



Con A Beads 4FF

目录

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

1. 产品介绍

Con A Beads 4FF 是一种将伴刀豆球蛋白 A（简称 Con A）与琼脂糖偶联，纯化一些糖蛋白的亲层析介质。Con A 是从巨豆（Jack bean, *Canavalia ensiformis*）中分离出来的一种植物血凝素，能与含有 α -D-吡喃甘露糖基、 α -D-吡喃葡萄糖基以及与其空间位置相关的分子基团的结合。Con A 与糖类分子结合主要在 C-3、C-4 及 C-6 的羟基部分。Con A 与 D-吡喃甘露糖的结合比与 D-吡喃葡萄糖要强些。**Con A Beads 4FF** 主要用来分离和纯化一些糖蛋白、膜蛋白、糖脂、多糖、带甘露糖苷或葡萄糖苷残基的膜囊泡、IgM、激素脂蛋白等。例如人血清中胰蛋白酶抑制剂、碱性磷酸酯酶、小牛脾磷酸二酯酶、不同变种的甲胎球蛋白和某些激素如绒毛膜促性腺激素（HCG）、促黄体激素（LH）等物质都可以用它纯化。**Con A Beads 4FF** 应用范围广，具体性能见表 1。

表 1. Con A Beads 4FF 产品性能

性能	指标
基质	高度交联的 4%琼脂糖微球
配体	Con A
载量	>20 mg 甲状腺球蛋白 /ml 介质
粒径范围	45-165 μ m
最大压力	0.3 MPa, 3 bar
pH 稳定范围	4-9
储存缓冲液	0.1 M NaAc, 1 M NaCl, 1 mM CaCl ₂ , 1 mM MnCl ₂ , 1 mM MgCl ₂ , 20% 乙醇, pH6.0
储存温度	2-8℃

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 μ m 或 0.45 μ m 滤膜过滤。

Con A Beads 4FF 在缓冲液 pH 小于 5.0 时，必须添加 Mn^{2+} 和 Ca^{2+} 以保证吸附活性。我们推荐使用以下缓冲液纯化。

平衡/洗杂液：20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MnCl₂, pH7.4

洗脱液：20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MnCl₂, 0.1 M-0.2 M α -D-甲基甘露糖苷或 α -D-甲基葡萄糖苷, pH7.4

注：1) 缓冲液配制原则是先溶解基础组分（Tris+NaCl），并调节 pH，最后加入金属盐避免生成沉淀。以下是平衡/洗杂液详细配制方法。

步骤 1：称取 20 mM Tris、0-0.5 M NaCl，加水溶解，使用 NaOH 或 HCl 调节 pH 至 7.4；

步骤 2：向调节好 pH 的缓冲液中分别加入终浓度 1mM CaCl₂，1mM MnCl₂，混合均匀后，使用 0.22 μ m 或 0.45 μ m 滤膜过滤。

2) 洗脱液中 α -D-甲基甘露糖苷或 α -D-甲基葡萄糖苷浓度可根据物质吸附能力进行线性或梯度洗脱。甘露糖和葡萄糖亦可以做洗脱物质，但洗脱能力较弱。

3) 结合能力较强的物质可采用降低洗脱液 pH 洗脱，但不要低于 pH3.0。也可采用硼酸盐作为洗脱液，如 0.1 M 硼酸盐, pH6.5。

4) 对于强结合的蛋白，可以在洗脱缓冲液中加入 1%的脱氧胆酸钠或者其他去污剂，以促进洗脱。

2.2 样品准备

上柱前要确保样品溶液有合适的离子强度和 pH 值，可以用平衡/洗杂液对血清样品、腹水或细胞培养液稀释，或者样品用平衡/洗杂液透析。样品在上样前建议离心或用 0.22 μ m 或 0.45 μ 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 Con A 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 **Con A Beads 4FF** 混合均匀，用枪头吸取适量浆液加入至重力柱中（介质实际体积占悬液的一半），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℃保存。

2.3.2 中压层析柱的装填

Con A 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。

2.4 样品纯化

2.4.1 孵育法纯化

- 1) 根据纯化的样品量，取适量 **Con A Beads 4FF** 加入离心管中，1000 rpm 离心 1 min，吸弃上清；也可加入重力柱中，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 **Con A Beads 4FF** 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

Con A Beads 4FF 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。

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

Con A 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。

用 3-4 倍柱体积的含有 0.5 M NaCl 的 pH8.5 或 pH4.5 的缓冲液清洗，然后立即用 5 倍柱体积的结合液平衡。

结合力较强物质的去除

用 2 倍柱体积的含 1% Triton™ X-100, pH6.5 的 0.1 M 硼酸盐缓冲液清洗，或 20%乙醇或 50%乙二醇溶液清洗，然后立即用 5 倍柱体积的 PBS, pH7.4 清洗。

4. 订购信息及相关产品

名称	货号	规格
Con A Beads 4FF	SA028005	5 ml
	SA028025	25 ml
	SA028100	100 ml
	SA028500	500 ml
	SA02801L	1 L
	SA02810L	10 L
PreCap Con A	SA028C11	1×1 ml
	SA028C51	5×1 ml
	SA028C15	1×5 ml
	SA028C55	5×5 ml
	SA028CS	3×1 ml+1×5 ml

