



碧云天生物技术/Beyotime Biotechnology
 订货热线: 400-1683301 或 800-8283301
 订货 e-mail: order@beyotime.com
 技术咨询: info@beyotime.com
 网址: http://www.beyotime.com

DEAE Agarose 6FF (DEAE琼脂糖凝胶)

产品编号	产品名称	包装
P2073-10ml	DEAE Agarose 6FF (DEAE琼脂糖凝胶)	10ml
P2073-50ml	DEAE Agarose 6FF (DEAE琼脂糖凝胶)	50ml
P2073-200ml	DEAE Agarose 6FF (DEAE琼脂糖凝胶)	200ml
P2073-1000ml	DEAE Agarose 6FF (DEAE琼脂糖凝胶)	1000ml

产品简介:

- 碧云天的DEAE Agarose 6FF (DEAE琼脂糖凝胶), 也称DEAE阴离子交换凝胶、DEAE阴离子交换树脂、DEAE阴离子交换填料、DEAE阴离子交换基质、DEAE弱阴离子交换凝胶、DEAE蛋白纯化凝胶、DEAE Ion Exchange Agarose或DEAE Ion Exchange Resin, 是由二乙胺基乙基(Diethylaminoethyl, DEAE)与高度交联、高流速(Fast Flow)的6%琼脂糖共价偶联(简称6FF)而成的一种弱阴离子交换介质, 可快速、高效、灵敏、特异性地与带负电荷的生物大分子结合, 主要用于带负电荷的天然或重组蛋白、抗体、多肽和核酸的分离纯化。本产品可用于非装柱的离心式直接纯化, 也同样可用于制备成预装柱以用于AKTA等设备中压或低压条件下纯化带负电荷的蛋白、多肽或核酸。
- 离子交换层析(Ion-exchange chromatography, IEC)是一种有效的生物分子分离纯化方法, 利用不同生物分子在特定条件下带有的电荷的性质和多少的差异, 通过正负电荷间的相互作用进行分离[1]。离子交换介质由三部分组成: ①网状基质(Matrix): 即琼脂糖、葡聚糖或纤维素凝胶等具有交联结构的高分子骨架; ②固定在基质上的配基(Ligand): 该配基, 也称功能基团, 是电荷基团, 决定了离子交换层析介质的性质, 配基带有负电荷为阳离子交换介质, 可结合带有正电荷的蛋白质, 反之功能基团带有正电荷为阴离子交换介质, 可结合带有负电荷的蛋白质; ③与配基带相反电荷的离子(Counter ion), 也称为平衡离子: 该离子可以可逆的与配基相结合。
- 碧云天的离子交换填料主要包括强酸性阳离子交换填料SP Agarose 6FF (P2067)、弱酸性阳离子交换填料CM Agarose 6FF (P2069)、强碱性阴离子交换填料Q Agarose 6FF (P2071)和弱碱性阴离子交换填料DEAE Agarose 6FF (P2073), 四种填料的比较和选择请参见下表。

Product	SP Agarose 6FF	CM Agarose 6FF	Q Agarose 6FF	DEAE Agarose 6FF
Cat No.	P2067	P2069	P2071	P2073
Ion exchanger type	Strong cation	Weak cation	Strong anion	Weak anion
Ligand	$-(\text{CH}_2)_3\text{SO}_3^-$ (Sulphopropyl/ 磺丙基)	$-\text{O}-\text{CH}_2\text{COO}^-$ (Carboxymethyl/ 羧甲基)	$-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ (Quaternary ammonium/季铵基)	$-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{H}$ (Diethylaminoethyl/ 二乙基氨基乙基)
Ionic capacity	~0.18-0.25mmol H ⁺ /ml settled gel	~0.09-0.13mmol H ⁺ /ml settled gel	~0.18-0.25mmol Cl ⁻ /ml settled gel	~0.11-0.16mmol Cl ⁻ /ml settled gel
Binding capacity	>90mg lysozyme/ml settled gel	>50mg lysozyme /ml settled gel	>50mg BSA/ml settled gel	>90mg ovalbumin /ml settled gel
pH stability	3-14	2-14	2-14	2-14
Unstable chemicals	Oxidizing agents, cationic detergents		Oxidizing agents, anionic detergents	
Stable chemicals	Stable to all commonly used aqueous buffers; 1M NaOH; 8M urea; 6M guanidine hydrochloride; 1M acetic acid; 75% ethanol; 30% Isopropanol.			
Average particle size	~90μm			
Flow velocity	Recommended: 300-600cm/h; Maximum: 700cm/h			
Working temperature	4-30°C			
Autoclavable	121°C (pH7, 30min)			
Maximum pressure	0.3MPa			
Application	Purification for protein, antibody or other biomacromolecule			
Storage condition	4°C, 20% ethanol (SP Agarose 6FF: 0.2M Sodium acetate contain 20% ethanol)			

