
NW Dex G-25 系列葡聚糖

凝胶过滤层析介质

产品使用说明书

文件编号：NM-A-DF-0101

版本号：A2

NW Dex G-25 系列葡聚糖

凝胶过滤层析介质

NW Dex G-25 系列葡聚糖凝胶是用于生物分子分离纯化的层析介质。它是以前葡聚糖为原料，经交联剂而制成的葡聚糖微球，具有亲水、多孔的特性，常用于病毒、蛋白质、多糖、核酸等生物样品的缓冲液置换、脱盐和去除小分子物质，也可以用于多肽、寡核苷酸的分离纯化以及抗生素、化学合成药物、天然产物的分离纯化，还可用于化工中纳米材料的提纯以及环保领域的污水处理等领域。

NW Dex G-25 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）主要应用于以下两个领域：

组份分离：

根据分子的大小差别将样品分为主要两个组群--大分子组与小分子组，从而达到分离的目的。例如：蛋白质分子与盐分子，大病毒颗粒分子与小分子污染物。主要用于病毒分离，脱盐以及缓冲液更换。

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。

非凝胶过滤分离（吸附），例如：芳香族小分子（嘌呤、吡啶等），也有在低离子浓度下发生离子吸附。

另一方面的应用，在某些条件下，通过控制改变缓冲液条件，凝胶过滤层析也可以用于变性蛋白的重新折叠。

NW Dex G-25 最常用的应用：脱盐以及缓冲液更换。

NW Dex G-25 根据凝胶颗粒大小分为以下四种类型：

- NW Dex G-25 C 即粗颗粒
- NW Dex G-25 M 即中颗粒
- NW Dex G-25 F 即细颗粒
- NW Dex G-25 SF 即超细颗粒

NW Dex G-25 系列葡聚糖层析介质技术参数如表 1 所示。

表 1. NW Dex G-25 系列葡聚糖层析介质的技术参数。

产品型号	NW Dex G-25 C	NW Dex G-25 M	NW Dex G-25 F	NW Dex G-25 SF
分离原理	分子筛			
基质	葡聚糖微球			
平均粒径 (水溶胀)	320 μm	140 μm	80 μm	50 μm
分离范围 (线性分子)	1×10 ² ~1×10 ³ D			
分离范围 (球状分子)	1×10 ³ ~5×10 ³ D			
最大流速	1400 cm/h	640 cm/h	360 cm/h	80 cm/h
耐压	0.5 MPa			
pH 稳定性	2-13			
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:

按照应用领域选择层析柱:

- 组份分离:
一般选用柱高 30cm 左右的层析柱
- 高分辨率分离:
一般选用柱高 60cm 以上的层析柱。
- 非凝胶过滤分离 (吸附分离):
按照实验室小试试验决定。

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 Dex G-25 葡聚糖层析介质处理

2.1 根据层析柱的体积计算需要的 NW Dex G-25 干粉的量:

层析柱体积=层析柱底面积 × 柱高;

干粉的量 (g) = 柱体积 × 1.15 ÷ 4.5

其中, 1.15 为层析介质压缩比, 4.5 为介质溶胀系数

将称量好的凝胶介质倒入容器, 将 5 倍干粉重量的 80~100°C 的 0.1 M NaCl 中并搅拌均匀, 保持 80~100°C, 凝胶溶胀 1h; 或者室温溶胀至少 4h 以上或过夜。也可以搅拌均匀后使用高压锅 121°C, 20min 高压灭菌处理。

注意:

- a) 在使用电炉或电磁炉保持 80~100°C 时, 应缓慢搅拌, 防止底部局

部温度过高, 使凝胶损毁。

- b) 在凝胶溶胀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。
- c) 常温溶胀后最好在负压下脱气。溶胀完成后 (高温溶胀需等到冷却到室温), 去掉部分上层清液, 使沉降胶的体积占总体积的 50%~75%, 搅匀备用。
- d) 凝胶温度过高可能在装柱过程中会损毁层析柱。

层析柱装填

- 1) 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);
- 2) 装柱缓冲液一般使用去离子水或平衡缓冲液;
- 3) 调整层析柱水平;
- 4) 层析柱底膜排气, 层析柱底部保留 1cm 装柱缓冲液;
- 5) 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;
- 6) 将搅匀后的胶悬液一次性缓慢倒入层析柱内, 注意不要带入气泡, 倒入后用搅胶棒再次搅拌均匀;
- 7) 层析柱柱头连接, 注意柱头与系统或蠕动泵之间加压力表 (工业规模层析柱需要), 将层析柱头膜排气;
- 8) 将层析柱头插入层析柱, 使层析柱头底膜接触到液面, 除去液面与

层析柱头膜间的气泡；

- 9) 连接系统或蠕动泵，调整流速。控制压力，不要超过 3 bar；
- 10) 随着液流，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；
- 11) 停泵，卸下装柱器 (如果需要)。将柱头下降至层析介质界面 (标记位置再下 0.5 cm)；
- 12) 按照停泵前流速继续压胶 20-30 min。如果层析介质界面稳定，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)

