

此说明仅限参考

苯甲脒琼脂糖凝胶 4FF

1 简介

苯甲脒类物质是丝氨酸蛋白酶的广谱抑制剂，所以将这类物质偶联到琼脂糖凝胶4FF上，可以从各种来源的样品中一步纯化胰蛋白酶、凝血酶、尿激酶、激肽释放酶、前激肽释放酶等丝氨酸蛋白酶。

2 亲和填料特征

基质	4%的高度交联琼脂糖凝胶
配基	苯甲脒
配基密度	6-10 μmol /ml
吸附载量	10-25 mg胰蛋白酶/ml
填料的颗粒大小	45-165 μm
最大流速*	300cm/h
pH范围	2-8
保存温度	+4~8℃
保存液体	20%乙醇

* 层析柱16mm*10cm，柱床高度5cm，20 ℃

3 使用方法

苯甲脒-琼脂糖凝胶 4FF 对于不同的样品的亲和力不同，吸附载量取决于流速、pH、缓冲液组成和温度等参数。

3.1 装柱

- （1）让所有的材料和试剂达到室温。配制初始缓冲液（平衡液）和洗脱缓冲液。
- （2）根据柱子大小取所需量的凝胶，用去离子水清洗掉 20%乙醇，用初始缓冲液（按凝胶：缓冲液=3：1 的比例）配成匀浆。
- （3）将柱内及柱子底端用水或缓冲液润湿并保持一小段液位，务必使底端无气泡。
- （4）用玻璃棒引导匀浆沿着柱内壁一次性倒入柱内，注意勿使产生气泡。打开柱子出液口，使凝胶在柱内自由沉降，连结好柱子顶端柱头。
- （5）打开蠕动泵，让缓冲液用使用时流速的 1.33 倍的流速流过，使柱床稳定（注意压力不要超过填

料最大耐压)。

3.2 样品的制备

样品应完全溶解，并且pH值应与结合缓冲液pH值相同。

为了避免堵塞层析柱，我们建议通过0.45μ m过滤器进行离心和过滤，以去除细胞碎片或其他颗粒物。

3.3 平衡色谱柱

用5-10个柱体积的结合缓冲液平衡该柱，直到流出液电导和pH不变。

参考结合缓冲液：0.05M Tris-HCl, 0.5M NaCl, pH 7.4。

3.4 上样

(1) 样品用平衡液配制，样品一定要离心或过滤后上样。盐浓度太大的样品需要处理后再配。

(2) 一般情况是让目标产品结合在柱子上，用平衡液洗去杂质和没有结合的蛋白，再选择一种洗脱液洗下目标产品。

3.5 洗脱

洗脱条件因样品而异，具体参考文献。

参考洗脱缓冲液：0.05M甘氨酸，pH 3.0或10mM HCl, 0.5M NaCl, pH2.0，可以往收集到的洗脱液中加入pH9 1M Tris-HCl，这将防止洗脱蛋白质由于pH低而变性。

结合物可以特异性或非特异性地洗脱。在结合缓冲液中加入20mM对氨基苯甲脒，使用竞争剂为目标分子，抑制剂对氨基苯甲脒来洗脱特异性结合的物质。

4 再生

根据样品的性质，可以通过用2-3床体积的高pH (0.1M Tris-HCl + 0.5M NaCl, pH8.5) 和低pH值 (0.1M 乙酸钠+ 0.5M NaCl, pH 4.5) 缓冲液交替洗涤填料，来再生苯甲脒-琼脂糖凝胶 6B，该循环应重复3次，然后用5-10倍柱床体积的结合缓冲液重新平衡。

5 保存

使用完的填料，用纯水彻底冲洗，最后保存在 20%乙醇中，4℃保存。

注意事项：

- 1.上样之前，样品必须经过膜过滤及去除色素，否则杂质及色素会被吸附到填料上，影响填料的正常使用。
 - 2.在使用过程中，避免使用高浓度的强酸强碱，酸和碱的浓度应低于 0.1 摩尔。碱会使流速变慢。
 - 3.不同的样品，吸附和洗脱方法不相同，可以根据相关的文献进行。
-