

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。

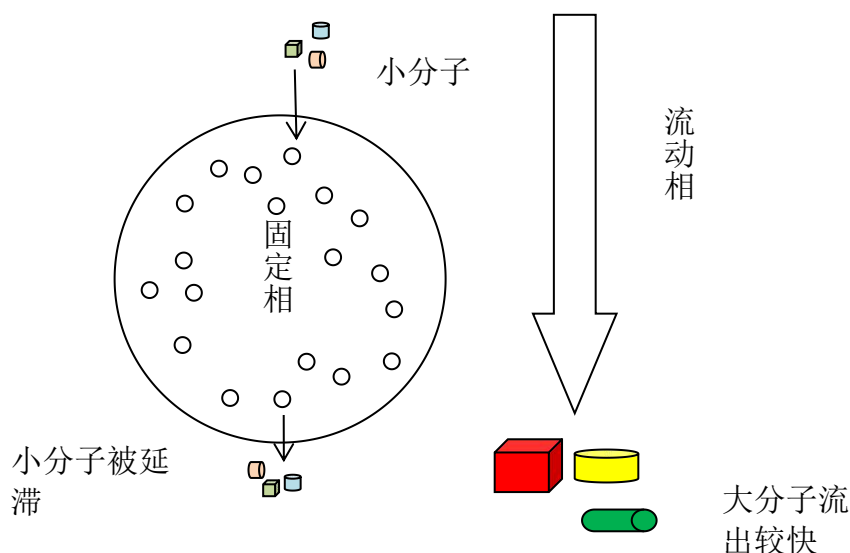
细颗粒，20–80 μm ：用于需要极高分辨率的柱色谱和薄层色谱，缺点流速慢；

中颗粒，50–150 μm ：用于制备性色谱过程，一般的分离纯化选择此款填料；

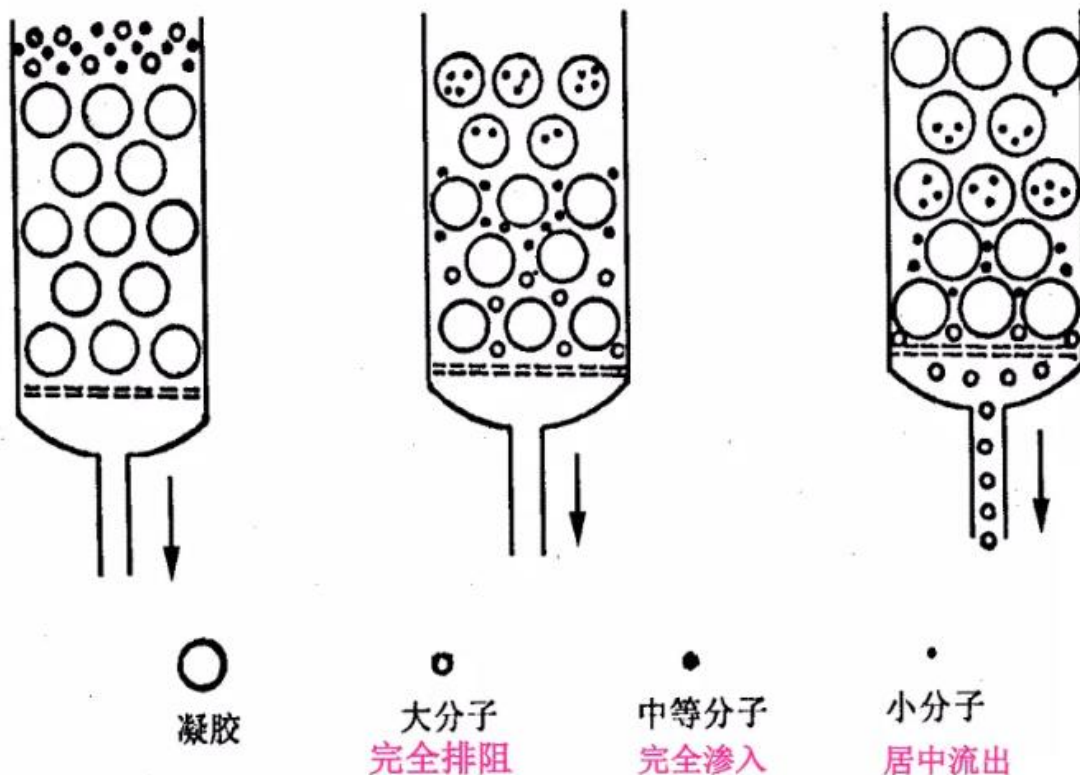
粗颗粒，100–300 μm ：主要用于脱盐、缓冲液交换，分离效果不佳。

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=20: 1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。

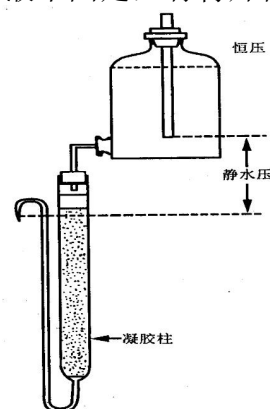
凝胶过滤的上样量一般为不大于 5% 的柱床体积 (即 100ml 的柱体积上样量不要大于 5ml, 浓度自定, 但是样品一定要完全溶解, 如果是多糖类粘度高应进行稀释。), 我们建议初次上样控制在 1-2% 的柱床体积, 视分离情况可以调整; 脱盐时上样量可以达到 20% 的柱床体积, 柱高的选择也与分离要求相关, 柱子越高, 分离效果相应越好, 但是, 柱高过高的凝胶柱会引较大的反压, 也应当尽可能避免。难分离物质要有一定柱高和流速控制, 脱盐时高径比为 5: 1 即可。

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: $V = \pi (r^2) h$

$\pi \cdots \cdots 3.14$; $r \cdots \cdots$ 柱子内半径; $h \cdots \cdots$ 柱高。

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

B. 计算填料质量:

$m = V / \text{溶胀倍数}$

例如需要 G-50 的 600ml 柱体积: $m = 600 / 8 = 75 \text{g}$ 。

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