



Sepax Technologies, Inc.

Delaware Technology Park

5 Innovation Way, Suite 100 Newark DE 19711 USA

Phone: (302) 366-1101; Fax: (302) 366-1151

Toll Free: (877) SEPAX-US; www.sepax-tech.com

## 赛分 Proteomix 离子交换柱使用手册

### 色谱柱信息

赛分 Proteomix 离子交换柱特别针对蛋白质、寡核苷酸和多肽的分离而设计, 该柱具有高分辨率、高柱效、高回收率的特点。填料基质为刚性、球形、高交联度的聚苯乙烯-二乙烯苯(PS/DVB)颗粒。离子交换柱分多孔与无孔 PS/DVB 两种。多孔 PS/DVB 树脂颗粒大小有 5 $\mu\text{m}$ 、10 $\mu\text{m}$ , 孔径为 500 Å。无孔的树脂颗粒大小有 1.7 $\mu\text{m}$ 、3 $\mu\text{m}$ 、5 $\mu\text{m}$ 、10 $\mu\text{m}$ 。PS/DVB 树脂表面键合有一层高度亲水的纳米级厚度的中性聚合物薄层。疏水的 PS/DVB 树脂表面完全被这种亲水材料覆盖, 从而消除了 PS/DVB 对生物分子的不可逆吸附, 保证了其具有很高的分离效率和生物样品回收率。运用赛分独有的化学键合技术, 可将离子交换功能基团致密均匀地键合在亲水层的表面。

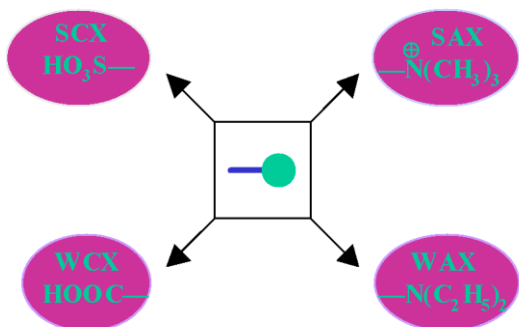


图 1. Proteomix SCX、WCX、SAX、WAX 键合的化学组成

如图 1 所示, Proteomix 离子交换柱有强阳离子交换 (SCX)、弱阳离子交换(WCX)、强阴离子交换(SAX)、弱阴离子交换(WAX)四种。Proteomix SCX、WCX、SAX、WAX 相分别是将磺酸基、羧基、季胺基和叔胺基化学键合在有孔或无孔 PS/DVB 树脂亲水涂层表面而制备得到。

### 稳定性和性能

由于 PS/DVB 的表面修饰是完全基于化学键键合, 所以 Proteomix 离子交换柱具有优异的稳定性。该固定相能够与大多数缓冲液如醋酸铵、磷酸盐、Tris 等相容。在 pH 6.0 时以 20 mM 磷酸盐缓冲溶液为流动相运行 Proteomix SCX 和 WCX 色谱柱, 或在 pH 8.0 时以 20 mM Tris 缓冲盐为流动相运行 Proteomix SAX 和 WAX 色谱柱 1000 次或使用 3 个月, 柱效几乎没有变化。

