

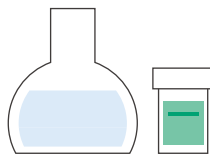
实验室层析柱 养护笔记



目录

01/	分子筛的清洗与维护	02
02/	亲和柱的清洗与维护	04
03/	离子柱的清洗与维护	08
04/	疏水柱的清洗与维护	11
05/	层析柱的正确保存	13
06/	层析柱与设备的连接	14
07/	常见问题解答	16

第一章



分子筛的清洗与维护

以Superdex™ 30 Increase 10/300为例

1.1 在位清洗 (CIP)

在进行 10 至 20 次分离循环后，或在其他有需要的情况下，执行以下常规清洗循环。

注意：

- 1、进行在位清洗时，**建议采用反向流。**
- 2、在在位清洗程序完成后如需储存，**在转移至 20 % 乙醇之前，务必用缓冲液冲洗至中性 pH 值。**

1.2 常规清洗

1 以 0.5 mL / min 的流速，用 1 CV 的 0.5 M 氢氧化钠、0.5 M 乙酸或 30 % - 70 % 乙醇冲洗层析柱。

2 **立即用 1 CV 的水冲洗层析柱**，随后以 0.5 mL / min 的流速用至少 2 CV 的缓冲液冲洗。

在下一次运行之前，平衡层析柱，直至紫外基线和 pH 值稳定。**测定柱效确认预装柱是否恢复。**

注意：以上流速为室温下推荐流速，在冷室或冷柜中运行，建议流速减半。清洗过程中时刻观察压力情况，压力过高时请酌情减慢流速。

1.3 强力清洗

1

根据污染物的性质，可以使用对应的缓冲液和耐受的清洗溶液。**在使用任何一种清洗溶液后，都要用至少 2 CV 的水冲洗**，然后再用 2 CV 的缓冲液冲洗。

2

如果层析柱性能未恢复，用 3 CV 的 0.5 M 精氨酸冲洗层析柱。用至少 2 CV 的水冲洗。

3

如果层析柱性能仍然未恢复，用含有 0.5 M 氯化钠的 0.1 M 乙酸配制的浓度为 1 mg / mL 的胃蛋白酶溶液填充层析柱，并在室温下放置过夜，或在 37 °C 下放置 1 小时。酶处理后，按照“常规清洗”部分中描述的程序清洗层析柱。

4

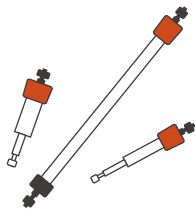
更换层析柱顶部的滤膜。（因为污染物会随着液体流动进入，其中很多会被滤膜拦截。）

5

如有必要，小心地悬浮凝胶柱床顶部 2 至 3 毫米的部分，然后用滴管将其移除。调整适配器，消除凝胶柱床上方的空隙。



第二章



亲和柱的清洗与维护

2.1 His 亲和柱

再生

如果要纯化的是同一种蛋白质，那么在每次纯化之间无需对填料进行剥离处理；根据提取物、提取物体积、目标蛋白质等情况，在进行五到七次纯化后对介质进行再整合就足够了。

剥离处理

- 为了去除残留的镍离子（ Ni^{2+} ），用 5 CV 的 20 mM 磷酸钠、0.5 M 氯化钠、50 mM 乙二胺四乙酸（EDTA），pH 值为 7.4 的溶液进行冲洗。在对层析柱进行再整合之前，先用至少 5 CV 的结合缓冲液冲洗以去除残留的 EDTA，然后再用 5 CV 的蒸馏水冲洗。

再整合

- 将 0.5 CV 的 0.1 M 硫酸镍（溶于蒸馏水中）上样到层析柱中。
- 用 5 CV 的蒸馏水冲洗层析柱，接着用 5 CV 的结合缓冲液冲洗（以调节 pH 值），然后再将层析柱储存于 20 % 的乙醇中。
- 在某些应用中，诸如变性蛋白质或脂质之类的物质在再生过程中无法被清洗下来。这些物质可以通过在位清洗（CIP）的方式去除。

