M 醋酸，1 M 氢氧化钠，1 M 盐酸，70%乙醇、30%异丙醇，30%乙醇，1%SDS，6M 盐酸胍、8 M 尿素等常用有机溶剂；避免接触强氧化剂。
使用温度	4-30 °C	4-30 °C

高流速、低反压

层析柱装填

NM90Agarose 产品储存于 20%乙醇中，1.5 Kg 匀浆液对应 1 L 介质体积，推荐装柱匀浆流动相为 0.1 M NaCl 或纯水，推荐装填系数为 1.15-1.2。NM90Agarose 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 μm。装柱步骤如下：

1) 计算所需层析介质匀浆液质量

所需匀浆液质量 (Kg) = 目标柱体积 (L) × 1.5 Kg/L × 1.15。

例如，装填 40 cm I.D × 20 cm 的 25 L 层析柱所需匀浆液质量为：25 L × 1.5 Kg/L × 1.15 = 43.125 Kg。为保证层析介质体积计量准确度，在称量之前，必须保证匀浆液浓度是均匀的（可以使用塑料勺缓慢搅拌均匀或使用低于 50 rpm 的机械搅拌匀浆，匀浆完毕静置时间不可超过 10 分钟）。

2) 装柱匀浆液的准备

开始前，准备足量的 0.1 M NaCl（或纯水）作为装柱液进行装柱。下文以装柱液代指 0.1 M NaCl（纯水）。

实验室规模的小柱子（内径 ≤ 50 mm）：

将计算所需的 20 %乙醇介质悬液转移到过滤漏斗，抽滤后加入介质 3 倍体积的装柱液，用塑料勺缓慢搅拌均匀后再抽滤。重复上述步骤两次使层析介质悬液中原先的 20%乙醇被充分置换成装柱液，最后补加装柱液定容至目标柱体积的 1.67~2 倍（浆液浓度 50%~60%）。

大柱子（内径 > 50 mm）：

将计算所需的 20 %乙醇介质悬液在匀浆罐中静置沉降 2 小时以上，然后去除上清液（上清液中可能会有一些轻微浑浊），加入与去除的上清液相同体积的装柱液。缓慢搅拌均匀后静置沉降 2 小时以上，然后去除上清液。重复上述步骤两到三次使介质悬液充分置换成装柱液，最后补加装柱液定容至目标柱体积的 1.67~2 倍（浆液浓度 50%~60%）。

注意：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，另外层析介质如果需要重新装柱，也须按上述过滤或沉降步骤来准备装柱匀浆液。

3) 装柱

- 流动装填：

3-1) 将上述介质悬液充分匀浆, 并转移到柱管中。

3-2) 用装柱液为流动相开始装柱 (装柱刚开始时流出液有可能观察到一些浑浊现象, 随着装柱进行 1-2 个柱体积之后会变清)。

注意: 装柱起始流速不要太高。

3-3) 待柱床高度稳定后, 提高流速至目标最高流速 (推荐最高流速为使用流速的 2 倍) 或者使压强达到目标最高压强 (推荐压强不超过 1.0 MPa), 压力恒定后再稳定 20 分钟。

3-4) 将活塞调至胶面以下 2-3 毫米位置即可。

● **轴向压缩装填 (内径>300 mm):**

3-1) 将柱子进行清洗, 排气。

3-2) 将匀浆罐和柱子连接, 然后排除柱子内多余的溶液, 将活塞降至距下筛板 5 cm。

3-3) 打开进料阀向上移动活塞进行抽料。抽料速度 200~300 cm/h。根据料液浓度确定抽料的量, 换算活塞移动距离。关闭进料阀, 向下移动活塞进行压柱, 压柱速度 60~100 cm/h。

压至填料全部沉降, 柱床高度不再增加, 停止移动活塞, 读取柱床高度, 此时再根据 1.05 的压缩比计算最终活塞最终的位置。

注意: 未避免匀浆液在抽料时进气泡, 一般按照 120% 以上计算填料质量。

柱效评价

装好的色谱柱应使用 2 CV 0.5 M NaCl 溶液平衡, 以 100 cm/h 流速进行柱效测试, 具体测试参数详见表 3:

表 3. NM90Agarose 装填离子交换层析柱的柱效测试方法。

样品	2 M NaCl
上样量	1~5% 柱体积
洗脱液	0.5 M NaCl
线性流速	100 cm/h
检测	2 M NaCl 上样: 电导检测仪

合格标准	As: 0.8-1.5; Plates (N/m) : >3000
------	-----------------------------------

使用方法

1) **平衡。**用 5 CV 以上的平衡缓冲液平衡层析柱, 至流出液电导率和 pH 不变 (与平衡液一致), 缓冲液如 Buffer A, 如 20 mM PB, pH 7.0, 具体的缓冲体系应根据目标蛋白的稳定性和等电点、离子交换介质的种类进行筛选和优化。

