
羟基磷灰石

复合模式层析介质

产品使用说明书

文件编号：NM-A-DF-0135

版本号：A0



羟基磷灰石

复合模式层析介质

陶瓷羟基磷灰石 (Ceramic hydroxyapatite, CHT) 是一种具有重要应用价值的羟基化合物复合模式层析介质, 外观呈球形, 具有超大孔径。与传统的层析介质不同, CHT 同时具备金属亲和以及离子交换能力, 具备特殊的分离能力, 可提供独特且有效的纯化解决方案。CHT 层析介质可用于纯化各类生物大分子, 包括:

- 不同类型单克隆抗体、多克隆抗体
- 双抗及抗体片段
- 病毒颗粒
- 疫苗
- 重组蛋白
- 酶
- 超螺旋 DNA、单链或双链 DNA

纳微科技采用优质原材料, 通过专有的工艺研发生产的羟基磷灰石具有稳定的微观结构 (如图 1 所示), 能够精准调控颗粒的大小、孔径和孔隙率。

介质具有以下特点:

- 具有超大孔径, 能够快速吸附和洗脱目标分子, 提高纯化效率和产量。
- 机械强度高, 有利于填料密度以及有效床高的提升, 使流体在床层内更加均匀流动, 降低压降。
- 生产工艺先进, 产品质量稳定可靠, 可满足不同生物制品纯化需求。

纳微科技提供 NMCHT Type I 和 NMCHT Type II 两种类型的羟基磷灰石层析介质, NMCHT Type I 适合用于酸性蛋白纯化; NMCHT Type II 具有更大的孔径, 适合用于如病毒、IgM、VLP 颗粒、质粒等超大生物分子 (> 400 KD) 的纯化。两种填料详细技术参数如表 1 所示。

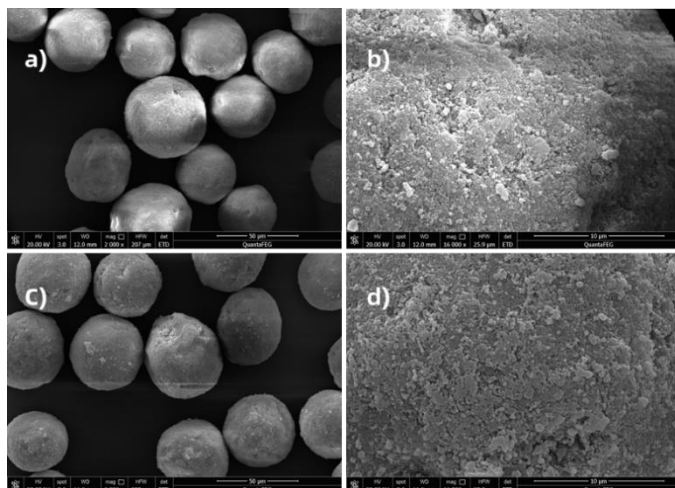


图 1. NMCHT Type I 型羟基磷灰石 2,000 倍放大(a), 16,000 倍放大(b) SEM 图; NMCHT Type II 型羟基磷灰石 2,000 倍放大(c), 16,000 倍放大(d) SEM 图。

表 1. 羟基磷灰石复合模式层析介质技术参数表。

产品型号	NMCHT Type I	NMCHT Type II
官能团	Ca ²⁺ , PO ₄ ³⁻ , -OH	
粒径	40±4 μm	
堆积密度	0.72 g/mL	
载量 (IgG)	~35 mg/mL	~15 mg/mL
推荐流速	50-1000 cm/h	
消毒	1-2 M NaOH	
pH 稳定性	6.5-14, 可在 1 M NaOH 中存储 1 年以上	
再生	0.4 M 磷酸钠缓冲液, pH 7-7.5; 1 M 磷酸三钠缓冲液, pH 11-12; 如需更高磷酸盐浓度, 可采用 0.4-1 M 磷酸钾缓冲液	
高压灭菌	121 °C, 20 min, 磷酸盐缓冲液, pH 7	
存储条件*	0.1 M NaOH, 室温	

*开封前请在密封、干燥、室温 (2-30°C) 下以干粉形态保存, 此处为开封后的存储条件。

层析柱装填

羟基磷灰石层析介质具有卓越的机械强度，能够在高流速下保持较低的压降。这种特性使其在大规模的层析纯化工艺中更具优势。羟基磷灰石层析介质的优异性能可归功于其独特的孔隙结构和优化的压力-流速曲线。