在位清洗 (CIP)

当发现层析柱性能下降或柱压升高时，应进行清洗。

- 在清洗之前，需按照推荐的步骤剥离镍离子 (Ni^{2+}) (见“再生”)。
- **清洗时建议设置液流方向反向或将层析柱反向接入系统。**
- 清洗后，将层析柱储存在 20 % 的乙醇中；或者在储存于乙醇之前，**对其进行镍离子 (Ni^{2+}) 的再螯合。**

去除镍离子 (Ni^{2+}) 后的层析柱可通过以下方法进行清洗：

离子结合蛋白质

- 用 10 CV 的 1.5 M 的氯化钠溶液冲洗。然后再用 10 CV 的蒸馏水冲洗。

沉淀蛋白，疏水结合蛋白，脂质

- 用 1 M 的氢氧化钠溶液冲洗层析柱，**接触时间通常为 1 至 2 小时**（若要去除内毒素，则需 12 小时或更长时间）。然后用大约 10 CV 的结合缓冲液冲洗，接着再用 10 CV 的蒸馏水冲洗。

疏水结合蛋白，脂蛋白，脂质

- 用 5 到 10 CV 的 30% 异丙醇冲洗约 15 到 20 分钟。然后用大约 10 CV 的蒸馏水冲洗。
- 或者，用 2 CV 的碱性或酸性洗涤剂溶液冲洗。例如，使用含 0.1 % 到 0.5 % 非离子型洗涤剂的 0.1 M 乙酸溶液，接触时间为 1 到 2 小时。处理之后，务必用 5 到 10 CV 的 70 % 乙醇冲洗以去除残留的洗涤剂。然后再用大约 10 CV 的蒸馏水冲洗。

Ni Sepharose excel & HisTrap excel 在位清洗 (CIP)

当观察到柱压升高时，就应该对层析柱进行清洗。下面的表格中描述了不同的在位清洗 (CIP) 方法。**在进行在位清洗过程中，流速不得超过 150 cm / h。**

离子结合蛋白质

- 用 10 CV 的 1.5 M 的氯化钠溶液冲洗。然后再用 10 个 CV 的蒸馏水或平衡缓冲液冲洗。

沉淀蛋白，疏水结合蛋白，脂质

- 用 1 M 的氢氧化钠溶液冲洗层析柱，**接触时间通常为 1 至 2 小时**（若要去除内毒素，则需 12 小时或更长时间）。然后用大约 10 CV 的平衡缓冲液冲洗。

疏水结合蛋白，脂蛋白，脂质

- 用 5 到 10 CV 的 30 % 异丙醇冲洗约 15 到 20 分钟。然后用大约 10 CV 的蒸馏水或平衡缓冲液冲洗。
- 或者，用 2 CV 的碱性或酸性洗涤剂溶液冲洗。例如，使用含 0.1 % 到 0.5 % 非离子型洗涤剂的 0.1 M 乙酸溶液，接触时间为 1 到 2 小时。处理之后，务必用 5 到 10 CV 的 70 % 乙醇冲洗以去除残留的洗涤剂。然后再用大约 10 CV 的平衡缓冲液冲洗。

其余标签蛋白层析纯化柱清洗方法详见说明书。

2.2 抗体亲和层析柱 以MabSelect™ Prisma为例

在位清洗 (CIP)

