

NHS-Activated Beads 4FF

产品简介

NHS- Activated Beads 4FF是一种预活化的琼脂糖微球，可以直接用于含氨基的蛋白或多肽的耦联。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。NHS-Activated Beads 4FF耐压性能好，耦联蛋白后性能比较稳定，可用于工业大规模纯化。

表1. NHS- Activated Beads 4FF产品性能

项目	性能
基质	高度交联的 4%琼脂糖微球
粒径	45-165
配体	巯基乙醇
载量	>10mg hIgG/ml介质
工作pH	3-11
最大压力	0.3MPa,3bar
保存	100%异丙醇， -20℃

使用流程

1 . 缓冲液的准备

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

清洗液: 1 mM HCl

偶联液: 0.2 M NaHCO₃, 0.5 M NaCl, pH8.0

封闭液: 0.5 M 乙醇胺, 0.5 M NaCl, pH8.3 或 0.1 M Tris, pH8.5

清洗液 1: 0.1 M 乙酸-乙酸钠, 0.5 M NaCl, pH3.0

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

保护液:含 20%乙醇的 1×PBS

注: 1)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)当偶联样品为抗体时，可选择 1XPBS，0.02%NaN₃ 或者 1×PBS, 0.02%Proclin 300 作为保护液。

2 . 样品准备

样品用偶联液溶解或透析，浓度约 5-10 mg/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 NHS- Activated Beads 4FF,用清洗液抽滤清洗三次，用偶联液清洗一次。注:填料不可抽太干，以免结块，万一出现结块现象可振荡或吹打分散开。可以选用预冷的溶液快速清洗，减少预活化介质的水解。

2)溶解好的样品加入至清洗好的 NHS- Activated Beads 4FF 中，NHS- Activated Beads 4FF:样品溶液体积比约 1: 1-2 (VN)。

3) 28°C 振荡反应 2-4 h 或 4°C过夜。注:确保填料悬浮起来，否则会大大影响偶联效率。

4)反应完后收集偶联样品，以便检测偶联效率。去离子水清洗填料,加入 2 倍柱体积的封闭液，28°C振荡反应 1 h。

注:偶联后无法用紫外吸收测定上清蛋白浓度，建议用电泳或者 BCA 定量法检测偶联效率。

5)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°C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：

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

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 1-2 cm 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 μm 或 0.45 μm 滤膜过滤。

平衡/洗杂液: 0.15 M NaCl, 20 mM Na_2HPO_4 , pH 7.0

洗脱液: 0.1 M 甘氨酸, pH 3.0

中和液: 1 M Tris-HCl, pH 8.5

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 2-4 h 或者 37℃ 孵育 30 min-2 h。

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 10-15 min,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。

***本试剂仅供实验室研究使用**