

---

# NW Super 100&150

凝胶过滤层析介质

## 产品使用说明书

文件编号：NM-A-DF-0106

版本号：A1

# NW Super 100&150

## 凝胶过滤层析介质

NW Super 100&150 是用于生物分子分离纯化的琼脂糖凝胶层析介质。它是以琼脂糖为原料，高度交联葡聚糖而制成的微球，具有亲水、多孔的特性，常用于蛋白质、多糖、核酸等生物样品高分辨率分离纯化。是生物分子（蛋白质）首选的凝胶过滤层析介质。

NW Super 100&150 凝胶过滤层析介质有以下特点：

- 凝胶介质颗粒均一，分辨率高，通常柱效在 12000 以上
- 可以在较高的流速下达到分离
- 化学稳定性、物理稳定性高
- 高产率
- 简单放大生产

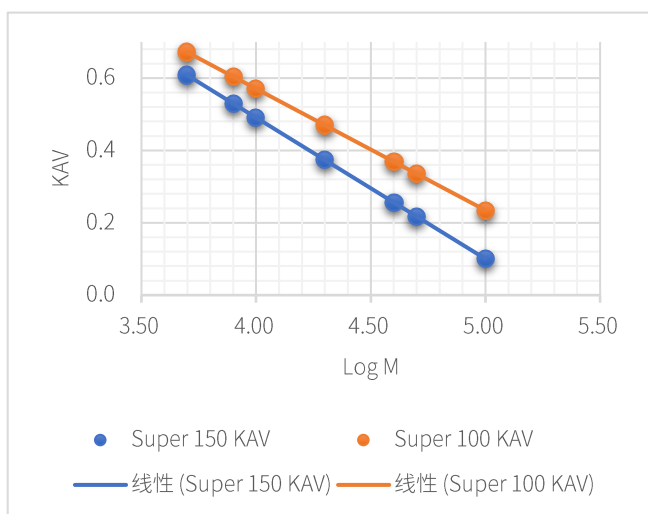


图 1. NW Super 100&150 标准葡聚糖分子量选择曲线。

NW Super 100&150 的分离纯化原理是分子筛原理（或凝胶过滤原理），分子筛是最简单、最温和的层析技术，分子筛原理（凝胶过滤原理）主要应用于高分辨率分离纯化。

高分辨率分离：根据生物分子大小差异进行分离。高分辨率分离可以将样品分离为一种或多种组份，例如：从聚集体中分离单体或从单体分子中去除聚集体，测定分子量或分子量分布分析。注意：天然蛋白有空间结构，所以在某些情况下，例如蛋白的分子量的大小与蛋白质的天然结构的大小可能不一致。即：某些大分子天然结构的蛋白在凝胶过滤的分离行为可能小于分子量稍小的线性分子。

NW Super 100 主要设计分离 5k-100KD 的蛋白分装；

NW Super 150 主要设计分离 5k-250KD 的蛋白分装。

NW Super 100&150 凝胶过滤层析介质技术参数如表 1 所示。

表 1. NW Super 100&150 的技术参数。

产品型号	NW Super 100	NW Super 150
分离原理	分子筛	
基质	高交联琼脂糖和葡聚糖微球	
平均粒径（水溶胀）	24-44 $\mu\text{m}$	
分离范围（球状分子）	5~100 KD	5~250 KD
最大流速	90 cm/h	
流速范围	30-60 cm/h	
耐压	0.3 MPa（最大耐压 0.5 Mpa）	
pH 稳定性	3-12（工作），1-14（CIP）	
化学稳定性	常见水相溶液，1 M NaOH、6M 盐酸 胍、30%异丙醇、70%乙醇	
使用温度	4-40°C	
存储条件	20%乙醇，4-30 °C	

## 使用前的准备工作

### 1. 建议使用的层析柱类型:

根据应用领域选择层析柱:

高分辨率分离:

