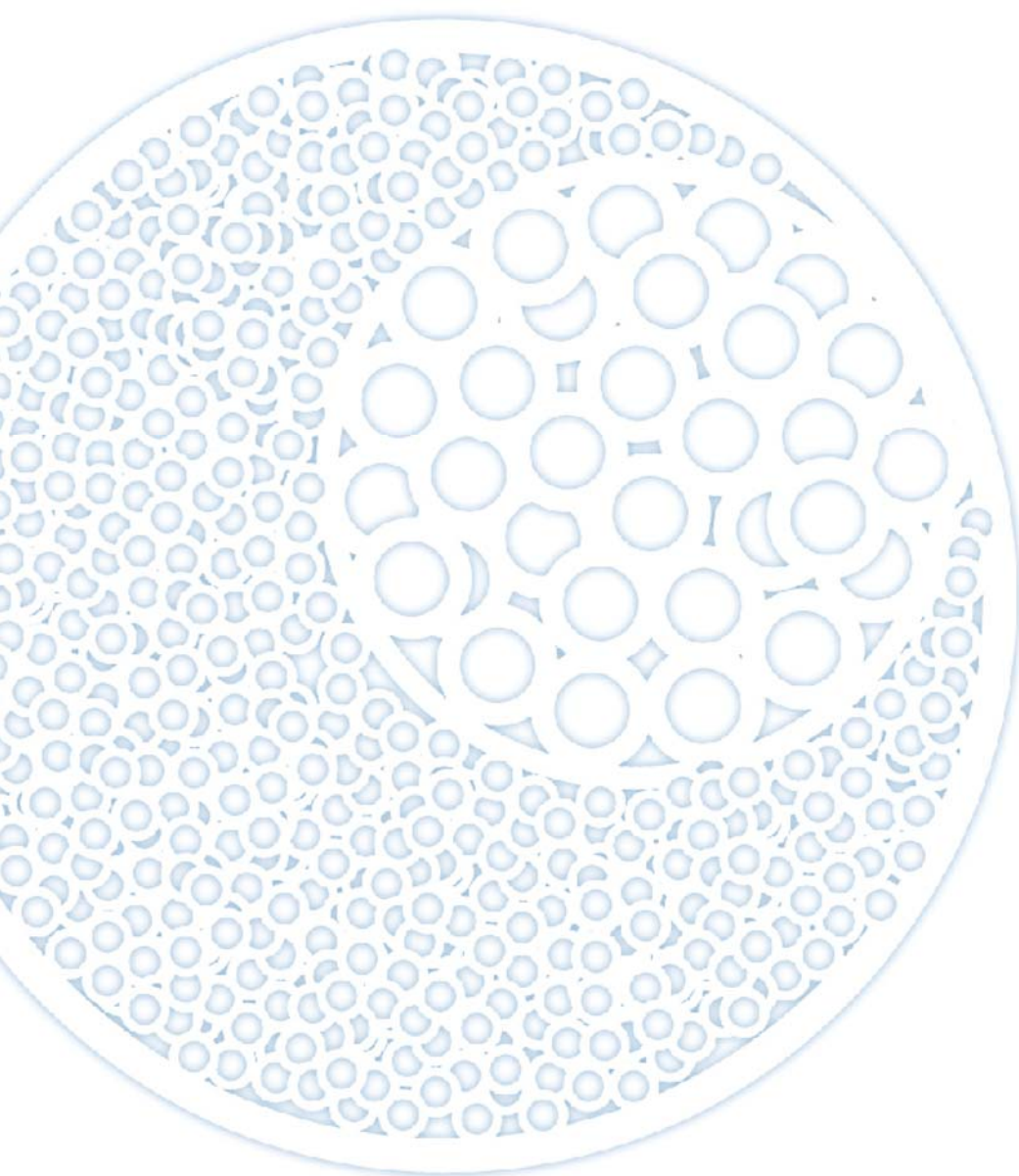




TOSOH

TOYOPEARL[®] 及 TSKgel[®] PW 填料 装填及使用说明书



TOSOH BIOSCIENCE

目录

I. TOYOPEARL 填料的装填步骤	03
1. 装填准备	03
1.1 装填的一般注意事项	03
1.2 细颗粒去除	03
1.3 缓冲液更换	04
1.4 浆液制备	05
1.5 备选浆液制备	05
2. 装填方法	08
2.1 恒速 / 半恒压法	08
2.2 备选装填法, 辅助重力	09
3. 平衡及效率评估	09
II. TSKgel PW填料的装填步骤	11
III. 层析柱操作	12
1. 层析分离	12
1.1 排阻层析法 (SEC)	12
1.2 离子交换层析法 (IEC)	12
1.3 疏水作用层析法 (HIC)	12
1.4 亲和层析法 (AFC)	13
1.5 混合模式层析法 (MMC)	13
2. 清洗	14
3. 储存	15
4. 消毒 / 除热原 / 除防腐剂 / 层析柱筛板	15
5. 所选 TOYOPEARL 和 TOYOPEARL GigaCap 填料的压力流速曲线及性能测试结果	15
6. 工业层析柱装置示例	19



简介

TOYOPEARL 层析填料是用于生物制品分离纯化工艺的多孔聚合物填料 (图 1)。适用于球状蛋白质、多肽、核酸及其他生物材料的实验室及工业纯化。这些填料为改性甲基丙烯酸聚合物, 因其含有乙醚及羟基, 所以能为填料提供亲水性表面。此外, 还能为填料提供极好的有压流特性及 pH 稳定性。

图 1: TOYOPEARL 基本骨架



I. TOYOPEARL 填料的装填步骤

1. 装填准备

1.1 装填的一般注意事项

最佳做法是通过沿柱床长度施加 0.05 至 0.3 MPa 的压力来装填 TOYOPEARL 填料。

另外, 尽管不建议这样做, 但仍可通过简单的重力沉降来装填 TOYOPEARL 填料。

成功装填 TOYOPEARL 填料所需的组件包括 (如图 2 所示): 泵, 压力表, 水平仪, 玻璃杯, 聚丙烯酸或不锈钢柱, 个人安全设备, 量筒及装柱器 (可选)。

图 2: 装填所需的器材



1.2 去除细小颗粒

我们建议使用前去除浆液中的细小颗粒。细小颗粒会堵塞滤膜或筛板, 并最终导致穿过层析柱的压降升高。去除胶浆液的细颗粒包括以下倾析步骤。

- a) 装运容器内沉淀的填料应通过震荡或用玻璃棒搅拌使其悬浮 (请勿使用搅拌器, 它产生的剪切力会磨削填料, 导致填料颗粒破碎)。一旦填料悬浮, 就向体积充分的容器内转移一定数量的浆液 (大约 4 体积悬浮液: 3 体积填料), 向 4 倍体积于填料体积的容器中添加蒸馏水或缓冲液, 并充分搅拌。

细颗粒去除示例:

5 升安排好的填料: 共 7-8 升悬浮液 (~72% 浆液浓度) 因此, 您将需要一个最小 20 升的容器。将重新悬浮的 7-8 升填料放入 20 升的容器。

- b) 添加 12 升蒸馏水或填料缓冲液, 同时对其进行搅拌, 以使增加液体体积内的填料重新悬浮, 使填料沉降。沉降时间取决于容器高度、浆液浓度、溶剂及填料颗粒大小。TOYOPEARL 填料在标准量筒中, 在水相中的平均沉降时间如表 1:

表 1: TOYOPEARL 填料在水中的沉降时间

Toyopearl 填料等级	粒径	分钟
C 级	100 μm	10-35
GigaCap 和混合模式-"M"	75 μm	30-45
M 级	65 μm	30-45
F 级	45 μm	45-60
S 级	35 μm	60-90

