ECH-Activated Beads 4FF

目录

1. 产品介绍.....1
2. 使用流程.....1
3. 订购信息及相关产品.....3

1. 产品介绍

ECH-Activated Beads 4FF 是一种预活化的琼脂糖微球，该填料在一个 10 原子的亲水间隔臂的末端具有游离羧基基团，可以直接用于含氨基的蛋白和样品的耦联。较长的亲水间隔臂使其更适于偶联小分子。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。

表 1. **ECH- Activated Beads 4FF** 产品性能

项目	性能
基质	高度交联的 4%琼脂糖微球
配基密度	＞15 μmol/ml 介质
粒径范围	45-165 μm
最大压力	0.3 MPa，3bar
储存缓冲液	含 20% 乙醇的 1XPBS
储存温度	2-8℃

2. 使用流程

2.1 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。
偶联液：0.1 M MES，pH 4.5-6.0
清洗液 1：0.1 M 乙酸钠-乙酸，0.5 M NaCl，pH4.0
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：偶联缓冲液中不要含有氨基、磷酸基和羧基，否则会影响反应。缓冲液体系中可以加入一定浓度的盐离子减少非特异性吸附。

2.2 样品准备

样品用偶联液溶解或透析，如果样品不溶，可以加入 50%的二氧六环或者乙二醇，然后用 pH 试纸调 pH4.5-6.0。

2.3 样品偶联（氨基样品）

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 **ECH-Activated Beads 4FF**，去除保护液，用稀盐酸(pH4.5)溶液抽滤清洗三次，用偶联液清洗一次。
2）将溶解好的样品中溶解后转入清洗好的 ECH-Activated Beads 4FF 中，填料：样品溶液体积比约为 1：1-1:2。
3）直接加入称好的 EDC 固体粉末，或逐滴加入高浓度的 EDC,使其终浓度为 0.1 M。如果是母液需提前调节 pH。
注：通常 EDC 摩尔数约为配体摩尔数的 10-100 倍，推荐浓度 0.1 M。EDC 溶液需要现配现用。
4）4-25℃摇床中振荡混合反应（离心管水平放置）2-24 h。**注：**确保填料悬浮起来，否则会大大影响偶联效率。
5）反应第 1 小时后溶液 pH 会降低，需要用 0.1 M NaOH 溶液调节 pH 至 4-6。
6）反应完后收集偶联样品，以便检测偶联效率。
7）将上述反应体系取出，流干其中的溶液，用 3 倍柱体积的去离子水清洗填料，然后用 3 倍体积的清洗液 1 和清洗液 2 交替洗 2 次，5 倍去离子水清洗，然后保存在等体积的保护液中，于 2-8℃保存。

2.4 层析柱的装填

2.4.1 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。

2.4.2 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：

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

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。

2.5 样品纯化

2.5.1 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

2.5.2 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。

2.5.3 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。

2.5.4 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。

2.6 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。

3. 订购信息及相关产品

名称	货号	规格
ECH-Activated Beads 4FF	SA063005	5 ml
	SA063025	25 ml
	SA063100	100 ml
	SA063500	500 ml
	SA06301L	1 L