

葡聚糖凝胶型阳离子交换填料

1 理化指标

凝胶型号	SP 葡聚糖凝胶 C-25	SP 葡聚糖凝胶 C-50	CM 葡聚糖凝胶 C-25	CM 葡聚糖凝胶 C-50
类型	强阳离子	强阳离子	弱阳离子	弱阳离子
载量	1.5-2.6mmol/g	1.5-2.6mmol/g	3.5-5 mmol/g	3.5-5 mmol/g
颗粒大小	干粉 40-120 um	干粉 40-120 um	干粉 40-120 um	干粉 40-120 um
最大流速*	100cm/h	45cm/h	100cm/h	45cm/h
工作 pH 值	4-12	4-12	6-10	6-10
稳定性	0.1M 的酸碱以及常规缓冲液			

* 层析柱 10mm*20cm, 5 cm 柱床高度, 流动相为水, 25°C

2 使用方法

2.1 填料的准备

将干粉浸泡于纯水或缓冲液中, 液体可以适当多加一些, 室温下完全溶胀需 2 天 (室温低的情况下可能时间要延长), 或者用热水浸泡大约 4 个小时 (直接倒进去即可, 切记不要水浴)。完全溶胀后除去上清液以及上层少许漂浮物, 用缓冲液彻底清洗填料。

2.2 装柱

- (1) 所有实验材料均需平衡至色谱层析操作的温度, 所有的缓冲液进行脱气处理 (填料不可以超声);
- (2) 检查层析柱所有部件, 特别是过滤网, 密封圈, 螺旋塞是否紧密, 玻璃管是否干净和完整。
- (3) 用去离子水清洗掉 20%乙醇保存液, 用缓冲液配成匀浆。
- (4) 将柱子底端用水或缓冲液润湿并保持一小段液位, 务必使底端无气泡。
- (5) 用玻璃棒引导匀浆沿着柱内壁一次性倒入柱内, 注意勿使产生气泡。打开柱子出液口, 使凝胶在柱内自由沉降, 连结好柱子顶端柱头。

2.3 平衡柱子

用上样的平衡缓冲液平衡柱子后即可上样。(当流出液的 pH 和电导值与起始缓冲液相同时层析柱即完全平衡)。

2.4 上样

样品应溶解在起始平衡缓冲液中，或者通过透析或脱盐的方法进行缓冲液置换，将样品缓冲液转移至起始平衡缓冲液。样品的粘度不应超过平衡缓冲液，上样前必须使用 0.45um 微孔滤膜对样品进行过滤。

最常见的程序是让目标分子结合到离子交换柱上，其他杂质流出。然而，在一些情况下，离子交换柱结合杂质而使目标分子流出，这样的操作也是可以的。

缓冲液的离子强度应保持较低，以免干扰样品结合，推荐的操作 pH 值应在缓冲液 pKa 的 0.5 个单位内，并且和目标分子的等电点 (pI) 相差至少一个 pH 单位。

对于目标分子的吸附，选择具有适当 pH 的缓冲液是至关重要的，请参考下表；

Buffers for cation exchange chromatography				
pH interval	Substance	Conc.(mM)	Counter-ion	pKa(25°C) ¹
1.4-2.4	Maleic acid	20	Na+	1.92
2.6-3.6	Methyl malonic acid	20	Na+or Li+	3.07
2.6-3.6	Citric acid	20	Na+	3.13
3.3-4.3	Lactic acid	50	Na+	3.86
3.3-4.3	Formic acid	50	Na+or Li+	3.75
3.7-4.7	Succinic acid	50	Na+	4.21
5.1-6.1	Succinic acid	50	Na+	5.64
4.3-5.3	Acetic acid	50	Na+or Li+	4.75
5.2-6.2	Methyl malonic acid	50	Na+or Li+	5.76
5.6-6.6	MES	50	Na+or Li+	6.27
6.7-7.7	Phosphate	50	Na+	7.20
7.0-8.0	HEPES	50	Na+or Li+	7.56
7.8-8.8	BICINE	50	Na+	8.33

¹Handbook of chemistry and physics,83rd edition,CRC,2002-2003.

2.5 洗脱

对于 CM 葡聚糖凝胶和 SP 葡聚糖凝胶填料，一般使用盐浓度递增或 pH 值递增（线性或者阶梯梯度）的方式来进行洗脱。

2.6 再生

根据样品的性质，通常通过用高离子强度洗脱缓冲液，如 2M NaCl 对柱子进行洗涤，或改变缓冲液 pH，然后在平衡缓冲液中重新平衡来进行再生。如果填料吸附性能发生改变，诸如变性蛋白质或脂质的物质在再生过程中洗脱不下来，则需要通过在位清洗程序 CIP 来清除。

2.7 在位清洗 (CIP)

通过用 2-3 倍柱床体积的 0.1M NaOH 溶液在位清洗填料，随后立即用大量纯水彻底清洗直至中性，从而除去沉淀的蛋白质、疏水结合的蛋白质和脂蛋白。

2.8 保存

未使用的填料，请室温密闭保存。使用完的填料，用纯水彻底冲洗，用然后保存在 20%乙醇中，4°C 保存，不能冷冻。

3 注意事项：

- (1) 上样之前，样品必须经过膜过滤及去除色素，否则杂质及色素会被吸附到填料上，影响填料的正常使用。所有的缓冲液均需要用 0.45um 的过滤器过滤。
- (2) 在使用过程中，避免使用高浓度的强酸强碱，酸和碱的浓度应低于 0.1 摩尔。碱会使流速变慢。
- (3) 不同的样品，吸附和洗脱方法不相同，可以根据相关的文献进行。