

## Benzamidine 亲和层析介质(4FF)

### Benzamidine Beads 4FF

货号	规格
BDTL0075-25	25ml
BDTL0075-200	200ml

#### 1. 产品介绍

Benzamidine Beads 4FF 是一种用于纯化胰蛋白酶、尿激酶和激肽释放酶等丝氨酸蛋白酶的介质。苯甲脒类物质是丝氨酸蛋白酶的广谱抑制剂，Benzamidine Beads 4FF 是将苯甲脒类物质连接至高度交联的 4%琼脂糖介质上，可以从血清、细胞上清液和菌体裂解液中一步纯化样品。具体性能见表 1。

表 1. Benzamidine 亲和层析介质(4FF)产品性能

性能	指标
基质	高度交联的 4%琼脂糖微球
配体	4-氨基苯甲脒
载量 (/ml 介质)	>20mg/ml 介质
粒径 ( $\mu\text{m}$ )	45-165
最大流速	0.3 MPa, 3 bar
pH 稳定范围	3-11
储存缓冲液	50mM NaAc, pH4.0, 20%乙醇
储存温度	2-8 $^{\circ}\text{C}$

#### 2. 纯化流程

##### 2.1 Buffer 的准备

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

- **平衡/洗杂 Buffer:** 50mM Tris-HCl, 0.5M NaCl, pH7.4
- **洗杂 Buffer:** 50mM Tris-HCl, 0.5M NaCl, pH7.4
- **洗脱 Buffer:** 10mM HCl, 0.5M NaCl, pH2.0 或 50mM 甘氨酸, pH3.0
- **中和 Buffer:** 1M Tris,pH8.5
- **竞争性洗脱 Buffer:** 50mM Tris-HCl, 20mM 4-氨基苯甲脒, 0.5M NaCl, pH7.4

##### 2.2 样品准备

样品在上样前建议离心或用 0.22 $\mu\text{m}$  或 0.45 $\mu\text{m}$  滤膜过滤，减少杂质，提高蛋白纯化

效率和防止堵塞柱子。

### 2.3 Benzamidine Beads 4FF 装填

**Benzamidine Beads 4FF** 被广泛应用于工业纯化，因此，涉及到各种中压色谱层析柱的装填，下面介绍使用 **Benzamidine Beads 4FF** 装填层析柱的方法。

#### 层析柱的装填（使用储液器装填）

- 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。
- 将树脂悬浮起来，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。
- 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。
- 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。
- 关闭泵，关闭层析柱出口。
- 如果使用储液器，去除储液器，将分配器置于层析柱中。
- 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。
- 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。

### 2.4 样品纯化

**Benzamidine Beads 4FF** 装填好后，可以用各种常规的中低压色谱系统。

- 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。
- 用 3-5 倍柱体积的去离子水冲洗出储存缓冲液。
- 使用至少 5 倍柱床体积的平衡液平衡色谱柱。
- 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。
- 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）。
- 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。

## 2.5 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。

## 3. 层析介质清洗

本纯化产品可以重复使用而无需再生，但随着非特异性结合的蛋白的增多和蛋白的聚集，往往造成流速和结合载量都下降，这时可按照下面方法对树脂进行清洗。

### 去除一些沉淀或变性物质，建议使用下面的方法

用 2 倍柱体积的 6M 盐酸胍或 8M 尿素溶液进行清洗，然后立即用 5 倍柱体积的去离子水清洗。

### 去除一些疏水性吸附造成的非特异性吸附物质

用 3-4 倍柱体积的 70%乙醇或 2 倍柱体积的 1% Triton™ X-100 清洗，然后立即用 5 倍柱体积的去离子水清洗。

### 去除一些离子键结合物质

用 3-4 倍柱体积的 2M NaCl 清洗，然后立即用 5 倍柱体积的去离子水清洗。

## 4. 订购信息及相关产品

名称	货号	规格
Benzamidine 亲和层析介质 (4FF) Benzamidine	BDTL0075 -25	25ml
Beads 4FF	BDTL0075-200	200ml