实验室装柱

GE imagination at work

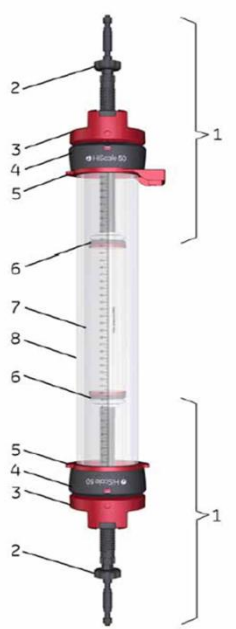
实验室装柱

- 确定装柱方案
- 装柱流程
- 柱效测定

确定装柱方案

- 装柱规模：根据试验所需
- 层析柱类型：压力范围，尺寸
- 凝胶填料种类：粒径大小，耐压范围，流速....
- 装柱缓冲液：水，盐溶液，有机溶剂
- 装柱泵

实验室常用层析柱



XK column

Tricorn

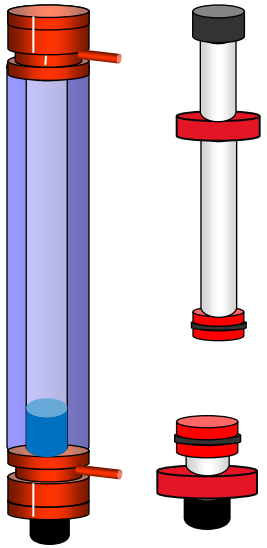
Hiscale

实验室层析空柱

	XK	Tricorn	Hiscale
长度	20-100 cm	2-60 cm	20-40 cm
直径范围	1.6-5 cm	0.5-1 cm	1.6-5 cm
耐压	0.5 Mpa XK 16,26 0.3 Mpa XK 50 0.2 Mpa （jacket）	10 Mpa, Tricorn 5 5 Mpa, Tricorn 10	2 Mpa

确认装柱方案

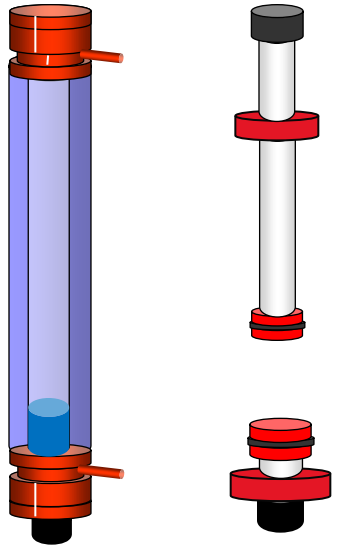
填料:	Q Sepharose Fast Flow
平均粒径:	90 µm
装柱体积:	53.1ml
层析柱:	XK 26/20
层析柱筛网:	23 µm< 1/3 90µm
内径:	2.6 cm
横截面积:	5.31 cm^2
装柱高度:	10 cm
压缩因子:	1.25
所需介质体积:	53.1ml × 1.25=66.375 ml
装柱缓冲液:	去离子水



实验室装柱

- 确定装柱方案
- 装柱流程
- 柱效测定

装柱流程1：层析柱的准备



提示：

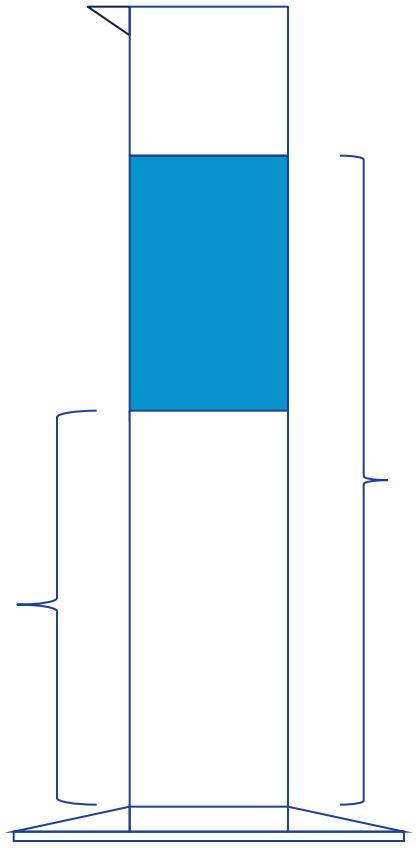
- 筛网定期用0.5M NaOH 超声清洗， 用20% 酒精排除气泡
- 各个部件组装完毕后，检查密闭性
- 垂直固定

装柱流程2：填料匀浆的准备

- 置换填料缓冲液至装柱缓冲液中
- 匀浆浓度建议在50%-75%之间

$$\text{所需凝胶悬液的体积 (ml)} = \frac{\text{装柱体积 (ml)} \times \text{填料的压缩比}}{\text{凝胶悬液的浓度}}$$

计算填料匀浆浓度



匀浆浓度 Cr： Vg/Vt (%)

总体积
(Vt)

