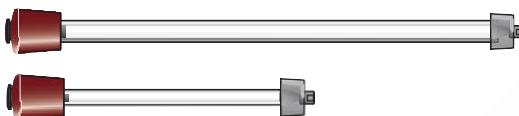




Superdex 200 Increase 5/150 GL

Superdex 200 Increase 10/300 GL

使用说明



一、产品介绍

Superdex™ 200 Increase 5/150 GL 和 Superdex 200 Increase 10/300 GL 是预装的 Tricorn™ 玻璃层析柱。

Superdex 200 Increase 5/150 GL 适用于蛋白质和其他生物分子的快速大小分析。循环时间短，样本量小，缓冲液消耗量低，使该色谱柱非常适合用于检查蛋白质同质性的筛选实验。

Superdex 200 increase 10/300 GL 适用于作为最终精细纯化步骤的小规模制备纯化，以及蛋白质分析和表征。

层析柱配套有两个 1/16" Male 接头，用于连接到 ÄKTA™ 或其他系统。

表 1. 填料数据

基质	交联琼脂糖和葡聚糖的复合物
粒径, d_{50v}	~ 8.6um
排阻极限 (M_r)	~ 1.3×10^6
分离范围	
球状蛋白 (M_r)	10 000 至 600 000
葡聚糖 (M_p)	1000 至 100 000
pH 稳定性范围	
操作	3 到 12
CIP	1 到 14
温度	
操作	4°C 至 40°C
贮存	4°C 至 30°C

表 2. 层析柱数据

	5/150	10/300
柱床尺寸 (mm)	5 x 153-158	10 x 300-310
近似柱床体积 (mL)	3	24
柱效(N/m)	> 42 000	> 48 000
柱床耐压 (delta pressure)	3.0 MPa (30 bar, 435 psi)	3.0 MPa (30 bar, 435 psi)
层析柱硬件耐压(pre-column pressure)	10 MPa(100 bar, 1450 psi)	5.0 MPa(50 bar, 725 psi)
上样量范围	4-50ul	25-500ul

表 3. Superdex 200 Increase 5/150 GL推荐流速和最高流速

温度	流速 (ml/min)
20°C to 25°C	推荐流速, 水 0.45
	最高流速, 水 0.75
	最高流速, 20%乙醇 0.35
	最高流速, 10% 甘油 0.35
4°C to 8°C	最高流速, 水 0.35
	最高流速, 20%乙醇 0.17
	最高流速, 10% 甘油 0.17

表 4. Superdex 200 Increase 10/300 GL推荐流速和最高流速

温度	流速(ml/min)
20°C 至 25°C	推荐流速, 水 0.75
	最高流速, 水 1.8
	最高流速, 20%乙醇 0.9
	最高流速, 10% 甘油 0.9
4°C 至 8°C	最高流速, 水 0.9
	最高流速, 20%乙醇 0.45
	最高流速, 10% 甘油 0.45

注意: 大多数以水为基础的缓冲液可以被认为与水相似, 例如磷酸盐和 Tris 缓冲液。

注意: 当运行粘性样品 (例如含有甘油) 时, 建议降低流速。

二、初次使用操作

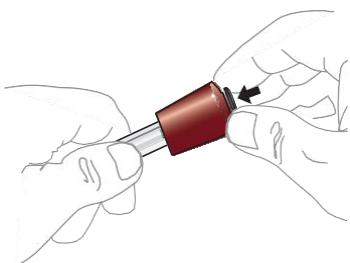


图 1. 如何锁定适配器的图示。锁定环（黑色）必须处于下方的位置，以防止在使用时层析柱高度发生变化。

在层析柱连接到系统之前，应确保管道和阀门中没有空气。移除存储/运输设备 (Storage/Shipping device) 和层析柱下面的堵头。检查上部适配器是否已锁定（按下锁定环，请参见上面的图1）。确保层析柱入口充满液体并通过液滴对液滴的方式连接到系统（防止空气进入层析柱）。

首次使用层析柱时的准备：

注意：操作时缓冲溶液、层析柱和系统应保持在同一温度。

步骤

- 1 以 0.30 mL/min (5/150) 或 0.75 mL/min (10/300) 的流速使用至少 2 个柱体积 (CV) 的室温去离子水进行平衡。如果在较低温度下运行，请注意降低流速。
- 2 根据层析柱的耐压在系统中设置柱压限制。
- 3 以 0.30 mL/min (5/150) 或 0.75 mL/min (10/300) 的流速用至少 2 个柱体积 (CV) 洗脱液平衡层析柱。