一般选用柱高 60 cm 以上的层析柱。

在工艺放大设计中, 一般层析柱高不变, 放大层析柱直径。

### 2. NW Super 100&150 琼脂糖层析介质处理

2.1 根据层析柱的体积计算需要的 NW Super 100&150 匀浆的量

$$\text{层析柱体积} = \text{层析柱底面积} \times \text{柱高}$$

$$\text{层析介质质量 (mL 或 L)} = (\text{柱体积} \times \text{层析介质压缩比})$$

层析介质压缩比=1.15 (一般在 1.15-1.2 之间)。

2.2 将沉实的介质混匀后倒入量筒中, 自然沉降 24 小时后, 测量匀浆浓度 (新介质的匀浆浓度在 70-75%)。

$$\text{层析匀浆的量} = \text{层析介质质量} / \text{层析介质的匀浆\%}$$

层析介质匀浆浓度 (沉淀层析介质体积与匀浆体积比例), 一般装柱的匀浆比例在 50-70%。匀浆浓度过高, 搅拌时容易产生气泡, 不利于装柱; 匀浆浓度过低, 匀浆体积过大, 不能一次性将层析介质匀浆倒入层析柱中, 不利于柱效。

注意:

- 层析介质最好在室温保存。但是注意冬季低温时, 层析介质储存时不能结冰。
- 装柱时, 层析介质的温度最好与装柱缓冲液, 层析柱, 层析系统一致。防止温度变化产生气泡。
- 在凝胶搅拌过程中不要使用磁力搅拌子搅拌, 使用磁力搅拌子会导致介质颗粒破裂。
- 为了得到较好的柱效, 层析介质最好脱气处理, 一般负压下脱气。或使用高压灭菌的方法脱气, 灭菌。
- 使用 20% 乙醇保存时注意气泡。

注意:

层析柱温度与层析介质不一致, 可能在装柱过程中会损毁层析柱。

## 装柱

请参考层析柱使用手册 (不同公司生产的层析柱, 使用方法不同, 操作不当可能会损害层析柱和层析介质)。

- 装柱缓冲液一般使用去离子水或 0.15 M NaCl、平衡缓冲液。
- 调整层析柱使其保持竖直。
- 层析柱底膜排气, 层析柱底部保留 1 cm 高装柱缓冲液。

- 加装装柱器, 一般装柱高度超过层析柱的 2/3 时, 需要加装装柱器。
- 将搅匀后的胶悬液一次缓慢倒入层析柱内, 注意不要带入气泡, 倒入后用搅胶棒再次搅拌均匀。
- 层析柱柱头连接, 注意柱头与系统或蠕动泵之间加压力表 (装柱时监控装柱压力是非常重要的。工业规模层析柱需要加装压力表), 将层析柱头膜排气。
- 将层析柱头插入层析柱, 使层析柱底膜接触到液面, 除去液面与层析柱头膜间的气泡。
- 连接系统或蠕动泵, 调整流速。控制压力, (注意此压力为加载在层析柱上的压力)。
- 随着流速, 层析介质界面逐渐下降。待层析介质界面稳定后 (30 min 内层析界面不再下降), 标记界面位置。
- 停泵, 卸下装柱器 (如果需要)。将柱头下降至层析介质界面 (标记位置下 0.5 cm)。
- 按照停泵前流速继续压胶 20-30 min。如果层析介质界面稳定, 则装柱完成。

建议装柱流速 (实际根据层析系统以及层析柱确定)。

第一步: 建议流速	30 cm/h
第二步: 恒压	3-3.5 bar

## 柱效评价

### 1. 柱效测定

可以采用丙酮或 NaCl 作为指示剂, 按照下表配制指示剂溶液和流动相。

样品	1.0% (v/v) 丙酮水溶液	2 M NaCl (溶于水)
样品体积	1.0%柱体积	1.0%柱体积
流动相	水	0.4 M NaCl 水溶液
流速	30 cm/h	30 cm/h
检测器	UV 280 nm	电导率