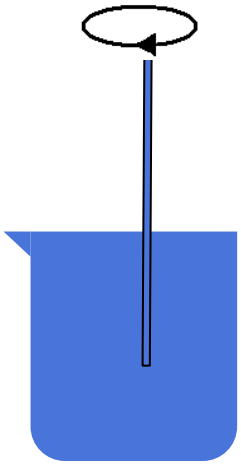
凝胶体积
(Vg)

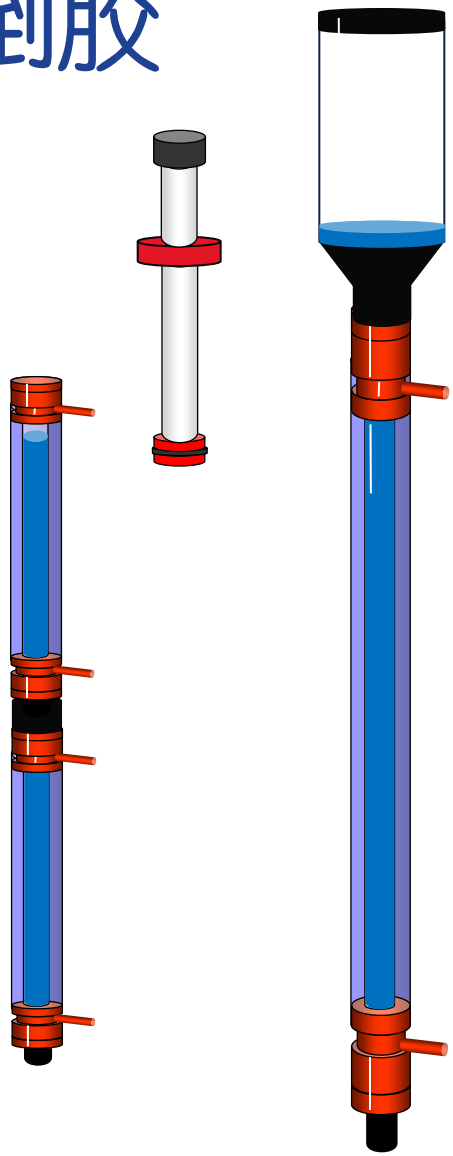
常用介质的压缩因子

介质	压缩因子
Q Sepharose Fast Flow	1.25
DEAE Sepahrose Fast Flow	1.25
SP Sepharose Fast Flow	1.25
CM Sepharose Fast Flow	1.25
Phenyl Sepharose Fast Flow	1.25
Sepharose 4 and 6 Fast Flow	1.2
Sphacryl High Resolution	1.2
Superdex 75 and 200 Prep grade	1.2
Q and SP High Performance	1.2
Phenyl High Performance	1.2
Sephadex G-25	250g/L