- 本产品是以DEAE作为功能基团、高度交联的琼脂糖为高分子基质的阴离子交换填料。DEAE是一种弱碱性的叔胺基团, 具有极佳的稳定性, 中心N原子带有正电荷, 可以吸附样品中带负电荷的蛋白质等, 所以这些带负电荷的蛋白质等被留在柱子上, 然后通过

提高洗脱液中的盐浓度等方法，将吸附在柱子上的带负电荷的蛋白质等洗脱下来，从而实现带负电荷的生物大分子的分离纯化。本产品采用高度交联的琼脂糖是以Beyorose™ 6FF为基质，该基质是高度交联的6%琼脂糖(Agarose)，与Sepharose 6 Fast Flow的性能基本一致。

- DEAE琼脂糖凝胶在生物医学领域内应用非常广泛，可以特异性地纯化生物制药或生物工程下游的蛋白、多肽、抗体等；或分离细胞和植物中多糖物质，多用于分离中性、酸性和粘多糖等物质等；还可用于分离大量的基因组DNA以及细菌、细胞裂解液中质粒DNA。本产品可用于非装柱的离心式直接纯化，也可用于装柱后纯化。本产品用于非装柱的离心式直接纯化实验流程请参考图1。

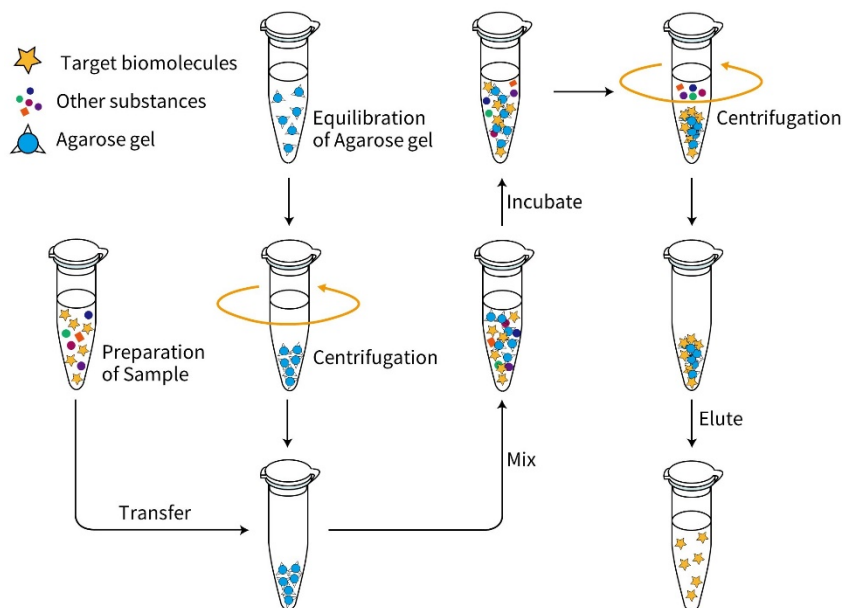


图1. 碧云天DEAE Agarose 6FF (DEAE琼脂糖凝胶) (P2073)用于非装柱的离心式直接纯化的实验流程图。

- **本产品结合容量高。**与同类的很多产品相比，本产品具有非常高的结合容量，对复杂样品中带负电荷的蛋白、多糖和核酸等生物分子可以快速进行分离纯化。每毫升DEAE Agarose 6FF沉淀可结合0.11-0.16mmol Cl⁻，可结合约90mg卵清蛋白。本产品用于BSA的结合效果参考图2。