### 2. 计算柱效:

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:

$$\text{HETP} = L/N$$

$$N = 5.54(VR/Wh)^2$$

其中：VR=保留体积

Wh=半高峰宽

L=柱高

N=理论塔板数

VR 和 Wh 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

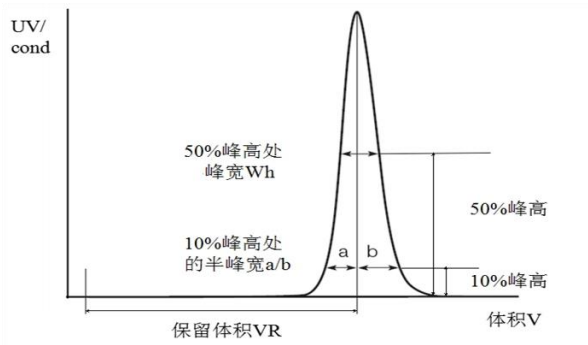
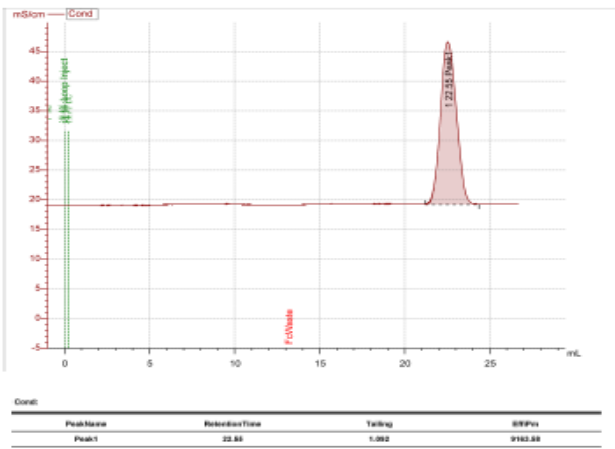


图 2. 柱效检测。



Super 100 装柱 10/30 层析柱柱效

### 3. 结果评价

由以上公式计算出的 HETP 的数值若大于三倍溶胀后的介质平均颗粒大小且非对称因子在 0.8~1.3 则判定为合格。对于不理想的柱效需要分析原因并重新装柱。

对于不同应用领域，所需要的柱效不同：

在高分辨率分离时，柱效要求较高；HETP 在 2-4 倍的介质平均颗粒。NW Super 100&150 的 HETP 值一般>8000。

## 层析方法

### 1. NW Super 100&150 的分离原理

NW Super 100&150 采用分子筛（凝胶过滤）原理进行分离纯化，根据生物分子通过层析柱（装填好的层析介质），按照生物分子的大小（一般按照分子量的大小）进行分离。生物分子不与层析介质结合，只是流过层析介质的孔径进行分离的。因此，缓冲液的成分不直接影响分离效果（分辨率）。