	G-25 C	G-25 M	G-25 F	G-25 SF
建议流速 (cm/h)	450	300	150	100

柱效评价

柱效测定可以采用丙酮或者 NaCl 作为指示剂，按照下表配制指示剂溶液和流动相

表 2. 柱效评价参数表。

样品	1.0% (v/v) 丙酮水溶液	2 M NaCl 溶液
上样量	1.0%柱体积	1~5 % 柱体积
流动相	水	0.4 M NaCl 溶液
线性流速	30 cm/h	30 cm/h
检测	UV 280 nm	电导检测器

体积流速计算参考附录，流速转换公式

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：

$$HETP=L/N$$

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

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；

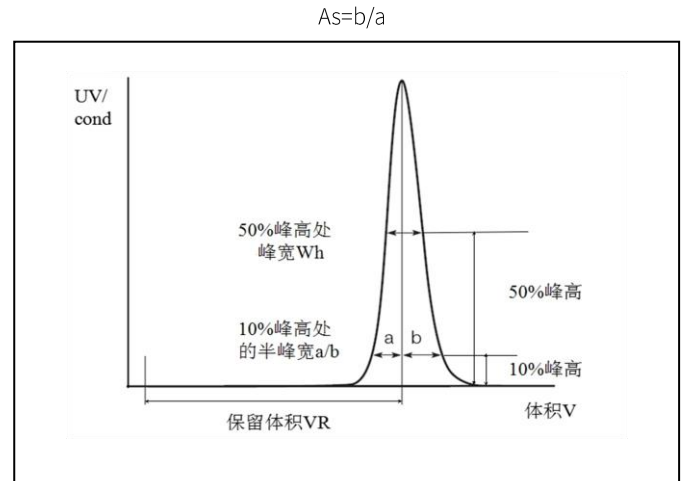


图 2. 柱效检测。

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。

结果评价

由以上公式计算出的 HETP 的数值若小于的介质平均颗粒直径的三倍，且非对称因子在 0.8~1.8 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：

当纯化分离需要高分辨率时，对柱效要求较高，HETP 在 2-4 倍的介质平均颗粒直径组份分离时。

层析方法

NW Dex G-25 的分离原理

NW Dex G-25 的纯化分离是凝胶过滤 (分子筛) 原理。凝胶过滤根据生物分子通过层析柱 (装填好的层析介质)，按照分子的大小 (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)。

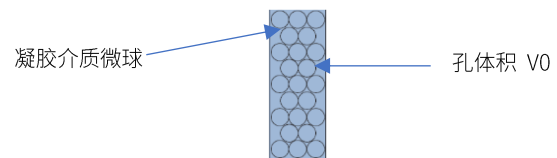


图 3. 层析柱示意图

柱床体积 Vc 层析柱的物理体积，层析柱底面积 × 柱高

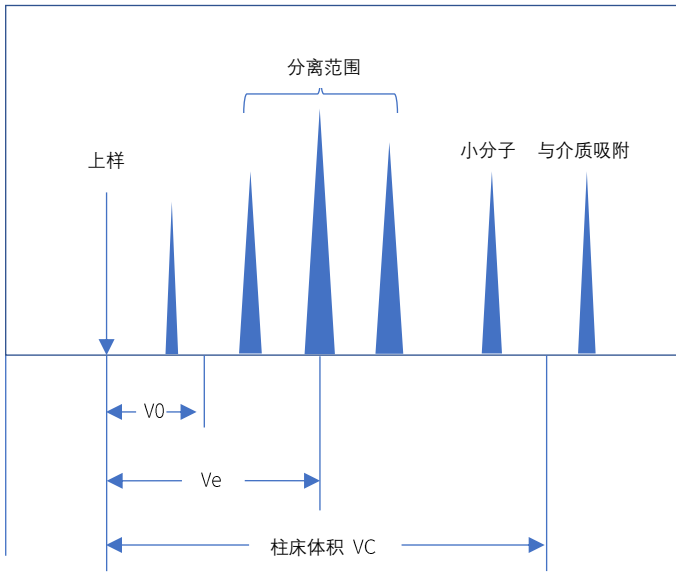


图 4. 凝胶过滤分离示意图。

NWDexG-25 葡聚糖亲水性微球，是惰性材料，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渡到流动相中，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。

建议使用的层析柱

NWDexG-25 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：

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：

- 组分分离：一般在 10-30% 的柱床体积；上样量低（10% 左右）分离效果好，上样量大（30% 以上）分离效果下降。
- 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

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。

NW Dex G-25 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：

- 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，影响柱压以及样品的收率。
- 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）。

- 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，所以在添加前注意层析介质的耐受性。
- 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。
- 样品的缓冲液同样也会影响分离纯化的效果。

NW Dex G-25 介质进行一般的步骤

- 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；
- 上样：一般上样 1-5% 的柱床体积；
- 洗脱：使用平衡缓冲液洗脱，一般 1-1.5 CV。洗脱后按照试验要求，可以连续上样。