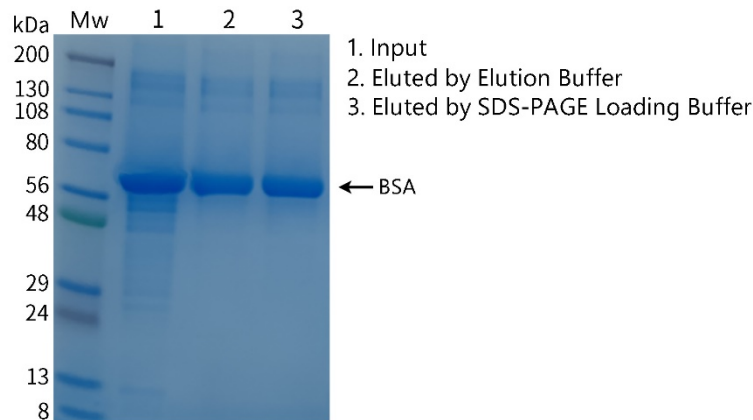


图2. 碧云天DEAE Agarose 6FF (DEAE琼脂糖凝胶) (P2073)用于BSA的结合效果图。样品1为Input，即BSA；样品2为本产品结合BSA后经推荐的洗脱缓冲液(Elution Buffer)洗脱后得到的样品；样品3为本产品结合BSA后经SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(1X) (P0015A)洗脱后得到的样品。图中约66kDa处的条带为BSA。图中可见，仅本产品处理后，分子量小于66kDa处的蛋白条带显著减少。实际结果会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异，图中数据仅供参考。

- **本产品特异性强。**本产品可特异性地结合带负电荷蛋白、多肽、多糖和核酸等生物大分子等，获得的产物纯度高，可进一步用于Western、ELISA、质谱分析等一系列后续的分析测试。
- **本产品流速快，适用性广。**本产品性能稳定，可以快流速操作，可适用于实验室规模制备和生物制药、生物工程的大工业化制备，也可对接常用的层析设备。
- 本产品保存在20%乙醇中，凝胶沉淀体积为总体积的50%，即例如10ml包装体积中含有5ml凝胶沉淀体积。

包装清单：

产品编号	产品名称	包装
P2073-10ml	DEAE Agarose 6FF (DEAE琼脂糖凝胶)	10ml
P2073-50ml	DEAE Agarose 6FF (DEAE琼脂糖凝胶)	50ml
P2073-200ml	DEAE Agarose 6FF (DEAE琼脂糖凝胶)	200ml

P2073-1000ml	DEAE Agarose 6FF (DEAE琼脂糖凝胶)	500ml×2
—	说明书	1份

保存条件：

4°C保存，两年有效。

注意事项：

- 本产品使用前须混合均匀，即颠倒若干次使琼脂糖凝胶混合均匀，混匀操作须轻柔，不宜剧烈涡旋震荡等，避免琼脂糖凝胶破碎。
- 在纯化时，建议设置阳性和阴性对照组。
- 蛋白样品收集后宜尽快完成纯化工作，并应始终放置在4°C或冰浴，以减缓蛋白降解或变性。为有效抑制蛋白降解，可以在蛋白样品中添加适量的蛋白酶抑制剂混合物，例如碧云天的蛋白酶抑制剂混合物(通用型, 100X) (P1005/P1006)、蛋白酶磷酸酶抑制剂混合物(通用型, 质谱兼容, 50X) (P1048/P1049)、蛋白酶抑制剂混合物(哺乳动物样品抽提用, 100X) (P1010/P1011)、蛋白酶磷酸酶抑制剂混合物(哺乳动物样品抽提用, 50X) (P1050/P1051)等。
- 如果离心不能完全除去蛋白样品中的不溶物，可以将样品溶液用0.45μm的滤膜过滤。
- 高浓度的DTT、巯基乙醇等对本产品与目标分子的结合可能有一定影响，且本产品不耐受阴离子去垢剂如SDS、脱氧胆酸钠等以及氧化剂，但Western及IP细胞裂解液(P0013)或NP-40裂解液(P0013F)等都完全适用。碧云天生产的不同裂解液的主要特点和差异，以及如何选择裂解液可参考我们的相关网页：<http://www.beyotime.com/support/lysis-buffer.htm>。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明：

