



## 醛基活化亲和层析介质

货号: R43299

储存条件: 2-8℃

有效期: 12个月

### 产品简介:

本产品是一种预活化的琼脂糖微球,可以直接用于含氨基和巯基的多糖、蛋白或多肽等样品的偶联。预活化介质可以根据需要制备成特殊的亲和介质,快速有效地从复杂体系中一步纯化相应的物质。醛基活化亲和层析介质耐压性能好,偶联蛋白后性能比较稳定,可用于工业大规模纯化。

醛基活化亲和层析介质储存在含 20%乙醇的 1×PBS 中,凝胶和保护液的体积比为 1:1, 我司产品规格为实际凝胶的体积。

| 参数    | 指标                       |
|-------|--------------------------|
| 基质    | 高度交联的 4%琼脂糖微球            |
| 离子载量  | 10-15 mg Protein A/mL 介质 |
| 粒径范围  | 45~165 $\mu\text{m}$     |
| 最大压力  | 0.3 MPa, 3 bar           |
| 储存缓冲液 | 含 20%乙醇的 1×PBS           |
| 储存温度  | 2-8℃                     |
| 保质期   | 1 年                      |

### 使用说明

#### 1、缓冲液的准备

所用水和缓冲液在使用之前建议用 0.22 $\mu\text{m}$  或 0.45 $\mu\text{m}$  滤膜过滤。

偶联液: 0.1M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 0.5M NaCl, pH9.0

封闭液: 1.0M 乙醇胺, pH8.0 或 0.1M Tris, pH8.5

清洗液 1: 0.1M 乙酸-乙酸钠, 0.5M NaCl, pH3.0



清洗液 2: 0.1M Tris-HCl, 0.5M NaCl, pH8.0

保护液: 含 0.02%叠氮钠的 1×PBS

注: 偶联液可以选择碳酸盐、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。

## 2、样品准备

样品用偶联液溶解或透析, 浓度约 5-10mg/mL。

## 3、样品偶联

下面以偶联抗体纯化抗原为例, 介绍偶联及后续纯化步骤。

(1) 取适量的醛基活化亲和层析介质, 用纯水清洗一次, 再用偶联液清洗三次。

(2) 溶解好的样品加入至清洗好的醛基活化亲和层析介质中, 并加入终浓度 1mg/mL 的氰基硼氢钠, 填料: 样品溶液体积比约 1: 1-2 (V/V)。28℃振荡反应过夜。

注: 确保填料悬浮起来, 否则会大大影响偶联效率。如果偶联蛋白不稳定, 也可 4℃反应过夜。反应完后收集偶联样品, 以便检测偶联效率。

(3) 用去离子水清洗填料, 加入 2 倍柱体积的封闭液, 28℃振荡反应 1h。

(4) 将上述反应体系取出, 流干其中的封闭液, 用 3 倍柱体积的去离子水清洗填料, 清洗液1、去离子水、清洗液 2 和去离子水重复冲洗 2 次, 然后保存在等体积的保护液中, 于 2-8℃保存。

