

蓝色染料层析介质（6FF）

Blue Beads 6FF

名称	货号	规格
蓝色染料层析介质（6FF）	BDTL0016-50	50ml
蓝色染料层析介质预装柱	BDTL0016-11	1×1ml
	BDTL0016-51	5×1ml
	BDTL0016-15	1×5ml
	BDTL0016-55	5×5ml
	BDTL0016-3115	3×1ml+1×5ml

1. 产品介绍

蓝色染料层析介质（6FF）是一种用于纯化白蛋白、干扰素、需要核苷酸辅助的酶、 α 2-巨球蛋白凝血因子等的亲和层析介质。该层析介质以高交联的 6% 琼脂糖为介质，可耐受较高的流速及更高的化学稳定性，适合大规模纯化。具体性能见表 1。

表 1. 蓝色染料层析介质（6FF）产品性能

性能	指标
基质	高度交联的 6% 琼脂糖微球
配体	活性蓝 3G
配体密度	约 7 μ mol/ml 介质
载量	>18mg 人血清白蛋白/ml 介质
粒径 (μ m)	45-165
最大流速	0.3 MPa, 3 bar
pH 稳定范围	4-12
储存缓冲液	20% 乙醇, 0.1M KH_2PO_4 , pH8.0
储存温度	2-8°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 μ m 或 0.45 μ m 滤膜过滤。以人血清白蛋白(HAS) 的纯化为例。

➤ **结合/洗杂 Buffer:** 50mM Na₂HPO₄, 50mM 柠檬酸钠, pH7.0

➤ **洗脱 Buffer:** 50mM Na₂HPO₄, 50mM 柠檬酸钠, 1-2M NaCl, pH7.0

注: 结合液和洗脱液可根据样品性质进行适当改变, 原则是低盐上样高盐洗脱。

2.2 样品准备

样品在上样前建议离心或用 0.22μm 或 0.45μm 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 层析介质装填

本层析介质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。

层析柱的装填 (使用储液器装填)

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. 将层析介质悬浮起来, 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, 开起泵, 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, 将分配器至于层析柱中。
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。

2.4 样品纯化

1. 将层析介质装入合适的层析柱, 层析用 5 倍柱体积的结合 Buffer 进行平衡, 使层析介质处于与目的蛋白相同的缓冲体系下, 起到保护蛋白的作用。
2. 将样品加到平衡好的层析介质中 (保证目的蛋白与层析介质充分接触, 提高目的蛋白的回收率), 收集流出液。
3. 用 10-15 倍柱体积的洗杂 Buffer 进行清洗, 去除非特异性吸附的杂蛋白, 收集洗杂液。
4. 使用 5-10 倍柱体积的洗脱 Buffer, 收集洗脱液, 即目的蛋白组分。
5. 依次使用 3 倍柱体积的结合 Buffer 和 5 倍柱体积的去离子水平衡层析介质, 最后再用 5

倍柱体积的 20%的乙醇平衡，然后保存在等体积的 20%的乙醇中，置于 4°C 保存，防止层析介质被细菌污染。

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

本层析介质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层析介质进行清洗。

➤ 去除一些沉淀或变性物质，建议使用下面的方法

用 3-4 倍柱体积的 0.1M NaOH，然后用 3-4 倍柱体积的 70%乙醇或 2M 硫氰酸钾溶液清洗，然后立即用 5 倍柱体积的结合液平衡。

➤ 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 30%的异丙醇或 1% Triton X-100 清洗，然后立即用 5 倍柱体积的结合液平衡。