上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话：021-61312973　传真：021-55068248
网址：www.shyuanye.com
邮箱：shyysw@sina.com

此说明仅限参考

葡聚糖凝胶 G 系列使用说明

1. 化学和物理性质

葡聚糖凝胶是一种珠状的凝胶，含有大量的羟基，很容易在水中和电解质溶液中溶胀。亲水基质使其非特异性吸附最小化，并在生物分子分离期间得到较高的回收率。G 型的葡聚糖凝胶有各种不同的交联度，因此它们的溶胀度和分级分离范围也有所不同。葡聚糖凝胶的溶胀度基本上不因盐和洗涤剂的存在而受影响。

葡聚糖凝胶有不同的粒度。细颗粒的葡聚糖凝胶是用于需要极高分辨率的柱色谱和薄层色谱。中颗粒的凝胶用于制备性色谱过程，可在较低的压力下获得较高的流速。粗颗粒主要用于脱盐、缓冲液交换。

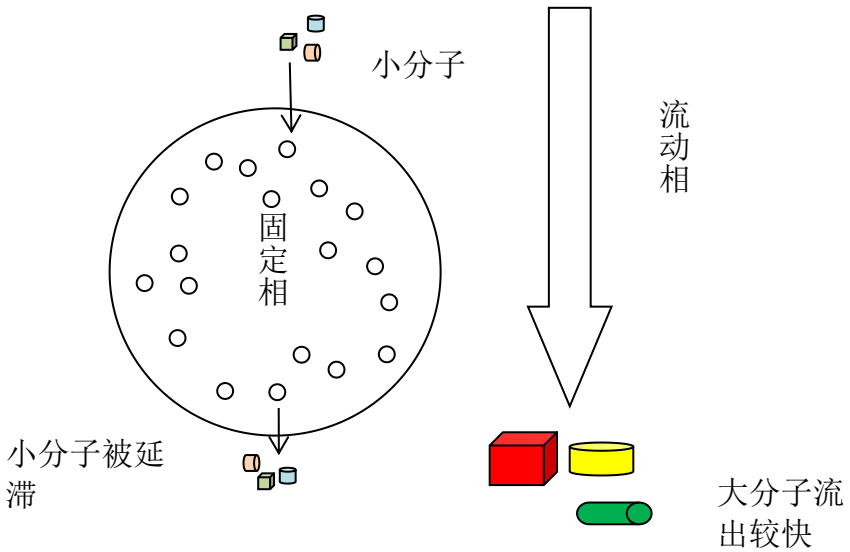
细颗粒，20-80μm：用于需要极高分辨率的柱色谱和薄层色谱，缺点流速慢；

中颗粒，50-150μm：用于制备性色谱过程，一般的分离纯化选择此款填料；

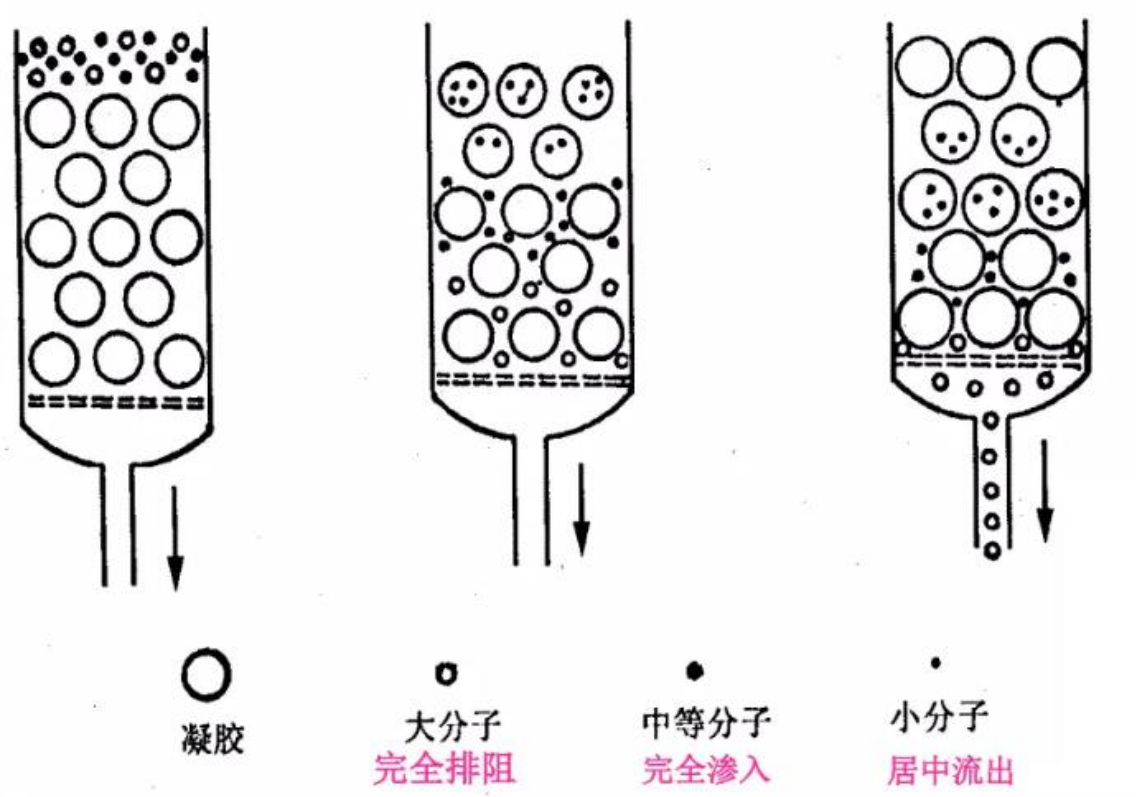
粗颗粒，100-300μm：主要用于脱盐、缓冲液交换，分离效果不佳。

2. 作用原理

凝胶是由胶体粒子构成的立体网状结构。网眼里吸满水后凝胶膨胀呈柔软而富于弹性的半固体状态。人工合成的凝胶网眼较均匀地分布在凝胶颗粒上有如筛眼，小于筛眼的物质分子均可通过，大于筛眼的物质分 子则不能，故称为“分子筛“。



小于筛眼的分子将完全渗入凝胶网眼，并着流动相的移动沿凝胶网眼孔道移动，从一个颗粒的网眼流出，又进入另一颗粒的网眼，如此连续下去，直到流过整个凝胶柱为止，因而流程长、阻力大、流速慢;大于筛眼的分子则完全被筛眼排阻而不能进入凝胶网眼，只能随流动相沿凝胶颗粒的间隙流动，其流程短、阻力小、流速快，比小分子先流出层析柱;小分子最后流出。分子大小介于完全排阻不能进入或完全渗，入凝胶筛眼之间的物质分子，则居中流出。这样被分离物质即被按分子的大小分开。



3. 产品说明

产 品 名 称	球蛋白分离范围	应　用	最大耐压 MPa
葡聚糖凝胶 G-10	<700	缓冲液交换、脱盐，分离小分子，去除小分子	0.15