在较大容器内，颗粒的沉降时间较长。表 2 列出了 TOYOPEARL 填料在各种溶液（25% 和 50% 浆液）中的沉降时间。

表2：TOYOPEARL填料在各种溶剂中的沉降时间

溶液	50% 浆液	25% 浆液
水中	65 μm 粒径填料每沉降 1 米需 3-4 小时 35 μm 粒径填料每沉降 1 米需 5-7 小时	65 μm 粒径填料每沉降 1 米需 1.5-2.5 小时 35 μm 粒径填料每沉降 1 米需 2-3.5 小时
1 mol/L NaCl 中	65 μm 粒径填料每沉降 1 米需 3-5 小时 35 μm 粒径填料每沉降 1 米需 12-16 小时	65 μm 粒径填料每沉降 1 米需 2-3 小时 35 μm 粒径填料每沉降 1 米需 3-7 小时
1.8 mol/L (NH ₄) ₂ SO ₄ 中	65 μm 粒径填料每沉降 1 米需 6-9 小时	65 μm 粒径填料每沉降 1 米需 4-8 小时
20% 的乙醇中	65 μm 粒径填料每沉降 1 米需 6 小时	

SD= 沉降距离

- c) 一旦填料沉淀, 就将上清液小心移入其他容器(图 3)。
- d) 向倾析容器内添加 3 倍于填料容积的蒸馏水或填料缓冲液, 并在高处进行轻微搅拌使其悬浮(图 4)。请勿使用磁力搅拌器, 它会产生剪切力磨削填料, 导致产生细颗粒。

图3：轻轻倒出



图4：重新使其悬浮



- e) 重复步骤 c) 和 d) 至少两次。

1.3 置换缓冲液

如果细小颗粒去除过程(步骤 1.2)使用的是装填缓冲液, 则进入装填准备步骤(步骤 1.4 或 1.5)。

如果细小颗粒去除过程使用的是水, 则用装填缓冲液重复步骤 1.2 b) 3 次。

每种填料的填料缓冲液随应用不同而不同。通常, 使用离子强度较高的流动相进行分离为适合的起始点。表 3 列出了一些典型的装填缓冲液。

表 3: 典型的装填缓冲液

Toyopearl 填料	装填缓冲液
SEC	
HW-40, HW-50, HW-55, HW-65 及 HW-75	50 mmol/L 磷酸盐或 Tris 缓冲液中 0.1 mol/L Na ₂ SO ₄ 、NaNO ₃ 或 NaCl
IEC	
DEAE 型、QAE 型、Q 型、CM 型、SP 型、S 型、MegaCap II-SP 型、所有 GigaCap 型填料	50 mmol/L 磷酸盐、Tris 或醋酸盐缓冲液中 1 mol/L NaCl
HIC	
Ether-650、SuperButyl-550 Phenyl 型、Butyl 型 Hexyl-650、PPG-600	50 mmol/L 磷酸盐缓冲液中 2 mol/L Na ₂ SO ₄ 、(NH ₄) ₂ SO ₄ 或 NaCl
Protein A	
AF-rProtein A-650、AF-rProtein A HC-650	100 mmol/L 磷酸盐或 NaHCO ₃ 缓冲液中 1 mol/L NaCl
AFC	
AF-Tresyl-650 和 AF-Epoxy-650	100 mmol/L NaHCO ₃ 或磷酸盐缓冲液中 0.5 mol/L NaCl
AF-Formyl-650, AF-Heparin HC-650, AF-Amino-650 和 AF-Carboxy-650	100 mmol/L 磷酸盐或 NaHCO ₃ 缓冲液中 1 mol/L NaCl
AF-Chelate-650, AF-Blue HC-650 及 AF-Red-650	20 mmol/L 磷酸盐或 Tris 缓冲液中 0.5 mol/L NaCl 或 0.2 mol/L 甘氨酸
MMC	
MX-Trp-650	50 mmol/L 磷酸盐、Tris 或醋酸盐缓冲液中 1 mol/L NaCl

1.4 浆液制备

完成填料的细颗粒去除及缓冲液置换后,可调整浆液浓度以装填层析柱。浆液浓度计算为:沉淀胶体体积除以浆液总体积。浆液浓度调整如下:

- 将细颗粒去除后的填料浆液重新悬浮,并将均匀的浆液倒入量筒。
- 使浆液沉淀一整夜(>12 小时),以获得最佳效果(图 5)。
- 确定沉淀填料的体积并调整浆液浓度至 30-50%(添加或去除缓冲液)。对于 TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F 填料,建议使用 40% 的浆液。

图5: 水中的沉淀填料



- 对于体积固定的层析柱,请参考表 4 所列数量的沉淀填料(假设装填压力在 0.24 至 0.3 MPa 之间):

表4: 大约所需的填料量

TOYOPEARL 填料	沉淀填料的数量
HW-40、HW-50、HW-55	使用大约 1.1 × 柱体积
HW-65 及 HW-75F Ether-650, Butyl 型, Hexyl-650, PPG-600, DEAE 型, Q 型, CM-650, SP 型, GigaCap 型, 非 Protein A 亲和及混合模式	使用大约 1.2 × 柱体积
Phenyl 型*, QAE-550C, SP-550C 及 Protein A 亲和	使用大约 1.25 × 柱体积

* 关于 TOYOPEARL Phenyl-600M 填料,请咨询技术人员以获得关于此类特殊填料装填的最新信息。

1.5 备用浆液准备

- 将细颗粒去除后的填料重新悬浮,并将均匀的浆液倒入布氏漏斗或等同物。
- 抽滤浆液,直至浆液变成湿滤饼(所有多余液体均已清除)。
- 参考上表 4 称出适量填料湿滤饼(1 g 滤饼 = 1 ml 重力沉淀胶)。
- 将湿滤饼移入烧杯,并添加足够的填料缓冲液以使浆液浓度达到 30-50%。

2. 装填方法

不建议像装填传统软凝胶一样装填 TOYOPEARL 和 TOYOPEARL GigaCap[®] 填料。为获得最佳效果，TOYOPEARL 和 TOYOPEARL GigaCap 填料应在较高流速和压力下装填。

表 5: TOYOPEARL 填料的装填及运行速度

实验室层析法

模式	Toyopearl填料类型	层析柱尺寸 (cm IDX cm L)	填料等级	装填速度 (cm/小时)	最大工作压力 (压降)
SEC	HW-40	2.2 x 60	S (30 μm) F (45 μm) C (100 μm)	30 - 40 60 - 80 120 - 160	0.3 MPa 0.3 MPa 0.3 MPa
	HW-50	2.2 x 60	S (30 μm) F (45 μm)	25 - 35 50 - 70	0.3 MPa 0.3 MPa
	HW-55	2.2 x 60	S (30 μm) F (45 μm)	25 - 35 50 - 70	0.3 MPa 0.3 MPa
	HW-65	2.2 x 60	S (30 μm) F (45 μm)	20 - 75 40 - 150	0.3 MPa 0.3 MPa
	HW-75	2.2 x 60	F (45 μm)	40 - 150	0.3 MPa
IEC*	DEAE-650, SuperQ-650, CM-650 CM-650, SP-650, Q-600C AR	2.2 x 60	S (30 μm) M (65 μm) C (100 μm)	400 - 600 800 - 1000 800 - 1200	0.3 MPa 0.3 MPa 0.3 MPa
	GigaCap S-650, GigaCap Q-650 GigaCap CM-650, GigaCap DEAE-650	2.2 x 20	S (35 μm) M (75 μm)	400 - 600 800 - 1000	0.3 MPa 0.3 MPa
	SP-550, QAE-550	2.2 x 20	C (100 μm)	700 - 1000	0.3 MPa
	MegaCap II SP-550	2.2 x 20	EC (200 μm)	800 - 1200	0.3 MPa
HIC*	Ether-650, Phenyl-650 Butyl-650, Hexyl-650	2.2 x 20	S (30 μm) M (65 μm) C (100 μm)	400 - 600 800 - 1000 800 - 1200	0.3 MPa 0.3 MPa 0.3 MPa
	PPG-600, Phenyl-600, Butyl 600	2.2 x 2	M (65 μm)	800 - 1000	0.3 MPa
	SuperButyl-550	2.2 x 20	C (100 μm)	800 - 1200	0.3 MPa
Protein A	AF-rProtein A-650	2.2 x 20	F (45 μm)	400 - 600	0.3 MPa
	AF-rProtein A HC-650	2.2 x 20	F (45 μm)	400 - 600	0.3 MPa
亲和	AF-Amino-650, AF-Tresyl-650 AF-Carboxy-650, AF-Formyl-650 AF-Epoxy-650, AF-Chelate-650 AF-Blue-HC-650, AF-Heparin H C-650 AF-Red-650	2.2 x 10	M (65 μm)	800 - 1000	0.3 MPa
MMC	MX-Trp-650	2.02 x 2	M (75 μm)	800 - 1000	0.3 MPa