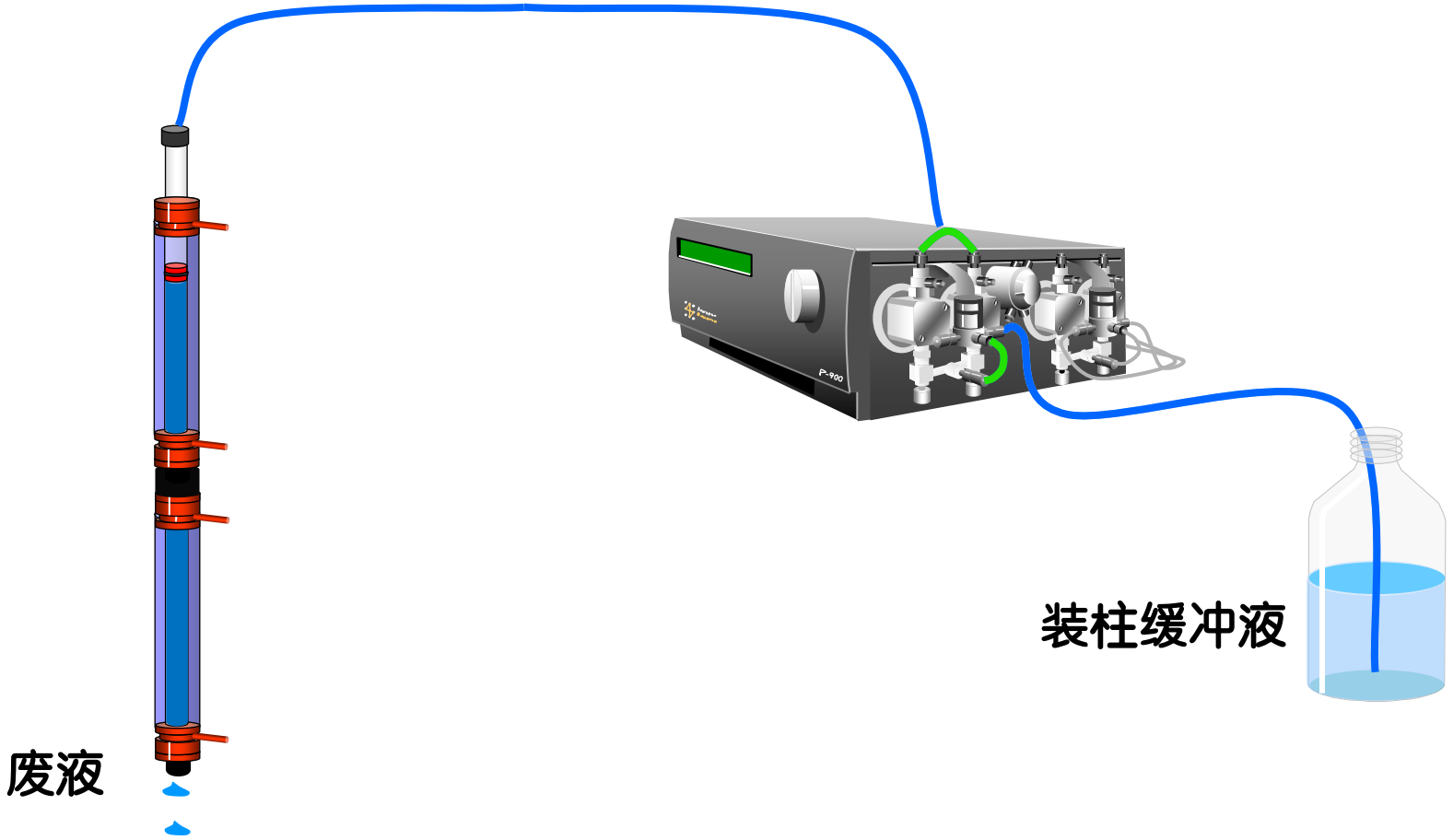
装柱流程3：匀浆，倒胶

- 保持层析柱垂直
- 快速，温和操作，避免气泡进入层析柱





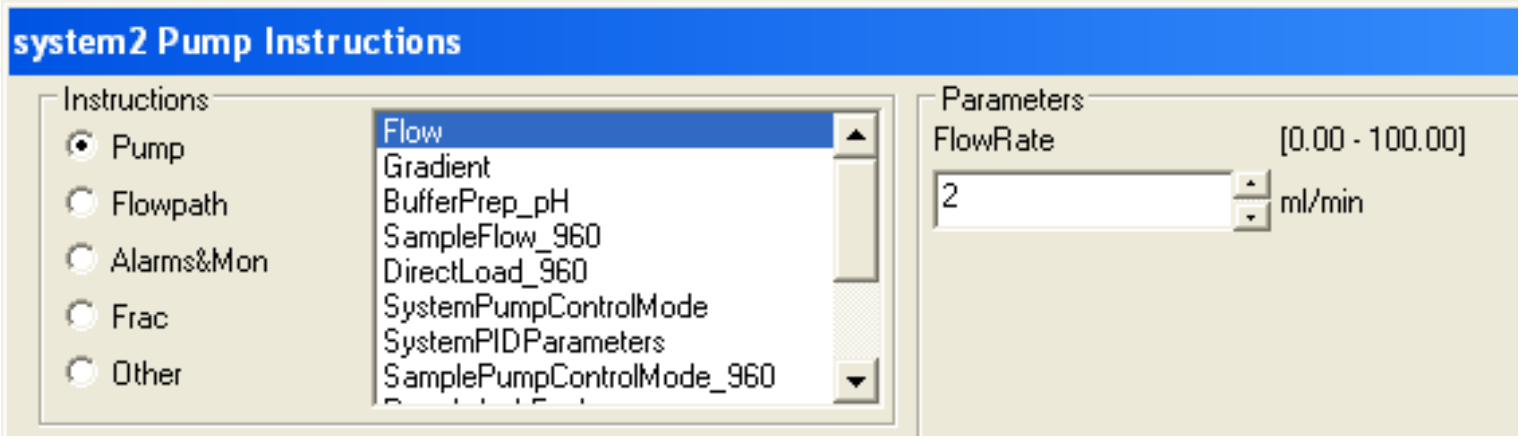
装柱流程4：压胶



