

Proteomix POR20-ConA

半制备柱使用手册

色谱柱信息

Proteomix POR20-ConA亲和色谱柱专门适用于糖类化合物的快速定量分析及纯化。其色谱填料为高交联度的多孔聚苯乙烯/二乙烯基苯 (PS/DVB) 微球，表面键合一层均一的亲水涂层，涂层表面键合刀豆蛋白A (Concanavalin A, Con A)。平均粒径为20 μm, D90/D10 < 1.3 的窄粒径分布，孔径为2000 Å。该色谱柱表面键合的Con A蛋白可与α-甘露糖，α-葡萄糖结合，使用过程中需要存在二价金属离子，如Ca²⁺，Mg²⁺以保持保Con A与糖类化合物的亲和活性。主要适用于亲和纯化糖缀合物，如糖蛋白、糖肽以及聚糖等。该色谱填料具有良好的机械强度，可以承受高流速和高压操作，可以以较高的流速应用到 HPLC 和 FPLC 系统中。

技术参数

Proteomix POR20-ConA 色谱柱参数	
基质	聚苯乙烯/二乙烯基苯 (PS/DVB)
配基	Concanavalin A, Con A
粒径	20 μm
孔径	2000 Å
配基密度	~18 mg/mL Con A
保存条件	2-8°C 条件下保存在 50 mM NaOAc, 0.2 M NaCl, pH 5.3, 1 mM CaCl ₂ , 1 mM MgCl ₂ , 含 0.1%NaN ₃
推荐流速	0.5~3 mL/min
最大流速	5 mL/min
pH 范围	5-8
压力	≤1200 psi
操作温度	≤30°C

图 1 是 Proteomix POR20-ConA (10.0×250 mm) 纯化辣根过氧化物酶 (Horseradish peroxidase, HRP) 色谱图。

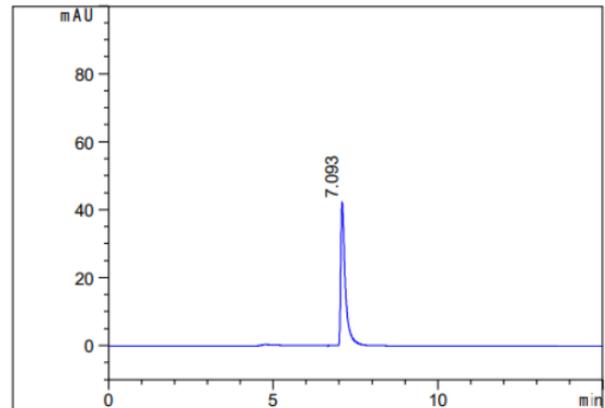


图 1. Proteomix POR20-ConA 色谱柱 HRP 蛋白测试图谱。

色谱柱: 10.0×250 mm

流动相: A: 50 mM NaOAc, 0.2 M NaCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂ (pH 5.3); B: A+100 mM

α-methyl-mannopyranoside

Gradient: 100%A for 2 min, 0% to 100%B in 0.5 min, hold 5.5 min

流速: 3.0 mL/min

温度: Ambient (~25° C)

检测器: UV 403 nm

进样体积: 15 μL

样品: HRP(3.4 mg/mL)

安全注意事项

Proteomix POR20-ConA 色谱柱通常在中压下运行。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，以防止微小的聚合物颗粒进入呼吸道。

色谱柱安装

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，或安装不合适，或者密封卡套与色谱柱端口不匹配，都有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的操作。

当色谱柱连接成功后，开始用流动相低流速运行，并监控系统压力确保无泄漏问题。

首次使用色谱柱前，建议至少用 Eluent A 冲洗 20 CV 以除去 NaN₃ 并使柱平衡，为了避免色谱柱堵塞，建议使用柱前过滤器 (0.5 μm)。

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 μm 或 0.2 μm 的滤膜过滤。Proteomix POR20-ConA 可与生物分析中使用的大多数常用缓冲液和洗脱液一起使用，前提是它们与 Con A 和样品兼容。乙酸盐和 Tris 缓冲液是 Con A 亲和柱的两种常用缓冲液；应避免使用磷酸盐缓冲液，因为需要 Ca²⁺ 来维持 Con A 活性，而磷酸钙基本上不溶于水。洗脱液中的高浓度盐如 0.2 M NaCl 有助于阻止蛋白质样品与柱的非特异性结合。流动相在使用前需要脱气。常用脱气方法是将流动相超声处理 5 min。