* 并非适用于所有粒径的填料。

工业层析法

工业层析柱的装填速度应至少为实际使用流速的 1.5 倍。

请致电我们的技术人员探讨您独特的装填步骤。

表 6 列出了各种装填法的装填特征。如果您有其他层析设备，如动态轴向压缩柱或自动装填柱，或您要装填大于 5 升的层析柱，请致电我们的技术专家。我们拥有丰富的层析柱设计及品牌经验。

表 6: 装填方法的特征

	装填方法		
	半恒压	恒速	辅助重力
装填速度	快速	快速	慢速
流速范围	高	高	低
泵	恒压	恒速	蠕动泵
压力表	需要	需要	不需要

2.1 恒速 / 半恒压法

- a) 如果必要，将一个装柱器连接在层析柱上。层析柱和装柱器的总体积应足以让全部填料浆液一次注入。
- b) 装填前，确保使层析柱保持水平。用缓冲液弄湿柱内的底部筛板或滤网。让缓冲液排出数秒，以排除气泡（图 6）。塞住层析柱开口，并在柱底部留 1-2 cm 的缓冲液。

图 6: 无气泡, 覆盖液体的底部筛板



- c) 使填料浆液重新悬浮，以确保均匀性（图 7）。

图 7: 将浆液搅拌至均匀



- d) 沿柱内壁向下小心倾注填料浆液。防止填料浆液中有滞留空气（图 8）。

图 8: 倾注填料



- e) 将填料浆液倒入层析柱后，用一个装有填料缓冲液的洗瓶冲洗柱内壁。
- f) 立即将层析柱的柱头放置到填料浆液上（图 9）。柱头和缓冲液间不应有滞留空气。

图 9: 调整层析柱



- g) 打开层析柱开口，启动泵。慢慢增加通过层析柱的缓冲液流速。记录系统压力以供今后参考。

如果使用 FPLC 系统进行装填，则在开始装填前记录系统压力。总压力减去系统压力得出层析柱压降 ΔP 。

h) 此时应遵循下列两种方法之一:

恒速法

慢慢增加到步骤 g 提到的最终流速。逐渐增加流速可防止液压冲击正在形成的柱床，并避免柱床装填不均。可通过多次梯度来增加流速。这些梯度取决于层层析柱尺寸及目标流速。表 7 列出了一些示例。

表 7: 流速梯度示例

层析柱尺寸 (内径×长度)	TOYOPEARL 填料	目标流速 (mL/min)	增量 (mL/min)	保持时间 (min)
2.2 cm × 60 cm	HW-55S	2	0.5	0.5
9 cm × 30 cm	QAE-550C	300	50	2
25 cm × 30 cm	DEAE-650M	2000	400	3

半恒压法

慢慢增加流速，直到获得目标压力（最大 0.3 MPa）。逐渐增加流速可防止液压冲击正在形成的柱床，避免层层析柱装填不均。必须手动降低流速来保持装填压力，从而保持正在形成的柱床上的恒压。TOYOPEARL 填料穿过柱床的最佳装填压力大约为 0.3 MPa。

关于 TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F 填料，打开层析柱开口并以 100 cm / 小时的线速度开始流速装填。线速度每分钟增加 100 cm / 小时，直至层析柱压降 ΔP 达到约 0.3 MPa。

- i) 当装填好的柱床稳定、且缓冲液高出柱床约 2-3 cm 时，停泵并关闭层析柱开口。
- j) 如果使用装柱器，整个柱床应在层析柱下部分。使用移液管或泵去除上部装柱器的上清液。去除上部装柱器及连接环。
- k) 将柱头小心放入层析柱内，离加固柱床大约 2-3 cm (图 10)。避免层析柱进入空气(图 11a-b)。

图 10: 部分装填柱床的透明上清液



图 11b: 受到气泡影响而无法形成稳定的柱床

图 11a: 无气泡(推荐)



- l) 固定柱头，按步骤 g 所述重新启动泵，并打开层析柱开口。
- m) 柱床会进一步压缩。当压缩完成且压力稳定时，停泵并关闭层析柱开口。
- n) 小心松开柱头的密封，并将柱头降至离柱床 0.5 至 1.0 cm。移动柱头时，请勿干扰柱床(图 12)。

图 12: 位于适当位置的流速柱头



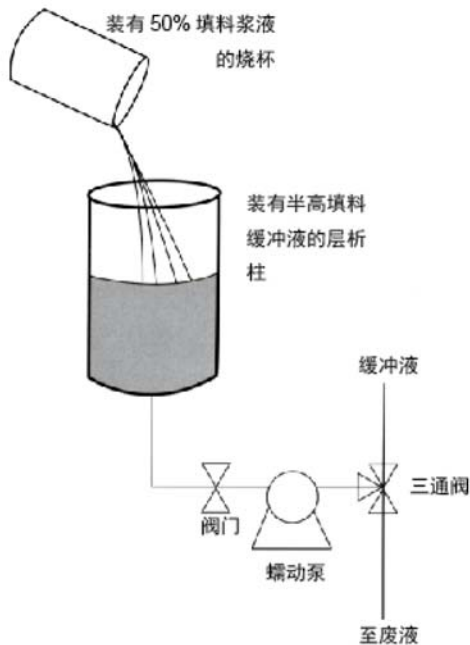
- o) 重复步骤 l - n，直至柱头处的填料床不再进一步压缩 (< 0.5 cm)。通常需要进行 2-3 次重复，直至柱床稳定。
- p) 将柱头降至离柱床 1-2 mm，并在适当位置锁定。
- q) 此时层析柱已为柱效评估做好准备。TOYOPEARL AF-rProteinA HC-650F 性能测试结果示例如第 15 页开始所示。