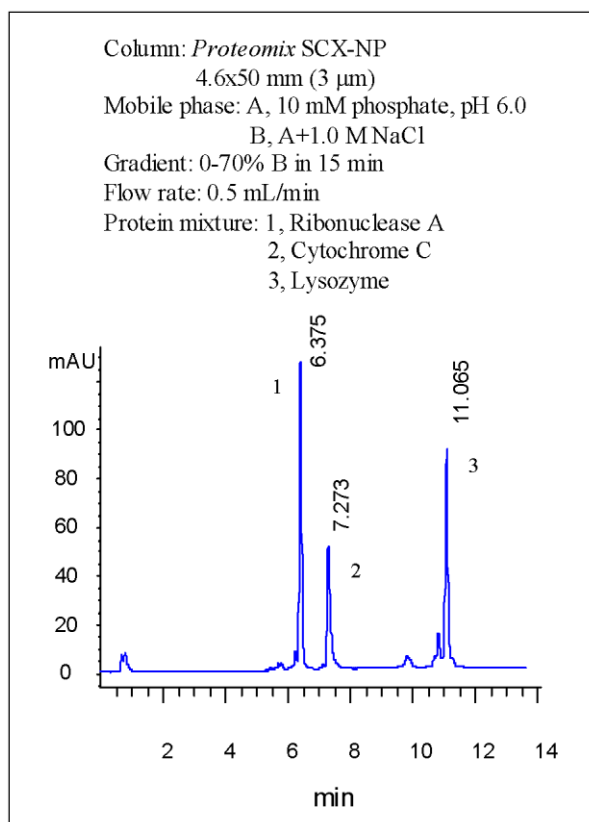


图 2.用 Proteomix SCX-NP3 分离蛋白质混合物得到的图谱

Proteomix SCX-NP、WCX-NP、SAX-NP、WAX-NP 树脂以无孔 PS/DVB 颗粒为基质, 表面覆盖有亲水层并键合了一层均匀的离子交换功能基团。这些固定相具有三个特点。首先, 纳米级厚度的亲水层完全消除了载体与生物样品之间的非特异性相互作用。其次, 无孔颗粒结构使样品的横向扩散达到最小, 同时抑制了其向填料颗粒内部的扩散。第三, 赛分的特有技术可以合成均匀致密的离子交换层。独特设计的 Proteomix SCX-NP、WCX-NP、SAX-NP 和 WAX-NP 固定相可为蛋白质、寡核苷酸、糖类和多肽等提供最好的分辨率和分离效率。图 2 是 Proteomix SCX-NP 柱(4.6x50 mm, 3  $\mu\text{m}$ )对三种蛋白(核糖核酸酶 A、细胞色素 C、溶菌酶)的分离结果。溶菌酶在 5cm 长的柱子上分离效率达到了 100,000 理论塔板, 这样的分离效果前所未有的。

图 3 是用 Proteomix SAX-NP5 柱分离卵清蛋白和 BSA 混合物得到的一张色谱图。Proteomix SAX-NP5 极高的分辨率和选择性不仅使 BSA 二聚体与 BSA 分开, 而且卵清蛋白混合物中的杂质也得到了分离。

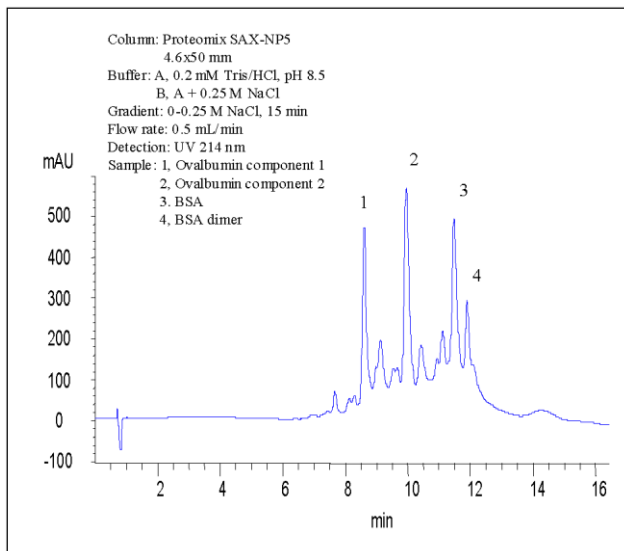


图 3. Proteomix SAX-NP5 柱分离卵清蛋白和 BSA 混合物的洗脱图谱

Proteomix SCX-POR、WCX-POR、SAX-POR 和 WAX-POR 填料以多孔 PS/DVB 颗粒为基质，表面覆盖有亲水层并键合了一层均匀的离子交换功能基团。孔径为 500 Å。该固定相具有三个特点。首先，纳米级厚的亲水层完全消除了载体与生物样品之间的非特异性相互作用。其次，赛分的特有技术可以合成均匀致密的离子交换层。第三，多孔颗粒具有较大的比表面积，从而具有很高的分离容量。Proteomix SCX-POR、WCX-POR、SAX-POR 和 WAX-POR 对蛋白质、寡核苷酸、多肽等的分离具有极高的分离度和分离容量。该多孔填料特别适用于生物分子的半制备和制备分离与纯化。

Proteomix SCX、WCX、SAX 和 WAX 色谱柱的内径有 0.75、2.1、3.0、4.6、7.8、10 和 21.2 mm，长度有 2、3、5、10、15、25 和 30 cm。赛分公司也可以根据客户的要求定制色谱柱。

