

亲和层析凝胶 ECH 4B 使用说明书

为确保产品的性能和无忧的操作，使用前请仔细阅读本手册，有任何疑问请咨询本公司售后技术支持或当地的销售人员。

1. 产品介绍

ECH 4B 是将 6-氨基己酸共价偶联到琼脂糖基质上制得的快流速纯化介质。它在间隔臂末端含有羧基，主要适用于偶联含有自由氨基的小分子化合物（配基）制作亲和纯化介质。

偶联反应需要在酸性条件下（酸催化）进行，加入偶联试剂（碳化二亚胺，例如 EDC、CMC）可以促进游离氨基和游离羧基的缩合。

特点如下：

- 应用广泛，可适用于偶联含氨基的小分子化合物。
- 单点偶联，单一的偶联方式易于控制，可有效避免。
- 流速快、产率高、易于放大。

表1：介质性能参数

基质	4%的琼脂糖
粒径范围	45-165 μm
平均粒径	90 μm
活性基团	氨基
配基浓度	15 $\mu\text{mol/ml}$ (介质)
间隔臂	10 个原子
偶联温度	4-25 $^{\circ}\text{C}$
偶联 pH	4.5-6.5
pH 稳定性	3-14（长期） 3-14（短期）
化学稳定性	所有常用的缓冲液
最大流速	75cm/h
操作压力	$\leq 0.02\text{MPa}$
贮存溶液	20%乙醇
贮存温度	4-8 $^{\circ}\text{C}$

