



BESTCHROM

博 格 隆

Diamond MMC

复合型弱阳离子交换介质

使用说明书





目 录

1、产品简介	1
2、技术参数	1
3、使用方法	2
4、应用实例	5
5、在位清洗	6
6、灭菌	6
7、储存	6
8、销毁及回收	6
9、订货信息	7

1、产品简介

离子交换层析 (ion exchange chromatography, IEX) 是一类非常有效的生物分子分离纯化方法, 该法主要依赖正负电荷间的相互作用, 利用不同生物分子在特定条件下带有的电荷的性质和多少差异来进行分离, 它具有载量高、分辨率好, 条件可控、易于放大的特点, 已广泛应用于医药、化工、冶金、食品等领域。但是在做离子交换层析的时候要求样品中的含盐量不能太高, 复合型离子交换介质通过在配基上引入苯环, 使的该类介质对盐有一定的耐受性, 免去了高盐样品的脱盐步骤, 拓展了离子交换的应用范围。

复合型离子交换介质是由三部分组成: (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, Diamond基架为高刚性琼脂糖基架, 是通过对传统的Bestarose 6FF基架进行化学改构和修饰而成的, 具有更好的机械性能; (2) 固定在基架上的功能基团, 它是复合型的荷电基团, 通常为由带电荷的部分和疏水的部分两部分组成; (3) 与功能基团带相反电荷的离子 (可称为平衡离子), 该离子可以可逆的与离子型功能基团相结合。

Diamond MMC 是将带有苯环和羧基的复合基团偶联在高刚性琼脂糖微球上形成的一种多模式弱阳离子交换介质。

2、技术参数

外观	白色浆状物, 放置可分层
基架	高刚性琼脂糖
功能基团	复合型弱阳离子基团
平均颗粒大小 ⁺	75 μ m
离子载量	70~90 μ mol H ⁺ /mL填装介质
动态载量 ⁺⁺	>28 mg BSA/mL 填装介质 (30mS/cm时)
耐压	0.5MPa
压力流速 ⁺⁺⁺	\geq 1200cm/h (0.5MPa BXK 100/500 H=20 cm 20 $^{\circ}$ C)
化学稳定性	常见水相溶液: 1M NaOH ⁺⁺⁺⁺ 、1M HAc ⁺⁺⁺⁺ 、6M盐酸胍、8M尿素、70%乙醇、30%异丙醇、20%乙醇、2%苯甲醇;



	避免与氧化剂、阳离子洗涤剂接触
pH稳定性	3~14 (CIP), 3~12 (工作)
温度耐受性	使用温度2~40℃, 不能冻结
储存 ⁺⁺⁺⁺	2~30℃, 20%乙醇或2%苯甲醇
推荐流速范围	90-500cm/h

+平均颗粒大小是填料体积分布累计的中值粒径

++在 BXH5/100 柱中, 柱高 10cm, 以 50mMNaAc+0.25M NaCl pH 4.75, 流速 2mL/min 条件下的 10%BSA 动态结合载量,

+++该流速为用 BXK100/500 20cm 柱高 20℃在 0.5MPa 压力下的线性流速

++++1M NaOH 和 1M HAc 仅用于清洗

+++++2%苯甲醇仅用于国外运输或者客户指定

3、使用方法

3.1 层析柱装填

注：装柱前最好将介质悬液平衡到室温。

- 用量计算：根据计划装填的层析柱的柱体积计算需要的 Diamond MMC 的量。

需要的沉降介质体积=柱体积×1.12 (即压缩比约为 1.12)

根据需要的沉降介质体积计算需要量取的介质悬液体积, 计算公式为:

需要的介质悬液¹体积=沉降介质体积÷介质悬液¹浓度。介质悬液¹原始浓度见下表。

包装规格	介质悬液 ¹ 浓度(%)
25mL、100mL、500mL、1L、5L、10L	80
20L、40L	75

1: 指博格隆销售的原包装介质悬液。

注：对于非原始浓度的介质悬液, 客户可根据介质悬液的实际浓度计算所需体积。

- 介质清洗：将介质悬液充分摇匀后量取上述方法计算所得的体积, 倒入漏斗, 抽去液体, 用约 3mL 装柱溶液 (20%乙醇+0.4M NaCl) /mL 介质洗涤, 重复洗涤 3 次, 每次加洗液时需用玻璃棒或者搅胶棒搅拌, 以便更好地清洗掉原保存液。
- 装柱胶悬液准备：将清洗好的介质从漏斗转移到烧杯或其它适当的容器中, 加



入装柱液至胶悬液浓度为 50~75%，搅匀备用。

- 取清洗干净的 BXK 层析柱（BXK 系列层析柱的直径从 1 厘米到 30 厘米不等，不同规格可以满足不同规模大小的层析应用），以层析柱 BXK16/20 为例，利用装柱液通过层析柱排液口排净下筛网内气泡，在柱子底部保留 1cm 高左右的液体，拧紧下堵头，调整柱子使其垂直于地面。
- 将搅匀后的胶悬液一次性缓慢倒入层析柱内（必要时使用装柱器），注意不要带入气泡。

装柱器：与 BXK 柱相同直径的空柱管。

- 用装柱液将装柱器加满，将装柱器与层析系统连接，开启流速，排空软管中气泡，关闭流速，再拧紧装柱器上盖。
- ◇ 倒入后用搅胶棒再次搅匀，然后用装柱液沿内壁从上而下冲洗柱子上的介质颗粒，让介质自然沉降，直至悬液上有大约 1cm 澄清液。安装上柱头，将上柱头与层析系统或者蠕动泵连接。调节适配器使其下降到与澄清液接触，待密封圈全部浸入澄清液后拧紧密封圈。确保层析柱顶部阀门打开情况下，慢慢下移适配器至所有气泡排净。

注：此操作仅用于 BXK 100 及以上层析柱。冲洗内壁可减少介质颗粒粘在密封圈和柱壁之间，避免泄漏风险。

- 柱高为 10cm 时，可将装柱流速设定为 750cm/h，打开层析柱底阀/堵头，开启流速，使用设定流速压至胶面清晰稳定，标记胶面稳定时的位置。
- 去掉装柱器（如有），装上上柱头，将柱头下降至胶面上约 0.5cm 的位置，按照上述流速继续压柱至胶面清晰稳定，然后标记胶面稳定时的柱高。
- 停泵，打开柱头上的阀门/堵头，关闭柱底的阀门/堵头，稍微放松柱头密封圈，按照压缩比 1.12 下压胶面，旋紧柱头密封圈，关闭柱头阀门/堵头，装柱完成。

3.2 柱效测定和评价

- 通过柱效测定和评价可以确认层析柱装填质量。装柱完成后、层析柱使用期间以及分离纯化效果不理想时都需要进行柱效测定和评价。柱效通常用理论塔板高度（HETP）和非对称因子（As）来评价。
- 柱效测定可以采用丙酮或者 NaCl 作为样品进行测定，按照下表配制样品溶液和流动相。



	丙酮法测柱效	NaCl法测柱效
样品	1.0% (v/v) 丙酮水溶液	0.8M NaCl (溶于水)
样品体积	1.0%柱体积	1.0%柱体积
流动相	纯化水	0.4M NaCl水溶液
流速	30 cm/h	30cm/h
检测器	UV 280 nm	电导率