经过高温煅烧处理的 NMCHT Type II 型具有更大的孔径，相对于 NMCHT Type I 型表现出更高的性能。图 2 展示了两种类型羟基磷灰石的压力-流速曲线。该曲线显示了在相同的流速下，NMCHT Type II 型羟基磷灰石的压降更低。这种特性使其在层析纯化过程中能够支持更高的流速，从而缩短工艺流程，降低生产成本。

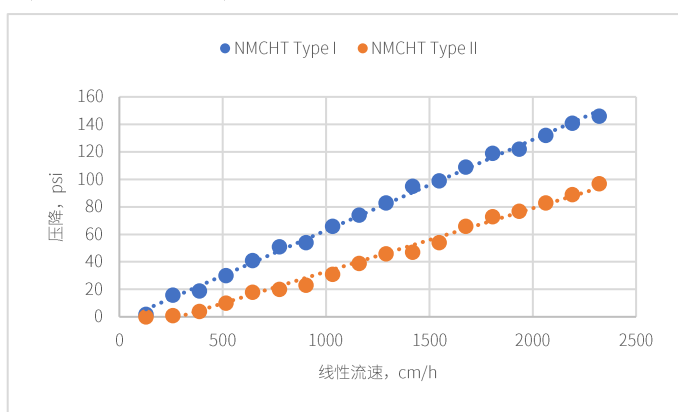


图 2. NMCHT Type I 型 (蓝色) 与 NMCHT Type II 型 (橙色) 压力-流速曲线。层析柱直径 7.7 mm，高度 100mm。

不同于聚合物层析介质，CHT 层析介质沉降速度快，不可压缩，因此需要调整层析柱装填方法。

注意：

装柱时切勿使用磁力搅拌棒或使柱头分配器压到柱床，避免磨损产生细小颗粒，影响层析效果。

装柱缓冲液选择：

使用 150 mM 离子强度，pH > 6.8 的缓冲液进行装柱，以下 3 种为推荐装柱缓冲液：

- 20 mM 磷酸缓冲液+150 mM NaCl, pH 7.2-8.0
- 200-400 mM 磷酸钾或磷酸钠缓冲液, pH 6.8-10
- 0.15-1 M NaOH

实验室规模

计算装填所需层析介质的重量：

$$\text{CHT 层析介质用量} = \text{柱体积} \times \text{堆积密度}$$

以 20 mL 装填柱体积为例，所需的层析介质用量为：

$$20 \text{ mL} \times 0.72 \text{ g/mL} \approx 14.4 \text{ g CHT 层析介质}$$

匀浆液制备及装填步骤

- 用塑料搅拌棒将 CHT 层析介质悬浮于 3.5 倍体积的装柱缓冲液中，形成匀浆液；
- 静置匀浆液，使封闭于层析介质颗粒中的空气分离出来；
- 用塑料搅拌棒将 CHT 层析介质再次悬浮制备匀浆液，备用。
- 将层析柱延长管连接到层析柱；
- 向层析柱-延长管中装入 1-2cm 的装柱缓冲液；
- 将 CHT 层析介质匀浆液转移到层析柱-延长管中；
- 打开层析柱出口，通过重力流动作用装填 CHT 层析介质，直至高度恒定；
- 关闭层析柱出口，移除延长管，插入适配器，使其正好能接触到 CHT 层析介质的表面；
- 连接层析系统，打开层析柱出口，用 3 CV 的装柱缓冲液以 250 cm/h 的流速进行平衡；
- 调节适配器高度，使其恰好接触到平衡后的 CHT 表面。

注意：装柱过程中，防止空气引入到层析柱中，如有空气侵入，请按以下步骤进行操作：

依次用 3 CV 平衡缓冲液，3 CV 0.5~1 M NaOH，3 CV 0.4~0.5 M PB 缓冲液 (pH 6.5~7.2)，3 CV 平衡缓冲液进行柱平衡。