必须定期进行在位清洗，以防止污染物富集，并维持预装柱的载量、流动性能以及整体性能。

建议在以下情况下进行在位清洗：

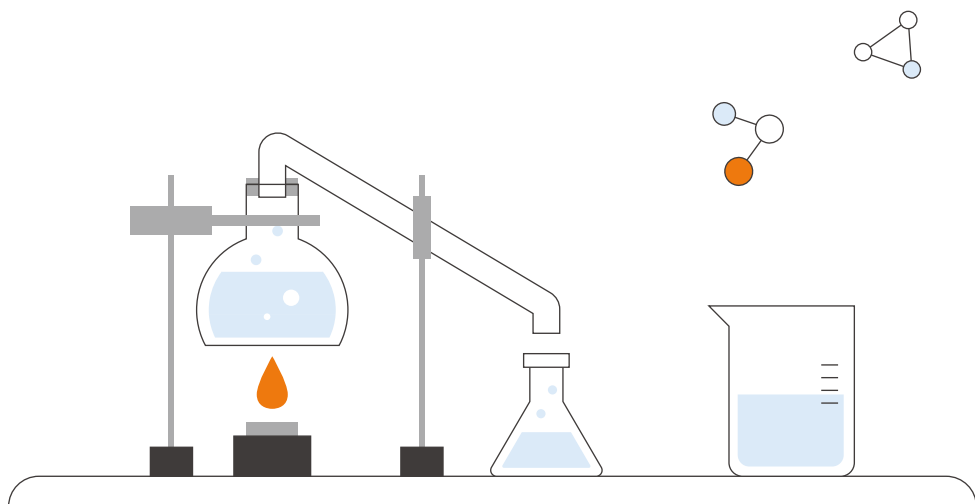
- 当注意到柱压升高时。
- 如果观察到层析柱性能下降。
- 当同一根层析柱用于纯化不同蛋白质时，为防止可能出现的交叉污染。

建议清洗步骤：

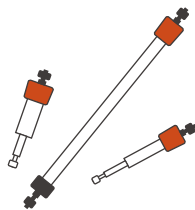
- 1 用 3 CV 的缓冲液冲洗层析柱。
- 2 以低流速用至少 3 CV 的 NaOH (0.5 ~ 1 M) 冲洗层析柱至少 15 分钟。
- 3 立即用至少 5 CV 的经过除菌过滤且 pH 值在 7 至 8 之间的结合缓冲液冲洗。
- 4 使用 20 % 乙醇置换结合缓冲液并将层析柱保存在 2 - 8 °C 环境中。

在使用 NaOH 清洗之前，**需要将层析柱保存在中性 pH 环境中**，避免因酸碱接触导致层析柱发热的现象。另外，NaOH 的浓度可以根据层析柱的使用程度进行调整。

对于特殊配基的抗体层析柱，请参照说明书进行相关操作。



第三章



离子柱的清洗与维护

3.1 再生

- 1 用 5 CV 的 1 M NaCl (100 % B) 洗涤，以洗脱柱子上剩余的结合物质。
- 2 用 5 至 10 CV 的起始缓冲液**重新平衡**，直到洗脱液的 pH 值和电导率达到所需值。

3.2 常规清洗方法

- 1 用至少 2 CV 的 2 M NaCl 冲洗。
- 2 用至少 4 CV 的 1 M NaOH 进行洗涤。
- 3 用至少 2 CV 的 2 M NaCl 洗涤。
- 4 用至少 2 CV 的蒸馏水冲洗，**直至紫外基线和洗脱液 pH 值稳定。**
- 5 用至少 5 CV 的起始缓冲液或储存缓冲液洗涤，**至 pH 值和电导率达到要求。**

注意：建议**全程反向冲洗**，以便于杂质尽快从柱子中流出。

3.3 去除沉淀的蛋白质的清洗方法

方法1：盐酸胍

- 1 用 2 CV 6 M 盐酸胍洗涤。
- 2 立即用至少 5 CV pH 值为 7.0 至 8.0 的缓冲液洗涤。
- 3 用至少 2 CV 的蒸馏水冲洗，直至紫外基线和洗脱液 pH 值稳定。
- 4 用至少 5 CV 的起始缓冲液或储存缓冲液洗涤，至 pH 值和电导率达到要求。

注意：建议**全程反向冲洗**，以便于杂质尽快从柱子中流出。

方法2：胃蛋白酶

- 1 注入 1 CV 胃蛋白酶（1 mg / mL 于 500 mM NaCl、100 mM 乙酸中）。**在室温下放置过夜或在 37 °C 下放置 1 小时。**
- 2 用至少 2 CV 的蒸馏水冲洗，直至紫外基线和洗脱液 pH 值稳定。
- 3 用至少 5 CV 的起始缓冲液或储存缓冲液洗涤，至 pH 值和电导率达到要求。

