

## Monomix MC-HIC Phenyl 疏水填料产品说明书

### 一、产品简介

Monomix MC-HIC Phenyl 填料以亲水性聚甲基丙烯酸酯为基质，粒径为 30 和 60  $\mu\text{m}$ ，粒径均一，具有良好的物理和化学稳定性。Monomix MC-HIC Phenyl 填料表面经赛分科技特殊涂层处理，具有更好的亲水性，最大程度地避免了与生物类样品的非特异性吸附。并通过专有的表面修饰技术，在亲水性表面均匀偶联疏水性的苯基基团(phenyl)，根据偶联配基密度的不同，填料分为 Monomix MC-HIC Phenyl 和 Monomix MC-HIC Phenyl Hsub 两款，其中 Hsub 具有更高的配基密度，疏水性相对更强。

疏水层析条件温和，不易引起生物分子的变性与失活，生物大分子的疏水性基团可与该疏水填料在高盐条件结合，低盐条件下与其解吸附，根据不同生物分子的疏水性差异可将其分离。Monomix MC-HIC Phenyl 填料可广泛的适用于重组蛋白、质粒、抗体等生物样品的分离和纯化。

#### 层析介质特点

- 📖 高结合载量和极好的生物相容性
- 📖 刚性基质可耐受高压和高流速
- 📖 高分辨率、高柱效和高回收率
- 📖 高批间重现性、易于放大
- 📖 常规装柱条件下，体积变化小
- 📖 产品供应能力：> 100 L

### 二、安全

有关本产品安全使用的信息，请参阅安全数据书(SDS)。

### 三、产品性质及特征参数

#### 3.1 层析介质化学结构与技术参数

Monomix MC-HIC Phenyl 疏水填料以疏水性的 Phenyl(苯基)为官能团，其中 Monomix MC-HIC Phenyl Hsub 具有更高的配基密度以提供更强的疏水性。结构示意图如图 1 所示，具体产品技术参数见表 1。

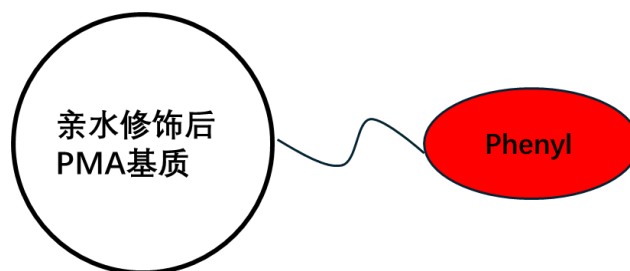


图 1.层析介质配基结构示意图

表 1. Monomix MC-HIC 层析介质技术参数

产品名称	Monomix MC-HIC Phenyl		Monomix MC-HIC Phenyl Hsub
官能团	Phenyl (苯基)		
粒径 (μm)	~30	~60	~60
动态载量* (mL 填料)	~45 mg Lysozyme	~20 mg Lysozyme	~20 mg Lysozyme
流速/压力关系*	—	800 cm/hr	—
pH 稳定性 (操作)	2-13		
pH 稳定性 (CIP)	1-14		
工作温度	4-35°C		
耐受压力	≤ 1.0 MPa (10 bar)		
化学稳定性*	兼容于水和乙腈、丙酮、甲醇和苯甲醇的混合液；常用缓冲液体系：Tris、磷酸盐、醋酸盐缓冲液等；其它试剂：5% 聚乙二醇、DMSO、DMAC、6M 盐酸胍、1% SDS 等。		
保存条件	具体见“八、产品储存”内容		
运输条件	4-35°C，保存于 20% 乙醇		
典型应用方向	重组蛋白、质粒、抗体		

\*注：1.DBC 测试方法：线性流速为 360 cm/h，上样液为含 1.0 mg/mL 溶菌酶的 25 mM 磷酸盐缓冲液(pH = 7.0)+2 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>；

2.最大流速测试方法：柱高为 200 mm，柱压为 2 bar 条件下；

3.化学稳定性测试条件：填料分别在表中其它试剂中 40°C 浸泡一周后测试，结果：载量是原载量的 90% 以上。

### 3.2 Monomix MC-HIC Phenyl 纯化应用

#### 3.2.1 Monomix MC-HIC Phenyl 某重组蛋白纯化应用方案

层析柱信息：Monomix MC60-HIC Phenyl

检测器：UV 280 nm

样品：某重组蛋白样品

上样量：20 mg/mL 填料

纯化步骤	流动相	驻留时间 min	冲洗体积 CV
平衡	25 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, pH 8.0		3
上样	上样液		N/A
后平衡	25 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, pH 8.0	6	3
再生	25 mM Tris-HCl, pH 8.0		3
CIP	0.5 M NaOH		3
保存	20% EtOH		3

