

## Agarosix 体积排阻填料使用手册

### 一、产品介绍

Agarosix 专门为特殊生物大分子样品纯化而设计，该基质由粒径为球形、多分散，交联度为 6% 的琼脂糖凝胶组成，具有高度的生物相容性和物理化学稳定性。对于某些生物相容性要求较高的样品，琼脂糖基质的 Agarosix 填料可以满足其纯化要求，填料表面的高度亲水性使得样品与固定相间的非特异性吸附降至最低。

### 填料结构

琼脂糖微球是一种生物相容性良好、多孔、亲水、含多羟基的天然多糖型生物填料。

### 填料特性

- ◇ 极强的生物相容性
- ◇ 高载量和高上样量
- ◇ 表面高度亲水
- ◇ 6% 交联度可用于高流速分离纯化
- ◇ 产品供应能力: >500 L
- ◇ ISO 9001:2008 体系下规模化生产，供货周期短
- ◇ 拥有法规支持文件（RSF）

### 技术参数

填料类型	Agarosix		
基质	6%交联度琼脂糖凝胶		
颜色	乳白色，半透明		
物理性质	球形，多分散，软胶		
粒径大小 (μm)	25-100	25-120	45-160
平均粒径大小，D50 (μm)	45	65	90
最大线性流速 cm/hr at 3 bar	>200	>400	>800
体积排阻分子量，球形蛋白 (Daltons)	10,000,000		
pH 使用范围	3-13		
pH CIP 使用范围	2-14		
最大操作压力 (Bar)	3		
储存条件	4-35°C，20%乙醇		
化学稳定性	适用于各种常规有机相/水相及缓冲盐体系。2 M NaOH，8 M 尿素，6 M 盐酸胍，30%异丙醇，70%乙醇，30%乙腈及其它常用试剂		
高温灭菌条件	20 min at 121° C		

## 二、使用说明

### 2.1 安全

有关本产品安全使用的信息，请参阅安全数据书(SDS)。

### 2.2 用前清洗

本产品一般情况下是在含20%乙醇的水溶液中运输的，在使用前需要清洗。清洗可用3倍于介质体积的去离子水冲洗来完成，此操作可作为层析柱装填的一部分（见2.3.3.1节）。

### 2.3 层析柱装填

2.3.1 本方法适用于内径 6.6-50 mm 玻璃层析柱装柱工作及装柱完成后的 QC 检测

#### 2.3.2 装柱前的准备工作

2.3.2.1 场所：装柱场所应清洁、无尘，室温 18°C-35°C，湿度 45%-65%

2.3.2.2 装柱设备及管道：蛋白纯化设备及 FPLC 层析柱管路冲洗干净，管道连接完毕，检查管路是否漏液，压力显示正常

2.3.2.3 FPLC 玻璃层析柱：柱管各部件分离浸泡于 20%乙醇 30 min，去离子水洗净备用

2.3.2.4 QC 检测设备：蛋白纯化设备：最大流速 36-100 mL/min；紫外检测器/电导；色谱工作站

2.3.2.5 其他：1 M NaCl 水溶液、去离子水、天平、量筒、烧杯

#### 2.3.3 装柱过程

2.3.3.1 将填料轻轻搅动，使其完全分散，形成均匀浆液，量取所需要的填料体积，倒于另一干净烧杯中，自然沉降后，倒掉上层 20%乙醇水溶液，加入 3 倍体积的去离子水，轻轻搅拌均匀后自然沉降约 30 分钟，倒掉上清液，如此重复 3 次；

2.3.3.2 倾出上层液体后，倒入装柱缓冲液（1 M NaCl 溶液），使填料匀浆浓度为 50-70%，搅拌均匀后放置 12 小时以上（过夜）；

2.3.3.3 柱出口端向下进行垂直固定，用去离子水略微清洗柱管，去离子水填满柱管，然后利用重力将水排除。

从上述制备的匀浆液中，提取含有约 1.4-2.0 倍（根据匀浆

浓度调整）柱床体积  $v$  的介质的匀浆液，缓慢搅拌匀浆，在去离子水全部排空之前，用玻璃棒延柱管内壁引流匀浆进入柱管内，一次性全部倒入底部装有筛板的层析柱管中，静置片刻，让填料在层析柱内静置片刻至上层出现分层。

