



MIX-A Captarose HF

复合模式层析介质

使用说明书

TS-ZB-S-164-C/00

目 录

产品介绍	1
1. 产品概述	1
2. 产品特点	1
3. 产品技术参数	2
操作指导	2
1. 装柱	2
2. 柱效检测	3
3. 分离纯化	4
4. 分离条件优化	5
5. 在位清洗	6
6. 消毒灭菌	6
7. 保存	7
8. 线性放大	7
问题解决	8
产品订购	8

产品介绍

1. 产品概述

复合模式层析介质是一种新型介质，将多模式配基固定在基质上，并通过多种类型的相互作用与靶分子或杂质结合，具有很高的选择性，允许在各种工艺条件下操作，以解决具有挑战性的分离纯化问题。

Captarose HF 是在 Singarose FF 的基础上进行化学改构和修饰而成的高刚性琼脂糖基架，平均粒径 75 μm ，具有刚性强、耐压高、流速快的特点，在高流速条件下呈现较高动态结合载量，能在较短时间内处理大体积的样品，常用于生物分子的捕获和中度纯化阶段。

MIX-A Captarose HF 是一种复合型强阴离子交换层析介质，与常规强阴离子交换层析介质相比，该介质不但有离子交换基团，还有苯环。特殊的功能基团赋予介质新的选择性，使用时应综合考虑蛋白的疏水性质、电荷性质等来进行蛋白的分离纯化。MIX-A Captarose HF 的基质为高度交联的刚性极强的琼脂糖，可适应高流速操作，物理化学性质稳定，适用于大规模工业化生产。用于抗体纯化时，常采用流穿模式，可有效去除抗体的聚体、宿主蛋白、核酸、内毒素及脱落的蛋白 A 等。

2. 产品特点

高刚性

高流速

粒径均一

稳定性好

重复性好

易于放大

高耐压、低反压

亲水性强、非特异吸附少

通用性强、应用范围广

3. 产品技术参数

表 1. MIX-A Captarose HF 复合模式层析介质

产品名称	MIX-A Captarose HF
基质	高刚性琼脂糖
平均粒径	75 μm
配基	复合模式的强阴离子配基（苯环、季氨基）
离子载量	90-120 $\mu\text{mol Cl}^-/\text{mL}$ 介质
建议流速	<600 cm/h
建议压力	<0.5 MPa (5 bar)
工作 pH 范围*	3-12
pH 稳定性	3-12（长期**）
	2-14（短期**）
化学稳定性	常用缓冲液中稳定，如 1 M NaCl、1 M NaOH、6 M 盐酸胍、8 M 尿素、70% 乙醇、30%异丙醇等。
保存条件	20%乙醇；4-30°C

备注 *：工作 pH 范围，指在层析介质稳定前提下，实现分离纯化功能的 pH 范围。

备注 **：长期，指介质在很长时间内保持稳定而不对其后续性能产生不利影响的 pH 范围。短期，指根据经验给出的介质再生、在位清洗和消毒的 pH 范围。

操作指导

1. 装柱

1.1 装柱缓冲液准备

纯化水，超声脱气 15 min。

1.2 层析介质准备

计算所需层析介质的量（压缩系数约为 1.15），并称取备用。用真空抽滤瓶置换至装柱缓冲液中。置换的介质加入一定量装柱缓冲液，制成约 50%浓度的胶悬液。

1.3 层析柱准备

检查层析柱，确保各部件完整、干净。安装下柱头，拧紧 O 型圈后，将层析柱垂直固定在铁架台上，用水平仪检查并调整使层析柱保持竖直。用注射器吸取装柱缓冲液，接于柱底的出口处，缓慢推出注射器内液体，排除底部筛网的气泡，取下注射器后拧上堵头。层析柱中加入约 2 cm 高的装柱缓冲液。

1.4 装柱（以直径 16 mm，床高 10 cm 的层析柱为例）

混匀胶悬液，用玻璃棒引流缓慢倒入层析柱中，若液面离柱顶还有空隙，加装柱缓冲液充满。将调节器连接至层析系统，启动泵以一定流速排除管路及顶部筛网中的气泡后暂停。将调节器沿 45° 放入柱中，固定好调节器并拧紧密封圈，注意避免气泡进入。拧开层析柱底部的堵头，将底部管路放入到废液缸中，流速设为 60 cm/h，至介质界面无变化后，设置流速为 600 cm/h（报警压力设为 0.5 MPa），维持该流速 45 min，用记号笔在界面处做好标记，暂停系统。拧上底部堵头，层析柱上端与泵断开，稍拧松调节器上的密封圈，将柱头压到胶面以下 2 mm 处，拧紧密封圈。将层析柱顶部和底部管路连接到层析系统上，进行柱效测定。