注意：建议**全程反向冲洗**，以便于杂质尽快从柱子中流出。

3.4 去除脂质、疏水结合蛋白或脂蛋白的清洗方法

方法1：醇类清洗

- 1 用 4 CV 不超过 70% 的乙醇或 30% 的异丙醇清洗。

- 2 用至少 2 CV 的蒸馏水冲洗，直至紫外基线和洗脱液 pH 值稳定。
- 3 用至少 5 CV 的起始缓冲液或储存缓冲液洗涤，至 pH 值和电导率达到要求。

注意：建议**全程反向冲洗**，以便于杂质尽快从柱子中流出。

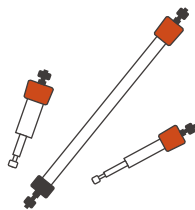
方法2：去垢剂

- 1 用 2 CV **含去垢剂的碱性或酸性溶液清洗**，例如 100 mM 乙酸中添加 0.1% 至 0.5% 的非离子去垢剂。
- 2 用至少 2 CV 的蒸馏水冲洗，直至紫外基线和洗脱液 pH 值稳定。
- 3 用至少 5 CV 的起始缓冲液或储存缓冲液洗涤，至 pH 值和电导率达到要求。

注意：建议**全程反向冲洗**，以便于杂质尽快从柱子中流出。



第四章



疏水柱的清洗与维护

4.1 再生

用 2 至 5 个 CV 的无盐洗脱缓冲液清洗，**洗脱任何残留的疏水结合物质。**

通过用不含盐的缓冲溶液清洗 HIC 填料，可以有效洗脱大多数结合的蛋白质。在每次运行结束时，应包括无盐再生步骤，去除仍然结合在填料上的任何分子。**密切关注紫外线吸收率，以便根据需要缩短或延长再生步骤。**

有时蛋白与填料间疏水相互作用很强，以至于可能需要使用更严苛的条件洗掉所有结合的物质，例如，0.5 至 1.0 M 氢氧化钠、70 % 乙醇或 30 % 异丙醇。

4.2 常规清洗

- 1 用至少 4 个 CV 的 1 M NaOH 清洗。
- 2 用至少 3 个 CV 的水清洗，或**直到洗脱液 pH 为中性。**

4.3 强力清洗

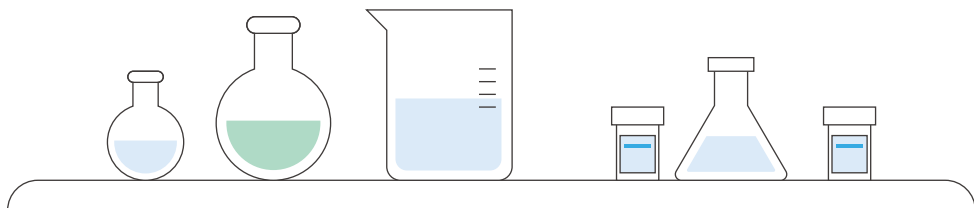
方法1

- 1 用至少 2 个 CV 的水以推荐流速清洗。

- 2 用至少 4 个 CV 的 70 % 乙醇或 30 % 异丙醇以推荐流速清洗。
- 3 用至少 4 个 CV 的蒸馏水以与步骤 1 中相同的流速清洗。
- 4 要开始新的分离：**用至少 3 个 CV 的起始缓冲液再平衡**，或者直到在推荐流速下达到正确的洗脱液 pH 值。

方法2

- 1 **用最多两个 CV 的 0.05 % 非离子去垢剂**（例如 Tween™-20）以推荐流速溶于 1 M 乙酸溶液进行清洗。
- 2 用至少 4 个 CV 的 70 % 乙醇清洗。
- 3 用至少 4 个 CV 的蒸馏水以与步骤 1 中相同的流速清洗。
- 4 要开始新的分离：**用至少 3 个 CV 的起始缓冲液再平衡**，或者直到在推荐流速下达到正确的洗脱液 pH 值。