色谱柱操作

洗脱条件 以下为推荐洗脱流动相可供参考：

Eluent A: 50 mM NaOAc, 0.2 M NaCl, pH 5.3, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂;

Eluent B: 100 mM α-methyl-mannopyranoside in eluent A

色谱柱初步使用 色谱柱出厂保存在 50 mM NaOAc, 0.2 M NaCl, pH 5.3, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 含 0.1% NaN₃ 中，安装之后先进行活化，2 分钟内逐步升高流速至 1 mL/min，运行约 20 CV 柱体积 eluent A 溶液，替换色谱柱溶剂并平衡色谱柱。

样品制备 由于色谱柱功能配基为 Con A 蛋白，含有蛋白酶的样品可能会导致柱子变坏和载量下降。因而需注意去除蛋白酶，或在样品中加入蛋白酶抑制剂，以避免任何不必要的性能损失。

流速范围 色谱柱使用最高限制流速为 5 mL/min，推荐流速为 0.5~3.0 mL/min。过高的流速会导致较高的系统压力，并可能降低色谱柱结合能力。

pH 为了获得最佳的分离效果和延长柱的使用寿命，建议在 pH 5-8 范围内使用该柱。

压力 正常使用 Proteomix POR20-ConA 色谱柱压力应不超过 1200 psi。长时间在高压下运行会损坏色谱柱和输液泵。突然改变系统/泵压力也可能导致不可逆转的损坏。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 30°C，长时间在高温 (>30°C) 下操作会损坏色谱柱。

关机程序 在工作日结束时，柱子平衡到适当的缓冲存储溶液中后，应逐渐降低流速。当流速和压力降至零，就可以将色谱柱从系统中取出。每根色谱柱都附带两个可拆卸的端塞。为防止柱床干燥，使用提供的端塞将两端密封。

储存 为保持色谱柱的使用寿命，Proteomix POR20-ConA 色谱柱在不使用时应储存在 2-8°C。对于短期储存 (<2 天)，可将柱子放在室温下的洗脱溶剂 A 中。对于长期储存，柱子应放在储存在含有 0.1% NaN₃ 的 eluent A 中，并置于 2-8°C。

色谱柱洗脱与平衡 通常用甘露糖溶液的梯度洗脱结合在 Con A 柱上的糖缀合物样品以达到纯化的目的。由于 α-甲基-吡喃甘露糖对 Con A 蛋白的亲合力比甘露糖高，因此推荐使用 α-甲基-吡喃甘露糖作为更有强的洗脱溶剂。样品洗脱后，用 eluent A 清洗色谱柱，以去除 α-甲基-吡喃甘露糖，色谱柱可以恢复亲和力。一般，在下一次进样之前，至少要用 10 CV 的 eluent A 来平衡色谱柱。

清洗 色谱柱在使用过程中可能存在与 Con A 蛋白亲和结合牢固或非特异性相互作用的蛋白样品，长期积累会导致载量降低，可以采用以下清洗流程以及溶液进行清洗，可有效改善。

通用的色谱柱清洗流程如下：

1. 断开色谱柱与检测器。
2. 逐渐增加流速进行冲洗，对于高于或低于 1 mL/min 的

流速，应基于 1mL 的柱体积使用等量的柱体积。

3. 以下为推荐的三种清洗溶液：

- 糖溶液清洗，在推荐洗脱溶液 A (eluent A) 中加入 0.25 M α -甲基-吡喃甘露糖，流速设置为 1 mL/min，冲洗约 30 min；在使用之前再以 1 mL/min 的流速用 eluent A 平衡至少 30 min。

或

- 采用高盐清洗，洗脱溶剂中加入 2 M NaCl, 50 mM NaOAc, pH 5.3, 1 mM CaCl₂，流速设置为 1 mL/min，冲洗约 40-60 min；在使用之前再以 1 mL/min 的流速用 eluent A 平衡至少 30 min。

或

- 有机溶剂清洗，在 eluent A 中加入 10% 甲醇，流速设置为 1 mL/min，冲洗约 40-60 min；在使用之前再以 1 mL/min 的流速用 eluent A 平衡至少 30 min。

Proteomix POR20-ConA 产品规格

产品	内径×长度 mm×mm	粒径 μm	货号
Proteomix POR20-ConA	10.0×250	20	271320980-10025

*其他规格色谱柱产品及任何问题可致电：400-636-8880
或联系 marketing@sepax-tech.com.cn。