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。

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% 乙醇室温，密封保存。

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

层析应用

不同的应用领域：

组份分离：

- 组份分离一般上样量在 10-30% 柱体积，按照试验对盐浓度的要求确认上样量。
- 流速对组份分离影响不大，在合适的压力下，可以选用较大的流速。

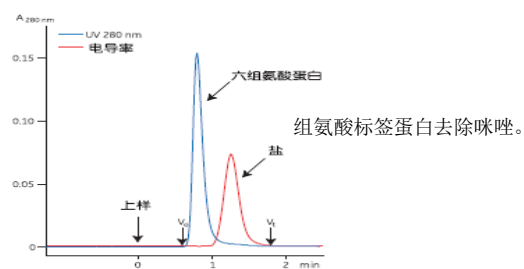


图 5. 缓冲液更换或去除有害物质。

高分辨率分离：

- NW Dex G-25 系列葡聚糖凝胶层析介质一般用于分离 1K-5KD 的多肽的分离。
- 一般采用较长的柱长一般 60 cm 以上。
- 上样量在 1-5%。
- 流速对分辨率影响较大，一般采用较低的流速。

e) 加 150 mM NaCl 有利于减少非特异吸附。

层析介质清洗与再生

NW Dex G-25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

溶胀后的 NW Dex G-25 可以使用 121°C高压灭菌 30min，或者采用 0.5M NaOH 处理 30min 达到灭菌的目的。

层析介质长期储存

干粉 NW Dex G-25 在阴凉干燥处密闭存放，防止吸潮；溶胀后的 NW Dex G-25 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，保存在 4~8°C 环境中的效果更好。

包装

纳微科技生产的 NW Dex G-25 葡聚糖系列层析介质有两种包装：固体粉末包装，在运输过程中使用室温运输。最高温度<40°C。

销毁及回收

由于 NW Dex G-25 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。

试剂	耐受性
2-chloroethanol 30%	Ok
2-mercaptoethanol 0.1M	Ok
Acetic Acid 50%	可以用于平衡以及洗脱
Acetone 60%	Ok (介质会收缩)
碱溶液溶液	Ok
NH ₄ OH	OK
盐溶液	Ok
CHAPS 30mM	Ok
Choroform/methanol 3:1	Ok
葡聚糖酶	避免使用
Dimethyl Sulphoxide	Ok
Dioxane 50%	Ok
Dithiothreitol 1mM	Ok
Ethanol 95%	Ok
Formate buffer 0.1M	Ok
Formic acid 10%	Ok
Glycine-Hcl 0.1M pH 1.0	Ok
Guaniine hydrochloride 6M	Ok
Hydrazine 80%	Ok
Hydrochloric acid 0.1M	Ok
Methanol 75%	Ok
Oxidizing aganets	避免使用
Piperidine 1M	Ok
Propionic acid 1M	Ok
Pyridine 1M	Ok
Sodium borohydride 4mg/ml	Ok
Sodium deoxycholate 16mg/l	Ok
Sodium dodecyl sulphate 3%	Ok
Urea 8M	Ok

NW Dex G-25 试剂稳定性和耐受性

问与答

如果您在使用 NW Dex G-25 层析介质产品遇到任何问题，请参考下表进行解决或联系我们。

问题 1 装柱时层析柱玻璃破碎？

这种现象一般是新介质装柱时出现，主要原因是层析介质没有完全溶胀。在使用时一定要注意层析介质的溶胀倍数，尤其是 G-50/75/100 的介质。在溶胀时没有完全溶胀，装柱后介质在缓冲液中继续溶胀将层析柱涨破。

问题 2 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 20-30 min 后，即可。

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 1 CV 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 20-50 mM。

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 脱盐后，样品稀释？

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。可以从提高上样样品浓度或提高上样体积部分解决

问题 7 层析介质变色，结块，怎么处理？

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。对于一般的样品 NW Dex 系列层析介质可以使用 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 Dex G-25 C	100 mL	60011-003401-2100
	500 mL	60011-003401-2500
	1 L	60011-003401-1001
	10 L	60011-003401-1010
NW Dex G-25 M	100 mL	60011-003301-2100
	500 mL	60011-003301-2500
	1 L	60011-003301-1001
	10 L	60011-003301-1010
NW Dex G-25 F	100 mL	60011-003201-2100
	500 mL	60011-003201-2500
	1 L	60011-003201-1001
	10 L	60011-003201-1010
NW Dex G-25 SF	100 mL	60011-003101-2100
	500 mL	60011-003101-2500
	1 L	60011-003101-1001
	10 L	60011-003101-1010

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

中文网站：www.nanomicrotech.com

总部地址：苏州工业园区百川街 2 号 215123

邮箱：info@nanomicrotech.com

英文网站：en.nanomicrotech.com

(本公司产品仅限科研或工业使用)

2022-苏州纳微科技股份有限公司版权所有

2022 年 6 月第一版