2.2 备选装填法,重力辅助装填

由于硬件限制,在装填 TOYOPEARL 填料时无法使用装柱器时,可选用以下方法进行填料装填。

- a) 调整填料浆液浓度至 50%,并在高处搅拌使填料重新悬浮。请勿使用磁力搅拌器!
- b) 如图 14 所示,将蠕动泵固定于层析柱的底部开口。

图 14: 重力辅助装填法



- c) 装填前,确保使层析柱保持水平。
- d) 使泵在上流向运转,将填料缓冲液回流至层析柱,直至其半满,停泵。
- e) 使泵在下流向以所需流速运转,向层析柱内缓慢添加均匀的填料浆液。沿层析柱内壁向下倾注浆液,以防形成气泡。
- f) 当柱床几乎完全形成且缓冲液高出柱床大约 2-3 cm 时,关闭泵及层析柱开口阀门。
- g) 用装有填料缓冲液的洗瓶轻轻冲洗层析柱内壁。
- h) 小心地将流速柱头放入层析柱,使柱头恰好接触填料缓冲液。

i) 将柱头固定在适当位置,泵的放置应便于流速进入层析柱顶部。在装管时消除任何空气。

j) 在低流速下启动泵,同时打开底部阀门。

k) 慢慢增加泵速,直至获得所需流速。逐渐增加流速可防止液压冲击正在形成的柱床,从而避免层析柱装填不均。流速可在装填的初始阶段以若干 mL/min 梯度增加。这些梯度的大小和持续时间取决于正被装填的层析柱的尺寸(见表 7)。

l) 柱床加固完成后,停泵并关闭底部开口。

m) 松开流速柱头上的密封,并轻轻将流速柱头放到填料床上。注意不要让填料越过层析柱密封。

n) 重复步骤 l) 和 m),直至流速柱头处的填料床不再进一步压缩(<0.5 cm)。

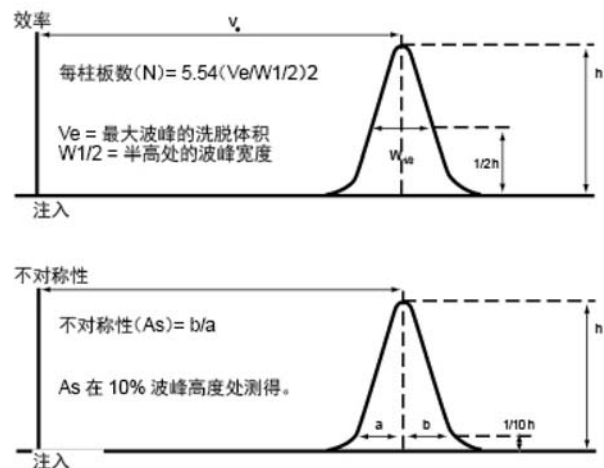
o) 到最后一步时,将柱头落入柱床 1-5 mm。

p) 此时层析柱已为柱效评估做好准备。

3. 平衡及柱效评估

一旦完成装填操作,即用 5-10 柱体积的低离子强度缓冲液来平衡层析柱。通过注入无保留的低分子量化合物(即丙酮、维生素 B12、氯化钠)样品(层析柱总体积的 0.25-1%)来测试装填步骤的有效性,并确定理论塔板数及图 15 所示的不对称性。根据以上步骤装填且以 50-250 cm/h 线速度运行的层析柱应至少具备表 8 所列的理论塔板数,以及 0.8-1.4 之间的不对称性。

图 15: 如何计算理论塔板数及不对称系数



如果预期理论塔板数及不对称系数偏差较大,请重复装填步骤。

如果柱直径 > 40 cm, P/M 将按比例下降。

表 8: 典型的理论塔板数

模式	柱内径 (cm)	S 级 (P/M)	F 级 (P/M)	M 级 (P/M)	C 级 (P/M)
SEC	2.2	5000	3500	-	3000
	5.5	5000	3300	-	-
	10.8	5000	2500	-	-
	21	4000	2200	-	1500
	31	-	2000	-	1200
	40	-	1800	-	1000
IEC	2.2	6000	-	4000	2000
	5.5	6000	-	4000	-
	10.8	6000	-	4000	-
	21	4000	-	2600	2000
	31	-	-	2000	1000
	40	-	-	1500	750
HIC	2.2	6000	-	4000	2000
	5.5	6000	-	4000	-
	10.8	6000	-	4000	-
	21	4000	-	2600	2000
	31	-	-	2000	1000
	40	-	-	1500	750
ProteinA	2.2	-	3500	-	-
	5.5	-	3300	-	-
	10.8	-	2500	-	-
	21	-	2200	-	-
	31	-	2000	-	-
	40	-	1800	-	-
AFC	2.2	-	-	4000	-
	5.5	-	-	4000	-
	10.8	-	-	4000	-
	21	-	-	2600	-
	31	-	-	2000	-
	40	-	-	1500	-
MMC	2.2	-	-	4000	-
	5.5	-	-	4000	-
	10.8	-	-	4000	-
	21	-	-	2600	-
	31	-	-	2000	-
	40	-	-	1500	-

TOYOPEARL GigaCap 系列离子交换填料需要特殊的运行条件,以在使用电导检测器时正确进行柱效评估。进行柱效测试的平衡缓冲液必须至少含有 250 - 300 mmol/L 盐。如果不添加盐,柱效测试会导致峰型前延(最可能的原因是受离子排斥的影响)。

如果柱内径 >40 cm, P/M 将稍微下降。如果预期理论塔板数及不对称系数偏差较大,请重复装填步骤。表 9 列出了层析柱装填不良的一些潜在原因。

有关详情请致电我们的技术人员。

表 9: 性能评估以及故障排除

As < 0.8	As > 1.4
层析柱过装。 装填压力过高。 层析柱床层破裂。	层析柱装填不够“紧密”。层析柱顶部或底部的滤网或筛板堵塞,层析柱顶部有较小空隙。层析柱硬件孔隙空间有气泡。进样技巧欠佳。
高 HETP*	低 HETP*
注入样品或检测器离层析柱太远。注入体积过高。层析柱未有效装填。	样品由于非特异性吸附作用而吸附在层析填料官能团或骨架上。

*HETP 为理论塔板高度。

II. TSKgel PW 填料的装填步骤

通常, TSKgel PW 填料的装填步骤与第 I 节说明的 TOYOPEARL 填料相同。由于 TSKgel PW 填料高交联度以及其较小粒径所产生的较高压力(见表 10), 针对 TSKgel 填料的特性应对第 I 节说明的填料装填步骤加以修改。

1. TSKgel PW 填料在 0.3 - 1.0 MPa 下装填最佳, 装填压力最高不能超过 2 MPa。
2. 细颗粒去除如第 1.2 节所述, 沉降时间如表 11 所示。
3. 浆液制备如第 1.4 节所述, 浆液浓度范围为 20-75%。40 - 50% 的浆液浓度可获得最佳效果。
4. 一般使用 1.2 的压缩比来装填层析柱。



表 10: TSKgel PW 填料的装填和使用流速

填料类型	层析柱尺寸 (cm 内径 x 长度)	粒径	装填流速 流速 (cm/hr)	使用流速	
				(cm/hr)	(mL/min)
TSKgel 3PW TSKgel 5PW	5.5 x 20	20 μm	100 - 400	50 - 300	19.8 - 119
	10.8 x 20	20 μm	100 - 400	50 - 300	76.3 - 458
	15.8 x 30	30 μm	100 - 500	50 - 400	163 - 1307
	21 x 30	30 μm	100 - 500	50 - 400	289 - 2309
	30 x 20 - 30(DAC*)	20-30 μm	(不适用)	50 - 400	589 - 4712

*DAC = 所施活塞压力 > 0.3 MPa 下的动态轴向压缩。

表 11: TSKgel PW 填料的沉降时间:

TSKgel PW 填料粒径	沉降时间
30 μm	90-120分钟
20 μm	>120分钟

III. 层析柱使用

1. 层析分离纯化

1.1 尺寸排阻法(SEC)

用 5-10 个柱体积的适当缓冲液来平衡层析柱 (见第 1.3 节的表 1)。TOYOPEARL HW 层析柱的尺寸排阻分离在等度条件下进行, 使用中等离子强度的缓冲盐溶液。注入层析柱内的样品体积通常为通常层析柱床体积的 1-3%。如果保留时间短于或长于预期, 可能需要改变流动相。关于建议的流动相变化, 请参考表 12。