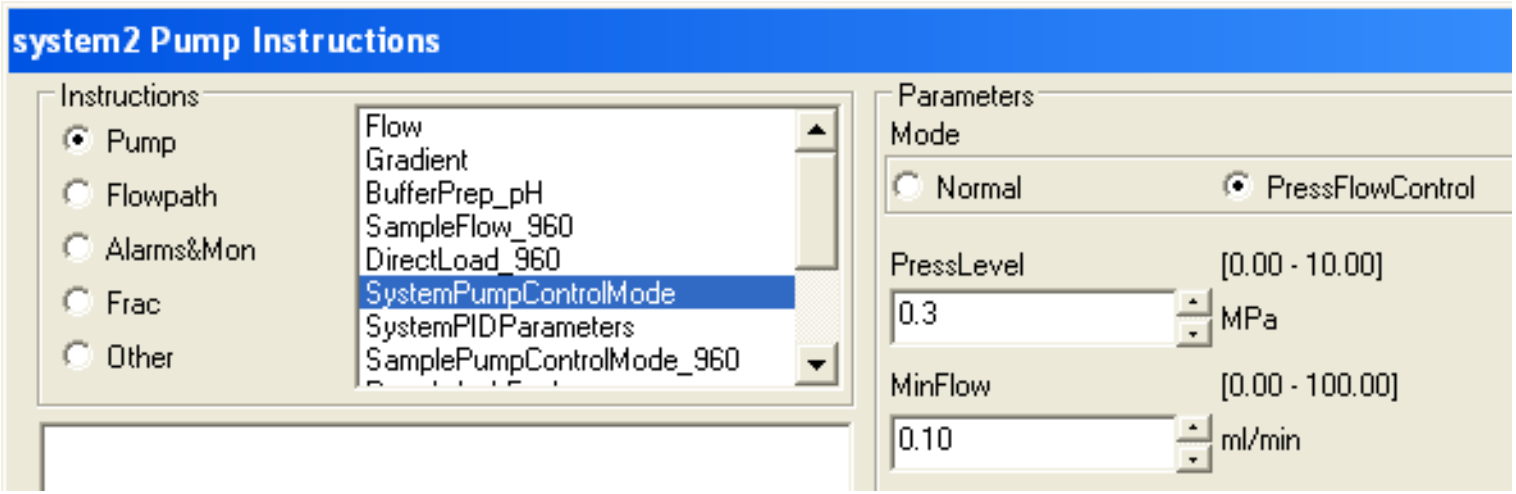
装柱流路图

压胶：恒流和恒压

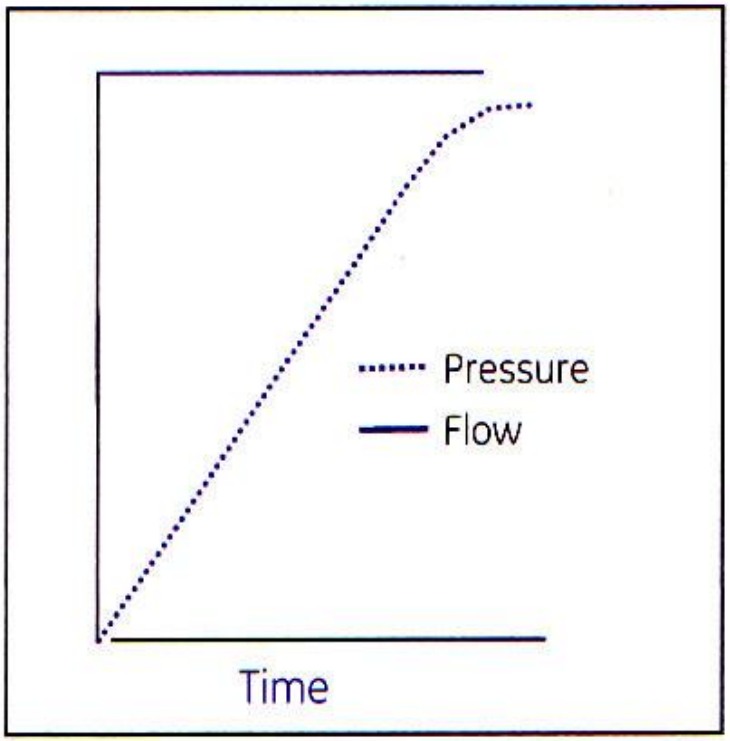
恒流:

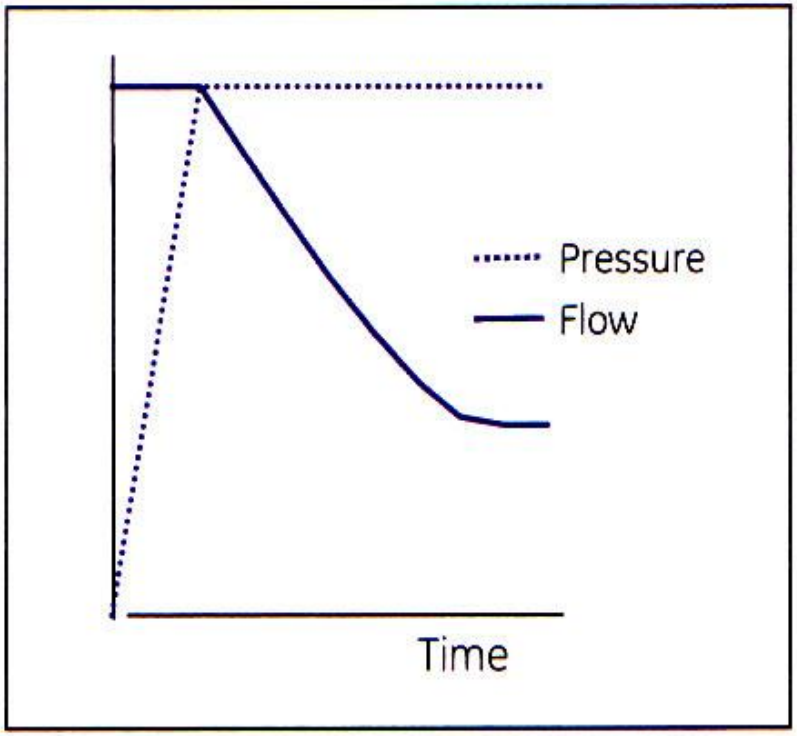


恒压:

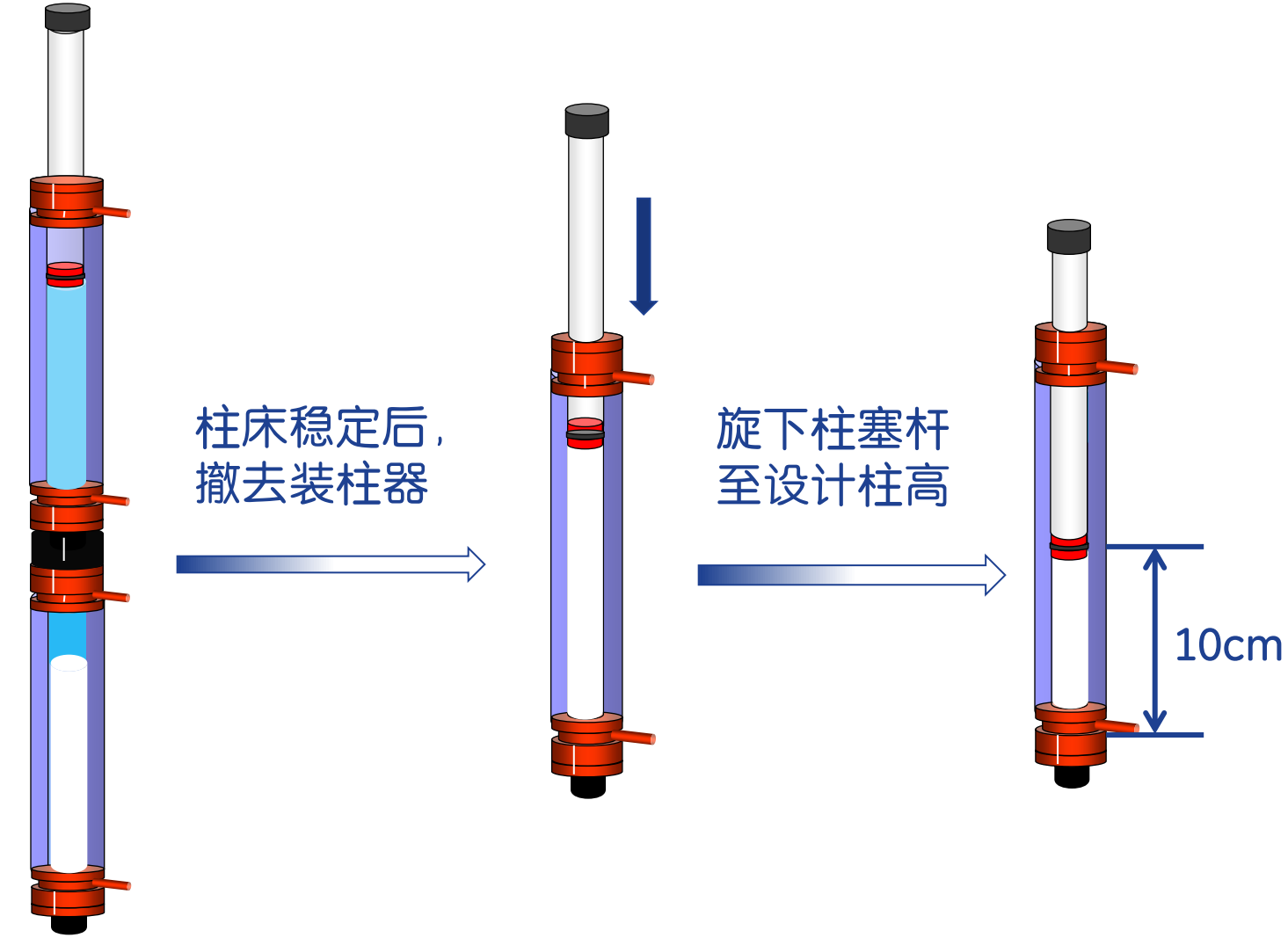


恒压 VS 恒流





装柱流程5：完成



实验室装柱

- 确定装柱方案
- 装柱流程
- 柱效测定

柱效测定

- 柱效高低是纯化成败的关键之一
- 柱效包括：

  每米理论塔板数/理论塔板高度（HETP)

