上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话：021-61312973　传真：021-55068248
网址：www.shyuanye.com
邮箱：shyysw@sina.com

NHS活化琼脂糖凝胶4FF

产品编号：S14064

产品简介

NHS 活化的琼脂糖树脂将蛋白质简单有效地共价固定到珠粒-糖链载体上，为抗体、抗原或其他生物分子的亲和纯化提供了 有价值的方法。活化的（Sepharose）琼脂糖含有能够与蛋白质或其他分子上的伯氨反应形成稳定的酰胺键的 N-羟基琥珀酰 亚胺（NHS）官能团。耦合反应在 pH 6~9 的无胺缓冲液中进行。不管配体的分子量或等电点（pI）耦合反应的效率均大于 80%。一旦配体被固定，所制备的树脂即可以被应用到多重亲和纯化程序中。交联的串珠塞糖具有快速的线性流动电位，使 其可用于重力流和中低压应用中。

特征参数

基球	4%高交联琼脂糖
配基	NHS
偶联量	3~20 mg/ml基质
平均粒径	90 μm
最大运行流速	500 cm/h
工作温度	4～40℃
最大压力	0.3 MPa,3 bar
化学稳定性	常用水相缓冲液
储存液	100%异丙醇

储存

2~8°C 下储存36个月，不可冻存。

蛋白配体固定过程

Buffer 的准备

所有的水和缓冲液均用 0.22 μm 或 0.45 μm 的滤膜进行过滤。

所需附加材料

1. 空柱以及兼容的离心机/收集管。

2. 介质洗涤液：1 mM 盐酸，静置在 0~4°C。

3. 偶联缓冲液：0.2 M NaHCO3，0.5 M NaCl，pH 8.3 或其他无胺缓冲液。

Note: 偶联缓冲液可以选择碳酸盐、磷酸盐等不含氨基的缓冲液体系。缓冲液体系中加入一定浓度的盐离子减少非特异性吸附。偶联缓冲液 pH 根据配体决定，通常在 pH 6~9 范围内，需注意 NHS 配基在较高的 pH 下会快速水解。为了避免除偶联的抗体/蛋白质之外的氨竞争偶联位点，偶联配体阶段不能使用含氨缓冲液。

4. 低 pH 值洗涤液：0.1 M 醋酸/醋酸钠，0.5 M NaCl，pH 4.0~5.0。

5. 高 pH 值洗涤液：0.1 M Tris-HCl，pH 8.0~9.0。

6. 保护液：包含 20%乙醇的 0.05 M Na2HPO4，pH 7.0。

7. 配体偶联液准备：将要偶联的含氨基的蛋白或者多肽用偶联缓冲液溶解，偶联浓度可选择在 1~10 mg/ml。对于已经在溶液中的蛋白质，若蛋白浓度超过推荐范围，则可以用偶联缓冲液稀释；若蛋白溶液中含氨基，则需用脱盐/透析等方法将溶剂置换成偶联缓冲液，从而彻底清除含有伯氨的缓冲液（如 Tris 或甘氨酸）。

8. 封闭液：0.5 M 乙醇胺，0.5 M NaCl，pH 8.3 或 0.1 M Tris-HCl，pH 8.5。

9. 中性平衡液：0.05 M Na2HPO4，pH 7.0。

配体偶联过程

1. 颠倒混匀琼脂糖树脂几次，混匀树脂。取合适体积的NHS活化琼脂糖树脂加入空柱中，垂直放置含有NHS活化琼脂糖树脂的柱子，平衡柱至室温，使树脂沉降，并流出储存液。用10~15倍树脂体积的介质洗涤液（0~4°C）洗涤树脂，再用2~3倍树脂体积的偶联缓冲液洗涤一次。

Note: 在实验过程中不能使树脂床变干，通过吹打或震荡使结块溶解，可以通过遇冷介质洗涤液清洗树脂预防水解作用。

2. 将准备好的配体偶联液加入到清洗好的 NHS 活化琼脂糖树脂中（NHS 活化琼脂糖树脂体积：样品溶液体积=1:1~2）。

3. 在室温下，震荡反应2~4小时；如果在4°C下进行偶联，震荡反应时间可以适当延长至过夜。

Note: NHS 活化琼脂糖树脂必须是悬浮状态，否则会影响偶联效率。偶联的反应温度和反应时间的选择要根据蛋白自身的性质进行优化，尤其要考虑配体活性的保持。若蛋白性质不稳定，不能震荡，可以间隔 30 min 后上下轻轻颠倒柱子几次，保证树脂和蛋白溶液是混合状态。

4. 偶联结束后收集反应液，并用 3 倍树脂体积的偶联缓冲液清洗介质。将收集到的反应液与清洗液合并，用于偶联率的测定。

5. 偶联反应完成后，加入两倍树脂体积的封闭液于 28°C 震荡反应 1 h，封闭树脂上所有未反应的基团。

6. 流出封闭液，交替使用高 pH 值洗涤液和低 pH 值洗涤液清洗封闭后的树脂。10 倍树脂体积的高 pH 值洗涤液与 10 倍树脂体积的低 pH 值洗涤液交替循环洗涤 3~6 次。再用 10 倍树脂体积的中性平衡液平衡后即可使用。如果不立即使用，将树脂保存于保护液中备用，于 2∽8°C 储存。

偶联率的计算

1. 测定偶联液于280 nm处的吸光度。

2. 取1 ml收集的反应液与清洗液的混合溶液，加入1 ml 2 M甘氨酸-盐酸缓冲液（pH 2.0）。测定溶液于280 nm处的吸光度。

Note: 若用我司的改良型 Bradford 法蛋白浓度测定试剂盒或改良型 BCA 法蛋白浓度测定试剂盒等试剂盒测定蛋白浓度，则不需要加入 1 ml 2 M 甘氨酸-盐酸缓冲液（pH 2.0）。

3. 偶联率的计算：偶联率 $= \frac{A1\times V1-A2\times V2}{A1\times V1}\times 100\%$

A1 = A280（偶联前的偶联液浓度）

V1 = 参与偶联的溶液体积

A2 = A280（偶联反应后的反应液与收集液的混合溶液浓度）

V2 = 清洗出的混合溶液体积

纯化方案

样品预处理

为了保证层析介质使用寿命，样品在进入到层析柱前应使用 0.22 μm 或 0.45 μm 滤膜过滤。并确保样品的 pH 值和离子强度与平衡缓冲液相同。

结合

吸附取决于样品浓度、流速、pH、缓冲液成分和温度等参数。平衡缓冲液的组成应根据靶蛋白和配体的性质进行优化。

洗脱

可以通过改变缓冲液的 pH 值、离子强度或极性，或添加变性剂来实现洗脱。应针对不同的样品和配体优化洗脱条件，以获得最大的纯度。

再生

再生的条件取决于所偶联的配体。一般可用洗脱缓冲液洗涤再生，随后用平衡缓冲液重新平衡。

在位清洗（CIP）

在位清洗(CIP)可去除再生后仍留在层析柱中的杂质，如脂质、内毒素、核酸和沉淀或变性蛋白质。定期 CIP 可有效保护介质，根据料液的不同，一般每使用 5 次后进行一次 CIP，如果料液变性，有沉淀物析出，则需使用后立刻进行 CIP。

CIP 条件取决于偶联配体，如果配体稳定性好，可以使用 6 M 盐酸胍、8 M 尿素甚至 0.1~0.5 M NaOH 清洗