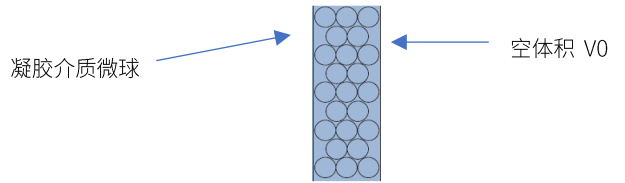


图 3. 层析柱示意图。

柱床体积 Vc 为层析柱的物理体积，等于层析柱底面积×柱高

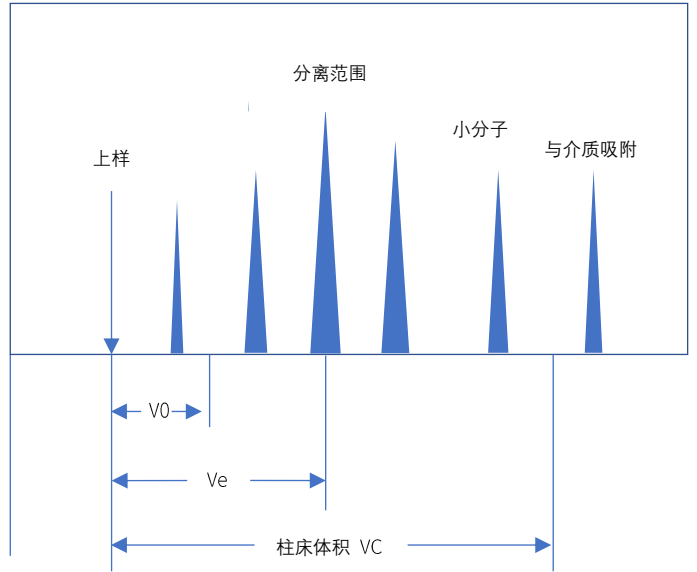


图 4. 凝胶过滤分离示意图。

NW Super 100&150 为琼脂糖亲水性微球，是惰性材料，一般不与生物分子发生反应。凝胶过滤是一个温和的分离纯化技术，温度、盐浓度、pH 值等均不影响分离效果。在层析过程中，样品逐渐由原缓冲液过度到流动相

中, 样品溶解缓冲液和流动相缓冲液尽可能使用相同的组分, 缓冲液成分不同时注意样品的溶解度。

## 2. 建议使用的层析柱

NW Super 100&150 为凝胶过滤 (分子筛) 层析介质, 使用的层析柱按照纯化分离的规模确定。

### a) 实验室规模

对于实验室规模的纯化, 一般按照需要的处理样品的量决定。凝胶过滤 (分子筛) 层析介质的上样量按照应用选择。

高分辨率分离: 一般上样量在 1-5% 的柱床体积, 根据实验确定具体上样量。

### b) 生产规模

用于生产规模的层析柱, 同样也要按照样品量选择层析柱。层析柱的高度与实验小试的柱高一致。

## 3. NW Super 100&150 建议使用的缓冲液

分离纯化过程中的缓冲液选择一般按照以下原则:

a) 生物分子稳定的缓冲液 pH、盐浓度。如果使用样品不稳定的缓冲液, 样品在分离纯化中会聚集、沉淀, 堵塞层析柱的筛网以及层析介质, 影响柱压以及样品的收率。

b) 为了减少非特异吸附 (提高收率), 一般缓冲液中加入 0.15 M 的盐 (例如 NaCl)。

c) 有机试剂可以添加, 但是在高浓度的有机试剂, 层析介质可能会使微球收缩, 所以在添加有机试剂前注意层析介质的化学耐受性。

d) 在使用有机试剂 (例如: 甘油) 注意粘度的影响, 高粘度的缓冲液会影响分离纯化效果。样品的缓冲液成分有可能会影响分离纯化的效果。

## 4. NW Super 100&150 一般的步骤

a) 平衡: 平衡缓冲液平衡层析柱 1-2 柱床体积 (CV)。待 UV、电导率以及 pH 曲线稳定后即可上样。

b) 上样: 一般上样 1-5% 的柱床体积。

c) 洗脱: 使用平衡缓冲液洗脱, 一般 1-1.5 CV。

d) 洗脱后按照试验要求, 可以连续上样。

e) 如果试验结束, 需要使用保存液 (脱过气的 20%乙醇) 1-1.5 CV 保存。

如果需要清洗, 按照 CIP 方法

## 5. 层析柱以及层析介质的保存

长期不使用的介质: 建议层析介质从层析介质拆卸出来, 使用 20%乙醇 (0.01 M NaOH) 室温, 密封保存。

短期保存: 可以在层析柱中使用 20%的乙醇 (0.01 M NaOH) 室温保存。

## 层析应用

### 1. 高分辨率分离:

a) NW Super™ 75 系列琼脂糖凝胶层析介质一般用于分离 3K-70KD 蛋白的分离

b) 一般采用较长的柱长一般 60cm 以上。

c) 上样量在 1-5%。

d) 流速对分辨率影响较大, 一般采用较低的流速。

e) 加 150mMNaCl 有利于减少非特异吸附。

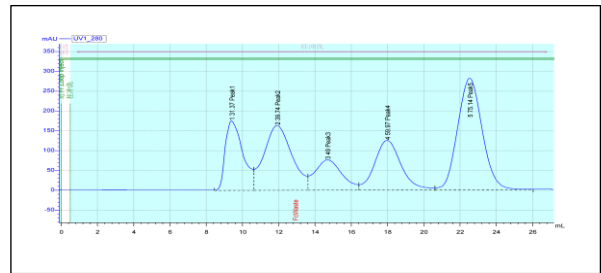


图 5. NW Super 150 (16/70 柱 120ml)层析图谱

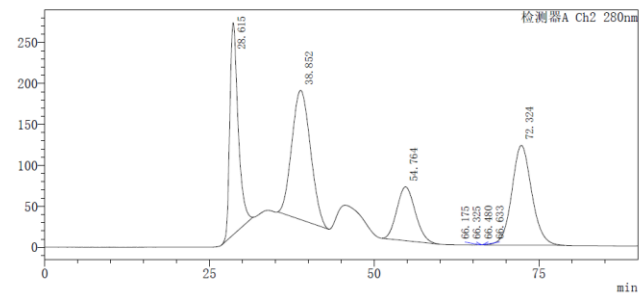


图 6. NW Super 100 (10/30 柱 24ml)层析图谱

层析条件:

层析柱: XK (GE) 16/70 空柱

层析介质: NW Super 100 批号:L11D2503

NW Super 150 批号:L11D2103

缓冲液: 50mM PB+0.15M NaCl, pH 7.0

样品: 蓝色葡聚糖 2000 (3 mg/ml), BSA (8.0 mg/ml); B-lactoglobulin (3mg/ml); cytochrome C (1.0mg/ml); VB12 (0.3mg/ml)。

上样量: 100 μL

流速：1 mL/min

样品分子量：

峰 1：蓝色葡聚糖 2000 MW 2000KDa

峰 2：BSA, MW 66 KDa

峰 3：Lactoglobulin, MW 18 KDa

峰 4：Cytochrom C, MW 13.7KDa

峰 5：VB12: 1.4 KDa

## 层析介质清洗与再生 (CIP)

NW Super 100&150 系列介质在使用一段时间后有可能柱效下降，分离效果变差，可采用下面的流程进行清洗和再生。

- 用蒸馏水冲洗 2 个柱体积
- 用 1 M NaCl 冲洗 1 个柱体积
- 用 0.2 M NaOH 冲洗 1 柱体积
- 用蒸馏水冲洗 4 个柱体积

## 层析介质灭菌

NW Super 100&150 可以使用 121°C, pH 中性, 高压灭菌 30 min, 或者采用 0.5 M NaOH 处理 30 min 达到灭菌的目的。

## 层析介质长期储存

NW Super 100&150 在阴凉干燥处密闭存放，储存于 20%乙醇中，为了防止乙醇挥发以及微生物生长，建议 3 个月更换一次新鲜的 20%乙醇。

## 销毁及回收

由于 NW Super 100&150 系列介质在自然界很难降解，为了保护环境建议采用焚烧处理。

## 附录

### 转换公式

$$\text{线性流速 (cm/h)} = \frac{\text{体积流速 ml/min}}{\text{层析柱底面积 cm}^2} \times 60$$

$$\text{体积流速 (ml/min)} = \frac{\text{线性流速 cm/h} \times \text{层析柱底面积 cm}^2}{60}$$

$$1 \text{ Mpa} = 10 \text{ bar} = 14.5 \text{ psi}$$

### 化学稳定性

化学试剂	中文	稳定性
30% Acetonitrile	乙腈	OK
70% ethanol	乙醇	OK
6 M Guanidine Hydrochloride	盐酸胍	OK
30% Isopropanol	异丙醇	OK
2 M NaOH	氢氧化钠	OK
1% SDS	SDS	OK
8 M Urea	尿素	OK