● HETP和As计算方法

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:

$$HETP=L/N$$

$$N=5.54(V_R/W_h)^2$$

其中: V_R =保留体积

W_h =半高峰宽

L =柱高

N =理论塔板数

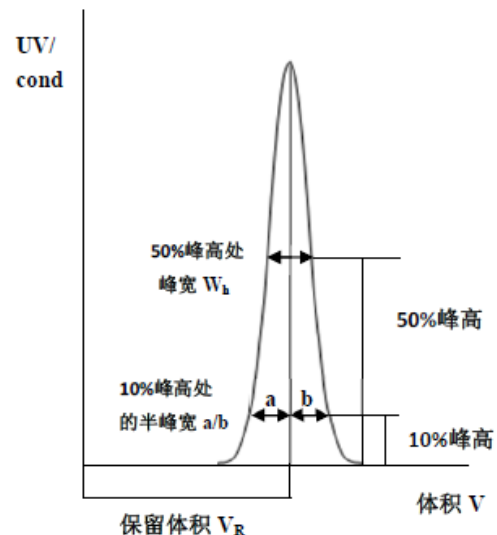
V_R 和 W_h 的单位应一致;

$$As=b/a$$

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



● 结果评价

一般来说, HETP 的数值若小于三倍介质平均颗粒大小且非对称因子在 0.8~1.8 之间, 说明柱效良好。对于不理想的柱效结果需要分析原因并重新装柱。

3.3 层析方法

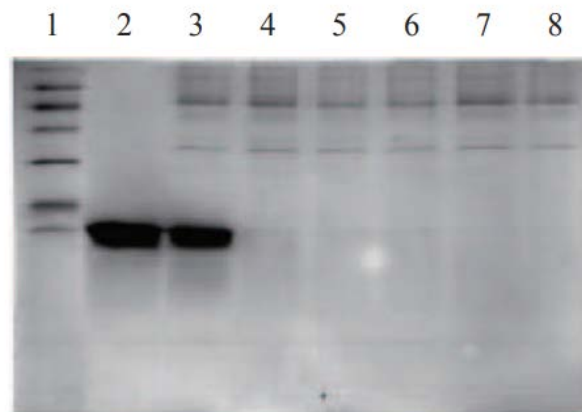
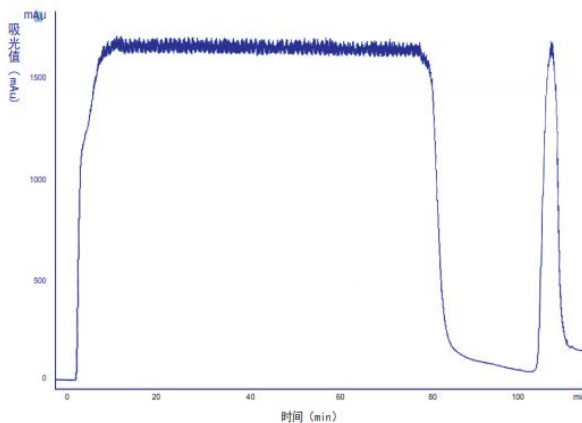
- 缓冲液选择: 应选择缓冲基团不与介质作用的缓冲盐, 平衡缓冲液的 pH 通常低于目的物等电点 1 个 pH 单位, 缓冲液以有利于目的物的结合, 同时需要考虑目的物在缓冲液中的稳定性。洗脱缓冲液通常为在平衡缓冲液中加入高浓度盐(如 1M NaCl) 的缓冲液或高 pH 洗脱, 如果疏水作用在结合中起到一定作用, 需要选择低盐高 pH 缓冲液来作为洗脱缓冲液。
- 流速: 根据柱子的高度一般选用 90~500cm/h 的流速, 柱高越大流速越慢。