第五章

层析柱的正确储存

5.1 储存液

层析柱储存时，小体积（1 mL, 5 mL）层析柱先用 4 CV 的蒸馏水清洗，再用 4 CV 的 20% 乙醇清洗，大体积层析柱（20 mL 或自装柱）可减少至 2 CV 清洗体积。对于使用 SP 和 S 配基的阳离子交换层析柱，需要在 20 % 的乙醇溶液中加入 0.2 M 乙酸钠。**对乙醇/水混合溶液进行彻底脱气，并以低流速充入柱中，以避免层析柱超压。**

5.2 储存温度

室温储存，或长期储存于 4 °C 至 8 °C。**切勿冷冻。**

5.3 储存装置的使用

取下时先向下按压弹簧帽，抽出固定杆，再旋下整个保护装置（图 5.1 左）。

装回时，旋上不带弹簧的保护装置，压入弹簧帽，使得孔与孔对准，再插入固定杆（图 5.1 右）。

液体不足时，可使用注射器和接头对储存装置进行补液，取下弹簧帽，用注射器从一端注入 20 % 乙醇，**注意排除气泡**，注入到管子上的标线以上为止。

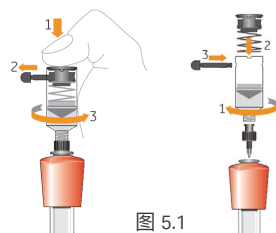


图 5.1

扫码查看
视频解析



第六章

层析柱与设备的连接

6.1 Tricorn/XK/HiScale层析柱接入系统

- 1 查阅层析柱说明书，**正确设置报警压**。
- 2 将 ÄKTA 系统流速设置为 0.5 mL / min，切换到对应柱位流路，**确保管路中没有气泡**。
- 3 拧开层析柱上端堵头，将管路伸入层析柱柱头中并持续泵送液体。
- 4 待层析柱柱头上端有液面凸起后，**将上端接头拧上但不拧紧**。
- 5 打开层析柱下端堵头，拧紧上端接头。
- 6 待层析柱下端有液体流出后将层析柱接入 ÄKTA 系统中。



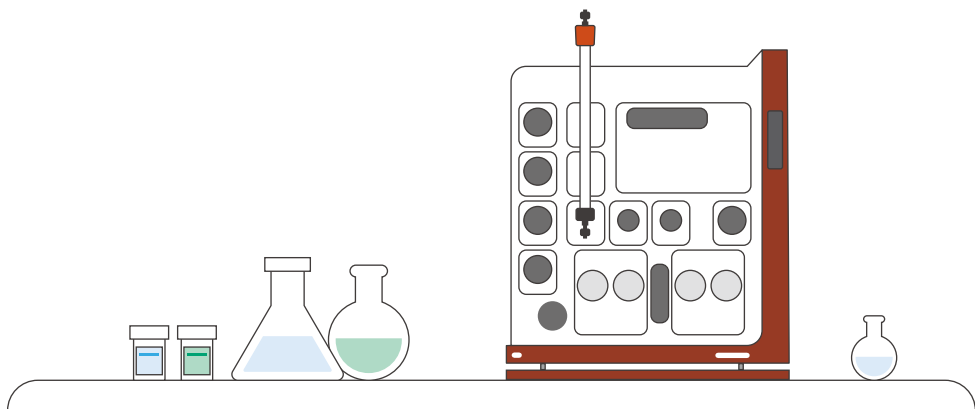
扫码查看
视频解析

6.2 HiTrap™ 预装柱接入系统

- 1 查阅层析柱说明书，**正确设置报警压**。
- 2 将 ÄKTA 系统流速设置为 0.5 mL / min，切换到对应柱位流路，**确保管路中没有气泡**。
- 3 拧开层析柱上端堵头，将管路伸入层析柱柱头中并持续泵送液体。
- 4 待层析柱柱头上端有液面凸起后，**将上端接头拧上但不拧紧**。
- 5 掰断层析柱下端塑封口，拧紧上端接头。
- 6 待层析柱下端有液体流出后将层析柱连接入 ÄKTA 系统中。