注意

确保层析柱运行时不要超过柱压限制。在低温下工作时要格外小心，例如在冷室中，或者当层析柱与 20% 乙醇或其他粘性溶液一起使用时。根据表 3 或表 4 降低流速。

三、设置柱压限制

使用层析柱时需要考虑两个压力限制，柱床的压力限制和层析柱硬件压力限制。超过任何压力限制都可能导致柱床坍塌或损坏柱硬件。例如，以下情况可能会引起压力增加：

- 具有较高粘度的洗脱液或样品，包括 20% 的乙醇。
- 比室温更低的温度下使用。

- 对流路进行修改，例如使用更细或更长的管道。

为了获得最佳功能，了解系统不同部分的压力以及它们如何影响色谱柱非常重要。所有 ÄKTA 色谱系

统都测量系统泵的压力 P_{pump} (参见图2)。一些系统在层析柱前后都有额外的压力传感器， $P_{\text{pre-c}}$ 和 $P_{\text{post-c}}$ 。

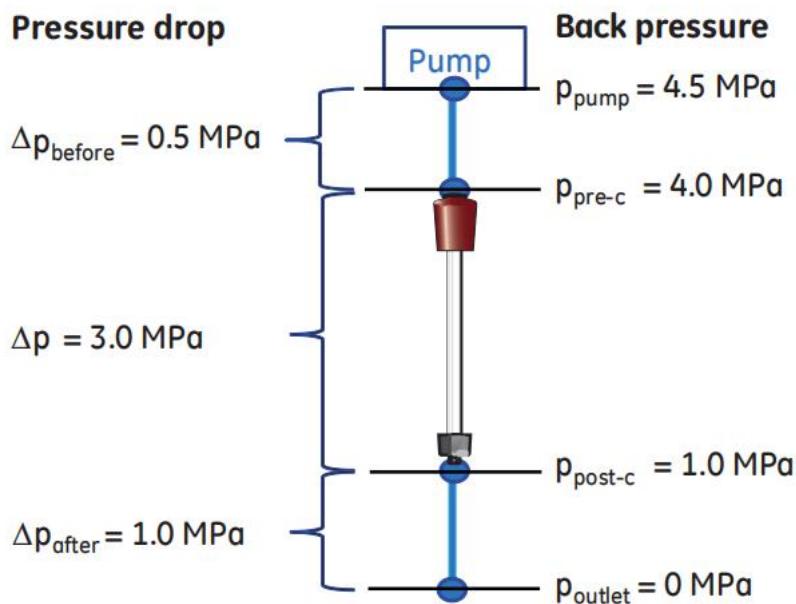


图2.运行过程中系统不同部分的压力示例

- ΔP_{before} 不影响层析柱。
- 层析柱的硬件压力是 ΔP_{after} 和 Δp 之和 (在一些系统上被称作 $P_{\text{pre-c}}$)。
- ΔP 指柱床压力。

每个柱子的耐压不同，在使用前需要参考说明书。

四、推荐运行条件

洗脱液：	0.01 M 磷酸盐缓冲液, 0.14 M NaCl, pH 7.4
流速： (室温)	0.45 ml/min (5/150); 0.75 ml/min (10/300)
样品量：	10 μL (5/150); 100 μL (10/300)

五、推荐样品条件

分子量 (M_r) :	10 000 至 600 000
蛋白质浓度:	样品中最多50 mg/mL，在低于10 mg/mL时可获得更高的分辨率。
样品量:	4 至 50 μL (5/150) 25 至 500 μL (10/300)
准备:	将样品溶解在洗脱液中，用0.22 μm 过滤器过滤或10 000 g 离心10 分钟。

注意: 高样品粘度 (高蛋白质浓度或添加剂) 会导致分离不稳定，背景压力可能会增加。在上样过程中需稀释样品或降低流速。

六、运输/储存

层析柱随柱带有存储/运输装置，可防止其变干。层析柱中填装有脱气的 20% 乙醇。

如果色谱柱在使用后要存放 2 天以上，请用 2 倍柱体积 (CV) 的水清洗色谱柱，然后用至少 2 CV 20% 乙醇平衡。

注意：20% 乙醇要使用较低的流速。参见表3或表4。

我们建议您根据下面的使用方式连接存储/运输设备以进行长期存储。

❖ 如何移除存储/运输设备



- 1、向下推弹簧帽。
- 2、取下锁定销。
- 3、松开盖子并拧下设备。

❖ 如何重新填充存储/运输设备



- 1、将注射器连接到存储/运输设备并在管子里添加20%的乙醇上直到超过标记处。
- 2、取下注射器。
- 3、敲出气泡并将柱塞推至装置的标记处。

❖ 如何连接存储/运输设备



- 1、用 20% 乙醇填充层析柱入口和接头，并将填充好的存储/运输设备液滴对液滴连接到层析柱顶部。
- 2、安装弹簧帽 (2)。
- 3、用锁销将其固定 (3)。