葡聚糖凝胶 G-15	<1500	缓冲液交换、脱盐，分离小分子，去除小分子	0.15
葡聚糖凝胶 G-25	1000-5000	工业上脱盐及交换缓冲液	0.15
葡聚糖凝胶 G-50	1500-30000	多肽分离、脱盐、清洗生物提取液、分子量测定	0.10
葡聚糖凝胶 G-75	3000-80000	蛋白分离纯化、分子量测定、平衡常数测定	0.016
葡聚糖凝胶 G-100	4000-150000	蛋白分离纯化、分子量测定、平衡常数测定	0.0096
葡聚糖凝胶 G-150	5000-300000	蛋白分离纯化、分子量测定、平衡常数测定	0.0096

葡聚糖凝胶 G-200	5000-600000	蛋白分离纯化、分子量测定、平衡常数测定	0.0096

4. 使用方法

Sephadex 系列产品以干粉形式存在，使用前必须溶胀，在膨胀期间应避免过度搅拌，因为它可能破坏填料，不要使用磁力搅拌器。

4.1 填料的准备

（1）将填料在过量去离子水或缓冲液中（水：填料=1：20 倍以上，即 1g 填料加入 20ml 水，水过量才能充分溶胀），室温条件下膨胀 48 小时，或用热水膨胀 1 - 3 小时（沸水与凝胶混合后自然冷却，无需持续加热，不要水浴！）。洗脱缓冲液不应含有高粘度的试剂。溶胀完毕后，如果上层有少量漂浮物，请去除。

（2）将溶胀好的填料，所有的缓冲液等材料平衡至实验操作温度，对所有的缓冲液进行抽滤和脱气处理。填料本身不需要脱气，不要带填料一起超声。

4.2 装柱

（1）检查层析柱所有部件，特别是过滤网，密封圈，螺旋塞是否紧密，玻璃管是否干净和完整。

（2）将柱内及柱子底端用水或缓冲液润湿并保持一小段液位，务必使底端无气泡。

（3）用玻璃棒引导匀浆沿着柱内壁一次性倒入柱内，注意勿使产生气泡。打开柱子出液口，使凝胶在柱内自由沉降，连结好柱子顶端柱头。

（4）打开蠕动泵（必须恒流恒压），让缓冲液用使用时流速的 1.33 倍的流速流过，使柱床稳定（注意压力不要超过填料最大耐压）。使用过程中流速建议设置成为重力自然流速，即未连接蠕动泵，下端打开出液口，使流动相随重力下降的速度。

注：装柱是凝胶层析中一个关键的操作步骤。灌注凝胶时要求将均匀的凝胶一直加到所需柱床高度，不能时断时续，否则将出现分层或“纹路”等现象。若在灌好胶后才发现“纹路”、分层等现象时，要重新装柱，以免影响层析效果。