平衡缓冲液一般为离子强度较低的缓冲液，如 2~20 mM PB，当需要使用 2~10 mM PB 时，需加入 Good's 缓冲液。

生产规模

CHT 层析介质的装填方法有多种，如何选择取决于所用层析柱类型和装柱设备，请在装填前，参阅层析柱、介质转移设备和介质装填设备的相关说明书。

计算装填所需 CHT 层析介质重量：

计算填充柱的柱体积，并按如下公式计算所需 CHT 层析介质重量：

$$\text{CHT 层析介质用量} = \text{柱体积} \times \text{堆积密度}$$

根据柱体积称取所需的 CHT 层析介质重量，按每升柱体积，称取 720 g 层析介质干粉及 1.84 L 装柱缓冲液，以用于制备 50% (V/V) 匀浆液。

匀浆液制备及装填步骤 (开放型层析柱)

- 关闭层析柱的排水口，导入装柱缓冲液，随后加入 CHT 层析介质干粉；
- 用塑料搅拌器搅拌 CHT-缓冲液混合物使干粉悬浮混合形成匀浆液，再逆向搅动以尽量减少匀浆液的移动；

- c) 将顶部适配器安装到层析柱中，5 min 后待介质沉降，顶部出现上清后，缓慢降低适配器排出顶部空气，并用装柱缓冲液清洗适配器上的流动收集器和入口线路；
- d) 以 200~300 cm/h 的流速运行 2 个 CV，待介质界面不再下沉后，调低适配器，使介质固定位板和层析柱顶端留有 1~5 mm 距离；切忌将适配器降至介质柱床中，造成 CHT 颗粒不可逆损伤。

匀浆液制备及装填步骤（封闭型层析柱）

- a) 按标准方法配制好匀浆液，同时将色谱柱预先排好气泡；
- b) 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 200~300 cm/h；
- c) 活塞即将压到实胶面的时候，降低下压速度，上筛板距离实胶面 5 mm 的时候停止压柱。切忌将适配器降至介质柱床中，造成 CHT 颗粒不可逆损伤。若使用不锈钢层析柱时，保持轴向流直至适配器达到目标高度上方 2 cm 后，降低流速至 10 cm/h，直至适配器信号传感器与填充床顶端接触。

柱效评价

柱效测定

装好的色谱柱按照表 2 进行柱效测试。

表 2. 柱效测试条件。

样品	20 mM 磷酸钠, 1 M NaCl, pH 7.2-7.4
上样量	1.0%柱体积
洗脱液	20 mM 磷酸钠, 0.15 M NaCl, pH 7.2-7.4
线性流速	60-100 cm/h
检测	电导

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。

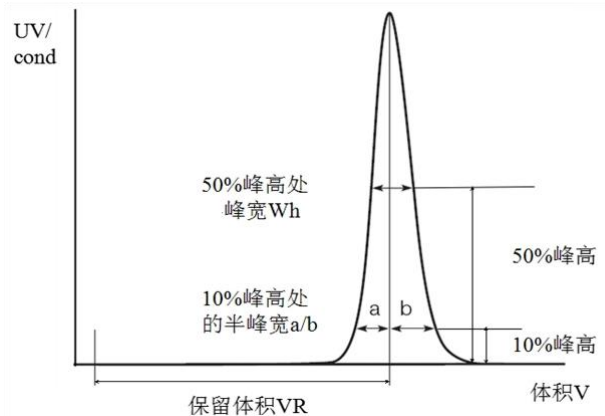


图 3. HETP 和对称性测定。

结果评价

由以上公式计算出的 HETP 的数值若在的介质平均颗粒直径的 2-4 倍，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。

层析方法

CHT 层析介质的分离原理

CHT 层析介质颗粒表面含有两类结合位点，一方面，C（钙）位点具备金属亲和能力，可与生物分子上的磷酸基团形成配位键，适用于吸附 DNA、RNA 或去除内毒素和脂膜病毒颗粒等。此外，C 位点还能与天冬氨酸和谷氨酸残基上的多个羧基形成配位键，因此也可用于纯化抗体或重组蛋白等蛋白质类物质，可以高效去除 HCP 和聚集体。另一方面，P（磷酸盐）位点具备阳离子交换能力，碱性蛋白质通过 P 位点结合，从而实现有效地去除目标分子中的杂质。