## 问与答

如果您在使用 NW Super 100&150 凝胶过滤层析产品遇到任何问题，请参考下表进行解决或联系我们。

---

### 问题 1 层析搅拌为匀浆后，会有一些细小白色的泡沫漂浮？

这种现象一般是在使用一段时间，或在介质搅拌中使用了磁力搅拌器或介质转移中使用了蠕动泵，造成介质微球破碎。或介质长时间没有使用，介质沉降过实，开始搅拌太过剧烈。或者是层析介质在抽滤更换缓冲液时，介质脱水时间长，造成介质内部孔脱水，新加了液体后，介质孔内没有完全浸润液体。缓慢搅拌后，沉降 20-30min 后，即可。

---

### 问题 2 装柱时是否需要脱气？

凝胶过滤层析在较高的柱效下才能达到最佳分离效果，柱效一般为层析介质平均粒径的 2-4 倍。气泡对层析介质的分离有较大的影响，所以在装柱前最好做脱气处理，尽量避免引入气泡。避免以下操作：

- a) 快速搅拌。
- b) 抽滤换液时，凝胶脱水时间过长。
- c) 有机溶液与水混合时气泡很多。
- d) 直接使用管道中放出的纯化水等。
- e) 脱气的最好方法是：高压灭菌，真空脱气。

---

### 问题 3 介质微球出现破碎（有碎片）了，是否可以继续使用？

如果碎片极为少量 1-3% 以下，显微镜观察。对于脱盐等应用可以继续使用。如果不能确定碎片的含量需要更换新的层析介质。

---

### 问题 4 为什么我的样品总是在 1CV 之后出现？

一般样品与介质发生了吸附，样品的行为没有按照凝胶过滤的原理。对于这种现象一般先检测试验目的是否达到，如果达到预期可以按照这种条件分离。如果没有到达，一般提高洗脱缓冲液的盐浓度。在一般的纯化中缓冲液的浓度在 20-50mM。

---

### 问题 5 是否可以重复上样，可以重复上样多少次？

检测纯化目的是否达到，层析介质是否被污染。一般样品澄清、无颗粒、沉淀，分离后的样品同样澄清，此类样品可以重复上样 10-15 次。如果样品为乳浊液，一般在纯化过程中柱压可能会升高，这种情况要注意观察柱压，超过 1 bar，柱床会压缩。

---

### 问题 6 样品稀释了，浓度很低？

凝胶过滤技术本身就是一种稀释的技术，这是这个技术的缺点。可以从提高上样品浓度或提高上样体积分解决。在样品浓缩时，注意样品的粘度。

---

### 问题 7 层析介质变色，结块，怎么办？

这种现象一般是使用过一段时间的层析介质，层析介质被样品污染，例如：样品中的色素、脂类以及核酸类物质；尝试不同的 CIP 方法解决。对于维护好的层析介质，NW Super 系列层析介质可以一般使用 300-600 次，对于样品复杂的样品可以使用 100-200 次。

---

### 问题 8 如何确定层析介质的寿命

在实验室使用：一般从层析介质的柱压，流速，颜色等简单判断介质寿命。在工业生产中：需要严格按照工艺验证的方法确定介质寿命。

---

## 订货信息

产品型号	包装	货号
NW Super 100	150 mL	60013-030000-2150
	500 mL	60013-030000-2500
	1 L	60013-030000-1001
	5 L	60013-030000-1005
	10 L	60013-030000-1010
NW Super 150	150 mL	60013-030100-2150
	500 mL	60013-030100-2500
	1 L	60013-030100-1001
	5 L	60013-030100-1005
	10 L	60013-030100-1010

注：可以提供 7.7 mm × 22 mm 、 16 mm × 25 mm 、 7.7 mm × 100 mm 的层析预装柱。更多规格型号或定制需求，请联系我们。

## 苏州纳微科技股份有限公司

全国咨询热线：400-828-1622

邮箱：info@nanomicrotech.com

(本产品仅限科研或工业使用)

中文网站：www.nanomicrotech.com

英文网站：en.nanomicrotech.com

2022-苏州纳微科技股份有限公司版权所有

总部地址：苏州工业园区百川街2号 215123

2022年6月第一版