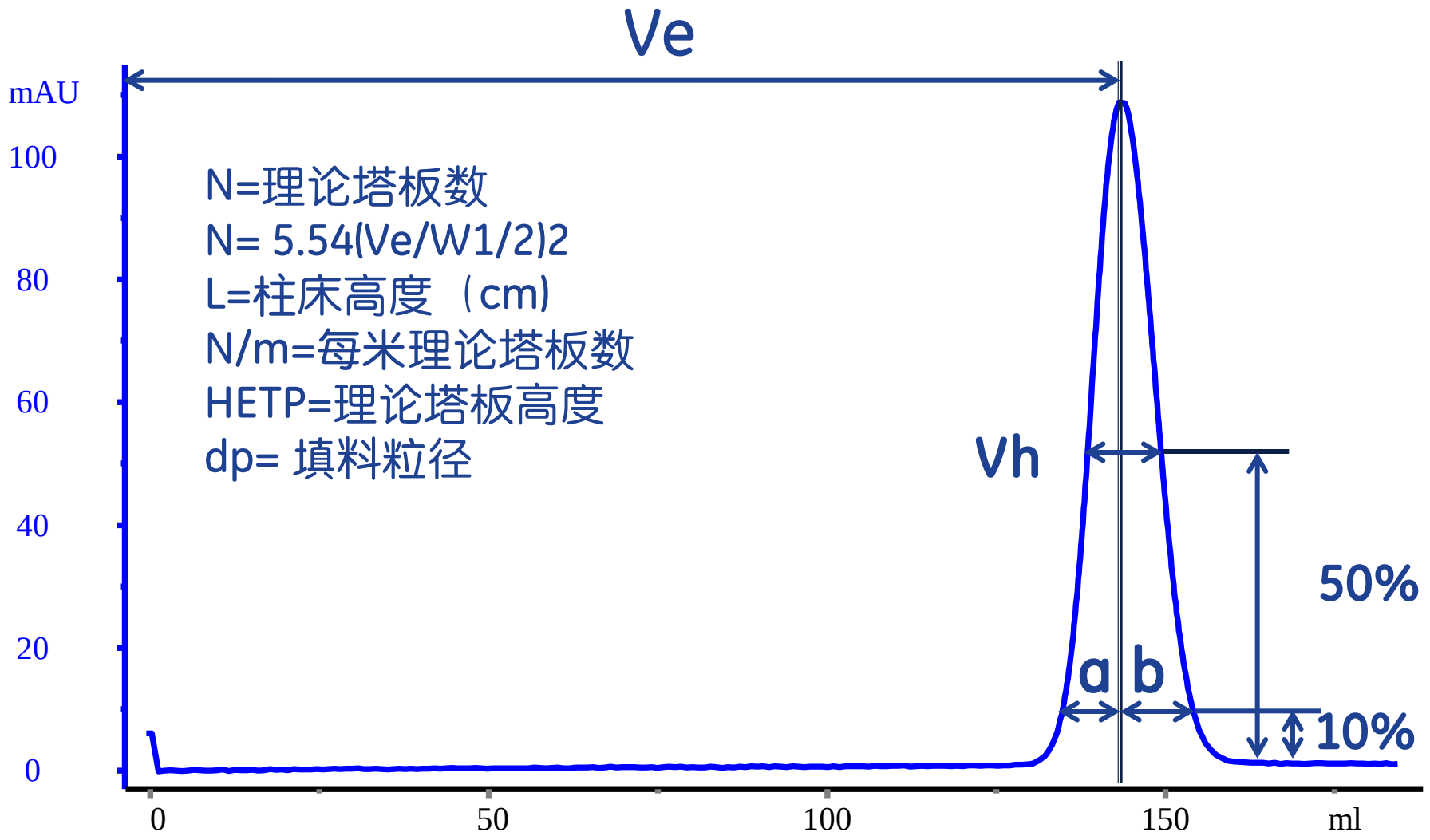
  对称因子（As)
- 测柱效的方法：

  流速 15-30 cm/h

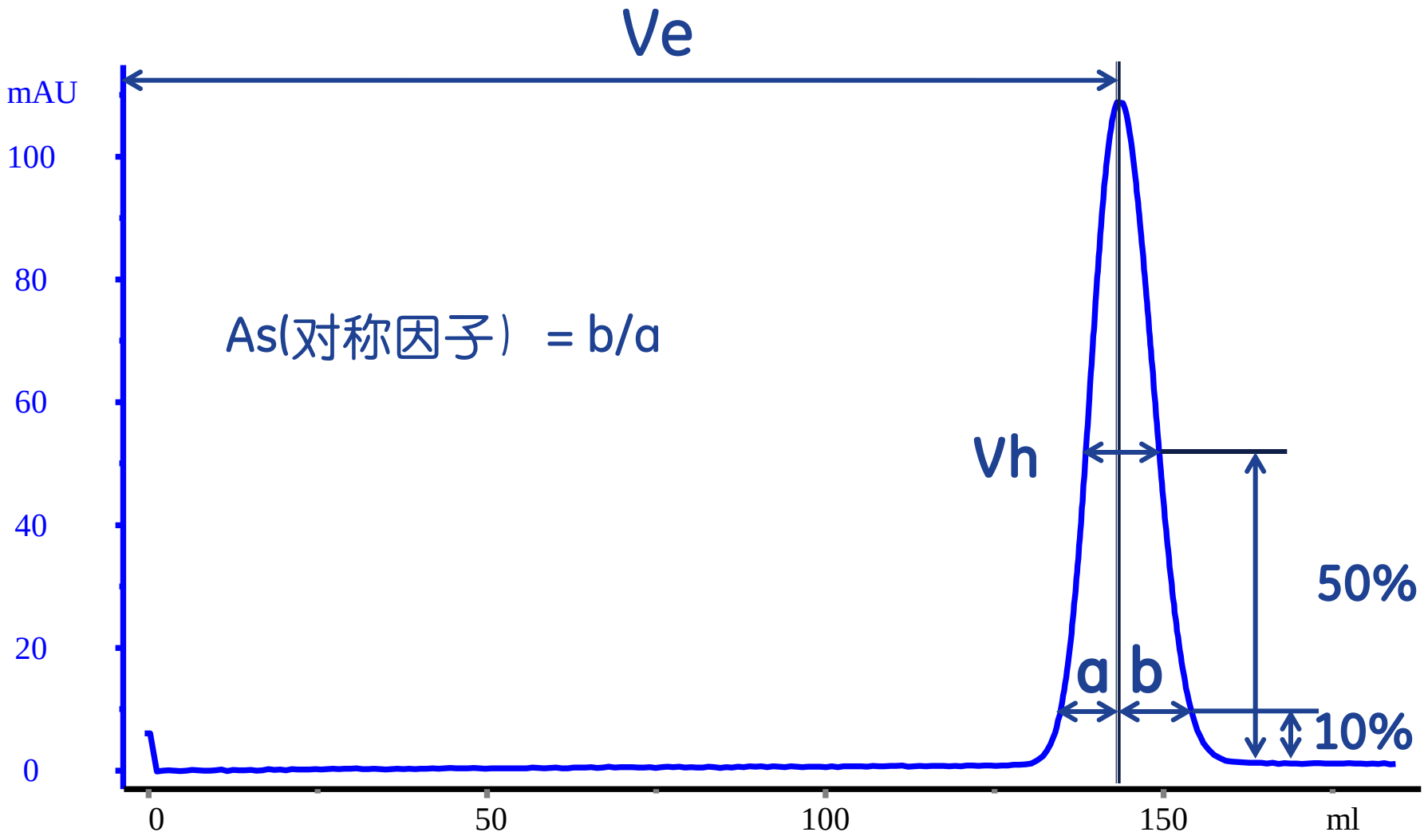
  1%丙酮 （280nm 检测）或 2M NaCl （电导检测）

  上样体积1%-2%

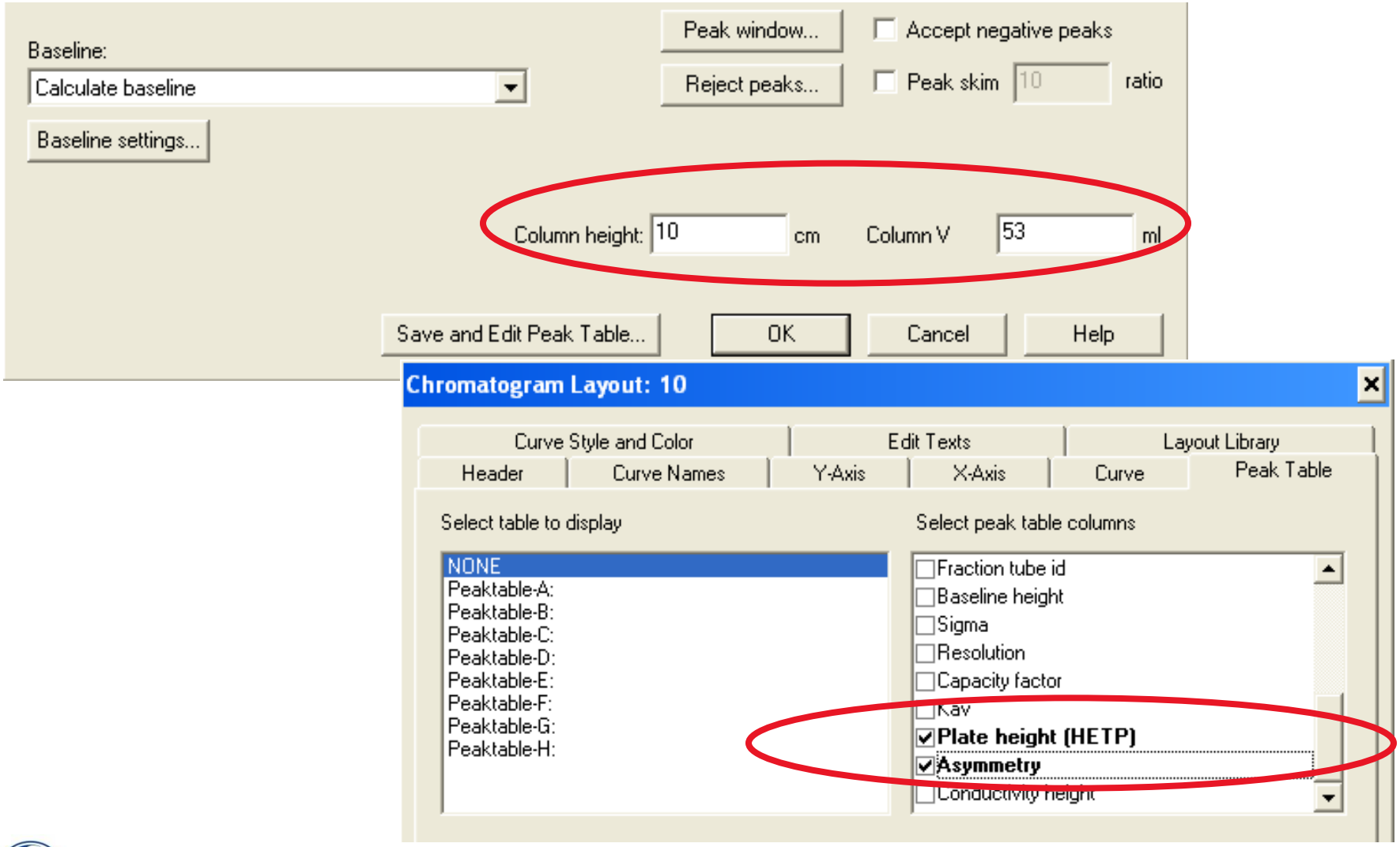
HETP 检测


Ve
mAU
100
80
60
40
20
0
N=理论塔板数
N= 5.54(Ve/W1/2)2
L=柱床高度（cm)
N/m=每米理论塔板数
HETP=理论塔板高度
