

Chrom S100

Chrom S200

凝胶过滤层析介质

使用指南

1 产品简介

凝胶过滤层析介质，也常被称为体积排阻层析，是依据分子大小及形状的差异进行生物分子的分离，由于空间排阻效应，大分子物质先流出，小分子物质后流出。粒径大小和孔径大小是控制先后流出的关键因素，不同的凝胶过滤层析介质具有不同的分离分子量范围。

科诺赛生物生产的 Chrom S 系列凝胶过滤层析介质以烯丙基化的葡聚糖为基质，具有良好的刚性及化学稳定性，亲水性好，非特异性吸附低。

应用领域：生物制药和生物工程下游小蛋白、中等蛋白、抗体及多肽的分离和纯化。

2 技术参数

产品名称	Chrom S100	Chrom S200
基质	烯丙基葡聚糖	烯丙基葡聚糖
平均粒径	50 μ m	50 μ m
分离范围(球蛋白)	1 \times 10 ³ ~1 \times 10 ⁵	5 \times 10 ³ – 2.5 \times 10 ⁵
推荐流速	125 cm/h (根据柱子规格选择合适流速)	125 cm/h (根据柱子规格选择合适流速)
最大耐压	0.15 MPa	0.15 MPa
pH 稳定性	3~11 (工作) 2~13 (清洗)	3~11 (工作) 2~13 (清洗)
化学稳定性	稳定于常用的水缓冲液：0.1 M 盐酸，1 M 乙酸，8M 尿素，6M 盐酸胍，1% SDS，2 M 氯化钠，20%乙醇，30%丙醇，30%乙腈。	稳定于常用的水缓冲液：0.1 M 盐酸，1 M 乙酸，8M 尿素，6M 盐酸胍，1% SDS，2 M 氯化钠，20%乙醇，30%丙醇，30%乙腈。
存储	4~30 $^{\circ}$ C 20%乙醇	4~30 $^{\circ}$ C 20%乙醇

3 使用指南

3.1 填料装柱

Chrom S 系列层析介质可以在实验室被填充到 HiQumn[®] 中压层析柱中，以扩大产量。将填料填充到层析柱中，根据样品中蛋白含量和填料载量选择合适的层析柱和柱高。

3.1.1 填料准备

在装柱前，填料要平衡到室温，建议采用静置沉淀法，确定胶悬液浓度，我们原包装的填料以 50% 的浓度储存在 20% 的乙醇中。压缩比在 1.10~1.12。

通过真空抽滤，将填料中 20% 乙醇溶液更换为装柱所需的溶液（例如水），重复以上步骤 3 次，最后用装柱缓冲液重新悬浮填料，建议胶悬液浓度为 50%~60%。

所需悬浊液体积 (mL) = 装柱体积 (mL) × 填料压缩因子 / 胶悬浊液浓度

3.1.2 层析柱准备

HiQumn[®] 中压层析柱和装柱器在使用前，应用装柱液润洗，检查层析柱完好无损伤，确保所选筛网（筛板）的孔径和所选填料的粒径相匹配，确保底端部件和顶部适配器的管件连接牢固。

3.1.3 层析柱装柱

- 1) 取清洗干净的 HiQumn[®] 中压层析柱，借助蛋白纯化仪或注射器，用装柱液通过下端接头排空管线及筛板中的空气，也可用重力法排空筛板及管线中的空气，在柱子底部保留 1cm 高左右的液体，拧紧下堵头，调整柱子使其垂直于地面。
- 2) 再次混匀胶悬液，确保悬液均一，借助玻璃棒将胶悬液缓慢且一次性贴壁倒入柱管中，用装柱液冲洗柱管并加满。注意不要带入气泡。

注：当装柱体积大于柱体积的 50% 以上时建议借助配套装柱器装柱。

- 3) 使其自然沉降，胶面上有 1~2cm 澄清液时，将适配器管线连接设备，低流速运行，排出适配器管线中的气泡，打开底部管线堵头，将适配器以 45° 角放入玻璃管中，顺时针拧紧上端固定帽，调节适配器使其 O 型圈浸入澄清液中，之后顺时针拧紧上端调节帽。请确保整个操作在一条直线上完成，注意不要引入气泡。
- 4) 可以采用高流速或者恒压法压至胶面清晰稳定。读取刻度并记录，关闭流速。
- 5) 如用装柱器装柱，拆除装柱器，用快速锁将调节杆缓慢下移至胶面位置，将上端调节帽顺时针拧紧，继续运行上述流速，如果胶面发生改变，可以重新调节适配器高度。
- 6) 稍微拧松上端调节帽，按压缩比确定最终柱床高度，拧紧上端调节帽，采用先下后上的方式拧紧上下端堵头，装柱完毕。

3.2 柱效测定

- 1) 通过柱效测定和评价可以确认层析柱装填质量。装柱完成后、层析柱使用期间以及分离纯化效果不理想时都需要进行柱效测定和评价。柱效通常用理论塔板高度 (HETP) 和非对称因子 (As) 来评价。
- 2) 柱效测定可以采用丙酮或者 NaCl 作为样品进行测定，按照下表配制样品溶液和流动相。