玻璃管表面涂有保护性塑料膜。在生产过程中，玻璃和薄膜之间可能偶尔会带有少量空气。由此产生的不平整表面不会影响层析柱性能或耐用性。

七、洗脱液的选择

选择确保样品完全可溶的洗脱液。也可以尝试选择一种可以简化下游应用的洗脱液。例如，如果之后蛋白/肽需要冻干，则需要选择挥发性洗脱液。由于在极低盐浓度的情况下，酸性和碱性蛋白质都可能发生离子相互作用，因此推荐的缓冲液是 0.01 至 0.05 M 磷酸钠再加上 0.15 M NaCl, pH 7.4。下面的表 5 列出了一些推荐的洗脱液。

表 5. 推荐的洗脱液成分

酸碱度	缓冲液/洗脱液	特性/应用示例
5.0	0.1 M 醋酸铵	对某些酶具有良好的溶解性，如纤维素酶。易挥发的。
6.8	0.2 M 磷酸钠	适用于某些抗体分离。
7.2	0.05 M 磷酸盐 + 0.15 M 氯化钠	生理条件。
7.8	0.15 M 碳酸氢铵	适用于某些 DNA 和蛋白质分离。易挥发的。
8.0	0.1 M Tris-HCl, 0.001M EDTA	对 DNA 和 RNA 的溶解性非常好。
8.6	6 M 盐酸胍溶于 0.05 M Tris-HCl	良好的紫外线透明度。如果需要在变性条件下纯化蛋白质，则适用。
11.5	0.05 M NaOH	对某些化合物具有良好的溶解性。

缓冲添加剂	
高达 8 M 尿素 (pH<7)	对许多组分具有良好的溶解性。生物活性可以在较低的尿素含量下保持。存在蛋白质氨基甲酰化的风险。
6 M 盐酸胍, 0.1% SDS, Tween TM 或类似物	对一些蛋白具有良好的溶解性，如膜蛋白。确保与洗涤剂溶液完全平衡。
0.2 M 精氨酸	减少聚集趋势

八、缓冲液和溶剂耐受性

脱气并通过 0.22 μm 过滤器过滤所有溶液。在进样阀前安装在线过滤器。

注意：粘度较大的样品或者缓冲液会影响背景压力。必要时降低流速，参见表3或表4。

❖ 长期使用

长期使用是指填料树脂在这个缓冲液中可以很长一段时间内保持稳定并且对层析柱的性能没有不利影响。

- 所有常用的水性缓冲液, pH 3 至 12
- 尿素, 最高 8M
- 离子和非离子去垢剂
- 盐酸胍, 最高 6M

❖ 短期使用

短期使用是指在层析柱再生、在位清洗和消毒过程中的使用。

- 乙腈, 最高 30%
- 氢氧化钠, 最高 1 M
- 乙醇, 最高 70%
- 甲醇, 最高 100%
- 乙酸, 最高 1 M
- 异丙醇, 最高 30%
- 盐酸, 最高 0.1 M
- 三氟乙酸, 最高 10%
- 甲酸, 最高 70%

