



Smac LCA

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

Smac LCA 是一种将小扁豆凝集素 (Lens Culinaris Agglutinin, 简称 LCA) 与琼脂糖偶联, 纯化一些糖蛋白的亲层析介质。LCA 是从小扁豆中分离出来的一种金属蛋白, 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结合。**Smac LCA** 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。**Smac LCA** 应用范围广, 具体性能见表 1。

表 1. Smac LCA 产品性能

性能	指标
基质	高刚性琼脂糖微球
配体	Lens Culinaris Agglutinin
载量	15-20 mg 甲状腺球蛋白/ml 介质
平均粒径	70-80 μ m
最大压力	0.3 MPa, 3 bar
储存缓冲液	150 mM NaCl, 1 mM CaCl_2 , 1 mM MnCl_2 , 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 μ m 或 0.45 μ m 滤膜过滤。

Smac LCA 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, 0-0.5 M NaCl, 1 mM CaCl_2 , 1 mM MnCl_2 , pH7.4

洗脱液: 20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 1 mM CaCl_2 , 1 mM MnCl_2 , 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 CaCl_2 , 1mM MnCl_2 , 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 Smac LCA 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 **Smac LCA** 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 $^{\circ}\text{C}$ 保存。





2.3.2 中压层析柱的装填

Smac LCA 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 **Smac LCA** 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 **Smac LCA** 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

Smac LCA 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

Smac LCA 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 和 pH4.5 的缓冲液交替清洗三次，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 0.1% Triton™ X-100，pH6.5 的 0.1 M 硼酸盐缓冲液低流速清洗，也可用 20%乙醇或最高 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
Smac LCA	SA127005	5 ml
	SA127025	25 ml
	SA127100	100 ml
	SA127500	500 ml
	SA12701L	1 L
	SA12710L	10 L
PreCap Smac LCA	SA127C11	1X1 mL
	SA127C51	5X1 mL
	SA127C15	1X5 mL
	SA127C55	5X5 mL