1. 缓冲液的准备。

参考下表，根据具体的实验用途配制相应的缓冲液。

Buffer	Components	Products from Beyotime
Binding Buffer	20mM Tris-HCl (pH8.0)	1M Tris-HCl, pH8.0 (ST780/ST787)
Elution Buffer	20mM Tris-HCl (pH8.0), 500mM NaCl	5M NaCl (ST347/ST348)

注1：所用水和缓冲液在使用之前建议用0.22μm或0.45μm孔径滤膜过滤，以减少杂质，提高蛋白纯化效率。

注2：推荐的缓冲液适用于大多数蛋白的纯化，也可根据蛋白的稳定性或其自身特点更换其它缓冲体系。对于特殊样品，需自行进行优化，基本原则是低盐浓度上样，高盐浓度洗脱。

注3：对于与本产品结合比较紧密的目的蛋白，可适当地将Elution Buffer中NaCl浓度提高至1M。

2. 填料用量计算。

a. 计算装柱所需层析介质体积 V_m (充分沉降后层析介质部分的实体积)，计算公式：

$$V_m = \text{层析柱横截面积} \times \text{计划装柱的柱床高度} \times \text{层析介质的压缩比}$$

注：DEAE琼脂糖凝胶的压缩比为1.15。若是直接纯化， V_m 为根据载量计算得到的实体积，无须考虑压缩比。

b. 计算所需DEAE琼脂糖凝胶悬液体积。根据计算得到的 V_m 计算需要量取的介质悬液体积，计算公式：

$$\text{DEAE琼脂糖凝胶悬液体积} = V_m \div \text{介质悬液浓度}$$

注：DEAE琼脂糖凝胶悬液浓度为50%。

3. 蛋白样品的准备。

蛋白样品必须处在低盐溶液中，否则会影响其与填料的结合。通常推荐把蛋白样品透析至Binding Buffer中，也可以使用脱盐柱进行脱盐处理，或者使用适当孔径的超滤膜以通过超滤去除盐离子。如果样品中盐离子浓度不太高而蛋白浓度比较高，也可以酌情考虑使用Binding Buffer适当进行稀释。为防止样品堵塞柱子，在上样前样品需要用0.45μm的微孔滤膜过滤。

4. DEAE琼脂糖凝胶非装柱的离心式直接纯化。

DEAE琼脂糖凝胶的使用有两种方式。一种是非装柱的离心式直接纯化(本步骤)，即按照DEAE琼脂糖凝胶的载量，量取合适的体积和目的蛋白通过混合孵育和离心的方式进行目的蛋白的纯化，通常适合少量样品的纯化；另一种是比较常见的装柱后进行目的蛋白的纯化(步骤5)。

a. 量取琼脂糖凝胶。重悬DEAE琼脂糖凝胶，混合均匀，取根据步骤2计算所需要的悬液体积如20-100μl置于1.5ml离心管(FTUB306)中待用。注：使用大孔径吸头(如用剪刀剪去部分吸头)吸取凝胶悬浊液会比较方便。

b. 洗涤琼脂糖凝胶。加入Binding Buffer至最终体积为约0.5ml，轻轻重悬DEAE琼脂糖凝胶。600×g在4°C离心5分钟，小心去除上清，不要吸到凝胶，完成一次洗涤步骤。然后再按照前述洗涤步骤，洗涤2次。最终去除上清，并根据后续的实验目的，用适量的适当溶液重悬DEAE琼脂糖凝胶。

c. 蛋白吸附。加入适量处于Binding Buffer中的目的蛋白，轻轻重悬DEAE琼脂糖凝胶，置于翘板式摇床或旋转混合仪上，室温孵育30-60分钟。注：如果需要，可以在2-8°C混合1小时，以防止目标蛋白降解。推荐使用BeyoShaker™数字式翘板摇床(E6673)。