## 安全注意事项

Proteomix 离子交换柱通常在高压下运行。如果管路连接不紧，将会导致有机溶剂和注入样品的泄漏，从而对操作人员的健康产生影响。一旦发生泄漏，应佩戴适当的手套进行处理。另外当打开色谱柱时还应采取适当的保护措施，以防止微小的高分子颗粒进入呼吸道。

## 色谱柱安装与操作

色谱柱在运输过程中或在没有使用时，它的两端总是用堵头进行密封。当将色谱柱接入色谱仪器系统时，首先移去两端的堵头。请注意将流动相流动的方向与柱上标记的方向保持一致。除非出于特殊考虑，例如为了清除堵在色谱柱入口端的脏污等而需要将色谱柱反接以进行冲洗时，建议用户在接上色谱柱时一定要遵循柱上标记的方向。由于色谱柱的连接是整个色谱操作过程的一部分，如果密封卡套过紧，

## 技术参数

Proteomix 固定相	SCX-NP1.7、3、5、10 和 SCX-POR10 WCX-NP1.7、3、5、10 和 WCX-POR10 SAX-NP1.7、3、5、10 和 SAX-POR10 WAX-NP1.7、3、5、10 和 WAX-POR10
填料	以高度交联的 PS/DVB 树脂为内核，表面键合一层致密、纳米厚度的亲水层。亲水层的表面再键合了一层均匀的离子交换功能基团。
粒径	无孔：1.7、3、5、10 μm 多孔：10 μm
孔结构	无孔 有孔，500 Å
动态吸附容量	Proteomix SCX-NP3、5、10 分别为 ~53、38、20 mg/mL Proteomix SCX-POR10 为 ~35 mg/mL Proteomix WCX-NP3、5、10 分别为 ~19、15、10 mg/mL Proteomix WCX-POR10 为 ~22 mg/mL Proteomix SAX-NP3、5、10 分别为 ~35、28、17 mg/mL Proteomix SAX-POR10 为 ~25 mg/mL Proteomix WAX-NP3、5、10 分别为 ~26、18、12 mg/mL Proteomix WAX-POR10 为 ~20 mg/mL
pH 稳定性	2-12
操作温度极限	80 °C
操作压力极限	无孔 5 和 10 μm 粒径为 5000 psi 无孔 1.7 μm 粒径为 10,000 psi 3 μm 粒径为 8,000 psi 多孔树脂为 3,000 psi
流动相兼容性	与水溶液，水与乙腈、丙酮或甲醇的混合物等相容。典型的缓冲液包括磷酸盐、Tris 和醋酸盐等。
流速	内径为 4.6 mm 的色谱柱典型操作流速为 0.10-1.0 mL/min。

或安装不合适，或者密封卡套与色谱柱端口不匹配，都可能导致溶液的泄漏。请按照下面步骤将色谱柱与密封卡套相连接，从而将色谱柱接入 HPLC 系统：

(a) 第一次使用的管线，请依次将管线接头和密封卡套装在外径 1/16”的管线上。密封卡套的宽口端应朝向管线接头。

(b) 将管线紧紧插入色谱柱的接口，向前滑动密封卡套和管线接头，并使管线接头的螺纹与色谱柱端口的螺纹相互衔接，然后拧紧管线接头。如果管线为高分子材料，请转到步骤 (d)；如果是金属管线，请继续 (c)。

(c) 在用力将管线压入柱端接口之后，用 1/4”扳手将已拧紧的螺帽再进一步紧固。

(d) 对色谱柱的另一端采用上述方法进行操作。

## 样品与流动相

为了避免色谱柱的堵塞，所有样品和溶剂，包括缓冲溶液在内，都必须在使用前用 0.45 $\mu$ m 或 0.2 $\mu$ m 的滤膜过滤。建议使用预柱滤片（0.5 $\mu$ m 孔径）或保护柱来保护色谱柱。Proteomix 离子交换柱可以使用水溶液，或者有机溶剂（如甲醇、乙腈）与水的混合物等来作为流动相。典型的流动相中含有磷酸、醋酸或 Tris 的钠盐或钾盐。流动相在使用前需要脱气。一个简单的脱气方法是将流动相在由水泵形成的真空下超声 5min。