2. 柱效检测

装柱完成后应立即检测柱效。通常用每米理论塔板数 N/m 、峰不对称因子 A_s 等术语来衡量层析柱的性能。柱效越高，层析柱分离能力越强。为了更加准确地反映层析柱柱效，检测时待测样品上样体积为柱体积的 1.0%，线性流速控制在 15–30 cm/h。为了防止样品的稀释，尽量在接近层析柱的入口处上样

表 2 柱效检测方法

项 目	内 容	
检测方法	丙酮法	NaCl 法
样品	1.0% (v/v) 丙酮水溶液	0.8 M NaCl 水溶液
样品体积	1.0%CV*	1.0%CV*
流动相	水	0.4 M NaCl 水溶液
流速	30 cm/h	30 cm/h
检测	UV 280	电导率

备注*：CV (Column Volume) 柱体积，以下简称 CV。

柱效计算

根据 UV 曲线（或电导率曲线）计算 N/m 、和 A_s ，公式如下：

$$N/m = N/L$$

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

$$A_s = b/a$$

备注：公式中 VR：保留体积；Wh：半高峰宽；L：柱高(单位为 m)；N：理论塔板数。VR 和 Wh 的单位应一致；a 是图 1 中 10%峰高处的第一个半峰宽；b 是 10%峰高处的第二个半峰宽。

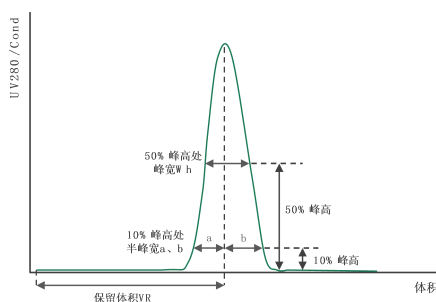


图 1. 柱效计算示意图

峰应该是对称的, A_s 尽可能接近 1 (通常可接受 0.8-1.8 之间的值)。 $N/m > 4,000$ 。

3. 分离纯化

3.1 柱平衡

将层析柱连接至纯化设备，使用结合缓冲液冲洗柱 3-5 CV 以上，至层析柱流出液 pH、电导同结合缓冲液的 pH、电导一致。平衡结束后将紫外归零。

3.2 加载样品

经 0.2 / 0.45 μm 过滤后的样品溶液加载在层析柱上，上样体积取决于层析介质载量、样本溶液中与介质结合分子的浓度和其他层析条件。

3.3 柱冲洗

使用结合缓冲液冲洗 3-5 CV，将该条件下不与介质结合的杂质洗去（至 UV 280 检测值回归基线附近）。或根据前期实验确定的杂质淋洗条件进行柱冲洗。

3.4 洗脱

使用洗脱缓冲液冲洗层析柱，目标紫外峰升起后开始收集洗脱样品。

3.5 清洗和保存

使用低 pH 缓冲液（如 0.1 M 乙酸钠-乙酸，pH3）清洗层析柱至电导率和 pH 稳定或用高浓度无机盐如 1-2 M NaCl 缓冲液清洗 2-5 CV，去除可逆结合的杂质，然后用纯化水冲洗至流出液电导为 0，最后用 20%乙醇冲洗 2-3 CV。层析柱置于 4-30℃环境中保存。

备注：缓冲液种类，根据目标分子纯化所需的 pH 进行合理选择，0.2 μm 过滤。

4. 分离条件优化

4.1 结合条件优化

4.1.1 pH 优化。MIX-A Captarose HF 具有强阴离子配基，通常选取较目的蛋白等电点 pI 高 0.5-2.5 的不同 pH 进行优化，选择目的蛋白最适宜的结合条件。

4.1.2 无机盐浓度优化。由于 MIX-A Captarose HF 的配基兼具疏水性质，因此结合可在较高盐浓度条件下进行，在 pH 确定的情况下，调整结合缓冲液的盐浓度，一般建议 50-500 mM NaCl 或 KCl 进行盐浓度优化，通过电泳或其他分析方法进行过程分析，挑选杂质成分流穿最多的盐浓度为结合缓冲液的无机盐浓度。

4.1.3 样品准备。经过前期的条件优化，确定最适的结合缓冲液条件，调整样品的 pH 和电导同结合缓冲液一致。

4.2 洗脱条件优化

4.2.1 pH 优化。MIX-A Captarose HF 为强阴离子配基，可通过降低洗脱缓冲液 pH 来进行洗脱。pH 的改变会导致目的物质分子带电状况发生变化，当 pH 接近或低于目的蛋白的等电点时，目的蛋白从介质上解吸附而被洗脱。也可选择 pH 梯度洗脱，筛选最适洗脱缓冲液的 pH。