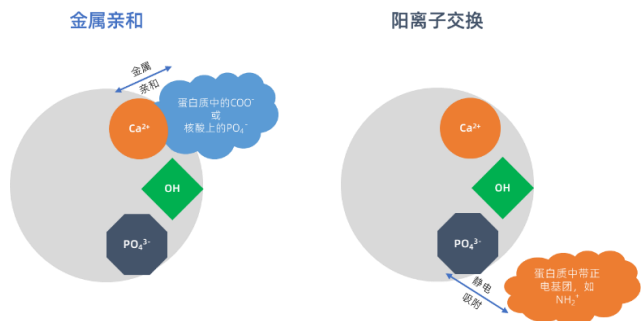


图 4. CHT 层析介质纯化原理示意图。

抗体纯化

CHT 层析介质常应用于抗体捕获和精纯过程，能够高效地对多聚体和抗体片段进行分离，同时也展现出良好的去除效果，包括 Protein A、DNA、内毒素以及脂质包膜病毒。

冲洗：去离子, 0.5 CV

平衡：400 mM PB, pH 6.5, 3 CV

10 mM PB+4-8 ppm Ca^{2+} , pH 6.5, 10 CV (可提高 Ca^{2+} 浓度提高介质稳定性)

上样：用 10 mM PB+4-8 ppm Ca^{2+} , pH 6.5 配制样品上清液 (上样量不超过介质载量的 80%)

淋洗：10 mM PB+4-8 ppm Ca^{2+} , pH 6.5, 5 CV

洗脱：10 mM PB+15 ppm Ca^{2+} , 0-2 M NaCl (线性洗脱), pH 6.5, 20 CV (如未出现洗脱峰, 可提高磷酸盐浓度)

清洗：400 mM PB, pH 7.0-7.5, 5 CV

去离子水, 0.5 CV

消毒：1.0 M NaOH, 5CV

平衡：400 mM PB, pH 6.5, 3 CV

10 mM PB+4-8 ppm Ca^{2+} , pH 6.5, 10 CV

CHT 层析介质亦可用于抗体片段、Fab、VHH、FC 融合蛋白、IgM 以及 IgA 的纯化, 可以参考 IgG 纯化指南进行上样、淋洗、洗脱条件进行方法筛选。

DNA 和 RNA 纯化

CHT 层析介质可以通过 C 位点与 DNA 和 RNA 上的磷酸基团作用, 常用于蛋白纯化中去除 DNA 和 RNA。这种机理也可应用于纯化 DNA 和 RNA, 不同于传统的阴离子交换层析基质, DNA 和 RNA 的保留时间随着碱基数的增加而增加, 对于不同长短的核酸展现更好的分辨率。

这里列举了 CHT 层析介质用于 Plasmid (超螺旋质粒 DNA) 纯化的一种层析方法。

消毒：0.1 M NaOH, 5CV

冲洗：去离子, 0.5 CV

平衡：400 mM PB, pH 7.0, 3 CV

10 mM PB+1 mM EDTA, pH 7.0, 5 CV (注意：添加 EDTA 会缩短介质使用寿命)

上样：上样量不超过介质载量的 80% (上样液中不含非醋酸盐碱性裂解物)

淋洗：10 mM PB+1 mM EDTA, pH 7.0, 5 CV

洗脱：0-400mM PB (线性洗脱) ++1 mM EDTA, pH 7.0, 10 CV

注意：这是一个单循环的质粒纯化步骤, 如果需要多循环使用, 需要进行额外的 DOE 开发。

病毒纯化

CHT 层析介质可与脂质包膜病毒中的磷酸基团形成配位键, 具有很强的亲和力, 需要用高浓度的磷酸盐进行洗脱。

冲洗：600 mM PB, pH 7.2, 5 CV

平衡：10 mM PB, pH 7.2, 10 CV

上样：10 mM PB, pH 7.2, 10 CV (上样量不超过介质载量的 80%)

淋洗：10 mM PB, pH 7.2, 10 CV

洗脱：10-600mM PB (梯度洗脱), 15 CV (如出现磷酸钠沉淀, 可以适当降低浓度或改用磷酸钾盐溶液替代)

清洗：600 mM PB, pH 7.2, 5 CV

800 mM 磷酸钾, pH 7-7.5, 3 CV

消毒：1.0 M NaOH, 5CV

再平衡：10 mM PB, pH 7.2, 10 CV

酸性蛋白纯化

酸性蛋白可以通过电荷与 CHT 层析介质上的 C 位点结合, 一些磷酸化蛋白的磷酸基团也可以与 C 位点形成配位键, 往往对蛋白质的洗脱产生较大影响, 需要在预实验时尝试采用磷酸盐和非磷酸盐梯度洗脱方法筛选。下面列举了 CHT 层析介质在酸性蛋白纯化中的一种层析方法。