#### 3.2.2 Monomix MC-HIC Phenyl 纯化某重组蛋白实验结果及纯化图谱

采用 Monomix MC-HIC Phenyl 通过流穿模式纯化该重组蛋白样品，流动相体系及纯化流程相对简单，纯化图谱如图 2 所示，经过一步疏水纯化后，目标分子纯度从 95.82% 提升至 98.69%，杂蛋白等杂质可通过 CIP 流程有效去除。

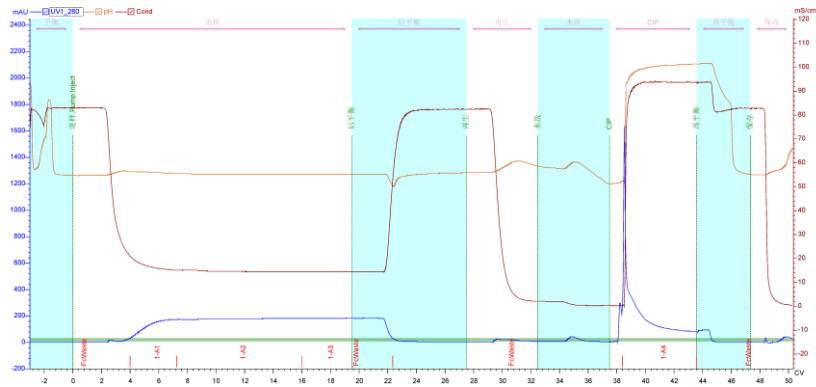


图 2. Monomix MC60-HIC Phenyl 纯化重组蛋白图谱

## 四、层析柱装柱

层析介质在不同场景下适用不同装柱方法，实验室装柱方法与规模化生产用装柱有较大差异，下文介绍不同层析柱规格的填料装柱方法。

### 4.1 实验室用装柱方法（内径 ID 6.6 mm -25 mm 实验室用层析柱）

#### 4.1.1 准备工作

4.1.1.1 装柱设备及层析柱：检查蛋白纯化仪是否正常，特别是压力检测模块和电导检测模块；

4.1.1.2 装柱液配制：配制足量的装柱缓冲液 0.1 M NaCl 水溶液、1.0 M NaCl 水溶液。

#### 4.1.2 置换保存溶剂

Monomix MC-HIC Phenyl 填料出厂时保存在 20% 乙醇中，体积比为 50%，装柱前需将 20% 乙醇置换为 0.1 M NaCl。快速置换方法：将填料混合后取所需匀浆液倒入柱管中，安装好柱头并用 0.1 M NaCl 冲 5.0 CV，将填料打出至广口瓶中，添加 0.1 M NaCl 至填料体积比为 50-70% 之间，也可采用沉降的方法置换保存溶剂。

#### 4.1.3 填料匀浆比测算

将置换好的填料混匀，取 20 mL 加入到玻璃柱管中，如 Generik FPLC 10×400 mm 玻璃柱管，打开下堵头，让水漏出，直至填料沉降高度不再变化，用直尺测量柱床高度，计算填料体积，例如柱床高度为 14 cm，填料体积则为  $14 \times 0.7854 = 10.9956$  mL，匀浆比则为 54.98%。也可用在量筒中沉降过夜的方式测算匀浆比，沉降时间要保持在 14-16 h。

#### 4.1.4 填料需求量计算

$$V_{\text{slurry}} = V / P = S \times H \times F / P$$

V：目标柱体积

P：匀浆比

H：目标装柱高度

S：柱管横截面积

F：压缩系数

H：装柱高度

例如：内径为 10 mm 的手动柱横截面积为  $0.7854 \text{ cm}^2$ ，装柱目标高度为 20 cm，则填料的需求量为  $V_{\text{slurry}} = 0.7854 \text{ cm}^2 \times 20 \text{ cm} \times 1.15 / 54.98\% = 32.9 \text{ mL}$

\*注：实验室规模、用盐水装柱条件下，填料的用量按照 1.15 压缩系数计算。

#### 4.1.5 具体操作步骤

4.1.5.1 用移液器吸取 32.9 mL 匀浆液，加入到 Generik FPLC 10 × 250 mm-AF 层析柱管中（使用装柱连接环）；

4.1.5.2 开启 100 cm/h 流速，将上柱头拧紧至柱管上，以 100 cm/h、200 cm/h、300 cm/h...线流速压缩填料，每级流速保持 3.0 min，直到柱压达到 3.0 bar 后保持 15 min，关闭层析系统，然后以 1: 1.04 的压缩系数（标记的柱床高度为基准）下降柱头至目标高度，装柱完成。