在做大型的凝胶柱时，灌注的凝胶是否均匀往往从表面上看不出来。所以使用前应该用一些带色的大分子物质如细胞色素 C、血红蛋白或专用的蓝色葡聚糖-2000(Blue dextran-2000)通过凝胶柱，观察形成的色斑带是否整齐，若斑带歪斜，应该重新装柱，直至达到要求。

4.3 平衡

上样前平衡层析柱至少 5-10 个柱体积直到填料液面本身不下降，记录仪基线变得平稳为止（流出液的 pH 值和电导值等于上柱的 Buffer 的 pH 值和电导值）。

4.4 上样

样品一定要离心或过滤后（0.45um 滤膜）上样。如果有不溶物会堵塞凝胶。

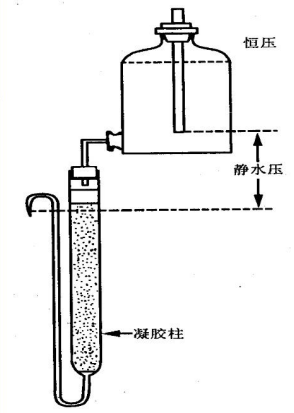
凝胶过滤的上样量一般为不大于 5%的柱床体积（即 100ml 的柱体积上样量不要大于 5ml，浓度自定，但是样品一定要完全溶解，如果是多糖类粘度高应进行稀释。），我们建议初次上样控制在 1-2%的柱床体积，视分离情况可以调整；脱盐时上样量可以达到 20%的柱床体积，柱高的选择也与分离要求相关，柱子越高，分离效果相应越好，但是，柱高过高的凝胶柱会引较大的反压，也应当尽可能避免。难分离物质要有一定柱高和流速控制，脱盐时高径比为 5：1 即可。

4.5 洗脱方法

可以用无盐水，也可以采用上柱时的缓冲液洗脱。（洗脱缓冲液不固定，有特殊需求请参考相关文献，最基础的为纯水。）

流速：接蠕动泵情况：未接泵之前上端不封闭，下端出液口打开，记录流速，蠕动泵流速按照自然流速设置；

如果不接蠕动泵：按照可以参考右侧图中设置。静水压越大，洗脱液的流速就越快。这个压力差可以调动，如提高洗脱瓶的位置或瓶中液面的增减，压力需要根据柱子高度和直径自行调整。



4.6 在位清洗（CIP）

凝胶使用十次后作一次 CIP，目的是去除柱床内沉淀的及顽固残留的蛋白。方法是用 0.1 M 氢氧化钠洗 2 个柱体积，再以至少 10 个柱体积平衡缓冲液再生。多次使用凝胶颗粒将逐渐沉积压紧，流速将减慢，所以使用一段时间后应倒出来，清洗后重新装柱。再生清洗可以在柱子中进行，也可以卸下来再生，如果是在柱子中进行，流速可能会变慢，如果流速变慢建议重新装柱，酸碱浓度不要高于 0.1M，并且时间不要过长，否则会损坏填料。

5. 保存

未处理的填料，室温密闭保存。使用完的填料，用纯水将盐分彻底冲洗，最后保存在 20%乙醇中，4℃保存。实验间隔时间短，第二天继续使用，可以直接保存在流动相中。如有遇到长菌情况，建议不要继续使用。

6. 注意事项：

（1）上样之前，样品必须经过膜过滤及去除色素，否则杂质及色素会被吸附到填料上，影响填料的正常使用。所有的缓冲液均需要用 0.45um 的过滤器过滤。

（2）在使用过程中，避免使用高浓度的强酸强碱，酸和碱的浓度应低于 0.1 摩尔。碱会使流速变慢。

（3）不同的样品，洗脱方法不相同，可以根据相关的文献进行。如果分离效果没有达到预期，请自行摸索增加柱子高度。

7.计算需要填料的克重：（计算只能得到大概需求量，不是准确数值。）

A.首先计算柱体积：公式：$V=\pi(r^2)h$

π……3.14；r……柱子内半径；h……柱高。

例如半径 2cm，高度 50cm，即 $V=3.14*2^2*50=628cm=628ml$

B.计算填料质量：

m=V/溶胀倍数

例如需要 G-50 的 600ml 柱体积：m=600/8=75g 。

类型	溶胀倍数（溶胀倍数有批次间差异，数据仅供参考）
葡聚糖凝胶 G-10	2 倍左右
葡聚糖凝胶 G-15	2.5 倍左右
葡聚糖凝胶 G-25	4 倍左右
葡聚糖凝胶 G-50	8 倍左右
葡聚糖凝胶 G-75	10 倍左右
葡聚糖凝胶 G-100	12 倍左右
葡聚糖凝胶 G-150	14 倍左右
葡聚糖凝胶 G-200	15 倍左右