- 样品准备: 为防止样品堵塞柱子, 在上样前样品需要用 0.45 μ m 的微孔滤膜过滤, 并将样品的 pH 和电导率调整到与平衡缓冲液一致 (可以采用稀释、超滤以及用 Bestdex G-25 置换缓冲液的方式调整样品的 pH 和电导率)。
- 平衡: 用平衡缓冲液清洗层析柱至出口处的缓冲液的 pH 和电导率与平衡缓冲液基本一致, 通常需要 3~5 个柱床体积。
- 上样: 根据样品中的物质含量和 Diamond MMC 的结合载量确定上样体积, 进行上样。
- 清洗: 用平衡缓冲液清洗层析柱至紫外吸收接近基线。
- 洗脱: 可以采用线性梯度或者步级梯度增加洗脱液中的洗脱强度, 将不同结合强度的物质从层析柱中洗脱下来, 收集不同的组分, 检测目的物所在的位置。
- 再生: 用高浓度的盐溶液 (如 2M NaCl) 且 pH 10-11 的平衡缓冲液洗脱可逆结合的物质。然后用至少 5 个柱体积的平衡缓冲液清洗介质, 或直到层析柱流出物显示稳定的电导率和 pH 值。
- 再平衡: 用平衡缓冲液清洗, 待 pH 和电导率与平衡缓冲液基本一致, 就可以进行第二次上样, 如此重复。

4、应用实例

用 Diamond MMC 纯化某重组蛋白毕赤酵母发酵液



层析柱: Ezload 50/20 Diamond MMC

平衡液: 20mM PB、0.4M NaCl, pH6.5

洗脱液: 20mM PB、1.5M NaCl, pH6.5

样品: 300mL 某重组蛋白毕赤酵母发酵液

泳道 1: Marker

泳道 2: 洗脱

泳道 3: 发酵液

泳道 4-8: 流穿

5、在位清洗

随着层析介质使用次数的增加，污染物在层析柱上的积累也在不断增加，定期的在位清洗能有效防止污染物的累积，保持层析介质稳定的工作状态。客户可根据使用过程中介质的污染程度确定在位清洗的频率（如果污染较严重，建议每次使用之后都进行在位清洗，以保证结果的可重复性）。

对于不同类型的杂质和污染物建议清洗条件如下：

- 结合比较紧密蛋白的去除：用 2~3 个柱体积的 2M NaCl 清洗。
- 强疏水性蛋白、沉淀蛋白的去除：先用 2~3 个柱体积的 1M NaOH 清洗，然后立即用 5~10 个柱体积的纯化水清洗。
- 脂蛋白和脂类物质的去除：先用 5~10 个柱体积的 70%乙醇或 30%异丙醇清洗，然后用 5~10 个柱体积的纯化水清洗。
- 也可将上述两种清洗条件结合进行清洗，如用含有 1M NaOH 的 30%异丙醇溶液清洗。

注：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 30~60cm/h；堵塞严重的时候可以采用反向清洗。

6、灭菌

由于 20%乙醇或 2%苯甲醇保存液不具有杀菌、除热原作用，建议 Diamond MMC 介质在使用前及使用过程中，可以采用 1M NaOH 处理 0.5~1h 以减少微生物污染风险的。

7、储存

Diamond MMC 用 20%乙醇或 2%苯甲醇为保存液进行销售。使用后的 Diamond MMC 应储存于 20%乙醇中、2~30°C 密闭保存，为了防止乙醇挥发以及微生物滋生，建议每 3 个月更换一次新鲜的保存液。

8、销毁及回收

由于 Diamond MMC 在自然界很难降解，为了保护环境建议采用焚烧处理。

9、订货信息

产品名称	货号	包装
Diamond MMC	AI0091	25mL
	AI0092	100mL
	AI305311	500mL
	AI0093	1L
	AI0094	5L
	AI0095	10L
	AI305315	20L
	AI305316	40L

预装柱名称	货号	包装
EzFast Diamond MMC	EI00921	1×1mL
	EI315351	5×1mL
	EI315303	1×5mL
	EI315353	5×5mL
EzScreen Diamond MMC	EI00925	1×4.6mL
	EI00935	5×4.6mL
EzLoad 16/10 Diamond MMC	EI044	1 根
EzLoad 26/10 Diamond MMC	EI045	1 根