

产品

HiBond DEAE FF

货号: 01IC02-05 产品名: HiBond DEAE FF 弱阴离子交换预装

产品信息	参数
基质	高度交联的 6%琼脂糖微球
离子交换类型	弱阴离子
离子交换基团	-O-CH ₂ CH ₂ -N ⁺ (C ₂ H ₅) ₂ H
尺寸与规格	1.6×2.5 cm (5 mL)
离子载量	0.11-0.16mmolCl ⁻ /mL介质, 此柱离子载量共约0.55-0.80mmol Cl ⁻
粒径	45-165μm
建议流速	流速300-600cm/h (5mL柱子约18mL/min), 实际使用推荐5mL/min
PH稳定范围	2-12
耐压	0.3MPa
保存与运输	20%乙醇保存。冰袋运输, 保存温度2-8℃, 有效期2年。

产品描述

HiBond DEAE FF是一种用于弱阴离子交换的预装柱, 广泛用于生物制药和生物工程下游蛋白质、核酸及多肽的分离纯化。在蛋白质纯化中, 其用于吸附带负电荷的蛋白质。预装柱具有标准接口, 可以适配商品化的各类中压色谱系统, 如AKTA等, 方便客户操作。

纯化流程

1. 缓冲液的准备

应选择缓冲基团不与介质作用的缓冲盐(说明书末尾可查看阴离子交换缓冲液表), 基本原理就是低盐和高 pH (通常高于目的物等电点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) 的缓冲液或低 pH 洗脱。

2. 样品准备

将菌体破碎离心, 取上清。样品在上样前建议离心或用 0.22 μm 或 0.45 μm 滤膜过滤, 减少杂质, 提高蛋白纯化效率和防止堵塞柱子。

3. 样品纯化

- (1) 将泵管道中注满去离子水。去掉上塞子, 将层析柱连接至色谱系统中。再折断下口, 将预装柱接到色谱系统中, 并旋紧。
- (2) 用3-5倍柱体积的去离子水冲洗出存储缓冲液。
- (3) 使用至少5倍柱体积的平衡液平衡色谱柱。5mL 预装柱推荐流速为5 mL/min。
- (4) 利用样品泵或样品环上样。注: 样品的粘度增加使得即使上样体积很少, 也会导致层析柱很大的反压。上样量不要超过柱子的结合能力。
- (5) 用洗杂液冲洗柱子, 直到紫外吸收达到一个稳定的基线(一般至少10-15个柱体积)。
- (6) 用洗脱液采用等度或线性梯度洗脱。等度洗脱中, 通常5倍柱体积洗脱液就足够了。梯度洗脱可以用20倍柱体积或更多, 来分离不同结合强度的蛋白质。
- (7) 离子交换填料每次使用后可以用 1 M NaCl 甚至更高离子强度溶液或高 pH 溶液清洗, 然后用至少 5 倍柱体积的平衡液进行平衡, 至离子强度或 pH 值稳定。

4. SDS-PAGE检测

将使用纯化产品得到的样品(包括流出组分、洗杂组分和洗脱组分)以及原始样品使用 SDS-PAGE 检测纯化效果。

在位清洗

当填料使用过程中发现反压过高或者填料上面出现明显的污染时, 需要进行在位清洗操作 (Cleaning- in-Place, CIP)。建议按照下面操作去除填料上残留的污染物, 如沉淀蛋白、疏水蛋白和脂蛋白等。

a. 去除一些沉淀或变性物质

使用1MNaOH 溶液冲洗填料3个柱体积, 然后立即用 5 倍柱体积的 PBS, pH 7.4 清洗。

b. 去除强疏水结合的蛋白, 脂蛋白和脂类

方案一: 使用70%乙醇清洗3-4个柱体积, 接触时间为15-20 min 可以去除此类污染物。然后立即用 5 倍柱体积的 PBS, pH 7.4 清洗。

方案二: 使用1%非离子去污剂清洗3-4个柱体积。然后立即用 5 倍柱体积的 PBS, pH 7.4 清洗。

c. 去除离子作用结合的蛋白

使用2 M NaCl溶液清洗10-15 min。然后, 再使用去离子水清洗10个柱体积。清洗好的柱子可再用20%乙醇冲洗2个柱体积, 置于2-8℃保存。

问题及解决方案

问题	原因	推荐的解决方案
柱子反压过高	填料被堵塞	对填料进行在位清洗 裂解液中含有微小的固体颗粒, 建议上柱前使用滤膜(0.22或0.45μm)过滤, 或者离心去除。
	样品太粘稠	样品中含有高浓度的核酸, 加长破碎时间直至粘度降低。
	缓冲液太粘稠	有机溶剂或者蛋白稳定试剂(如甘油等)可能会引起反压增高, 降低操作流速。
洗脱组分中 没有目的蛋白	样品中蛋白带正电荷	查阅目的蛋白的等电点, 优化PH
	表达量太低	优化表达条件。
	目的蛋白结合比较弱, 在洗杂步骤被洗下来了	优化PH, 降低洗杂缓冲液离子浓度
	目的蛋白结合过强, 不容易洗脱下来	增加洗脱缓冲液离子浓度
	蛋白降解	在4℃下进行纯化操作 菌体破碎时添加一些蛋白酶抑制剂。
洗脱组分不纯 (含有多重蛋白)	洗杂操作不彻底	增加洗杂液体积。
	样品带电性能相似	优化洗脱条件
上样过程中 蛋白发生沉淀	操作温度太高	4℃下进行上样。
	蛋白发生聚集	在样品和所有的缓冲液中添加稳定剂, 如 0.1%的 Triton X-100或者 Tween-20。

阴离子交换缓冲液表

pH 范围	缓冲盐	浓度 (mM)	平衡离子	pKa(25 °C)
4.3-5.3	N-Methylpiperazine	20	Cl ⁻	4.75
4.8-5.8	Piperazine	20	Cl ⁻ 或 HCOO ⁻	5.33
5.5-6.5	L-Histidine	20	Cl ⁻	6.04
6.0-7.0	bis-Tris	20	Cl ⁻	6.48
6.2-7.2	bis-Tris propane	20	Cl ⁻	6.65
7.3-8.3	Triethanolamine	20	Cl ⁻ 或 CH ₃ COO ⁻	7.76
7.6-8.6	Tris	20	Cl ⁻	8.07
8.0-9.0	N-Methyl-diethanolamine	20	SO ₄ ²⁻	8.52
8.0-9.0	N-Methyl-diethanolamine	50	Cl ⁻ 或 CH ₃ COO ⁻	8.52
8.4-9.4	Diethanolamine	50	Cl ⁻	8.88
8.4-9.4	Propane 1,3-Diamino	20	Cl ⁻	8.88
8.6-9.6	bis-Tris propane	20	Cl ⁻	9.10
9.0-10.0	Ethanolamine	20	Cl ⁻	9.50
9.2-10.2	Piperazine	20	Cl ⁻	9.73
10.0-11.0	Propane 1,3-Diamino	20	Cl ⁻	10.55
10.6-11.6	Piperidine	20	Cl ⁻	11.12