表 12: 不理想的 SEC 纯化

观察	原因 / 解决方案
保留时间 短于预期。	样品可能部分或全部在排阻范围之外, 确定样品的分子量, 并在必要时使用排阻限较高的填料。 阴离子可能会发生离子性的排斥, 提高流动相的离子强度。
保留时间 长于预期。	阳离子可能会发生离子性的吸附, 提高流动相的离子强度。 疏水性吸附可能会阻碍疏水分子, 降低流动相的离子强度或添加较少比例(10-20%)的有机溶剂, 如甲醇、乙醇或乙腈。

1.2 离子交换层析法(IEC)

用 5-10 个柱体积的缓冲液来平衡层析柱 (表 13)。通过增加盐浓度或改变洗脱液的 pH 值来进行洗脱。

如果离子交换填料不能吸附目标蛋白, 则更改平衡缓冲液的 pH 值以增强蛋白质与离子交换填料间的静电作用, 或降低平衡缓冲液的盐浓度。

表 13: IEC 中使用的缓冲液示例

填料类型	缓冲液	缓冲范围
阳离子交换	醋酸	4.8 - 5.2
	柠檬酸	4.2 - 5.2
	MES	5.5 - 6.7
	磷酸盐	6.7 - 7.6
	HEPES	7.6 - 8.2
阴离子交换	L-组氨酸	5.5 - 6.0
	咪唑	6.6 - 7.1
	三乙醇胺	7.3 - 7.7
	Tris.Cl	7.5 - 8.0
	二乙醇胺	8.4 - 8.8

1.3 疏水作用层析法(HIC)

用高盐浓度 (通常为 1 mol/L - 3 mol/L) (如表 14 所列) 的适当缓冲液来平衡层析柱。较高的离子强度增强了蛋白质与填料间的疏水作用, 从而促进吸附。在进样时, 至少进行一次空白分析, 并以初始流动相平衡层析柱。

表 14: HIC 中使用中性盐

盐(按强度 递减顺序)	评价
柠檬酸钠	可能展示出较高的紫外线吸收能力, 向于微生物生长倾向
硫酸铵	pH 大于 8 时不稳定, 较低的紫外线干扰, 抑制微生物生长, HIC 常用盐可能会更难处理。
硫酸钠	可溶性较低 (25°C 下 1.5 mol/L)
氯化钠	卤盐会腐蚀廉价的不锈钢
氯化钾	卤盐会腐蚀不锈钢

* 基于易溶盐的感胶离子序

通过降低洗脱液中盐的浓度来洗脱被吸附的蛋白质。疏水性较低的蛋白质在开始阶段洗脱,且盐浓度高于更多疏水蛋白质。如果不通过此方法洗脱所需蛋白质,则添加较少比例的有机溶剂或非离子洗涤剂,改变洗脱液的 pH 值或降低温度。建议使用的有机溶剂、洗涤剂或表面活性剂,见表 15。

表 15: HIC 的流动相添加剂

有	洗涤剂	表面活性剂
乙醇 甲醇 异丙醇 n-丁醇 乙腈 乙二醇	Triton X-100 辛基糖苷 Tween 20 SDS CHAPS 分散剂911 CTAB Lubrol PX	盐酸胍 四乙铵化氯 尿素 硫氰酸钾

如果样品性质不一致,首先通过额外 3-10 柱体积的起始洗脱液来增加层析柱平衡步骤。如果所需的蛋白质未吸附于层析柱,则增加起始缓冲液中盐的浓度,调整缓冲液的 pH 值使之更接近蛋白质的等电点,或选择配合基疏水性更强的填料。

1.4 亲和层析法(AFC)

TOYOPEARL 亲和填料为特殊群组配合基填料(AF-Chelate-650, AF-Red-650 及 AF-Heparin HC-650)及活化型的填料(允许最终用户附加定制配合基)。

关于 AF-Formyl-650、AF-Carboxy-650、AF-Amino-650、AF-Epoxy-650 及 AF-Tresyl-650 的偶联化学反应的信息,请联系我们的技术人员。

平衡

AF Red-650、AF-Heparin HC-650 及 AF-Chelate-650 填料应使用 3-5 柱体积的适当起始缓冲液来平衡,如磷酸盐或 Tris (含有少量盐或不含盐)。

储存过程中,色素配基亲和层析填料会释放少量共轭色素。每次使用前确保清洗填料,以清除脱落的色素配基。用 1 mol/L 氯化钠或 1 mol/L 氯化钾清洗装有新填料的层析柱。用 2 mol/L 氯化钾或 4 mol/L 尿素清洗用过的填料。用适当的起始缓冲液来平衡装有新或旧填料的层析柱,如 pH 7.5 的 20 mmol/L 磷酸盐。

上样和洗脱

加入样品后,用 3-5 柱体积的起始缓冲液清洗层析柱,以清除未被吸附的杂质。亲和层析法通常采用两种洗脱法:非特异性洗脱和特异性洗脱。

非特异性洗脱通常通过增加洗脱液的盐浓度来完成。很多蛋白质可用含 2 mol/L 氯化钠或 3 mol/L 氯化钾的溶液来洗脱。不用这些洗脱液进行洗脱的蛋白质可用表 16 列出的溶液来洗脱。

表 16: TOYOPEARL 亲和填料的洗脱液

优选	2 mol/L NaCl 或 3 mol/L KCl
备选	1% Triton X-100 / 1 mol/L NaSCN / 75%乙二醇/4mol/L尿素或 0.1 mol/L NaOH / 4.2 mol/L (NH ₄) ₂ SO ₄

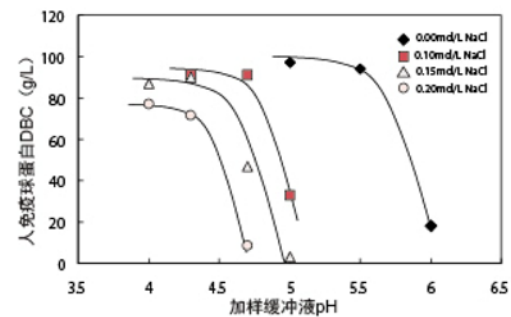
特异性洗脱,如酶的洗脱溶液中可以添加它的底物或辅酶,底物或辅酶浓度一般低于 10 mmol/L。

1.5 混合模式层析法(MMC)

TOYOPEARL MX-Trp-650M 填料为混合模式填料,它显示出较高的动态载量和对高盐上样的耐受性。此类填料还具备极好的结合和洗脱动力学。

用适当的缓冲液平衡装填好的层析柱,该缓冲液的电导与上样的电导相似。上样的 pH 值应较低(pH < 5.0),上样盐浓度应不低于 0.1 mol/L,对于含盐 < 0.1 mol/L 的样品,pH 值可调节至 pH 6.0(见图 16)。

图 16: 缓冲液和盐对 DBC 的影响



填料: TOYOPEARL MX-Trp-650M
层析柱: 6 mm ID × 4 cm
流动相: 缓冲液A: 0.05 mol/L 醋酸盐缓冲液 (pH 4.0 - 6.0) + 0 - 0.2 mol/L NaCl
缓冲液B: 0.1 mol/L Tris-HCl缓冲液 (pH 8.5) + 0.3 mol/L NaCl
流速: 1.0 mL/分钟 (212 cm/小时)
检测: UV @ 280 nm
样品: 人多克隆免疫球蛋白 (1 mg/mL)

通过 10% 的穿透曲线计算动态载量 (DBC)

若要洗脱蛋白质,则增加盐的浓度(如 0.3 mol/L)并将 pH 值升至高于 7.0。始终考虑这些条件及其如何影响靶分子的稳定性。

2. 清洗

TOYOPEARL 和 TSKgel PW 填料可在层析柱内清洗或卸柱清洗。清洗方法及处理持续时间取决于污染程度。在层析柱清洗过程中,通常需至少使用 3 个柱床体积的清洗液。

SEC 填料

大部分情况下,TOYOPEARL SEC 填料可简单地用蒸馏水清洗,以除去残余蛋白质。对于一些吸附力较强的杂质,需要进行以下的清洗步骤:

离子性杂质

对于结合力一般的杂质,可用 0.5-1 mol/L 盐水溶液来清洗填料。如果是结合力较强的杂质,可采用 0.1-0.5 mol/L 氢氧化钠或 0.1-0.5 mol/L 氯化氢或硫酸。绝不要使用硝酸来清洗 TOYOPEARL 填料!

