

# Whatman 离子交换纤维素在实验室中的用法

## 有关如何使得介质获得最佳结果

### 达到最佳分离结果

Whatman 公司已为蛋白质、酶和核酸片断等生物多聚物的有效分离特别开发了一系列 Whatman 离子交换纤维素。在使用时只有确切的按注意事项操作才能得到最佳分离效果。

### 介质种类

类型	阴离子交换	阳离子交换	物理形态
干品	DE23	CM23	纤维状
	DE32	CM32	微粒状
预溶胀	DE51	CM52	比 52 型结合力较弱的微粒状
	DE52		微粒状
	DE53		比 52 型结合力较弱的微粒状
	QA52	SE52	全离子化微粒
		SE53	比 52 型结合力强的全离子化微粒

### 交换剂的预处理

1. 预溶胀 (51, 52 和 53) 型离子交换剂不用预先反复处理就可使用。但必须用缓冲盐充分平衡。预溶胀的离子交换剂在每次预处理或再生后使用不要用任何方法使它变干。
2. 为了得到尽可能好的结果, 对于干的离子交换纤维素 (23 和 32) 预处理的每一步必须按下面即将介绍的流程进行操作。
3. DE51、QA52、SE52 和 SE53 含防腐剂。此类物质会在平衡和装柱时自动随之除去。如果离子交换剂还进行平衡, 则防腐剂可以用蒸馏水或者去离子水进行洗涤。

### 第一部分 干型离子交换纤维素

#### 预处理

1. 称量好的的离子交换剂添加到 15 倍容积 (W/V) 酸或碱溶液中轻轻搅动, 进行第一次处理。
2. 微粒产品至少浸泡 30min, 纤维状产品至少浸泡 60min。
3. 滤出上清液, 用水洗至下列“中间 pH”。
4. 再用 15 倍容积的酸或碱溶液浸泡进行二次处理, 放置 30min, 滤出上清液。
5. 重复上述“4”二次处理, 然后用水洗至洗液呈中性。

#### 处理条件

型号	一次处理	中间 pH	二次处理
DE	0.5NHCl	4.0	0.5NNaOH
CM	0.5NNaOH	8.0	0.5NHCl

注意: 对预溶胀的微粒状产品 (51, 52 和 53 型) 不需进行这一步, 因此干型产品用在大规模柱层析分离更好。

**一般操作注意事项**

- 离子交换剂可以在室温下储存
- 当不用时可以一直密封保存
- 可以用蒸馏水，更好的是使用去离子水
- 为了避免离子交换剂颗粒变细，不可以激烈窑洞或者搅动交换剂悬液
- 为了延长使用期，离子交换剂不可以采用浓酸、浓碱或强氧化剂处理。为了再生。灭菌和去热源，可以采用 0.5N-2.0N NaOH 处理 48 小时。
- 不添加防腐剂情况下，离子交换剂在缓冲液和多聚电解质溶液中不要超过一周。阳离子交换剂 (CM 和 SE 类) 采用 0.1% (W/V) 叠氮钠、0.1% (W/V) 2,2'-二硫双(氧化吡啶) 或 0.02% (W/V) 乙基汞硫化水杨酸钠。阴离子交换剂 (DE 和 QA 类) 用 0.2% (W/V) 烷基-二甲基-苄基氯化铵。

**第二部分 预溶胀型离子交换纤维素和预处理后的干型离子交换纤维素****交换剂悬浮液的准备**

一般 QA52 型和 SE52 型全离子化交换剂在用低离子浓度缓冲液中平衡时间比 DE52 和 CM52 型更短。

而且所有介质当采用的缓冲液离子与离子交换剂的相一致时，所需的平衡液体积最小，例如采用三(羟甲基)氨基甲烷盐酸缓冲液 (Tris HCl Buffer) 对 DE 或 QA 型离子交换剂平衡所需时间和体积都要比用醋酸盐类缓冲液少。

所有情况下实际采用的起始缓冲液浓度比需要的起始缓冲液浓度高 (典型的高 10 倍)，这样有利于交换剂的预平衡。下面介绍的是更可取的平衡方法。

离子交换剂装柱后在进样品前必须用低离子浓度的缓冲液进行平衡，通常将 2-4 倍柱床容积的低浓度缓冲液通过填充柱就可以完成平衡。

**推荐的方法**

1. 在使用之前用缓冲液 (0.1-1.0M) 轻轻摇动搅拌离子交换剂 2-3min。最初取干型纤维素时每克干品约用 15-30mL 缓冲液，湿离子交换剂约用 6mL/g。
2. 在搅拌时缓冲液的酸或碱成分使缓冲液/离子交换剂悬液的 pH 调到所希望的值。
3. 让悬液沉降并倾出上清液中的细小颗粒。
4. 再次使用缓冲液使离子交换剂松散。干型离子交换剂悬液的总容积按 30mL/g 计，湿离子交换剂约为 6mL/g。
5. 离子交换剂和缓冲液的悬液在合适的量筒中沉降，并置于无灰尘、无直射阳光和不发热的地方，沉降时间可按  $t = nh$  式计算。式中： $t =$  时间 (min)， $h =$  量筒中悬液总高度 (cm)， $n =$  系数可取 1.3~2.4。
6. 注意“湿沉降体积”是离子交换剂在规定条件下沉降后所占的体积。除去上清液中所含细粒后留在量筒中的最终体积是“湿沉降体积”加 20%。
7. 填充短柱或长柱时悬液可以选用上述密度，但是纤维状产品的长柱床的密度需用“湿沉降体积”加 50%。