❖ 避免使用

- 氧化剂
- 未经过滤的溶液

九、条件优化

如果您的结果不理想, 请考虑以下操作进行优化。

1、流速

措施: 降低流速。

效果: 提高高分子量组分的分辨率, 小分子的分辨率可能会降低。

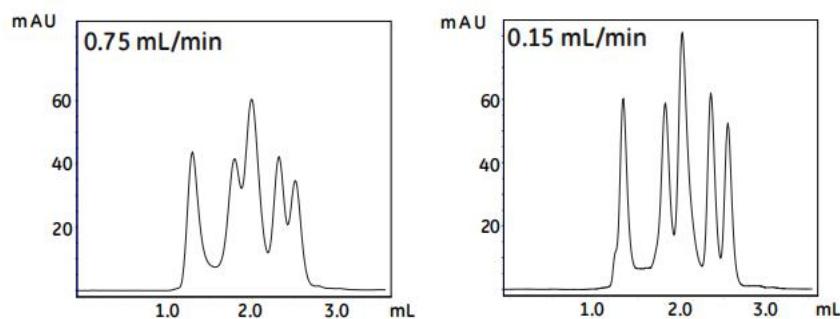


图 7. 不同流速下 Superdex 200 Increase 5/150 的蛋白质分离比较。

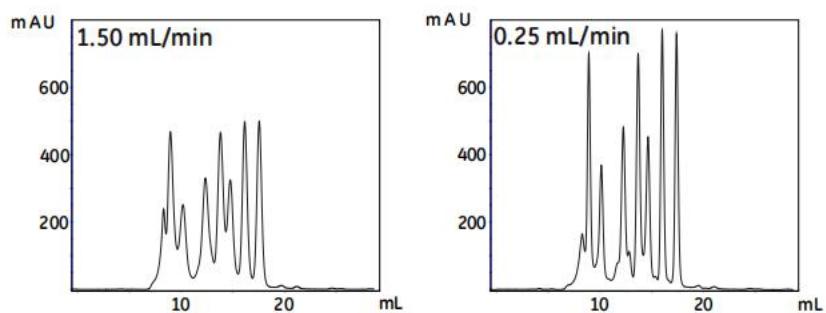


图 8. 不同流速下 Superdex 200 Increase 10/300 的蛋白质分离比较。

2、样品量

措施：减少样品量。

效果：提高分辨率。

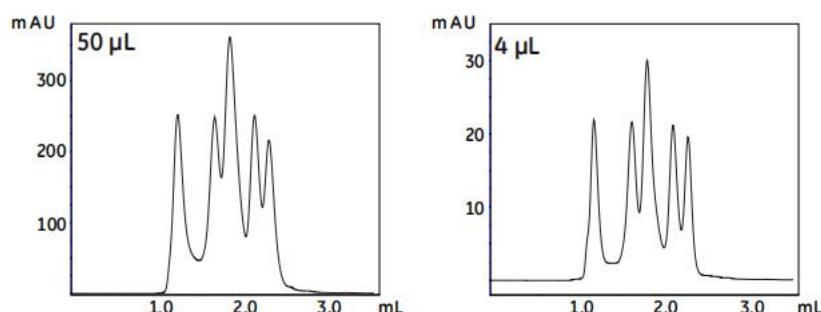


图 9. 使用不同样品体积的 Superdex 200 Increase 5/150 的蛋白质分离比较。

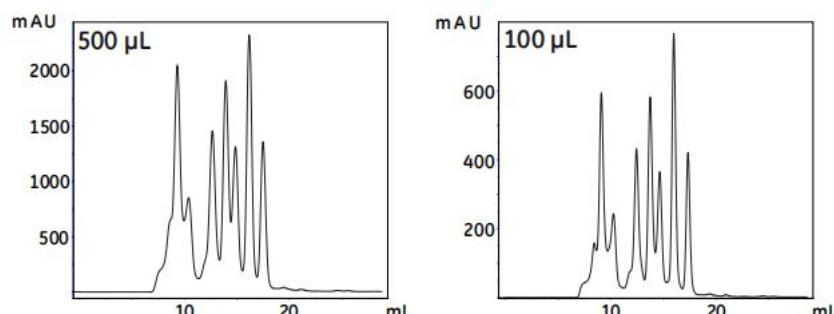


图 10. 使用不同样品体积的 Superdex 200 Increase 10/300 的蛋白质分离比较。

3、系统死体积

措施：减少系统死体积。

效果：提高分辨率。

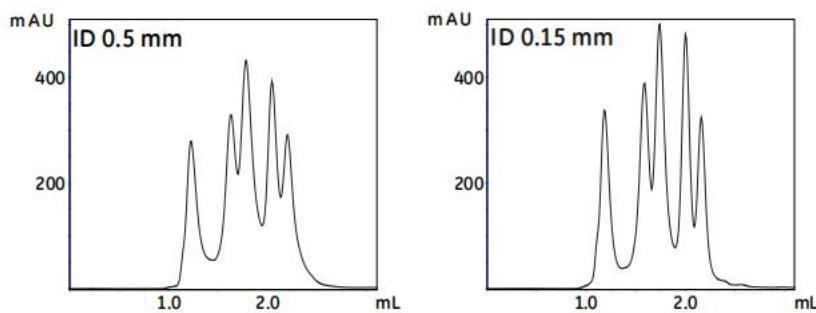


图 11. 使用不同直径的32厘米长管道连接到色谱柱时，Superdex 200 Increase 5/150的蛋白质分离比较。

4、有机溶剂

措施：加入有机溶剂。

效果：增加疏水性成分的溶解度。改变选择性。

5、串联层析柱 (Superdex 200 Increase 5/150)