硝酸会与 TOYOPEARL 填料发生强烈反应。由于酸有时会引起蛋白质聚集,应首先用碱性溶液来清除蛋白质。

疏水性杂质

清除疏水性吸附杂质可使用大约 10-20% 的醇类(如乙醇、甲醇或异丙醇)。也可使用乙腈及丙酮等溶剂。重要的是要注意这些溶剂有可能会引起蛋白质积聚或损伤层析柱。使用任何碱、酸或有机溶剂后,需要用蒸馏水进行最终清洗。

IEC 填料

对于轻度污染,用 0.5-1 mol/L 氯化钠清洗,然后用起始缓冲液进行平衡。对于中度污染,用 0.1-0.5 mol/L 氢氧化钠清洗,然后用 0.1-0.5 mol/L 氯化钠清洗,最后用起始缓冲液进行平衡。

DEAE 和 QAE 填料的重度污染,用 0.1-0.5 mol/L 氢氧化钠清洗,然后用蒸馏水清洗,再用 0.1-0.5 mol/L 盐酸冲洗,最后用 0.1-0.5 mol/L 氯化钠清洗。清洗完后用起始缓冲液进行平衡。

高盐流动相可用作最终冲洗,以保证填料表面挂有相反电荷的离子。

HIC 填料

大部分情况下,这些填料可用蒸馏水进行简单清洗,以去除残留的蛋白。对于结合力较强的杂质,需要以下的清洗步骤:

离子性杂质

对于结合力较强的杂质,可采用 0.1-0.5 mol/L 氢氧化钠或适当的酸,如盐酸或硫酸进行清洗。绝不要使用硝酸来清洗 TOYOPEARL 和 TSKgel PW 填料! 由于酸有时会引起蛋白质聚集,应首先用碱性溶液来去除蛋白。

疏水性杂质

去除疏水性杂质可使用 10-40% 的酒精(如乙醇、甲醇或异丙醇)。也可使用乙腈及丙酮等有机溶剂。

重要的是要注意这些溶剂有时会引起蛋白质聚集或损伤层析柱。也可使用非离子型洗涤剂进行清洗。

使用任何碱、酸或有机溶剂后,可用蒸馏水进行最终清洗。

Protein A 填料

可使用 0.1 mol/L 或 0.2 mol/L 的 NaOH 溶液(15 分钟接触时间)对填料进行清洗。0.5 mol/L NaOH 仅可在中度污染时用作清洗溶液。由于长期接触浓度升高的 NaOH 会造成配基脱落,影响填料寿命,所以接触时间应保持在 15 分钟或更短。

AFC 填料

在大量的清洗工作前,应使用高浓度的中性盐、离液剂或洗涤剂(如表 16 所列)作为洗脱液。吸附在填料上的杂蛋白可先用 2 柱体积 0.5 mol/L 的氢氧化钠清洗,然后用蒸馏水清洗。

MMC 填料

关于中度污染,用 0.5-1.0 mol/L 氯化钠清洗,然后用起始缓冲液进行平衡。关于较重污染,用 0.1-0.5 mol/L 氢氧化钠清洗,然后用 0.1-0.5 mol/L 氯化钠清洗,最后用起始缓冲液进行平衡。

结合力较强的疏水性杂质可能需要用 10-40% 的醇类,如乙醇、甲醇或异丙醇。重要的是要注意这些溶剂有时会引起蛋白质聚集或损伤层析柱。

3. 储存

SEC 和 IEC 填料

将层析柱或用过的散装填料储存在含有抑菌成分的溶液中，如 20% 乙醇，4-25°C 下较为适宜。作为备选方案 SEC 和 IEC 填料可储存在 2% 的苯甲醇溶液中。

关于 TOYOPEARL 填料储存于苯甲醇和 NaOH 溶液的信息，请联系我们的技术人员。

HIC 填料

将层析柱或用过的散装填料储存在含有抑菌成分的溶液中，如 20% 乙醇，4-25°C 下较为适宜。不建议将 HIC 填料储存在 2% 的苯甲醇中。关于储存于 NaOH 溶液的信息，请联系我们的技术人员。

Protein A 填料

将层析柱或用过的散装填料储存在含有抑菌成分的溶液中，如 20% 乙醇，4-10°C 下较为适宜。

TOYOPEARL AF-rProtein A-650F 填料可储存在 2% 的苯甲醇溶液（替代 20% 的酒精）中。关于 TOYOPEARL Protein A 填料及储存于苯甲醇的信息，请联系我们的技术人员。

AFC 填料

将层析柱或用过的散装填料储存在含抑菌成分（如 20% 乙醇）的 1 mol/L 氯化钠或氯化钾的中性溶液中，4-10°C 下较为适宜。关于 AF-Formyl 650M，将层析柱或用过的散装填料储存在 1 mol/L 氯化钠或含有 1% 戊二醛的氯化钾中性溶液中，4-10°C 下较为适宜。

请注意色素亲和层析填料可能会在储存过程中释放少量色素配基。每次使用前确保清洗色素亲和填料，以清除脱落的色素配基。

MMC 填料

将层析柱或用过的散装填料储存在含有抑菌成分的溶液中，如 20% 乙醇，4-25°C 下较为适宜。将散装填料储存在深色容器中，如装货时提供的容器。由于填料可能会在一段时间后发生轻微变色，在储存过程中应确保装填好的层析柱远离阳光直射。变色不会影响填料的性能。

4. 灭菌 / 除热原 / 除防腐剂 / 层析柱筛板

灭菌

TOYOPEARL 和 TSKgel PW 填料可通过在 121°C 下 20 分钟的高压来灭菌而不影响其性能。或者，装填过的层析柱可浸泡在 200 ppm 次氯酸钠 12 小时来进行灭菌而不影响其性能。如果考虑使用次氯酸钠，请咨询我们的技术专家。

除热原

建议在 pH 2 ~ 12 的范围内使用 TOYOPEARL 和 TSKgel PW 填料。当然，填料也可以耐受短时间 (< 12 小时) 的较高 pH (0.5 mol/L NaOH)。用 0.5 mol/L NaOH 处理 4 小时后，内毒素水平通常至少降低 4 个级别，然后用 3 柱体积的无内毒素平衡缓冲液进行冲洗。

除防腐剂

TOYOPEARL 和 TSKgel PW 填料出货状态为保存在 20% 的乙醇溶液中（除一些亲和产品外）。本文件中概括的填料装填过程将降低已装填层析柱废水中的乙醇水平。