Proteomix SAX 和 WAX 柱和非离子及两性离子洗涤剂相容，但是与阴离子洗涤剂不相容。Proteomix SCX 和 WCX 柱和非离子及两性离子洗涤剂相容，但是与阳离子洗涤剂不相容。

## 色谱柱的保养

**运输溶剂** 新的 Proteomix SAX 和 WAX 柱中的液相是 20 mM Tris 缓冲液（pH 8.0）。新的 Proteomix SCX 和 WCX 柱中的液相是 20mM 磷酸盐缓冲液（pH 6.0）。

**第一次使用** 在储存和运输过程中，填料可能会干涸。这时推荐用 10-20 倍柱体积的运输溶剂进行冲洗以活化色谱柱。接着可用用户自己选择的流动相冲洗色谱柱。流速由 0.1mL/min 逐渐升至所需的操作条件，直至基线稳定为止。如果柱压和基线波动较大，这可能是气泡进入了色谱柱中。这时可用较高流速冲洗色谱柱 2-5 分钟，例如 4.6 $\times$ 250mm 的色谱柱可采用流速 1.0mL/min。如果流动相的类型或 pH 与色谱柱中的储存溶剂差异较大，建议将色谱柱先用新的流动相冲洗 10 倍柱体积。

**pH** 为了获得最佳的分离效果和延长柱的使用寿命，请尽量使用 pH 在 2-12 范围内的流动相。

**压力** 尽管粒径为 1.7 $\mu$ m、3 $\mu$ m、5 $\mu$ m、10 $\mu$ m 的无孔 Proteomix 离子交换柱可分别在高至 10,000psi、8,000psi、5,000psi、5,000psi 的压力下使用，但正常的操作压力应当低于 3,500psi（1.7 $\mu$ m 应低于 5,000 psi）。长时间在高压下运行可能损坏色谱柱和输液泵。由于压力来源于流速，因此最大流速将受制于系统所能承受的压力。一般而言，柱压会随着色谱柱使用时间的增加而逐渐增加。压力突然增加预示色谱柱入口端的筛板发生了堵塞。在这种情况下，建议将色谱柱反接后用适宜的溶剂进行冲洗。

**温度** 最高操作温度为 80 $^{\circ}$ C。为了延长柱的使用寿命，请尽量在 10-50 $^{\circ}$ C 范围内操作。长时间在高温（>80 $^{\circ}$ C）下操作也会损坏色谱柱，这种情形在高的 pH（>12 或 <2.0）条件下特别突出。

**流速范围** 内径为 4.6mm 的色谱柱，其正常操作流速为 0.1-1.0mL/min。

**储藏** 长期不用时，请将 Proteomix SAX 和 WAX 柱保存在含 0.1%NaN<sub>3</sub> 的 20 mM Tris 缓冲液（pH 8.0）中。Proteomix SCX 和 WCX 柱保存在含 0.1%NaN<sub>3</sub> 的 20mM 磷酸盐缓冲液（pH 6.0）中。色谱柱需要用储存缓冲溶液冲洗至少 15 倍柱体积。然后再用随色谱柱附上的两个可拆卸的堵头塞紧色谱柱的两端以防止柱床的干涸。

**色谱柱的清洗** （1）如果预柱滤片或保护柱在分离之前曾经使用过，需要首先将预柱滤片或保护柱反接用清洗溶液冲洗 15-30min。如果经过冲洗效果没有得到明显改善，则需要更换预柱滤片或保护柱。对于 Proteomix 阴离子交换色谱柱，清洗溶液为含 150mM 硝酸钾的 75%乙腈溶液（用 HCl 调节 pH 至 2）。对于 Proteomix 阳离子交换色谱柱，清洗溶液为含 1.0M NaCl 的 50mM 磷酸盐缓冲液（pH10）。

（2）在使用过程中，样品经常会被吸附在柱入口端的筛板或者填料上。当样品吸附累积到一定程度时，柱压将会升高，色谱峰形也会出现展宽。这时就需要清洗色谱柱了。下面是色谱柱清洗的基本步骤。