**变换缓冲液可用的方法**

1. 按上项 (1) 那样轻轻搅拌离子交换剂到一定容积的缓冲液中。

2. 放置 10min，倾出或滤出上清液。
3. 重复处理直到滤液或上清液确实与缓冲液的 pH 和电导率一样为止。变换缓冲液后必须核对 pH。当采用低浓度缓冲液时本方法会有所变化，且需要增加处理的时间。
4. 除去细颗粒和装柱的准备工作请按上述 (4)(5) 和 (6) 项进行。

## 装柱

在装柱时必须避免离子交换剂和缓冲液的对流翻动。

为此必须使悬浮液倒入柱中瞬间使离子交换剂形成沉降柱床，操作进行得尽可能快，否则悬液中的对流需很长时间才会停下来。

1. 离子交换用柱应该垂直置于无灰、无直射阳光和不发热等环境中。
2. 假如选液体积大于柱体积时，应该另外接一段延长管。
3. 轻轻搅动下将悬液倒入柱中。
4. 让洗脱液从柱中排出。
5. 全部悬液加完后装上或插入柱顶盖。
6. 缓冲液用泵或流动法通过柱子，流速控制至少 45ml/hr/cm<sup>2</sup> 柱子内截面积，直到柱床高度恒定。
7. 停止缓冲液流进或流出柱子。
8. 取下延长管（若装着）并换上柱顶盖。

## 平衡

需要强调的是必须正确读取 pH 和电导率。

对真正的平衡而言平衡后的溶液应该与起始缓冲液一致，必须做到不仅连续两次平衡溶液的读数相同，而且要去起始缓冲液相同。不正确的平衡是产生无重现性结果的原因。起始缓冲液流过柱子直到流出液的电导率和 pH 精确地与起始缓冲液相同。此方法适用于开始时用低浓度缓冲液的柱分离。

## 样品准备和加样

样品溶于起始缓冲液中并调整溶液的 pH。细胞提取物和硫酸铵沉淀物要用层析柱起始缓冲液透析。这一步不注意就有可能得到无法重现的结果。被分离物通常在低流速时加样。

## 洗脱

加样品后立刻开始洗脱或在规定时间内开始。

层析分离通常采用三种方法。有分步洗脱、连续梯度洗脱和分段梯度洗脱。

## 分步洗脱

离子交换剂平衡和样品混合物准备时所有缓冲液也可在洗脱时用，洗脱可以有两种方式完成：

1. 目的物分子是游离状态的。所需离子交换剂量要根据混合物污染程度、结合力和成分不同而定。柱床高度在这种方式操作中并不重要。
2. 目的物分子是结合状态的。层析时混合物是由相类似的成分组成的，为了获得最佳分离应选用相对长的柱子。可取的是只用了柱总容量的很小一部分（如 5%）。  
应避免离子交换剂平衡和柱中层析分离两者选用不同的缓冲液，除非系统已经明确显出会得到错误的结果时才考虑。

## 梯度洗脱

连续地或分段地改变缓冲液的组用于有效分离。缓冲液的组分变化可以是提高一种离子浓度或改变适当的 pH，或者两者都改变。缓冲液本身是达到分离目的的主要因素，离子交换剂的量需要按离子交换剂对目的化合物的交换容量而定。万一混合物含层析相近似的组分时，为了获得好的分辨力需要稍增加些柱长度。

## 特殊技术

### 灭菌

所有 whatman 离子交换介质除 P11 型之外为了灭菌都可以高压灭菌。最好是离子交换剂用 PH6.5~7.5 的非挥发性缓冲液配成的悬液中进行。

建议的灭菌条件是 10psi/15min；或者 15psi/10min。另外除 P11 型之外所有的产品也可以用化学灭菌法，将介质分散在 0.5MNaOH 中，然后用灭菌水洗涤。所有产品也可用含 20~25% 体积百分比的乙醇水溶液处理。

### 脱气（对阴离子交换剂）

对大多数灵敏的分离，为了获得重现性好的结果，DE 和 QA 纤维素交换剂需除去吸附的二氧化碳。假如悬液预先按上述推荐的方法处理过后一般就不必进行这一步。

1. 将纤维素加到酸性缓冲液中。
2. 调整 pH 在 4.5。有时甚至要用更高浓度的酸溶液来调节 pH。
3. 在搅拌下抽真空（压力降至 10cmHg 以下）直到没有更多的气泡产生，在不产生沸腾之后停止真空。较合适的是在抽滤瓶中带磁力搅拌器搅拌下进行，抽滤瓶与吸气器相连。
4. 加碱性缓冲液使得所希望的 pH。对要求更高的分离，所用缓冲液必须用除 CO<sub>2</sub> 的水配制以保证无 CO<sub>2</sub>。

### 采用含醇缓冲液

对 SE53 型介质需要含醇缓冲液，平衡时先用水缓冲液处理，然后再用含醇缓冲液系统完成平衡。

### 分批法离子交换

1. 将一定量的包预处理并平衡过无细粒的离子交换剂加到原溶液中。
2. 按原溶液中所含成分的含量搅动一定时间进行吸附分离。
3. 用过滤法或者离心法将离子交换剂和缓冲液分开。
4. 用平衡时所用缓冲液洗涤离子交换剂。
5. 在搅动流化床下或离心下解吸，也可以将纤维素装柱后用上述洗脱技术进行解吸。

有关 Whatman 离子交换纤维素介质大规模分离的应用请与 Whatman 国际公司联系，公司联络地址：Springfield Mill, Maidstone, Kent. ME 142LE, England.