## 4.2 中试装柱方法（内径 ID 100 mm -300 mm 手动柱填装）

### 4.2.1 准备工作

4.2.1.1 场所：装柱场所应清洁、无尘，室温 18-35°C，湿度 45-65%；

4.2.1.2 装柱设备及管道：蛋白纯化设备及层析柱管路冲洗干净，管道连接完毕，检查设备管路是否漏液，必要时试漏，压力等各参数显示正常；

4.2.1.3 层析柱排气泡：层析柱清洗干净，排除上下筛板处气泡待用；

4.2.1.4 QC 检测设备：低压层析系统；

### 4.2.2 置换保存溶剂

Monomix MC-HIC Phenyl 填料出厂时保存在 20% 乙醇中，体积比为 50%，装柱前需将 20% 乙醇置换为纯化水。对于直径为 100 mm-300 mm 内径手动柱置换方式可以为：将填料混合后取所需匀浆液倒入柱管中，打开出口阀，使液体漏出，用纯化水置换三次。

### 4.2.3 填料需求量计算

$$V_{\text{slurry}} = V / 50\% = S \times H \times F / 50\%$$

V: 目标柱体积

H: 目标装柱高度

S: 柱管横截面积

F: 压缩系数

H: 装柱高度

例如：内径为 200 mm 的手动柱横截面积为 314 cm<sup>2</sup>，装柱目标高度为 18 cm，则填料的需求量为  $V_{\text{slurry}} = 314 \text{ cm}^2 \times 18 \text{ cm} \times 1.15 / 50\% \approx 13 \text{ L}$

\*注：填料保存在 20% 乙醇水中，填料的用量按照 1.15 压缩系数计算。

### 4.2.4 具体操作步骤

4.2.4.1 如置换保存溶剂过程中所述，重新匀浆后关好底阀使填料自然沉降，待液面下降距离大于 5.0 cm 后安装排好气泡的柱头，拧紧密封圈，打开底阀，开启低压层析系统，以 0.1 M NaCl 水溶液为流动相、100 cm/h 线速度加速填料沉降，柱床沉降稳定后标记柱床高度；

4.2.4.2 关闭层析系统，等柱压降为零后关闭底阀，旋转柱头上的四通阀至排液管，然后以 1: 1.04 的压缩系数（标记的柱床高度为基准）下降柱头至目标高度，装柱完成。

## 4.3 柱效测试及评价参考标准

Monomix MC-HIC Phenyl 填料装柱后，层析柱需进行柱效测试，下表为参考柱效测试方法及评价指标，实际使用时评价指标可结合需要制定标准。

表 2. 柱效测试方法及评价参考标准

样品	1.0 M NaCl
样品体积	1.0-2.0% CV
流动相	0.1-0.5 M NaCl
流速	60-180 cm/h
检测器	Cond.
合格标准	拖尾因子：0.8-1.8；柱效：≥ 2000 /m

#### 4.4 非理想柱效的解决办法

4.4.1 出现拖尾峰时，解决方法包括：

降低浆液浓度：降低填料在总体积占比

提高装填流速：增加装柱最高压力

4.4.2 出现前沿峰时，解决方法与拖尾峰相反。

4.4.3 柱效低：重装层析柱，降低测试流速。

4.4.4 峰分裂：清洗更换滤片，检查测试样品。

4.4.5 层析柱裂开：装柱时提高装柱压力，检查流动相是否脱气，连接柱头时充分排除气泡。

## 五、纯化方法优化简介

如果您在使用 Monomix MC-HIC Phenyl 疏水填料过程中遇到问题，请参考下述内容或联系我们。

### 5.1 上样问题

上样量不符合预期或早流穿，以下因素影响填料的结合效率：

1) 官能团结构及密度：一般情况脂肪烃类配体结合能力弱于芳香烃类，碳链结构越长结合力越强，官能团密度越高结合力越强。

**注：**高官能团密度不完全等于高载量，更多情况下可促进与蛋白的多点结合，以捕获低配基密度难以捕获的部分样本。

2) 缓冲液的离子种类：遵循 Hofmeister 规则，例如：相同浓度下，填料在 1 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液中的疏水结合力大于 1 M NaCl 溶液。