4.2.2 盐浓度优化。在确定的 pH 条件下，分别用 0.5、1.0 和 1.5 M 无机盐来筛选最适洗脱的盐浓度或用盐浓度梯度洗脱（如 20 CV，0-100%的梯度），分阶段收集样品并进行检测，以确定最适洗脱缓冲液的盐浓度。

5. 在位清洗

在位清洗 (Cleaning In Place, CIP) 是去除层析介质上强结合的、沉淀的或者变性的物质。杂质残留将会影响层析柱的层析性能。如果聚集严重, 将会堵塞层析柱, 加大反压并减慢流速。所以定期的在位清洗能够防止污染物在柱床聚集, 有助于保持介质的载量, 流速等。

层析柱在使用 3-5 个循环后需要进行清洗, 帮助介质恢复良好的性能。通常使用无机盐、酸、碱或有机溶剂等进行清洗, 对于不同类型的杂质和污染物建议清洗条件如下:

- 5.1 去除离子交换作用吸附的杂质: 用 2-3 CV 的 2 M NaCl 溶液清洗层析柱, 然后用 3-5 CV 纯化水冲洗层析柱。
- 5.2 去除蛋白沉淀、疏水性杂质: 用 1 M NaOH 浸泡层析柱 1 h 以上, 然后用 5-10 CV 纯化水冲洗层析柱。
- 5.3 去除强结合的疏水性杂质: 用 3-5 CV 的 70%乙醇或者 30%异丙醇冲洗层析柱 (15-20 min), 然后用 3-5 CV 纯化水冲洗层析柱。
- 5.4 去除核酸: 用中性缓冲液冲洗 1-2 CV 后, 以 pH3.0 的 0.1 M 乙酸清洗 2-5 CV, 再用 1 M NaOH, 反向清洗 15-30 min。

清洗后如果立即使用, 用结合缓冲液冲洗 3-10 CV 即可。

6. 消毒灭菌

消毒灭菌是为了将层析柱中的微生物污染降至最低。MIX-A Captarose HF 复合模式层析介质可使用 NaOH 溶液作为消毒剂。NaOH 溶液可有效去除病毒、细菌、酵母及内毒素, 运行成本极低。消毒步骤为:

- 6.1 使用结合缓冲液将层析柱冲洗 3-5 CV。
- 6.2 使用 0.5 M NaOH 溶液对层析柱冲洗 2-5 CV。
- 6.3 使用 0.5-1 M NaOH 溶液对层析柱浸泡 1 h。
- 6.4 使用 pH 在 7-8 之间的结合缓冲液冲洗层析柱 5-10 CV 后即完成消毒过程。

注意事项:

层析柱污染程度严重时, 使用混有 30-40%丙醇的 0.5 M NaOH 进行清洗。

高浓度 NaOH 或长时间 NaOH 处理会降低介质载量,消毒时要注意清洗浓度和时间。

7. 保存

未使用的介质应当保存在 4-30℃ 的干燥、通风、洁净环境中,确保容器口完全密闭,切记不可冷冻。

已装好 MIX-A Captarose HF 介质的层析柱应当使用 20%乙醇浸泡密封保存,防止微生物污染。

备注:保存的介质在使用前,应进行 CIP 和至少用结合缓冲液平衡 5 CV。

8. 线性放大

在实验室规模优化后的纯化工艺,可以线性放大到中试或生产规模。在放大过程中需要注意以下事项:

保持停留时间不变,保证动态载量的稳定。

根据需要的结合能力选择层析柱容积,如果柱高改变需要注意是否对纯化步骤产生影响。

根据流速需求确定层析柱直径,根据已知的停留时间确定柱床高度,一般推荐 10-25 cm。

保证样品浓度均匀一致,洗脱条件一致。

问题解决

表 3 问题及解决建议

问题	可能原因及解决建议
使用过程中压力过高	更换在线滤器
	层析柱堵塞，进行 CIP 清理
压力曲线不稳	排除上样泵里的气泡
	使用气泡陷阱去除样品中的气泡
洗脱峰逐渐变宽	层析柱可能被污染，优化洗脱条件，并严格按 CIP 进行清洗
回收率降低	上样量过高，适当减少上样量
	洗脱时发生沉淀，优化洗脱条件
	洗脱强度不够，优化洗脱条件
CIP 峰增大	CIP 强度不够，优化 CIP 条件

产品订购

产品名称	货号	规格
MIX-A Captarose HF	HC5010011	1 mL 预装柱
	HC5010012	5 mL 预装柱
	HC5010001	25 mL
	HC5010002	100 mL
	HC5010003	500 mL
	HC5010004	1 L
	HC5010005	5 L
	HC5010006	10 L



浙江壹生科生物技术有限公司

地址：浙江省诸暨市陶朱街道聚力路 16 号 1 号厂房

电话：0575-80709355