	丙酮法测柱效	NaCl 法测柱效
样品	1.0%(v/v)丙酮水溶液	0.8M NaCl (溶于水)
样品体积	1.0%柱体积	1.0%柱体积
流动相	纯化水	0.4M NaCl 水溶液
流速	30 cm/h	30 cm/h
检测器	UV 280 nm	电导率

3) HETP 和 As 计算方法

根据 UV 或者电导率曲线计算理论塔板高度 (HETP)、理论塔板数 (N) 和非对称因子 (As)，公式如下：

$$HETP=L/N$$

$$N=5.54(V_R/W_h)^2$$

其中：

V_R =保留体积 W_h =半高峰宽

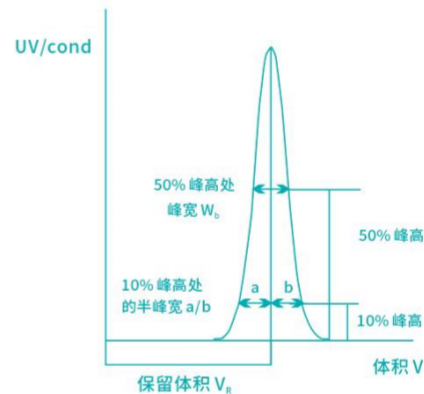
L=柱高 N=理论塔板数 V_R 和 W_h 的单位应一致；

$$As=b/a$$

其中：

a= 在 10%峰高处的第一个半峰宽

b= 在 10%峰高处的第二个半峰宽



4) 结果评价

一般来说，HETP 的数值若小于三倍介质平均颗粒大小且非对称因子在 0.8~1.8 之间，说明柱效良好。对于不理想的柱效结果需要分析原因并重新装柱。

3.3 层析方法

3.3.1 缓冲液准备

所用水和缓冲液在使用之前建议用 0.22 μ m 或 0.45 μ m 滤膜过滤。所使用的平衡液和洗脱液，根据不同目标蛋白填料自行选择。基本原则是低盐上样，高盐洗脱，例如：

平衡缓冲液：50 mM 醋酸钠，250mM NaCl，pH 4.75

洗脱缓冲液：50 mM 醋酸钠，1M NaCl，pH 7.8

3.3.2 样品准备

样品在上样前，建议离心或用 0.22 μ m 或 0.45 μ m 滤膜过滤，减少杂质，提高蛋白纯化效率和防止堵塞柱子。

3.3.3 样品纯化

- 1) 平衡：用 5~10CV 的平衡缓冲液平衡层析柱，至流出液电导和 pH 不变（与平衡液一致）；
- 2) 进样：样品缓冲液应尽可能与平衡液一致。固体样品可用平衡液溶解配制，低浓度样品溶液可用平衡液透析或添加相应量的盐；高浓度样品溶液可用平衡液稀释。
- 3) 淋洗：继续用平衡缓冲液淋洗至基线；
- 4) 洗脱：用洗脱缓冲液（也可采用 pH 梯度洗脱）洗脱（可采用线性梯度洗脱或阶越梯度洗脱），收集流出液；
- 5) 再生：每次层析之后可用 1~2M NaCl pH 10~11 清洗层析柱，除去强结合的蛋白，用 5~10CV 的平衡缓冲液平衡层析柱，至流出液电导和 pH 不变（与平衡液一致），即可二次上样。

4 在位清洗和储存

4.1 在位清洗

有变性蛋白、脂蛋白、强疏水蛋白等在再生过程中不易洗脱，或者使用一段时间后有可能柱效下降、反压增加、分离效果变差、层析介质颜色变化等，可采用下面的流程进行在位清洗：

0.2M~0.5M NaCl 溶液清洗层析柱 1~2 小时，再用 2CV 缓冲液平衡层析柱即可。

4.2 储存

2~30°C 下 20%乙醇中保存（4°C 下有利于长期保存）；层析柱中的介质可用 20%的乙醇冲洗后保存于 2~30°C。

注：防止乙醇挥发以及微生物生长，建议 3 个月更换一次 20%乙醇溶液；在装柱、使用和保存柱子的时候，要避免柱子流干或密封不严，防止气泡进入。

5 订货信息

预装柱

货号	产品名称	柱床高度
31-1970-601	CTNprep 16/600 Chrom S100	16/600
31-1970-603	CTNprep 26/600 Chrom S100	26/600
31-1980-602	CTNprep 16/600 Chrom S200	16/600
31-1980-604	CTNprep 26/600 Chrom S200	26/600

层析介质

货号	产品名称	规格
10-1970-02	Chrom S100	30mL
10-1970-03		100mL
10-1970-04		500mL
10-1970-05		1L
10-1970-07		10L
10-1980-02	Chrom S200	30mL
10-1980-03		100mL
10-1980-04		500mL
10-1980-05		1L
10-1980-07		10L

1. Chrom S100/200 层析介质可提供试用装

2. 如需更大规格或型号定制可联系我公司销售人员



非常感谢您订购科诺赛生物的产品！
如需了解最新产品信息，请拨打服务热线 0532-55679191
或发邮件至 marketing@chromsep.cn
或者登陆官方网站 www.chromsep.cn