北京沃凯生物科技有限公司
全国免费电话:400-819-385
www. bjoka- vip. com
Tel:010-62971590. Fax:62340519
M-ail:postmaster@oka-vip.com

CM Sepharose FF 使用说明

CM Sepharose FF 是一种弱阳离子交换剂，具有很好的流动性和很高的容纳所有 pI 值蛋白的能力，离子交换基团为羧甲基基团，可以保持带电状态（离子态），并在整个工作范围（ pH6 ～ 12 ）内维持持续的高容纳力（高容量）。

表一： 介质性质

离子交换类型：弱阳离子

总离子容量	0.1 ～ 0.14mM H/ml 介质	
有效容量	IgG (MW 160000) 9.5mg/ml(牛)	
	牛的 coHb (MW 69000) 75 mg/ml	
	核糖核酸酶（ MW 137000 ） 120 mg/ml	
颗粒结构	6% 交联的 Sepharose	
颗粒尺寸范围	45 ～ 165um	
平均粒子尺寸	90um	
最大线性流速	300cm/h at25℃,HR16/10 柱， 5cm 床高度	
pH 工作范围	6-12	
pH 稳定性	2-14	
化学稳定性	通常都用透明的水或者缓冲液： 1.0M 氨基酸， 1.0M NaoH， 8M 尿素 ， 8M 盐酸胍、乙醇、甲醇等。	
物理稳定性	由于 pH 变化或离子强度变化引起的柱子变化可忽略	
高压灭菌	在 0.1M 乙酸钠（醋酸钠） 121℃， 30min.	

介质准备：

CM Sepharose FF 保存于 20% 乙醇当中，倾掉 20% 的乙醇溶液，加入结合 buffer 平衡好备用，结合 buffer 中不能含有明显增加粘性的试剂。

在装柱步骤结束后，柱子继续用结合 buffer 平衡。

装柱：

1．在色谱进行的温度下平衡所有材料。

2．用 buffer 除去柱子颗粒空间内的空气，确定柱子中及相连的管中没有空气。

3. 关闭柱子开关，并留约柱长 1/3—1/4 的 buffer 在柱子中。

4．将平衡好的凝胶连续倒入柱子中，用玻璃棒抵住柱子壁，以减少空气气泡进入

5．立即加入 buffer, 填满柱子剩余空间，封闭柱子上方，连上橡胶管

6．打开柱子底部开关连上管，控制在所需流速，参考表 1 。主要用于装柱过程。（注：如果你装柱时采用了最大流速，在接下来实验过程中不应超过此速度的 75% ）。

7．在达到柱床高度后，保持装柱流速，平衡约 3 个柱体积。

平衡：

在开始之前应确保离子交换柱达到平衡，可以从柱子流出的结合 buffer 的导电率或 pH 达到不变数值并和加入的溶液相同来确定。

柱子平衡后可用来使用。

使用：

1. 介质装到需要的高度后，关闭柱子开关，小心移去上部多余 buffer 以在顶部形成一个向上的弯液面。

2．沿着管壁将样品加入柱子中，保证无空气进入凝胶

3．连接柱子和管子之间为一无气泡的液体连接系统，让样品以恒速进入凝胶。

4．待样品全部进入凝胶后，在顶部加入约两厘米的结合 Buffer，继续洗涤至紫外吸收值与初始吸收值相近。

5．然后加入洗脱液，保持流速不变，开始洗脱。注意收集洗脱峰。

结合：大部分过程中是让目的分子结合到离子交换剂上而让其它分子流过，然而，一些情况相反，让目的分子流过。

吸附过程中，选择一个合适的 pH 值的 buffer 很关键，离子强度应保持很低这样可以不干扰样品结合。建议操作的 pH 值在 buffer 的 pka 0.5 个 pH 单位以内，并且至少低于目的分子的 pI 值一个 pH 值。

洗脱：解离应用逐渐增高的盐溶液或逐渐增高的 pH 梯度。

再生：

根据样品的性质，再生一般用高离子强度的 buffer(1～2M NaCl) 或增高的 pH 值洗，随后用结合 buffer 再平衡。

在一些应用中，像变性的蛋白或脂类等一些物质不会在再生过程中洗掉。可以用 CIP 过程除去。

CIP： 用 0.5 倍柱床体积的 2M NaCl 清洗以除去离子化结合蛋白，以相反的流向处理 10-15min，

用 1M NaOH 清洗除去一些变性蛋白、疏水结合蛋白和脂蛋白，以约 40cm/h 的流速作用 1～2 小时，相反流向。

用 4 倍柱床体积，70% 乙醇或 30% 异丙醇反流向清洗，除去结合力强的疏水蛋白、脂蛋白等。

使用高浓度有机溶剂时或用渐增的梯度时应避免气泡的形成。

在所有情况下清洗后均须用至少 3 倍体积的 binding buffer 洗。

卫生处理：

将微生物污染降至最少值。用 0.5～1M NaOH 洗 40cm/h 30～60min 反流向。重新用灭菌的 binding buffer 平衡。

保存：介质 4～8℃ 20% 乙醇；长期保存，在合适的抑细菌剂中：如 20% 乙醇，介质不能结冻。