措施：串联连接两个层析柱。

效果：由于柱高增加，分辨率提高。背景压力会增加。确保不要超过最大压力限制。

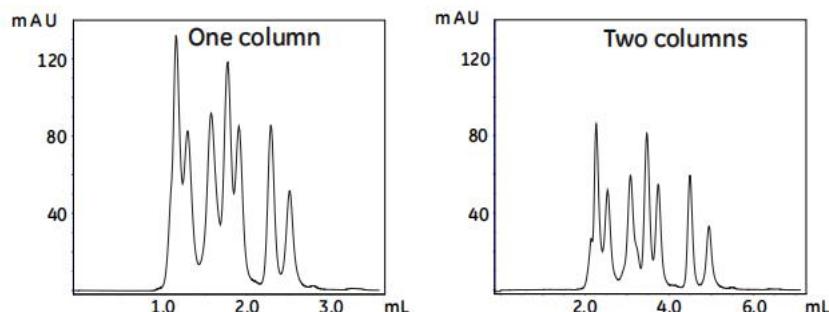


图 12. 一根或两根Superdex 200 Increase 5/150层析柱串联的蛋白质分离比较。

十、在位清洗 (CIP)

使用10到20次之后或者柱子堵塞后可执行以下清洗流程。

注意: 执行 CIP 时, 建议反向清洗。

❖ 定期清洗:

步骤

- 用 1 个柱体积 (CV) 的 0.5 M 氢氧化钠或 0.5 M 乙酸
- 1 以 0.13 mL/min (5/150) 或 0.5 mL/min (10/300) 的流速清洗色谱柱
 - 2 立即用1个柱体积的去离子水冲洗色谱柱, 然后使用至少 2 个柱体积洗脱液流速为 0.13 mL/min (5/150)或 0.5 mL/min (10/300)进行清洗

在下一次运行之前, 平衡层析柱直到 UV 基线和 pH 值稳定。

❖ 更严格的清洁:

- 根据污染物的性质, 可以使用缓冲液和溶剂耐受性中的溶液进行清洗。使用任何溶液清洗后, 务必用至少2个柱体积的去离子水冲洗。
- 如果层析柱性能未恢复, 请用3个柱体积的0.5 M 精氨酸清洗层析柱。然后用至少2个柱体积的水冲洗。
- 如果色谱柱性能仍未恢复, 则注入含有1mg/mL 胃蛋白酶的 0.1M 乙酸溶液 (含有 0.5M NaCl) , 并在室温下放置过夜或在 37°C 下放置 1 小时。 酶处理后, 根据上述常规清洁步骤清洗层析柱。
- 更改层析柱顶部的滤膜。 (由于污染物是随液流一起引入的, 因此其中许多被滤膜捕获) 。

十一、故障排除

症状	补救
层析柱背景压力增加和 /或分辨率下降。	请根据在位清洗(CIP)程序对其进行清洗。
柱内有空气	要确认系统中的高背压是由色谱柱引起的, 请在泵运行过程中一次断开一个连接 (从组分收集器开始) 。在每断开一个连接后检查压力读数, 以确定背压来源。室温下使用脱气的洗脱液以流速 0.2 mL/min (5/150) 或 0.5 mL/min (10/300)反向冲洗 3 到 4 个柱体积 (CV)以赶走气泡。
柱床和适配器之间有空隙	将适配器调低至柱床表面。

订购信息

产品	数量	产品代码
Superdex 200 Increase 5/150 GL	1	28990945
Superdex 200 Increase 10/300 GL	1	28990944

相关产品

产品	数量	产品代码
Superdex 200 Increase 3.2/300	1	28990946
Superose 6 Increase 10/300 GL	1	29091596
Superose 6 Increase 5/150 GL	1	29091597
Superose 6 Increase 3.2/300	1	29091598
Superdex 30 Increase 10/300 GL	1	29219757
Superdex 30 Increase 3.2/300	1	29219758
Superdex 75 Increase 10/300 GL	1	29148721
Superdex 75 Increase 5/150 GL	1	29148722
Superdex 75 Increase 3.2/300	1	29148723
凝胶过滤 LMW Marker	1	28403841
凝胶过滤 HMW Marker	1	28403842

配件

产品	数量	产品代码
Tricorn 10 过滤器套件 ¹	1	29053612
Tricorn 5 过滤器套件 ¹	1	29053586
过滤工具	1	18115320
Fingertight connector 1/16"	10	18111255
Male		
Tricorn 存储/运输设备	1	18117643

¹不要存放在日光下。