3) 缓冲液的离子强度：一定区间内，填料结合样品的能力与缓冲液的离子浓度成正相关，离子浓度越高，填料疏水结合能力越高。

### 5.2 洗脱问题

1) 筛选洗脱条件，可以先梯度洗脱确定目标分子的大致洗脱电导，后使用相应等度洗脱来得到目标分子。

2) 洗脱样品纯度低：在洗脱前加入较高电导的淋洗洗杂步骤。若样品与杂质的疏水性质过于接近无法通过梯度分离，可采用切峰收集的方式得到更为纯净的目标产物。

3) 样品难以洗脱：可能是洗脱 buffer 的电导过高，可以降低 buffer 的电导来提高洗脱能力，若纯化水也无法洗脱，建议使用疏水性更弱的填料。也可降低上样 buffer 的电导，减弱填料与样品分子的作用力。

4) 出现不明杂峰：可能是洗脱液成分不纯导致的信号波动或杂峰，建议走空白验证；此外，有可能是填料未再生彻底导致的杂质洗脱，建议在使用一段时间后及时进行彻底的 CIP，详见在位清洗 (CIP) 部分。

### 5.3 其他

1) 使用过程中柱床塌陷：首先确认是否是装柱问题，装柱的压力过低会导致所装柱床松散，从而在

使用过程中填料床层不稳定出现裂痕或空洞，详细请参考填料装柱方法部分：

2) 样品过于黏稠可能会使筛板或床层上部的局部压力增高，从而改变床层结构，建议含有细微颗粒物的料液或过于黏稠的料液做一定预处理再通过层析柱。

## 六、在位清洗 (CIP)

CIP 的目的是去除柱子上和系统中的顽固结合的杂质、沉淀物或者变性蛋白。这些杂质的累积会影响色谱柱的性能，污染填料。严重的话，会导致柱子堵塞，增加背压。可通过正向或反向的在线清洗来恢复层析柱的性能。常规 CIP 程序可以防止这些杂质在柱子上残留，从而保持色谱柱的载量和分离性能。

具体在线清洗方法应视杂质的特性而定：

### 普通杂质及常规清洗：

0.5-1.0 M NaOH 溶液冲洗 5 CV；去离子水和平衡缓冲液各冲洗 5 CV。

### 强疏水性结合的蛋白、脂类物质：

70%乙醇或 30%异丙醇溶液冲洗 5 CV；去离子水和平衡缓冲液各冲洗 5 CV。

**注：** 1.以上 CIP 流程仅作为参考；2.若采用 buffer 充满柱子浸泡的清洗方式，建议填料与介质的接触时间为 1~2 h。

## 七、灭菌

由于 20%乙醇或 10 mM NaOH 保存液不具有杀菌、除热原作用，建议 Monomix MC-HIC Phenyl 在使用前及使用过程中，可以采用 0.5 M NaOH 处理 0.5~1.0 h 以减少微生物污染风险。

## 八、产品储存

Monomix MC-HIC Phenyl 用 20%乙醇为保存液进行销售。收到填料后请按以下条件进行保存：

**未拆封填料：** 4-35°C，整个包装桶密闭保存，有效期 60 个月。

### 使用后填料：

1) 层析柱保存 4-35°C，20%乙醇或 10 mM NaOH 冲洗 3-5 CV 后密闭保存，为了防止乙醇挥发以及微生物滋生，建议每二个月更换一次新鲜的保存液。因有机溶剂、碱、纯化水等对层析柱管材质可能存在影响且层析柱长期保存柱床容易干裂，不建议长期将填料放在层析柱中保存；

2) 层析柱拆卸后填料：拆卸前层析柱需经过常规的再生及灭菌处理步骤，无菌注射用水冲洗 3-5 CV，用保存溶液 20%乙醇冲洗 3-5 CV，取出层析填料置于已经清洗干净并消毒后的包装容器中，加入保存液 20%乙醇使保存液体积与填料体积接近，4-35°C密闭保存。

## 九、销毁及回收

由于 Monomix MC-HIC Phenyl 在自然界很难降解，为保护环境建议采用焚烧处理或第三方委外处理。

## 十、产品订购信息

产品名称	类型	粒径	订货号
Monomix MC-HIC Phenyl	疏水填料	30 μm	281930950
Monomix MC-HIC Phenyl	疏水填料	60 μm	281960950
Monomix MC-HIC Phenyl Hsub	疏水填料	60 μm	285760950

预装柱规格：4.2 mL、5.0 mL；层析介质包装规格：1.0 L、5.0 L、10 L、50 L。



扫码关注公众号

公司信息：

苏州赛分科技股份有限公司

联系电话：400-636-8880

官网网站：<http://www.sepax-tech.com.cn/>