## 4、层析柱的装填

### 4.1 重力柱的装填

(1) 取合适规格的重力层析柱, 装入下垫片, 加入适量纯水润洗柱管和垫片, 关闭下出口。

(2) 将偶联好的填料混合均匀, 用枪头吸取适量浆液加入至重力柱中, 打开下出口流干保护液。



(3) 加入适量纯水冲洗介质，待柱管中液体重力流干后，关闭下出口。

(4) 装入润洗后的上垫片，确保垫片与填料之前没有空隙，且保持水平。

(5) 装填好的重力柱可以直接加入平衡液进行平衡。

#### 4.2 中压层析柱的装填

偶联好的填料也可用于大体积样品的纯化，因此，涉及到各种中压色谱层析柱的填装，下面介绍使填装层析柱的方法。

装柱前根据层析柱直径计算柱子底面积，根据所需装柱高度计算所需介质体积，公式如下：

$$V = 1.15 \times \pi \times r^2 \times h$$

V: 所需介质体积，ml

1.15: 压缩系数

r: 柱管半径，cm

h: 装填高度，cm

注意：所取悬液体积应为介质体积的两倍，因为介质体积只占悬液总体积的一半，另一半为保护液。

(1) 用去离子水冲洗层析柱底筛板与接头，确保柱底筛板上无气泡，关闭柱底出口，并在柱底部留出 1-2cm 的去离子水。

(2) 将填料悬浮起来，小心的将浆液连续地倒入层析柱中。用玻璃棒沿着柱壁倒入浆液可减少气泡的产生。

(3) 如果使用储液器，应立即在层析柱和储液器中加满水，将进样分配器放置于浆液表面，连接至泵上，避免在分配器或进样管中产生气泡。

(4) 打开层析柱底部出口，开启泵，使其在设定的流速下进行。最初应让缓冲液缓慢流过层析柱，然后缓慢增加至最终流速，这样可避免液 压对所形成柱床的冲击，也可以避免柱床形成的不均匀。如果达不到推荐的压力或流速，可以用你所使用泵的最大流速，这样也可以得到一个很好的装填效果。（注意：在随后的色谱程序中，不要超过最大装柱流速的 75%）当柱床高度稳定后，在最后的装柱流速下至少再上3倍柱床体积的去离子水。标上柱床高度。



(5) 关闭泵，关闭层析柱出口。

(6) 如果使用储液器，去除储液器，将分配器置于层析柱中。

(7) 将分配器推向柱子至标记的柱床高度处。允许装柱液进入分配器，锁紧分配器接头。

(8) 将装填好的层析柱连接至泵或色谱系统中，开始平衡。如果需要可以重新调整分配器。

## 5、样品纯化

### 5.1 缓冲液的准备

所用水和缓冲液在使用之前建议用 0.22 $\mu$ m 或 0.45 $\mu$ m 滤膜过滤。

平衡/洗杂液: 0.15 M NaCl, 20 mM Na<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub>, pH7.0

洗脱液: 0.1M 甘氨酸, pH3.0

中和液: 1M Tris-HCl, pH8.5

### 5.2 孵育法纯化

(1) 根据纯化的样品量，取适量偶联好的填料加入层析柱中，重力流干保护液。

(2) 加入 5 倍介质体积的平衡液清洗介质，重力流干。

(3) 加入样品，封闭柱管两端，4℃振荡孵育 2-4h 或者 37℃孵育 30min-2h。

(4) 孵育结束后，离心或过滤收集介质，上清保留作为流穿，用于电泳鉴定。

(5) 用 5 倍介质体积的洗杂液清洗介质，离心或过滤去除上清，重复 3-5 次，中间建议更换新离心管。

(6) 加入 3-5 倍柱体积的洗脱液进行洗脱，孵育 10-15min，离心或过滤收集洗脱液，可重复 2-3 次。洗脱组分需要立即调成中性，一般建议使用洗脱组分体积 1/10 的中和液进行中和。

### 5.3 重力柱法纯化

(1) 将装填好的重力柱用 5 倍柱体积平衡液进行平衡，使填料处于与目的蛋白相同的缓冲液体系下。

(2) 将样品加到平衡好的重力柱中，收集流出液，可以反复上样增加结合效率。



(3) 用 10 倍柱体积的洗杂液进行洗杂，去除非特异性吸附的杂蛋白，收集洗杂液。

(4) 使用 5 倍柱体积的洗脱液洗脱，分管收集。洗脱组分需要立即调成中性，一般建议使用洗脱组分体积 1/10 的中和液进行中和。

#### 5.4 中压层析柱法纯化

中压层析柱装填好后，可以用各种常规的中低压色谱系统。

(1) 将泵管道中注满去离子水。去掉上塞子，将层析柱连接至色谱系统中，打开下出口，将预装柱接到色谱系统中，并旋紧。

(2) 用 3-5 倍柱体积的去离子水冲洗出储存缓冲液。

(3) 使用至少 5 倍柱床体积的平衡液平衡色谱柱。

(4) 利用泵或样品环上样。注：样品的粘度增加使得即使上样体积很少，也会导致层析柱很大的反压。上样量不要超过柱子的结合能力。大量的样品体积也可能造成很大的反压，使得进样器更难使用。

(5) 用洗杂液冲洗柱子，直到紫外吸收达到一个稳定的基线（一般至少 10-15 个柱体积）。

(6) 使用 5-10 倍柱体积的洗脱液洗脱，收集洗脱液，即目的蛋白组分。洗脱组分需要立即调成中性，一般建议使用洗脱组分体积 1/10 的中和液进行中和。

介质洗脱结束后，用平衡液冲洗 5-10 柱体积，然后用纯水冲洗 5-10 个柱体积，再用 20%乙醇冲洗 2 个柱体积，置于 2-8℃ 保存。

#### 6、SDS-PAGE 检测

将使用纯化产品得到的样品（包括流出组分、洗杂组分和洗脱组分）以及原始样品使用 SDS-PAGE 检测纯化效果。