dp= 填料粒径
Vh
50%
a
b
10%
0
50
100
150
ml

As检测



Unicorn 软件计算HETP和As

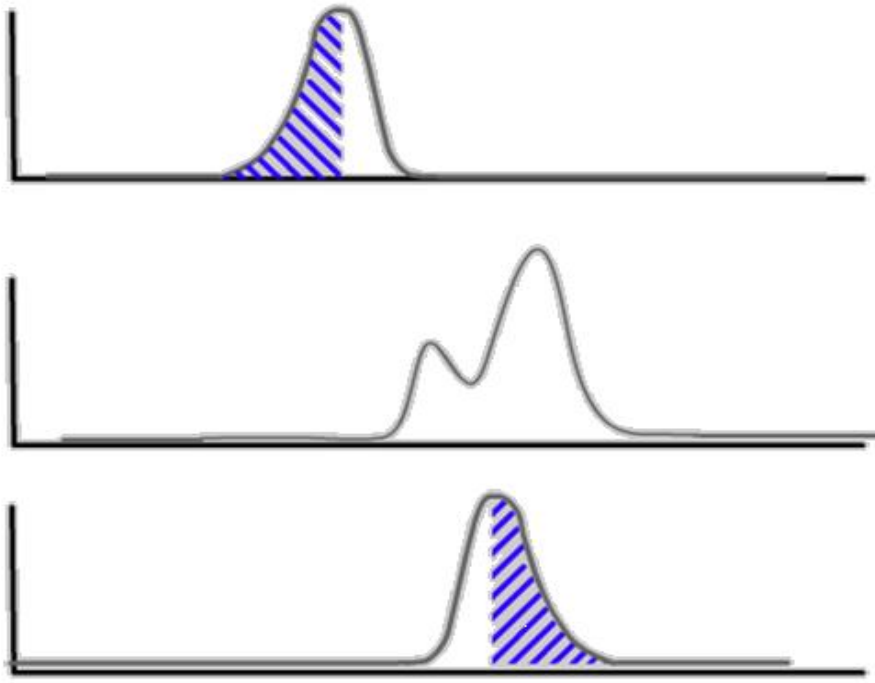


结果评价

HETP（理论塔板高度）	
理想情况	1-2 dp
非常好	2-4 dp
好	3-5 dp
差	5-10 dp

A_S（对称因子）	
理想	1.0
可接受范围	0.8-1.5

常见现象



Leading 前延，太紧

Split 多峰，装柱不均匀

Tailing 拖尾，太松

装柱实验

填料	Capto Q
填料体积	20 ml
层析柱	XK 16/20
装柱缓冲液	脱气去离子水
柱效测定缓冲液	0.4 M NaCl
柱效测定溶液	1% 柱体积
柱效测定程序	HETP test

1. 清洗层析柱
2. 检查密封性
3. 筛网排气
4. 层析柱底部连接并垂直固定
5. 加入1 cm高的水
6. 连接柱头，排除筛网气泡
7. 混匀填料，玻璃棒引流导入
8. 16 ml/min， 0.3 Mpa 报警压压柱
9. 待胶面不动时
10. 继续压胶 6 min，标记胶面
11. 暂停机器
12. 柱底部封口，松开入口
13. 下压柱头至胶面下约 2-3 mm
14. 重新连接柱子到 AKTA
15. 柱效测定

Thank you very much for your attention