凝胶琼脂糖SEF用户需求（URS）

Cytiva 凝胶琼脂糖SEF

1、 产品要求

Cytiva 凝胶琼脂糖SEF要求为多模式纯化层析介质，专为生物大分子的中间纯化和精细纯化而设计的。配基交联到高刚性琼脂糖上制备而成，具有多模式纯化层析作用；纯化过程中，大部分杂质可以通过离子和疏水作用结合在介质上。

凝胶琼脂糖SEF 的主要特性应包括：

 使介质可以有效的吸附杂质，以此达到纯化的效果。

 杂质以疏水和离子模式结合，操作条件比较广泛。

 样品上样量高以及高流速使得生产效率显著提高。

2、 技术参数

|  |  |
| --- | --- |
| 基架 | 高刚性琼脂糖 |
| 平均颗粒大小 | 70-90um |
| 动态载量 | 22mg卵清蛋白/ml介质 |
| 最大流速 | 700cm/h（柱高20cm，压力＜2bar） |
| 化学稳定性 | 常见水相溶液，1M NaOH、6M 盐酸胍、30%异丙醇、70%乙醇 |
| pH稳定性 | 3~14（短期），3~13（工作） |
| 储存 | 4~30℃，20%乙醇 |
| 注意项 | 避免与氧化剂、柠檬酸缓冲液接触 |

3、 使用方法

3.1 层析柱装填：

注：装柱前最好将介质悬液平衡到室温。

 根据层析柱的体积计算需要的介质的量需要的沉降体积=柱体积×1.15（即压缩比为 1.15）

置换溶液，将胶悬液倒入布氏漏斗，抽去液体，并用约 5 倍体积的含 0.4M NaCl 的 20%乙醇溶液洗涤，（当体积比较大或者条件不具备的时候也可以采用待胶分层后抽去上层溶液，

再加入适量含 0.4M NaCl 的 20%乙醇溶液搅匀等到分层后抽去，反复 5 次的方法置换介质

溶液）胶悬液准备，加入沉降胶体积的二分之一到一倍的含 0.4M NaCl 的 20%乙醇溶液，搅匀备用。

 取清洗干净的层析柱，将搅匀后的胶悬液一次缓慢倒入层析柱内（必要时使用装柱器），注意不要带入气泡，倒入后用搅胶棒再次搅匀。

 将上柱头连接到层析系统或者蠕动泵，排净上柱头筛网下面的气泡。设定好流速，启动泵压至胶面稳定，如果在装柱过程中压力超过 0.3MPa，需要适当降低流速。标记柱床稳定时的高度，装柱完成。

3.2 柱效评价

 柱效测定可以采用NaCl作为指示剂，按照下表配制指示剂溶液和流动相。

NaCl法测柱效

样品 0.8M NaCl（溶于水）

样品体积 1.0%柱体积

流动相 0.4M NaCl水溶液

流速 30cm/h

检测器 电导率

 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

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 的数值若小于三倍介质平均颗粒大小且非对称因子在 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。

3.3 介质层析条件

 缓冲液选择：应选择缓冲基团不与介质作用的缓冲盐，平衡缓冲液宜采用低盐和低 pH（通常高于目的物等电点 1 个以上 pH 单位）缓冲液以有利于物质的结合，同时需要考虑样品在缓冲液中的稳定性。洗脱缓冲液通常为在平衡缓冲液中加入高浓度盐（如 1M NaCl）或选用低 pH 的缓冲液。

 流速：根据柱子的高度一般选用 90~500cm/h 的流速，柱高越大流速越慢。

 再生：介质上结合的杂质需要用较强的洗脱条件洗脱，因此每次上样结束后的洗脱条件和CIP 条件相同，可参考“4、清洗与再生”部分。

 再平衡：用平衡缓冲液冲洗后就可以进行第二次上样，如此重复。

4、 清洗与再生

随着层析介质的使用次数增加，污染物在层析柱上积累也在不断增加，定期的在位清洗能防止污染物的累积，保持稳定的工作状态。

凝胶琼脂糖SEF 应满足以下清洗条件：

 用含有 1M NaOH 的 30%异丙醇或 27%正丙醇溶液反向清洗约 5 个柱体积。具体浓度以及处理时间需根据样品实际情况进行优化选择。

注：清洗溶液的的选择需考虑层析柱材质是否可耐受，以免损坏柱体。

5、 灭菌

由于 20%乙醇保存液不具有杀菌、除热原作用，凝胶琼脂糖SEF介质需满足在使用前及使用过程中，可以采用 1M NaOH 处理 0.5~1h 以上达到灭菌和去除热原的灭菌条件。

6、 储存

使用后的凝胶琼脂糖SEF可以储存于 20%乙醇中密闭保存。