层析柱筛板

与压力相关的问题通常由于柱筛板的堵塞引起。卸下柱筛板，并按照层析柱制造商的建议彻底清洗。如果问题仍然存在，请更换柱筛板。

5. 所选 TOYOPEARL 和 TOYOPEARL GigaCap 填料的压力流速曲线及性能测试结果

图 17: TOYOPEARL 填料的压力流速曲线对比

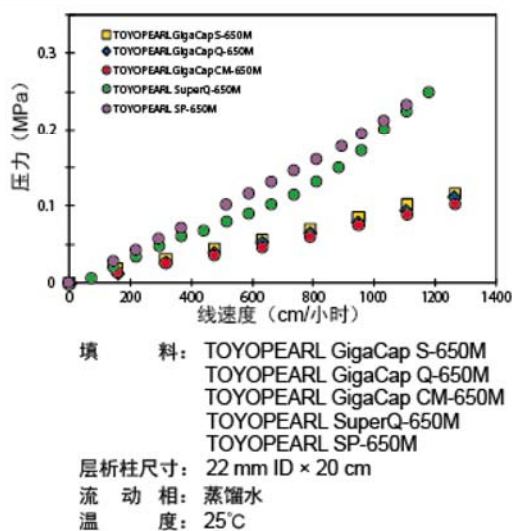
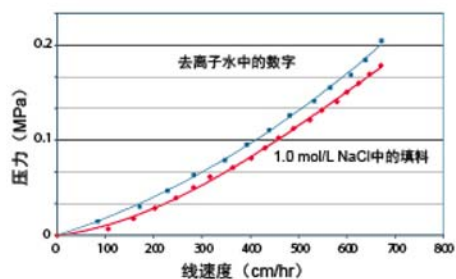
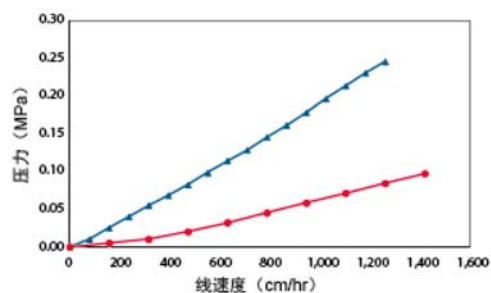


图 18: TOYOPEARL GigaCap S-650M 的压力流速数据



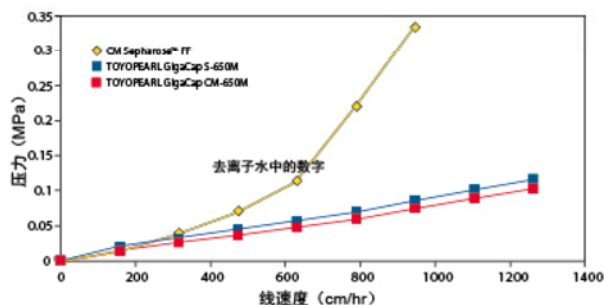
使用 TOYOPEARL GigaCap S-650M 装填一根 36cm ID x 25 cm 的 Eastern Rivers BioStream 层析柱，用以测定压力-流速特征。该填料在水和 1.0 mol/L NaCl 中装填并运行，填料具有相似的表现。

图 20: TOYOPEARL GigaCap DEAE-650M 的压力流速曲线



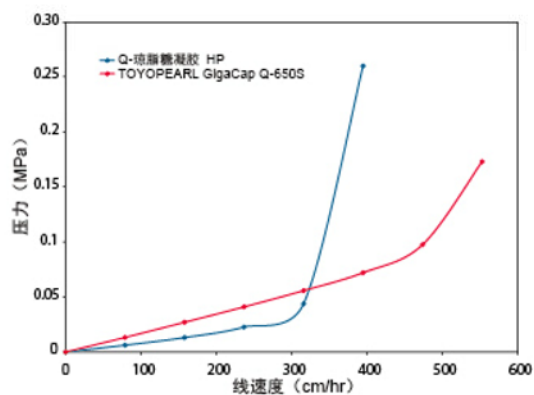
填 料: TOYOPEARL GigaCap DEAE-650M
层析柱尺寸: 22 mm ID x 20 cm
流 动 相: 0.1 mol/L NaCl
检 测: 压力 (MPa)

图 19: TOYOPEARL GigaCap CM-650M 的压力流速特性



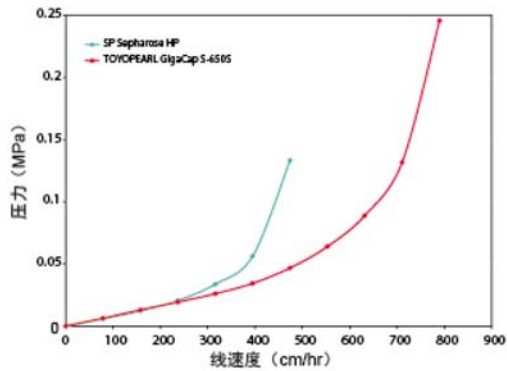
填 料: TOYOPEARL GigaCap CM-650M
层析柱尺寸: 22 mm ID x 20 cm
流 动 相: H₂O
检 测: 压力 (MPa)

图 21: TOYOPEARL GigaCap Q-650S 和 Q-琼脂糖凝胶 HP 压力流速曲线的对比



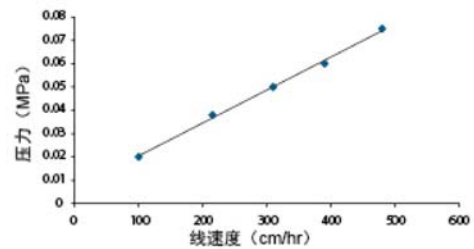
填 料: TOYOPEARL GigaCap Q-650S
Q Sepharose HP
层析柱尺寸: 22 mm ID x 20 cm
流 动 相: 0.1 mol/L NaCl
检 测: 压力 (MPa)

图 22: TOYOPEARL GigaCap S-650S 和 SP- 琼脂糖凝胶 HP 压力流速曲线的对比



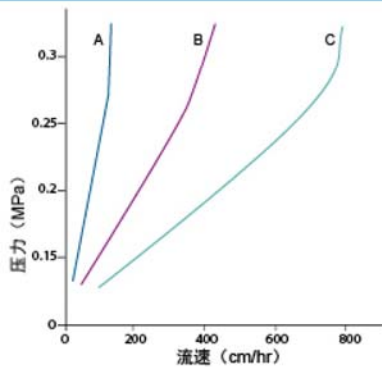
填 料: TOYOPEARL GigaCap S-650S
 SP Sepharose HP
 层析柱尺寸: 22 mm ID × 20 cm
 流 动 相: 0.1 mol/L NaCl

图 24A: 已装填 TOYOPEARL AF-rProtein A-650F 层析柱的线速度和压力曲线



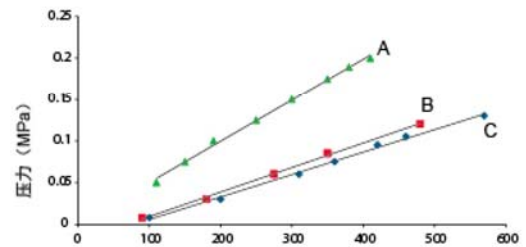
填 料: TOYOPEARL AF-rProtein A-650F
 层析柱及尺寸: Resolute, 40 cm ID × 8.4 cm
 流 动 相: H₂O
 线 速 度: 各种
 检 测: 压力 (MPa)