扫码查看
视频解析



第七章

常见问题解答

7.1 层析柱进气

发现系统出现气泡后，**首先暂停正在运行的实验，检查气泡所处的位置：**

若气泡位于入口管道中且尚未进入泵头

- 使用泵冲洗的命令排出气泡，在泵冲洗过程中，**确认废液管道 W1 有连续液体流出，无周期卡顿。**
- 若泵冲洗过程中发现 W1 无液体流出，在泵冲洗结束后进行泵头手动抽气。

若气泡已进入泵头尚未进入层析柱

- 此时通过泵冲洗的命令一般无法将气泡排出，可直接进行泵头手动抽气，抽气后再运行泵冲洗命令，**保证气泡完全排出。**

若气泡已经进入层析柱

- 首先按照上方的方法对系统进行排气，系统确保无气泡之后反向连接层析柱（若系统有柱位阀，可直接将流向切换为 up flow），使缓冲液流向为从下往上，之后，**设置低流速，直至肉眼观察层析柱中无明显气泡且紫外曲线维持稳定。**

注意：若层析柱进入气泡较多且时间较长，有可能已经对填料造成不可逆的伤害无法恢复，具体可由冲洗后层析柱能否满足分离要求决定。

7.2 层析柱超压

第一时间暂停流速。

- 观察在压力释放的状态下填料是否能够回弹。
- 对于 Tricorn 柱，使用记号笔在柱床高度面做好标记。随后向上拔出上柱头的黑色锁扣，**旋转红色端头使得柱头下降到刚好接触填料液面即可。**
- 对于 XK / HiScale 柱，使用记号笔在柱床高度面做好标记。随后旋转调节杆，**使得柱头下降到刚好接触填料液面即可。**

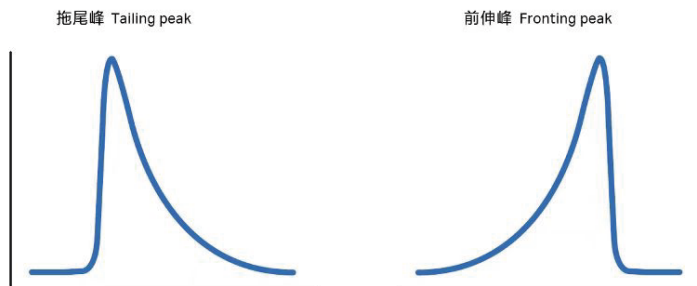
7.3 如何避免层析系统压力升高

- 实验缓冲液及样品均需使用 0.22 / 0.45 μm 滤膜过滤；当样品小于 1 mL 时，可将样品高速离心（ $\geq 10000\text{ g}$ ，10 min）后，取上清上样。
- 实验运行结束后务必及时使用 ddH₂O 及 20 % 乙醇冲洗并保存系统，**切勿将实验缓冲液静置于系统中。**
- 所有的层析柱、填料均有建议的 CIP 频率及步骤，良好的层析柱维护程序可保证层析柱可以在较长时间内维持良好的性能。

7.4 层析柱有色素该怎么去除

- 色素性质较复杂，可以根据填料的耐受情况，尝试使用高盐、NaOH、有机溶剂（如 30 % 异丙醇或乙醇）或酸（如 0.01 M HCl）处理，**最好将填料拆出，分别浸泡在不同试剂中。**
- 也可以考虑使用混合试剂进行处理，例如：通过混合 8 M 尿素 + 0.5 M 乙酸 + 2 M NaCl，对于和阴离子交换等介质紧密结合的化合物，通常很有效；或者 1 M NaOH 混合 1-2 M 盐；可以耐受有机溶剂的情况下，尝试 1 M NaOH 混合 20 - 30 % 的异丙醇；根据色素的不同性质，也可以尝试不同的去污剂，**注意避免操作中产生气泡。**如果去除不掉，可以定期把色素污染部分的填料去除，或验证是否对于样品纯化造成影响。

