
NW Rose 4 FF / NW Rose 6 FF

凝胶过滤层析介质

产品使用说明书

文件编号：NM-A-DF-0104

版本号：A1

NW Rose 4 FF / NW Rose 6 FF

凝胶过滤层析介质

NW Rose FF 系列琼脂糖凝胶是用于分离纯化生物分子的层析介质。它是以琼脂糖为原料，经过乳化、交联、分筛而制成的琼脂糖微球，具有亲水、多孔的特性，常用于病毒、蛋白质、多糖、核酸等大分子生物样品分离纯化或检测。具有较高的物理、化学稳定性，流速快，适合在大规模分离纯化中使用。

NW Rose FF 系列的分离纯化原理是分子筛原理（或凝胶过滤原理），分子筛是最简单和温和的层析技术，分子筛原理主要应用于以下领域：大生物分子分离纯化，例如：病毒类分子去除杂质，以及缓冲液置换。

NW Rose 6FF 琼脂糖凝胶介质具有以下特性：

- 高的化学和物理稳定性，可以在 pH2-12 范围内应用
- 流速快
- 方便放大生产
- 清洗简单

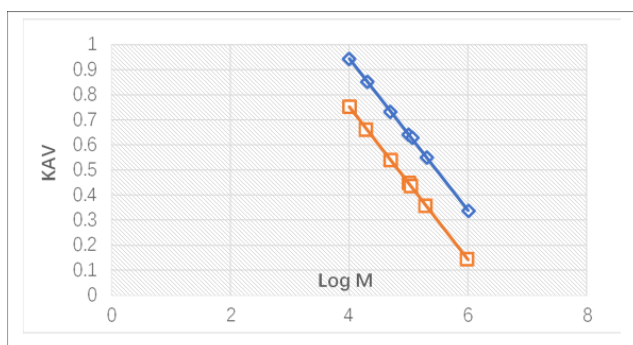


图 1. NW Rose 4/6 FF 的选择性曲线（蓝为 NW Rose 4FF,棕为 NW Rose 6FF）。

NW Rose™ FF 系列层析介质技术参数如表 1 所示。

表 1. NW Rose 4 FF、NW Rose 6FF 的技术参数。

| 产品名称 | NW Rose4 FF | NW Rose 6 FF |
|----------------------|---|--------------------------|
| 琼脂糖浓度 | 4% | 6% |
| 排阻范围 | 线性分子 | ≈6000kd |
| | 球状分子 | ≈2000kd |
| 颗粒大小范围 ⁺ | ≈30000kd | ≈4000kd |
| 平均颗粒大小 ⁺⁺ | 45-165μm | |
| 使用流速 | 90cm/h (50/100, h=80cm) | 110cm/h (50/100, h=80cm) |
| 最大使用流速 | 150cm/h (50/100, h=80cm) | 200cm/h (50/100, h=80cm) |
| 最大耐压 | 0.3MPa (3bar) | |
| pH稳定性 | 2-12 (工作) ,2-14 (CIP, 短期) | |
| 化学稳定性 | 2M NaOH、8M尿素、6M 盐酸胍、70%乙醇、30% 异丙醇、1%SDS | |
| 灭菌 | 0.5M NaOH 2h, 或121°C 20min 水溶液 | |
| 保存条件 | 20%乙醇, 室温 | |
| 外观 | 白色球状颗粒, 放置可分层 | |
| 注意事项 | 冻结可能破坏介质内部结构 | |

⁺颗粒大小呈正态分布，在该范围内的颗粒占总数的 90%以上；

⁺⁺不同溶液中颗粒大小会有差异，本数据为在水溶液非分散剂中颗粒大小。

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: 生物大分子分离纯化: 一般选用柱高 60-100cm 的层析柱。考虑到生产的操作方便性, 柱高超过 60cm 的工艺, 最好选择 2-3 根柱串联。

缓冲液置换: 一般可以选择 30-60cm 柱高。

2. NW Rose 4 FF / NW Rose 6 FF 琼脂糖凝胶处理

2.1 根据层析柱的体积计算需要的 NW Rose 4 FF / NW Rose 6 FF 量 (体积):