冲洗：去离子, 0.5 CV

平衡：400 mM PB, pH 6.7, 3 CV

5 mM PB+12-20 ppm Ca^{2+} + 50-100 mM NaCl, pH 6.7, 10 CV (可提高 Ca^{2+} 浓度提高介质稳定性)

上样：用 5 mM PB+12-20 ppm Ca^{2+} + 50-100 mM NaCl, pH 6.7 配制样品上清液 (上样量不超过介质载量的 80%)

淋洗：5 mM PB+12-20 ppm Ca^{2+} + 50-100 mM NaCl, pH 6.7, 5 CV

洗脱：从 5 mM PB+12-20 ppm Ca^{2+} + 50-100 mM NaCl, pH 6.7 到 120 mM PB+ 50-100 mM NaCl, pH 6.7, 20 CV

清洗：400 mM PB, pH 6.7, 5 CV

去离子水, 0.5 CV

消毒：1.0 M NaOH, 5CV

平衡：400 mM PB, pH 6.7, 3 CV

5 mM PB+12-20 ppm Ca²⁺+ 50-100 mM NaCl, pH 6.7, 10 CV

层析介质清洗与再生

层析介质在使用一段时间后柱效可能下降，分离效果变差，可采用下面的流程进行清洗和再生。

- a) 用平衡缓冲液冲洗2个柱体积；
- b) 用400 mM 磷酸盐冲洗3-5个柱体积（如需更高浓度磷酸盐去除结合紧密的杂质，考虑到磷酸钠溶解度和溶解速度，可使用磷酸钾；也可使用含有5 mM 磷酸盐的1-2M KCl/NaCl、8 M 尿素或6 M 盐酸胍，pH 6.5-7.5下进行清洗）；
- c) 用小于20 mM 磷酸盐冲洗1-2个柱体积；
- d) 用1.0 M NaOH 冲洗1-2个柱体积；
- e) 用平衡缓冲液冲洗4个柱体积。

层析介质灭菌

介质可采用 1.0 M NaOH 处理 60 min 或在磷酸缓冲液（pH 7）中，121°C，20 min 进行灭菌。

层析介质长期储存

未开封的干粉状介质可在干燥和密封条件下于室温下长期储存；

已开封的介质如需长期储存，建议使用 0.1 M NaOH 溶液，于阴凉干燥处密闭存放，保存温度为：2-30 °C；

不推荐使用含有叠氮化合物或含氯己定的抗菌剂中保存介质，以免细菌滋生。

故障排除

如果您在使用 CHT 复合模式层析介质 NMCHT Type I 或 NMCHT Type II 时遇到任何问题，请参考下表进行解决或联系我们。

问题 1 CHT 层析介质出现变色现象。

填料与其他有色金属离子结合会在层析柱顶部积累导致变色，污染物主要来自水，细胞培养物，也可能是上次纯化时遗留。
CHT 层析介质可用于清除其他工业树脂无法清除的金属离子，包括各种重金属（铬、铅、镉和铝离子等）。

问题 2 洗脱峰中含有钙离子。

使用 CHT 层析介质纯化洗脱液中往往含有约 1 mM 钙离子，这个浓度与人体体液中钙离子浓度相当，未见人和不良反应报道。

问题 3 是否可以用 EDTA、EGTA 等螯合剂。

EDTA、EGTA 等螯合剂，柠檬酸盐，包括其他天冬氨酸、谷氨酸可以溶解或螯合金属离子的化合物均会影响到 CHT 层析介质的稳定性，请尽量避免使用相关添加剂，以影响层析介质寿命。

订货信息

产品型号	包装	货号
NMCHT Type I	10 g	80000-040001-4010
	100 g	80000-040001-4100
	1 KG	80000-040001-3001
	5 KG	80000-040001-3005
NMCHT Type II	10 g	80000-040002-4010
	100 g	80000-040002-4100
	1 KG	80000-040002-3001
	5 KG	80000-040002-3005

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)

2023-苏州纳微科技股份有限公司版权所有

2023年10月第一版

