



Benzamidine Beads 4FF

目录

1. 产品介绍.....	1
2. 纯化流程.....	1
3. 填料清洗.....	2
4. 订购信息及相关产品.....	3

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 Beads 4FF 产品性能

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

2. 纯化流程

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。

平衡液：50 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, pH7.4

洗杂液：50 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, pH7.4

洗脱液：10 mM HCl, 0.5 M NaCl, pH2.0 或 50 mM 甘氨酸, pH3.0

中和液：1 M Tris, pH8.5

竞争性洗脱液：50 mM Tris-HCl, 20 mM 4-氨基苯甲脒, 0.5 M NaCl, pH7.4

2.2 样品准备

样品在上样前建议离心或用 0.22 μm 或 0.45 μm 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

2.3.1 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 **Benzamidine Beads 4FF** 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，暂不使用时则加入保护液，2-8 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

2.3.2 中压层析柱的装填

Benzamidine Beads 4FF 被广泛应用于工业纯化，因此，涉及到各种中低压色谱层析柱的填装，下面介绍使用 **Benzamidine Beads 4FF** 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) 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。

2.4 样品纯化

2.4.1 孵育法纯化

- 1) 根据纯化的样品量, 取适量 **Benzamidine Beads 4FF** 加入层析柱中, 重力流干保护液。
- 2) 向离心管中加入 5 倍介质体积的平衡液清洗介质, 1000 rpm 离心 1 min, 吸弃上清; 如使用重力柱, 则直接在重力柱中清洗, 直接重力流干平衡液; 重复两次以上。
- 3) 加入样品, 封闭离心管或重力柱管, 4℃振荡孵育 2-4 h 或者 37℃孵育 30 min-2 h。
- 4) 孵育结束后, 1000 rpm 离心 1 min, 吸弃上清, 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, 1000 rpm 离心 1 min 或重力柱管过滤, 去除上清 (注意不要吸到介质), 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, 室温孵育 5min, 1000 rpm 离心 1 min 或重力柱管收集洗脱液, 可重复 2-3 次。

2.4.2 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, 重复 2-3 次。
- 2) 将样品加到平衡好的重力柱中, 样品保留时间至少 2 min, 保证样品和介质充分接触, 收集流出液, 可以反复上样增加结合效率。
- 3) 用 10-15 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 5-10 倍柱体积的洗脱液洗脱, 分段收集, 每一个柱体积收集一管, 分别检测, 既可以保证所有结合的目的蛋白被洗脱, 又可以得到高纯度和高浓度的蛋白。

2.4.3 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。

2.5 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. 填料清洗

Benzamidine Beads 4FF 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填料进行清洗。





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 6 M 盐酸胍或 8 M 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 2 M 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 Beads 4FF	SA044005	5 ml
	SA044025	25 ml
	SA044100	100 ml
	SA044500	500 ml
	SA04401L	1 L
	SA04410L	10 L
PreCap Benzamidine 4FF	SA044C11	1X1 ml
	SA044C51	5x1 ml
	SA044C15	1X5 ml
	SA044C55	5X5 ml
	SA044CS	3X1 ml+1X5 ml