d. 去除上清。600×g在4°C离心5分钟，去除上清，不要吸到凝胶。这一步骤的上清可以保留，以便于检测目标蛋白的结合效果，甚至在出现结合效果不太理想的情况下，对于回收的上清可以再次用于纯化。

e. 洗涤。取1ml Binding Buffer加入DEAE琼脂糖凝胶中，轻轻重悬DEAE琼脂糖凝胶，600×g在4°C离心5分钟，去除上清，不要吸到凝胶。再重复洗涤3次。

f. 洗脱。根据目标蛋白的浓度及后续实验要求，加入100-200μl Elution Buffer，轻轻颠倒离心管数次，摇床摇动洗脱10分钟，

置于离心机中600×g在4°C离心5分钟，收集洗脱液转移到新的离心管中，即为目标蛋白。

5. DEAE琼脂糖凝胶装柱(本步骤为装柱使用方法，仅供参考，可根据实际情况或已有经验进行调整)。

a. 装柱。

(a) 取根据步骤2计算所需要的悬液体积，采用砂芯漏斗将所取的琼脂糖凝胶抽干，加入Binding Buffer (琼脂糖沉淀体积: Binding Buffer=1:1)重悬DEAE琼脂糖凝胶，形成均匀的凝胶悬浊液，并进行脱气处理。脱气推荐碧云天的BeyoSonicator™数字加热型超声波清洗仪(E6900/E6903/E6906)。

(b) 将层析柱垂直固定，使其底端浸没在盛有适量超纯水或者Equilibration Buffer的适当容器的液面下并保持一段液位。推荐碧云天的1ml (FCL01)、3ml (FCL03)、6ml (FCL06)、12ml (FCL12)等亲和层析柱空柱管。

(c) 将步骤5a的琼脂糖悬液用玻璃棒引导沿着柱内壁一次性全部倒入层析柱内，用塞子堵住层析柱底部，静置过夜，使凝胶自由沉降到底部。

注：所有操作过程不能引入气泡，保证装入填料的均匀度。

b. 平衡。

(a) 连接好柱子顶端的活动柱头与蠕动泵，打开蠕动泵，先用5倍柱体积Binding Buffer以上样操作时的流速平衡层析柱，再用5倍柱体积Binding Buffer以上样操作时1.5倍的流速平衡层析柱。

(b) 调节适配柱头，使其尽量贴近胶面，最后用2~3倍柱体积的Binding Buffer以上样操作时的流速平衡柱子，观察检测器的变化，直到电导、pH等参数稳定不变。

c. 上样。

(a) 对于处于Binding Buffer中的目的蛋白样品，切换转换阀进行蛋白上样，把样品从层析柱的上端加入，建议操作流速为300-600cm/h，这样能保证目的蛋白与琼脂糖凝胶充分接触，提高目的蛋白的回收率。

(b) 同时收集穿流液(Flow-through)，待检测。为了获得更好的目的蛋白结合效果可将穿流液再上样，重复步骤5c(a) 2次(或将样品1次性加入层析柱后置于摇床上，轻轻摇动，结合30分钟)。

注1：上样量根据样品的性质和层析介质的量进行选择，也可进行预实验找到最佳上样量。

注2：样品的预处理：除盐，用Binding Buffer透析或稀释，0.45μm孔微孔滤膜过滤。

d. 洗涤。

(a) 样品结合后，用2~3个柱体积的Binding Buffer洗涤上样后的层析柱，除去未交换结合的组分，观察检测器的变化，直到电导、pH等参数不变。

(b) 用约20倍柱体积的Binding buffer洗涤层析柱以去除非特异性吸附的杂蛋白，收集洗涤液。洗涤过程中勿让层析柱滴干。洗涤是否完全可以通过测定收集的洗涤液的280nm吸光度，最后的洗涤液的吸光度应该和Binding Buffer的吸光度或通过色谱系统测定紫外吸收达到一个稳定的基线而确定。

