

分子筛填料产品说明书

1、产品介绍

Superdex系列产品是将葡聚糖键合到交联琼脂糖基架上形成的高性能分子筛填料。该复合填料微球的平均粒径在 35 μm 左右，融合了琼脂糖优良的力学性能和葡聚糖网络的高选择性。相较于传统的分子筛填料，Superdex系列具有刚性强、分辨率高、流速快等优势，可用于除盐、换液等组族分离过程，也可以用于分子量相近的多肽、蛋白质、核酸等生物大分子以及天然药物各组分的分级分离过程。

2、产品特点与技术指标

品名	分子筛30	分子筛75	分子筛200
目录号	BN26143	BN26144	BN26145
外观	乳白色凝胶微球分散液，也可提供冻干粉末（定制）。		
填料粒径范围, μm	20~50 μm 范围的微球体积占比>80%		
填料平均粒径, μm	~35		
冻干粉溶胀 w/w ^a	5.5 \pm 0.5	8.5 \pm 0.5	11.5 \pm 0.5
球蛋白分离范围, Da	<1 \times 10 ⁴	3 \times 10 ³ ~7 \times 10 ⁴	1 \times 10 ⁴ ~6 \times 10 ⁵
流速	推荐工作流速为 15~100 cm/h，最大流速>300 cm/h		
pH 稳定性, (操作)	3~12		
pH 稳定性, (CIP)	1~14		
耐反压, MPa	0.3		
化学稳定性	在各种常用的缓冲液体系中均稳定，如 6 mol/L 的盐酸胍，1 mol/L 的乙酸，8 mol/L 的尿素，30%异丙醇；可用 0.5~1 mol/L 的 NaOH 在位清洗。		
灭菌	pH=7, 121 $^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 30 min		
储存与运输	2~30 $^{\circ}\text{C}$, 20%乙醇		

注：^a 溶胀完全后与冻干粉的质量比，溶胀微球沉降后的表观密度为 1.05 g/mL。

3、使用方法参考

3.1 色谱柱装填

Superdex填料的装柱方法与琼脂糖凝胶微球一致，避免了葡聚糖分子筛填料装柱前需要溶胀的过程。以下阐述与层析系统连接时，Superdex填料的色谱柱装填方法。

(1) 所有需要用到的材料的温度要与色谱操作的温度一样，液体最好做脱气处理。

(2) 填料用量计算：通过沉降定量填料体积，需要的沉降填料体积=柱体积×1.15~1.20（即压缩比约为1.15~1.20）。沉降体积是指填料在20%乙醇保存液中自然沉降24 h以上读取的稳定体积。冻干粉需溶胀完全后使用。

(3) 填料清洗：将填料悬液充分摇匀后量取相应体积，抽去液体，并用约3倍填料体积的纯化水洗涤，重复3次，以除去保存液。

(4) 装柱填料悬液准备：将清洗好的填料转移到适当的容器中，加入填料体积的三分之一到一倍的纯化水制成50~75%的装柱填料悬液，使用前搅匀。

(5) 装填前准备：在清洗干净的层析柱下端加入蒸馏水，以除去下垫片及层析柱下端的空气，在柱内保留少量的蒸馏水，拧紧下堵头，调整柱子使其垂直于地面。

(6) 装填：将搅匀后的填料悬液一次性缓慢倒入层析柱内（必要时使用装柱器），为避免引入气泡，应使之沿层析柱内壁自然流下。将所有填料加入后，用装柱液将装柱器加满，拧紧装柱器上盖，将柱子与层析系统连接。

(7) 压柱：使柱内填料自然沉降（或低于50 cm/h的流速下沉降），待填料沉降完全后（填料与液体的界面清晰），去除装柱器，装上上柱头，并将柱头下降至界面上约0.5 cm的位置；通过150 cm/h的流速（注意柱压不超过0.3 MPa），继续压柱至界面清晰稳定，标记界面稳定时的柱高。停泵，打开柱头上的阀门/堵头，关闭柱底的阀门/堵头，下压柱头至标记位置下方与压缩比对应的位置，旋紧柱头，装柱完成。

3.2 柱效测定和评价

完成装柱后、使用前可通过柱效测定和评价可以确认层析柱装填质量。柱效通常用理论塔板高度（HETP）和非对称因子（As）来评价。

柱效测定可以采用丙酮或者NaCl作为样品进行，按照下表配制样品溶液和流动相。

样品	1.0%丙酮	0.8~1.0 M NaCl
样品体积	1.0~2.5%柱体积	1.0~2.5%柱体积
流动相	纯水	0.4 M NaCl
流速	30 cm/h	30 cm/h
检测器	UV-280 nm	电导

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:

$$HETP=L/N$$

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

$$As=a/b$$

其中: L 为柱高; V_R 为保留体积; W_h 为半高峰宽; a 为在 10%峰高处的第一个半峰宽; b 为在 10%峰高处的第二个半峰宽。

一般来说, HETP 的数值应小于填料平均粒径的三倍 (即 $HETP/D_{50}<3$, D_{50} 为填料的平均粒径), As 应在 0.7~1.3 之间。

3.3 上样

(1) 缓冲液选择: 一般选用 pH=6~8 的缓冲液, 常用缓冲液有 20-150 mmol/L 的磷酸钠缓冲液、20~200 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液等。可在缓冲液中加入 0.15~0.5 mol/L 的 NaCl, 以消除非特异性吸附作用。

(2) 样品处理: 样品的缓冲液应与所选分离缓冲液一致。样品上柱前应 0.45 μm 过滤。

(3) 上样量: 用于组族分离, 上样量可达柱体积的 20~30%; 用于组分分离, 上样量推荐为柱体积的 0.5~4%, 样品浓缩后上样可增加处理量。

3.4 分离

(1) 使用平衡缓冲液冲洗层析柱, 通过 UV、示差等信号监测流出组分的信息。组族分离时, 一般 1.0 CV 以内可获得目标产物; 分级分离时, 需要 1.5 CV 收集所有的产物组分。

3.5 再生与平衡

(1) 在第二次上样前, 需要对色谱柱进行再生与再平衡。再生过程一般使用平衡缓冲液冲洗层析柱 2~3 CV, 当流出液的电导、pH 等信号与平衡缓冲液基本一致, 即可进行第二次上样。

3.6 在位清洗

使用完的层析柱出现堵塞、压力增大、流速减慢、载量下降等情况时, 就需要进行在位清洗。通常情况下, 推荐使用 5 次后进行在位清洗。Superdex 在位清洗最常用的方法: 使用完的层析柱用蒸馏水清洗 3~5 个柱体积, 然后用 0.5~1 mol/L 的 NaOH 溶液, 清洗 3~5 个柱体积 (保持时间 0.5~1h), 然后用蒸馏水清洗至中性即可。同其它层析介质一样, 为了达到更好的清洗目的, 可以采用反向清洗; 如需去除热源, 可在 1 M NaOH 中保持更长时间 (2 h 以上)。