7.5 什么原因造成峰前倾或峰拖尾？



- **Fronting Peaks** 为色谱峰前倾，表示柱子可能装的太紧，建议降低流速；样品超载，建议降低上样量；填料中形成一条通路（Channeling）造成部分样品的路径缩短；柱子存在污染。
- **Tailing peaks** 为色谱峰拖尾，表示柱子可能装的太松，建议使用更高流速；由于上样 buffer 条件不合适，造成样品没有和填料结合，建议调节上样 buffer 中的 pH 和盐浓度；样品太粘稠，可以稀释或更换 buffer 体系；柱子存在污染；系统体积大造成峰变宽，检查系统模块、管线和接头。

7.6 填料如何储存？

- 大部分填料可以在 4 - 40 °C 储存，或参考说明书。**切勿冷冻**，当环境温度低于 0 °C 时，运输和储存时需要添加保温材料，避免保存液冷冻结冰。储存过程中，**注意避免填料干燥**，长期不用的层析柱，接头处可能缓慢挥发导致填料干燥。低温储存时，避免产生气泡。
- 储存液：对于耐碱的层析介质，可以使用 0.01 M NaOH 作为储存液；对于不耐碱的层析介质，比如亲和介质，一般是用 20 % 的乙醇或 2 % 苯甲醇作为储存试剂。填料在进行储存的过程中，**需要注意污染的问题，因此建议定期更换储存液。**

7.7 纯化实验中对样品有什么要求？

- 无论哪一种纯化方式，我们都需要保证样品可溶无颗粒，**因此上样前需要通过离心或者过滤处理**，在必要的情况下，需要对样品的稳定性进行测试，以避免纯化过程中发生样品的降解、聚集、变性。
- 在分子筛实验过程中，**上样量有严格要求**，具体请参考对应柱子的说明书，有推荐最大上样体积，而对于样品的浓度，在高分辨分离时建议不超过 10 mg / ml 的浓度，另外可以通过核酸酶处理降低样品中核酸含量以降低样品的粘度。
- 在其它结合模式纯化（离子交换、亲和层析、疏水作用层析等）过程中，我们需要根据载量确定填料用量，而上样体积不是限制因素（因为结合为动态平衡，所以样品浓度对结合效率有一定影响，当样品浓度较低时，需要浓缩后上样）。
- 样品的上样条件需要与所选择的纯化方式相匹配，如 pH 和离子强度。**必要时可通过脱盐或者膜过滤等方式对样品的缓冲液条件进行优化。**

更多问题可扫描二维码进行查阅





关于 Cytiva 思拓凡

Cytiva（思拓凡）是全球生命科学领域的先行者，是Danaher（丹纳赫集团）旗下独立运营公司。

作为值得信赖的合作伙伴，Cytiva 积极携手学术及转化医学领域的研究人员、生物技术开发者和制造商，专注于生物药物、细胞与基因疗法以及以 mRNA 为代表的一系列创新技术的研究，通过提升药物研发和生物工艺的能力、速度、效率和灵活性，为惠及全球患者开发和生产变革性药物和疗法。请访问 cytiva.com.cn 获取更多信息。

智荟专线：400-810-9118

官微订阅号：Cytiva

官微服务号：CytivaChina

cytiva.com.cn

Cytiva 和 Drop 标识是 Global Life Sciences IP Holdco LLC 或其附属公司的注册商标。

Amersham、Biacore、HCPQuant、ImageQuant、MabSelect PrismA、PrismA ELISA 和 Typhoon 是 Global Life Sciences Solutions USA LLC 或以 Cytiva 名义开展业务的附属公司的商标。

丹纳赫商标是丹纳赫公司的专有商标。

所有其他第三方商标都是其各自所有者的财产。

© 2025 Cytiva

所有商品和服务的销售需遵守在 Cytiva 运营之供应商公司的销售条款和条件。如需查看当地办公室的联系信息，请访问 cytiva.com.cn/contact。

CY54738-29JUL25-BR