e. 洗脱。

可用恒定洗脱、线性梯度洗脱或者步级梯度洗脱。根据目标蛋白的浓度及后续实验要求，推荐使用Elution Buffer进行洗脱。通常按5倍柱体积的Elution buffer洗脱结合的目标蛋白。收集洗脱液，每管0.5ml-1ml (对于1ml层析柱)。

f. 再生。

(a) 按操作速度用3~5倍柱体积的高盐浓度的缓冲液(20mM Tris-HCl (pH8.0), 1-2M NaCl)冲洗层析柱。

(b) 接着用3~5倍柱体积的Equilibration Buffer洗涤层析柱。

注：若有失活蛋白质或脂类物质在再生时洗不掉，可用在位清洗(CIP)除去。

g. 在位清洗(Cleaning-in-place/CIP)。

(a) 介质经过长期使用后，过多的污染物会使柱床反压增大，从而降低柱效与介质吸附载量，甚至损害介质的寿命。定期在位清洗可有效保护介质。如果介质轻微污染，可每1-5次循环进行一次在位清洗。

(b) 对于实验后污染严重的介质，必须立即进行CIP处理。针对不同类型的杂质和污染物可按下述方法进行在位清洗：

1) 结合比较紧密蛋白的去除。用2~3倍柱体积的2M NaCl清洗，去除结合紧密的蛋白。

2) 强疏水性蛋白、沉淀蛋白的去除。先用3~5倍柱体积的1M NaOH清洗层析柱，去除沉淀蛋白和疏水结合蛋白，然后立即用5~10倍柱体积的超纯水清洗。

3) 脂蛋白和脂类物质的去除。先用5~10倍柱体积的70%乙醇或30%异丙醇清洗，然后用5~10倍柱体积的超纯水清洗。

4) 也可以将上述两种清洗条件结合进行清洗，如用含有1M NaOH的30%异丙醇溶液清洗。

注：70%乙醇或30%异丙醇使用前应进行超声波脱气处理；在位清洗过程中流速可选30-60cm/h；堵塞严重的时候可以进行反向清洗。

6. 灭菌。

由于20%乙醇不具有杀菌、除热原作用，建议DEAE Agarose 6FF介质在使用前及使用过程中，使用1M NaOH处理0.5-1小时以减少微生物污染风险。

7. 保存。

DEAE Agarose 6FF使用20%乙醇为保存液。使用后的DEAE Agarose 6FF应储存于20%乙醇中、4°C密闭保存。为了防止乙醇挥发以及微生物滋生，如有必要可以每3个月更换一次新鲜的保存液。

参考文献：

1. Kopaciewicz W, Regnier FE. Analytical Biochemistry. 1983. 133(1):251-259.

相关产品:

产品编号	产品名称	包装
P2015	Protein A Agarose (Fast Flow, 抗体纯化用)	2/10/50/200ml
P2017	Protein G Agarose (Fast Flow, 抗体纯化用)	2/10/50/200ml
P2019	Protein A+G Agarose (Fast Flow, 抗体纯化用)	2/10/50/200ml
P2067	SP Agarose 6FF (SP琼脂糖凝胶)	10/50/200/1000ml
P2069	CM Agarose 6FF (CM琼脂糖凝胶)	10/50/200/1000ml
P2071	Q Agarose 6FF (Q琼脂糖凝胶)	10/50/200/1000ml
P2073	DEAE Agarose 6FF (DEAE琼脂糖凝胶)	10/50/200/1000ml
P2159	Streptavidin Agarose (链霉亲和素琼脂糖凝胶)	1/5/20ml
P2165	Heparin Agarose (肝素琼脂糖凝胶)	1/5/20ml
FCL01	亲和层析柱空柱管(1毫升)	20套/包
FCL03	亲和层析柱空柱管(3毫升)	20套/包
FCL06	亲和层析柱空柱管(6毫升)	20套/包
FCL12	亲和层析柱空柱管(12毫升)	20套/包
FCL30	亲和层析柱空柱管(30毫升)	10套/包
FCL60	亲和层析柱空柱管(60毫升)	10套/包

Version 2024.08.11