图 23: 各种粒度 TOYOPEARL Phenyl-650 填料的压力流速曲线



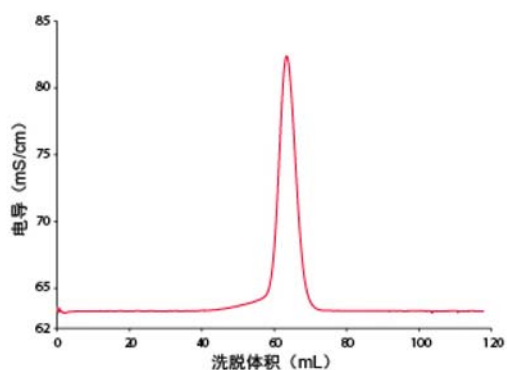
填 料: A. TOYOPEARL Phenyl-650S
 B. TOYOPEARL Phenyl-650M
 C. TOYOPEARL Phenyl-650C
 层析柱尺寸: 25 mm ID × 25 cm
 流 动 相: 2.0 mol/L (NH₄)₂SO₄
 流 速: 如图所示

图 24B: 线速度和压力曲线的对比



填 料: A. TOYOPEARL AF-rProtein A-650F
 - 45 μm (20 cm ID × 32 cm)
 B. TOYOPEARL AF-rProtein A-650F
 - 45 μm (20 cm ID × 18 cm)
 C. TOYOPEARL Butyl-650M
 - 65 μm (20 cm ID × 21 cm)
 层析柱: QuikScale 20 cm ID
 流动相: 水
 线速度: 各种
 检 测: 压力 (MPa)

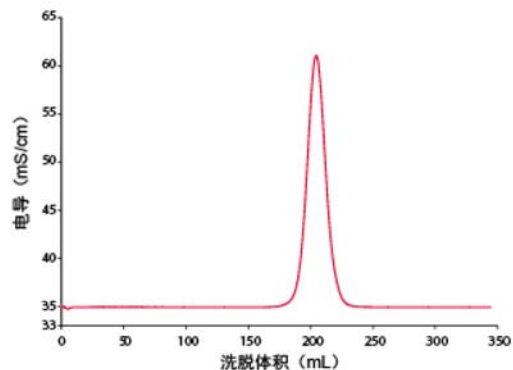
图 25A: 已装填 TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F 的层析柱的 HETP 及不对称系数评估



填 料: TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F
层析柱尺寸: 2.6 cm ID× 14.8 cm (78.5 mL)
流 动 相: 0.4 mol/L NaCl
流 速: 60 cm/小时 (5.3 mL/分钟)
检 测: 电导 (mS/cm)
温 度: 环境温度
样 品: 3.0 mol/L NaCl
上 样 量: 1.0% CV
仪 器: AKTA Avant

N/m	6537
不对称系数	1.03

图 25B: 已装填 TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F 层析柱的 HETP 及不对称系数评估



填 料: TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F
层析柱尺寸: 4.4 cm ID x 15 cm (228 mL)
流 动 相: 0.4 mol/L NaCl
流 速: 60 cm/小时 (15.2 mL/分钟)
检 测: 电导 (mS/cm)
温 度: 环境温度
样 品: 3.0 mol/L NaCl
上 样 量: 1.0% CV
仪 器: AKTA Avant

N/m	5932
不对称系数	1.10

6. 工业层析柱装置示例

层析柱制造商	层析柱类型	各种柱床尺寸 (ID×L cm)	层析柱性能		填料类型
			As	理论塔板数【N/m】	
Bio-Rad®	InPlace™/GelTec™	20-45 × 15-25 130 × 24	0.8-1.4	3,000-4,000 (盐-60 cm/小时)	HIC-65 μm
			1.1-1.2	3,500-3,900 (盐-300 cm/小时)	IEC-65 μm
GE医疗集团生命 科学部	AxiChrom™	60 × 20	1.1	8,000 (盐-100 cm/h)	HIC-65 μm
	BPG™	20-30 × 11-25	0.9-1.3	4,000-11,000 (盐-40 cm/h)	IEC/HIC-65 μm
	Chromaflo™	40-80 × 15-24	1.1-1.4	3,000-5,000 (盐-100 cm/h)	IEC-65 μm
	INdEX™	20-35 × 28-32 20 × 15-25	1.3-1.4	14,-20,000 (丙酮-20 cm/h)	IEC-20 μm
0.8-1.6			3,000-6,000 (丙酮-100 cm/h)	IEC/HIC-35/65 μm	
默克	Superformance®	20-30 × 15-30 20 × 30	1.0-1.3	2,500-3,500 (丙酮-100 cm/h)	IEC-65 μm
			1.2	7,000 (丙酮-250 cm/h)	IEC-20 μm
密理博	IsoPak® / Access®	44 × 25 44 × 13-30 100-160 × 15-25 140 × 25 160 × 13-15 200 × 30	1.2-1.5	6,000-9,000 (丙酮-60 cm/h)	IEC-35 μm
			1.1-1.4	3,000-8,000 (130-20 cm/h)	IEC/HIC-65 μm
			1.2-1.4	4,000-6,000 (盐-60 cm/h)	IEC/HIC-65 μm
			1.4-1.7	5,000-7,000 (盐-60 cm/h)	IEC-35 μm
			1.0	600-900 (丙酮-100 cm/h)	IEC-100 μm
			1.2-1.4	4,000-5,500 (100 cm/h-盐)	HIC-65 μm
	QuikScale®	20-30 × 13-20 14-30 × 13-33 63 × 17	1.2-1.6	4,000-10,000 (丙酮-100 cm/h)	HIC-35 μm
			1.3-1.6	2,500-5,000 (丙酮-100 cm/h)	IEC-65 μm
			1.2-1.4	2,500-4,000 (丙酮-130 cm/h)	IEC-65 μm
	Moduline®	140 × 20-25	0.8	5,000-6,000 (盐-30 cm/h)	IEC-65 μm
Pall/Euroflow	Resolute™	40-80 × 12-32 40-80 × 14-32 40-100 × 21-28 100-140 × 20-25	1.1	16,000-19,000 (盐-60 cm/h)	HIC-35 μm
			0.8-1.2	3,000-7,000 (盐-30 cm/h)	HIC/IEC-65 μm
			1.0-1.2	1,000-3,000 (盐-100 cm/h)	IEC-100/200 μm
			1.0-1.3	3,000-7,000 (盐-80 cm/h)	HIC-65 μm
PeakBiotech/ DAN Process	LPLC-DAC	30 × 19-21 30 × 20 30 × 20	1.3-1.4	13,000-17,000 (盐-100 cm/h)	HIC/IEC-20 μm
			1.2-1.8	6,000-8,000 (盐-100 cm/h)	HIC/IEC-35 μm
			1.2	4,000 (盐-80 cm/h)	IEC-65 μm
Proxcys	CRIO – 径向流	5 – 20升BV, -11.6 cm L	1.0-1.2	3,000-7,000 (盐-100 cm/h)	IEC-65 μm

这些示例显示了用户定义装填条件的实际值。这些数值不一定为最佳值。

通过与不同的制造商合作,东曹生物拥有 20 多年的层析柱装填经验。
如有任何顾虑和问题,请致电东曹(上海)生物科技有限公司技术部。

Tosoh Bioscience, TOYOPEARL, TSKgel, TOYOPEARL MegaCap 及 TOYOPEARL GigaCap 为东曹公司的注册商标。
Bio-Rad 为注册商标; GelTec 和 InPlace 为 Bio-Rad 公司的商标; AxiChrom, BPG, Chromaflo 及 INdEX 为通用电气医疗集团的商标。
Superformance 为默克公司的注册商标; KGAAccess, IsoPak, Moduline 及 QuikScale 为密理博公司的注册商标。
Resolute 为 Pall 公司的商标。



TOSOH

TOSOH BIOSCIENCE

东曹（上海）生物科技有限公司

地址：上海市虹梅路1801号A区凯科国际大厦1001室

电话：+86-21-34610856 传真：+86-21-34610858

电子邮箱：info@tosoh.com.cn

网址：www.separations.asia.tosohbioscience.com