层析柱体积=层析柱底面积 * 柱高;

层析介质用量 (ml 或 L) = (柱体积×1.15);

层析介质匀浆用量 (ml 或 L) =层析介质用量/层析介质匀浆浓度。

注意:

- 1) 使用的缓冲液或水需要脱气处理(如果是注射用水, 可以不用脱气);
- 2) 一般原包装的匀浆浓度为 75%左右。如果不确定匀浆浓度, 可以将层析介质匀浆倒入量筒中, 过夜后 (一般 12-24 小时), 计算层析介质自然沉降体积, 得到匀浆浓度;
- 3) 原包装 NW Rose 4 FF / NW Rose 6 FF 是在 20%乙醇中保存, 使用砂芯漏斗, 负压抽滤的方式, 更换装柱缓冲液 (装柱缓冲液一般使用含有 0.15-0.5M NaCl 的缓冲液, 也可以使用超纯水), 更换 3 次。搅拌时不要用力过度;
- 4) 如果需要高压灭菌, 可以在 121°C, 20min 高压灭菌, 水溶液下灭菌;
- 5) 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质颗粒破裂。

2.2 将准备好的层析介质配置成 50%~75%匀浆, 根据装柱体积以及空柱体积, 准备匀浆浓度。匀浆浓度大于 75%, 容易产生气泡, 搅匀备用。

注意: 凝胶温度过高 (灭菌后) 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水或平衡缓冲液;
- 3) 调整层析水平;
- 4) 层析柱底膜排气, 层析柱底部保留 0.5-1cm 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 1bar;
- 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 (30min 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 0.5cm);
- 12) 按照停泵前流速继续压胶 20-30min。如果层析介质界面稳定, 装柱完成。

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;

$$As=b/a$$

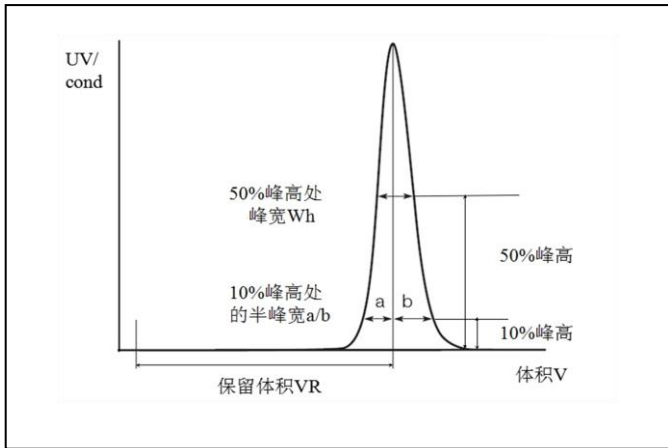


图 2. 柱效检测。

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 Rose 4 FF / NW Rose 6 FF 的分离原理

NW Rose 4 FF / NW Rose 6 FF 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)。

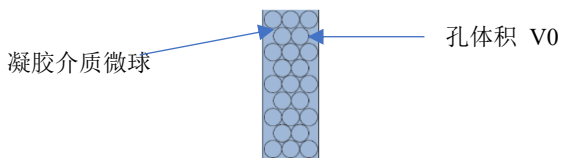


图 3. 层析柱示意图

柱床体积 V_c 层析柱的物理体积,层析柱底面积 \times 柱高

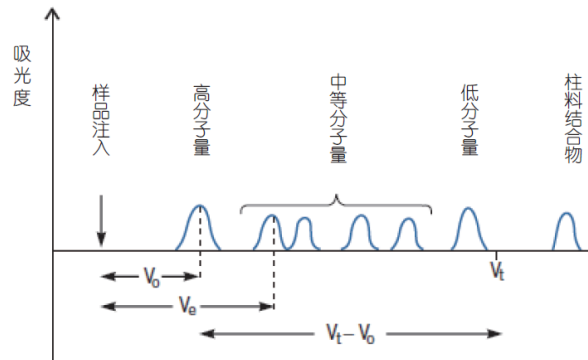


图 4. 凝胶过滤分离示意图。

NW Rose 4 FF / NW Rose 6 FF 琼脂糖亲水性微球,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,样品溶解于缓冲液,使用相同(也可以是不相同的)的缓冲液作为流动相。