1. 将色谱柱与检测器断开；
2. 将色谱柱反接后进行冲洗；
3. 将流速设置到所推荐的最大流速的 50%进行冲洗。注意柱压的变化。如果柱压超出正常水平许多，则需要降低流速，或选用低粘度的清洗溶液；
4. 通常 10-15 倍柱体积的清洗溶液就足够了。下面将介绍可供选择的清洗溶液。低 pH 的盐溶液有助于去除碱性蛋白。高 pH 的盐溶液有助于去除酸性蛋白。有机溶剂可去除疏水蛋白。这里推荐两种常用的清洗溶液：对于 Proteomix 阴离子交换色谱柱，清洗溶液为含 150mM 硝酸钾的 75%乙腈溶液（用 HCl 调节 pH 至 2）；对于 Proteomix 阳离子交换色谱柱，清洗溶液为含 1.0M NaCl 的 50mM 磷酸盐缓冲液（pH10）。

## 色谱柱的保护

除了需要过滤样品和流动相外，保护色谱柱的最佳方法是在色谱柱前连接保护柱或预柱滤片。预柱滤片可以去除样品或流动相中的残留颗粒，或者从 HPLC 系统，如泵或进样器垫圈上脱离下来的颗粒。更为有效的方法是使用保护柱，因为它可以除去样品、流动相或者来自于 HPLC 系统中的具有强吸附能力的样品组分和残留颗粒。

## 赛分 Proteomix 离子柱产品规格

### Proteomix SCX-NP 柱

内径×长度 (mm×mm)	粒径	孔径	型号
4.6×50	1.7 μm	NP	401NP2-4605
2.1×50	1.7 μm	NP	401NP2-2105
4.6×100	3 μm	NP	401NP3-4610
4.6×50	3 μm	NP	401NP3-4605
2.1×50	3 μm	NP	401NP3-2105
10×150	5 μm	NP	401NP5-10015
4.6×150	5 μm	NP	401NP5-4615
4.6×50	5 μm	NP	401NP5-4605
2.1×100	5 μm	NP	401NP5-2110
2.1×50	5 μm	NP	401NP5-2105
10×250	10 μm	NP	401NP10-10025
10×150	10 μm	NP	401NP10-10015
21.2×150	10 μm	NP	401NP10-21215

### Proteomix SAX-NP 柱

内径×长度 (mm×mm)	粒径	孔径	型号
4.6×50	1.7 μm	NP	403NP2-4605
2.1×50	1.7 μm	NP	403NP2-2105
4.6×100	3 μm	NP	403NP3-4610
4.6×50	3 μm	NP	403NP3-4605
2.1×50	3 μm	NP	403NP3-2105
10×150	5 μm	NP	403NP5-10015
4.6×150	5 μm	NP	403NP5-4615
4.6×50	5 μm	NP	403NP5-4605
2.1×100	5 μm	NP	403NP5-2110
2.1×50	5 μm	NP	403NP5-2105
10×250	10 μm	NP	403NP10-10025
10×150	10 μm	NP	403NP10-10015
21.2×150	10 μm	NP	403NP10-21215

### Proteomix WCX-NP 柱

内径×长度 (mm×mm)	粒径	孔径	型号
4.6×50	1.7 μm	NP	402NP2-4605
2.1×50	1.7 μm	NP	402NP2-2105
4.6×100	3 μm	NP	402NP3-4610
4.6×50	3 μm	NP	402NP3-4605
2.1×50	3 μm	NP	402NP3-2105
10×150	5 μm	NP	402NP5-10015
10×50	5 μm	NP	402NP5-10005
4.6×150	5 μm	NP	402NP5-4615
4.6×50	5 μm	NP	402NP5-4605
2.1×50	5 μm	NP	402NP5-2105
10×250	10 μm	NP	402NP10-10025
10×150	10 μm	NP	402NP10-10015
21.2×150	10 μm	NP	402NP10-21215

### Proteomix WAX-NP 柱

内径×长度 (mm×mm)	粒径	孔径	型号
4.6×50	1.7 μm	NP	404NP2-4605
2.1×50	1.7 μm	NP	404NP2-2105
4.6×100	3 μm	NP	404NP3-4610
4.6×50	3 μm	NP	404NP3-4605
2.1×50	3 μm	NP	404NP3-2105
10×150	5 μm	NP	404NP5-10015
4.6×150	5 μm	NP	404NP5-4615
4.6×50	5 μm	NP	404NP5-4605
2.1×100	5 μm	NP	404NP5-2110
2.1×50	5 μm	NP	404NP5-2105
10×250	10 μm	NP	404NP10-10025
10×150	10 μm	NP	404NP10-10015
21.2×150	10 μm	NP	404NP10-21215