*:结合载量取决配基的类型和偶联条件。

2. 偶联条件

a. (A 液) 清洗

取适量的沉降胶，用 5 倍体积的 A 液将介质重悬，3min 后将溶液抽干，重复此步骤 3 次。

备注：此步骤用于清洗介质，要保证 A 液的清洗体积要充分。

b. (B 液) 清洗

用 20 倍体积的 B 液将介质重悬，3min 后将溶液抽干，重复此步骤 3 次。

备注：此步骤用于清洗介质，要保证 B 液的清洗体积要充分。



c. 配基溶液的制备

取适量*需要偶联的小分子用 A 液溶解，溶解后调节 pH 与 A 液一致。

备注：确保配基溶液的 pH 和 A 液一致；小分子物质的量需要进行实验优化后确定。

d. 偶联

将清洗完的介质和准备好的样品按 1:2 的比例（体积比）混合，再加入适量*的偶联试剂，调节 pH 与 A 液一致。

在 4℃或室温条件下温和混匀 2-24h，确定偶联成功（通过测定偶联前后小分子含量确定偶联效率）后，将溶液抽干。

备注：在偶联的整个过程需要用 NaOH 或 HCl 调整混合物的 pH 与 A 液一致；偶联试剂的量需要进行实验优化后确定（初始建议浓度为 0.1M）。

e. (A 液) 清洗

用 5 倍体积的 A 液将偶联后的介质重悬，再将溶液抽干。再重复此步骤 3 次。

备注：此步骤用于清洗介质中残留的小分子，清洗要彻底。

f. (C 液和 D 液) 清洗

用 5 倍体积的 C 液将封闭后的介质重悬，5min 后将溶液抽干；再用 5 倍体积的 E 液将介质重悬，5min 后将溶液抽干。重复此步骤 3 次。

备注：此步骤用于酸碱清洗掉偶联不够紧密的小分子。

g. 保存

用 5 倍体积的纯化水将介质重悬后抽干，再用 5 倍体积的 E 液将介质重悬后抽干，最后用 E 液浸泡保存。

备注：此步骤用于保存介质，避免微生物生长。

h. 溶液配制

A 液：纯化水，用 HCl 调节 pH 至 4.5，现配现用。

备注：具体的 pH 值取决于配基稳定性，调整范围为 4.5-6.5 之间；当选用的偶联试剂在水溶液中溶解度较差时，可以加入一定浓度的有机溶剂（≤50%）。

B 液：0.5 M NaCl，用 HCl 调节 pH 至 4.5，室温保存。

备注：B 液具体的 pH 值取决于配基稳定性，调整范围为 4.5-6.5 之间。

C 液：0.1M NaAc、0.5 M NaCl，pH 4.0，室温保存。

备注：C 液用于清洗偶联不够紧密的小分子；若 A 液含有机溶剂，C 液中也应加入同等浓度的有机溶剂。

D 液：0.1M Tris-HCl、0.5 M NaCl，调节 pH 8.0，室温保存。

备注：D 液用于清洗偶联不够紧密的小分子；若 A 液含有机溶剂，D 液中也应加入同等浓度的有机溶剂。

E 液：20%乙醇，室温保存。

备注：B 液用于保存介质。



3. 清洗

清洗后可以去除一些强结合性物质（例如一些强结合的蛋白、变性蛋白、脂类等），从而达到恢复介质的优良性能（例如载量、流动性、柱效等）。

建议每使用 5 次后进行一次清洗，具体清洗频率需根据纯化的初始样品的洁净度进行调整。

(1) 常规清洗

- a. 用 5-10 倍柱体积的纯化水冲洗。
- b. 用 5-10 倍柱体积的 C 液冲洗。
- c. 用 5-10 倍柱体积的纯化水冲洗。
- d. 用 5-10 倍柱体积的 D 液冲洗。
- e. 用 5-10 倍柱体积的纯化水冲洗。
- f. 用 5-10 倍柱体积的 E 液冲洗后保存。

(2) 剧烈清洗

- a. 用 2-5 倍柱体积 0.2% 非离子型去污剂冲洗后，立即用 5-10 倍柱体积纯化水冲洗。
- b. 用 2-5 倍柱体积 6M 盐酸胍冲洗后，立即用 5-10 倍柱体积纯化水冲洗。
- c. 用 5-10 倍柱体积的 20% 乙醇冲洗后保存。

备注：剧烈清洗条件是否适用主要取决于偶联的小分子的稳定性，采用此条件清洗前，建议先做一个小规模预实验验证生物分子的稳定性。

4. 常见问题

表2：常见问题及解决方案

问题	可能原因	解决方案
偶联效率较低	1. A液、B液pH或盐浓度不对	检测A液、B液配制是否正确
	2. 偶联时间不够	延长偶联时间
纯化时目标物不与介质结合或结合量较低	1. 上样量过载	降低上样量
	2. 上样速度过快	降低上样流速
	3. 蛋白或脂类在介质中聚集	及时有效地清洗介质
	4. 样品在储存或上样过程中失活	正确储存待纯化样品以维持样品的活性
	5. 配基和目标物结合比例比较低	尝试加大偶联时配基浓度
	6. 配基在偶联或清洗过程中降解	检测配基在偶联或清洗中的稳定性
洗脱时没有收集到目标物或只收集到少量目标物	1. 目标物没有与介质结合或结合量较少	降低上样流速并检查介质的结合能力
	2. 洗脱条件不合适	更改相应洗脱条件或增强洗脱液的洗脱能力
	3. 目标物在洗脱液条件下出现聚集沉淀	检测目标物在洗脱液条件（盐浓度和pH等）下的稳定性
目标物纯度较低	1. 样品没有经过前处理	样品上柱前必须要经过离心



		或过滤
	2.样品粘度过高	用平衡液适当的稀释样品，降低粘度。
	3.洗杂不彻底	加大洗杂体积直至基线平稳并与平衡液一致
	4.杂质蛋白或脂类在介质中聚集沉淀	及时有效地清洗介质
	5.洗脱条件不佳，洗脱速度太快、梯度太陡。	调整洗脱条件
	6.目标物出现降解	检测目标物的稳定性
	7.柱料装填效果不佳	重新装填或购买
	8.杂质出现非特异性吸附	适当选择添加剂降低非特异性吸附
	9.分离柱顶部有较大储样体积	重新装柱或降低储样体积
	10.介质中有微生物生长	介质使用完后，请及时正确保存介质
介质载量下降	1.上样速度过快	降低上样流速
	2.蛋白或脂类在介质中聚集，导致载量下降。	及时清洗介质
	3.使用次数过多，配基出现脱落	重新偶联新的介质
	4.样品在储存或上样过程中失活，不能较好的与配基结合	正确储存待纯化样品以维持样品的活性
色谱峰上升缓慢	介质装填过紧	重新装柱
色谱峰拖尾	介质装填太松	重新装柱
柱床有裂缝或干涸	出现泄露或大体积气泡引入	检查管路是否有泄露或气泡，重新装柱
液流较慢	1.蛋白或脂类聚集	及时清洗介质或滤膜
	2.蛋白沉淀在介质中	调整平衡液和洗脱液组分，以维持目标物的稳定性和介质的结合效率
	3.分离柱中微生物生长	所用试剂必须经过过滤和脱气； 样品上柱前必须离心或过滤



5. 订购信息

表3：订购信息表

产品	规格(ml)	货号
亲和层析凝胶 ECH 4B	25	HZ1026-1
亲和层析凝胶 ECH 4B	100	HZ1026-1
亲和层析凝胶 ECH 4B	500	HZ1026-1
亲和层析凝胶 ECH 4B	1000	HZ1026-1

备注：大规格包装产品或其它产品购买，请咨询本公司当地销售或售前技术支持。