建议使用的层析柱

NW Rose 4 FF / NW Rose 6 FF 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)层析介质的上样量一般在 1-5% 的柱床体积;上样量低(1%左右)分离效果好,上样量大(5%以上)分离效果下降;在层析柱的选择是一般选择 60-100 cm 柱床高度。

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。层析柱的直径:<300mm 的层析柱一般选择 1 根柱分离。直径>300 mm 的层析柱,一般选择 2 根或多根柱串联。

NW Rose 4 FF / NW Rose 6 FF 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 Rose 4 FF / NW Rose 6 FF 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1-1.5CV。

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）1-1.5CV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0.01M NaOH）室温保存。

层析应用

缓冲液更换

NW Rose 4 FF / NW Rose 6 FF 琼脂糖凝胶层析介质一般选用水相缓冲液，可以用于去除有害试剂，更换缓冲液。

按照分子量的差异分离

分离不同分子量的生物分子一般需要分子量差异在1倍以上。如果分子量差异过小，分离效果不会理想。

大分子病毒（例如：疫苗类产品）的分离

- 组份分离一般上样量在5-20%柱体积，按照试验对盐浓度的要求确认上样量。如果在低上样量的情况下，分离度较好，可以加大上样量。
- 流速一般使用30-60cm/h，在合适的压力下（1bar以下）。

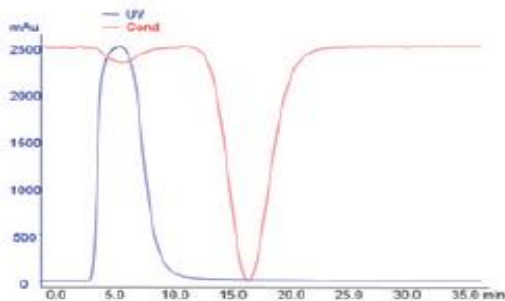


图 5. 狂犬疫苗病毒纯化色谱图。

层析介质清洗与再生

NW Rose 4 FF / NW Rose 6 FF 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1M NaCl 冲洗1-2个柱体积
- 使用蒸馏水冲洗1-2个柱体积，过渡
- 用0.2-0.5M NaOH 冲洗1-2柱体积
- 用蒸馏水冲洗4个柱体积

层析介质灭菌

在水溶液的 NW Rose 4 FF / NW Rose 6 FF 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。

注意：高压灭菌时溶液的 pH，pH 需要中性条件下。

层析介质长期储存

NW Rose 4 FF / NW Rose 6 FF 储存在 20%乙醇（或 0.01M NaOH），在阴凉干燥处密闭存放；建议 3 个月更换一次新鲜配置的 20%乙醇（或 0.01M NaOH），保存在 4~8°C 环境中的效果更好。注意：温度不要低于 0°C

销毁及回收

由于 NW Rose 4 FF / NW Rose 6 FF 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

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

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

化学稳定性

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

问与答

如果您在使用 NW Rose 4FF / NW Rose 6FF 凝胶过滤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 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 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 3 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 4 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 1bar，柱床会压缩。

问题 4 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。可以从提高上样样品浓度或提高上样体积部分解决。在样品浓缩时，注意样品的粘度。

订货信息

| 产品型号 | 包装 | 货号 |
|--------------|-------|-------------------|
| NW Rose 4 FF | 200ml | 60012-014900-2200 |
| | 1L | 60012-014900-1001 |
| | 10L | 60012-014900-1010 |
| NW Rose 6 FF | 200ml | 60012-015900-2200 |
| | 1L | 60012-015900-1001 |
| | 10L | 60012-015900-1010 |

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

(本公司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