（静置片刻不分层也进行下面的操作）封闭出口，用 1M NaCl 溶液缓慢加入柱内，直至液面到达柱上端口处，形成凸液面，用去离子水或装柱缓冲液淋洗适配器的 O 型密封圈。将适配器小心的插入柱管内（可微微倾斜适配器插入，防止有气泡进入柱子），缓慢推动至离柱床表面约 1 cm 处，拧入适配器的固定帽进行固定（不要过紧），打出口，连接层析系统或者装柱泵泵入装柱缓冲液压实柱床；

2.3.3.4 用 1M NaCl 以 90-360 cm/h 进行装柱，（装柱压力不应超过层析柱和填料耐压限），冲洗直至柱床不再下降，记录柱床高度，此时柱床高度除以压缩因子即为柱床理论高度，封闭出口，打出口，保持固定帽，依顺时针方向缓慢转动适配器的调节帽使柱塞移动到柱床理论高度，完成装柱。

#### 2.3.4 QC 检测方法

层析柱质量评价：使用低分子量或无保留的化合物进行柱效评价，具体操作参数如下：

样品	1.0%(v/v)丙酮水溶液	0.8 M NaCl
样品体积	柱床体积的 1%	柱床体积的 1%
洗脱液	水或稀释缓冲液	水或 0.4 M NaCl 水溶液
流速	60 cm/h	60 cm/h
检测	254/280 nm 紫外检测仪	电导检测仪
QC 检测标准	45 $\mu$ m	>4000 N/m
	65 $\mu$ m	>2000 N/m
	90 $\mu$ m	>1000N/m
	拖尾因子 0.8 –1.5	

## 注意事项

非理想柱效的解决办法：出现拖尾峰时，解决方法包括：

- 降低浆液浓度
- 提高装填流速

出现前沿峰时，解决方法与拖尾峰相反。

## 2.4 层析柱使用

2.4.1 根据待分离纯化或分析的样品的具体特性筛选和优化平衡缓冲液体系；

2.4.2 用约 5 倍柱体积平衡缓冲液，平衡层析柱，直到流出液的电导和 pH 不变，和平衡缓冲液一致；

2.4.3 **样品准备**：固体样品可溶解于平衡缓冲液中；低浓度样品可用平衡缓冲液透析增加浓度；高浓度样品可用平衡缓冲液稀释。有杂质的样品应经过滤处理，以避免堵塞层析柱、延长层析柱使用寿命；

2.4.4 **上样**：样品进样量应根据介质的载量和料液中目标物的含量确定；

2.4.5 **样品收集**：根据分离效果优化收集程序；

2.4.6 **在线清洗 (CIP)**：如有杂质未能通过再生步骤得到清除，造成层析柱阻塞，背压增加或流速下降，可通过正向或

反向的在线清洗来恢复层析柱的性能。因为一般情况下，在线清洗会导致柱子的背压增高，所以建议使用 0.5 倍以下的正常应用条件下的线流速。具体在线清洗方法应视杂质的特性而定：

- 对沉淀或变性物质类杂质，用 5 倍柱体积的 0.5 M NaOH 清洗，然后用至少 5 倍柱体积的 0.22  $\mu\text{m}$  过滤的平衡缓冲液或纯化水洗涤；
- 对以强疏水性结合的杂质，用 2 倍柱体积的非离子型去污剂（例如浓度为 0.1-1% 的吐温或 Triton X-100）洗涤柱子，然后立即用至少 5 倍柱体积的无菌过滤平衡缓冲液或纯化水洗涤；也可用 3-4 个柱体积的 70% 乙醇或 30% 异丙酮清洗，然后立即用至少 5 倍柱体积的无菌过滤的平衡缓冲液或纯化水洗涤。

## 三、产品保存

暂时不使用的层析介质，需保存在 4-35 $^{\circ}\text{C}$  密闭的含 20% 乙醇的水溶液中；已装入层析柱的介质，可保存在 4-35 $^{\circ}\text{C}$  含 20% 乙醇的水溶液中。

## 四、订购信息

产品名称	粒径 ( $\mu\text{m}$ )	订货号	包装规格 (L)
Agarosix-45	45	250145990	0.5, 1, 5, 10, 100
Agarosix-65	65	250165990	0.5, 1, 5, 10, 100
Agarosix-90	90	250190990	0.5, 1, 5, 10, 100

预装柱规格为 1.5 mL，也可根据客户的需要提供其它规格的产品和预装柱。