2) **上样。**固体样品可用平衡液溶解配制; 低浓度样品溶液可提前浓缩; 高浓度样品溶液可用平衡液稀释。为了避免堵塞层析柱, 样品应经离心或膜过滤处理。上样量根据介质的载量和样品中目标蛋白的含量计算, 上样前确保载量缓冲液应尽可能与平衡液一致。

3) **洗脱。**上样完后继续用平衡缓冲液淋洗至基线稳定, 可以根据实际情况采取改变盐浓度或流动相 pH 的方法依次洗脱吸附于层析介质上的样品。

4) **再生清洗 (CIP)。**定期 CIP 清洗可以防止介质床中蛋白质沉淀污染物的积聚, 有助于保持层析介质的载量、分离效果、流动特性等性能。应根据存在的污染物类型为每个工艺设计特定的 CIP 清洗方法。CIP 清洗频率取决于起始料液的性质和工艺条件, 推荐 CIP 清洗方法如下。

依次使用 5 CV 的 1-2 M NaCl, 5 CV 的 0.5-1 M NaOH, 3 CV 的水, 然后 5 CV 的 1 M 醋酸清洗。

储存

使用后的层析介质或预装柱再生完全后, 密封保存在 20%乙醇中, 建议保存温度 4~25 °C。

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。

故障排除

如果您在使用 NM90Agarose 复合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。

现象	原因分析	建议措施
柱压升高	流速过高	降低流速
	泵和收集器之间的阀门未打开	打开出口
	仪器的在线过滤器堵塞	去除杂质并清洗，或者替换，在使用前对样品和缓冲液用 0.45 μm 或 0.2 μm 进行过滤
	样品在柱子上发生沉淀	执行在位清洗操作（参考再生条件）
	样品较脏或有吸附作用较强的物质残留在填料上	执行在位清洗操作（参考再生条件）
	柱床被压缩	重新填装柱子
	色谱柱使用时间较长	更换色谱柱或更换色谱填料
样品吸附不够充分	样品溶液中离子强度太高	降低样品溶液中的离子强度，如采用稀释或脱盐等手段
	样品的 pH 不合适	调节 pH 增加结合强度
样品在洗脱过程中不被洗脱	洗脱液的洗脱能力过低	更换洗脱能力更强的洗脱液
	洗脱液的 pH 不合适	调整洗脱液的 pH
	色谱柱有残留疏水性较强的杂质	执行在位清洗操作（参考再生条件）
分辨率降低	不合适的洗脱条件，如梯度过陡或流速过高	改变洗脱条件，采用较缓的梯度洗脱或等度洗脱，降低流速
	柱子未装填好	重新装柱
	在柱子顶端或柱后有大部分的混合空间	加高填料的上表面或减少柱子后体积
	柱子过载	清洗并重新平衡色谱柱，降低上样量
进样若干次后对样品的吸附能力降低	样品中的杂质结合在介质上，干扰了正常的结合	执行在位清洗操作（参考再生条件）
使用中柱床出现裂痕	溶胀未充分消除	用 0.5 M NaCl 混合均匀，充分平衡
	溶液中有气泡	减压过滤除气
	外部空气进入系统	加入更多缓冲液，将气体充分赶出
	装填质量欠佳	重新装填
基线漂移	色谱柱未平衡好	增加平衡时间
	洗脱液 A、B 在同一紫外波长下吸收系数不同	使用不同的波长或走没有样品的空白梯度
出现不明杂峰	前一个样品的不完全洗脱	对柱子进行再生
	洗脱液不纯	运行空白梯度对照或使用高纯度的色谱纯级试剂
	痕量离子性杂质结合在色谱柱上，在平衡和上样过程中被浓缩，洗脱时出峰	清洗色谱柱
平衡时间过长	CIP 后直接再平衡	先用 2 CV 的 buffer B（含 1 M NaCl），再用 buffer A 进行平衡

订货信息

产品型号	包装	货号
NM90Agarose HCM	30 mL	04091-090001-2030
	50 mL	04091-090001-2050
	100 mL	04091-090001-2100
	300 mL	04091-090001-2300
	500 mL	04091-090001-2500
	1 L	04091-090001-1001
	5 L	04091-090001-1005
	10 L	04091-090001-1010
	50 L	04091-090001-1050
	100 L	04091-090001-1100
NM90Agarose HAM	30 mL	04092-090001-2030
	50 mL	04092-090001-2050
	100 mL	04092-090001-2100
	300 mL	04092-090001-2300
	500 mL	04092-090001-2500
	1 L	04092-090001-1001
	5 L	04092-090001-1005
	10 L	04092-090001-1010
	50 L	04092-090001-1050
	100 L	04092-090001-1100

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 8 月第一版

