



Smac Blue

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	2

1. 产品介绍

Smac Blue 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。该色谱填料具有高结合力，是工业纯化中可靠的理想选择。

表 1. Smac Blue 产品性能

项目	性能
基质	高刚性琼脂糖微球
平均粒径 (μm)	$\sim 75 \mu\text{m}$
配体密度	约 $13 \mu\text{mol/ml}$ 介质
蛋白载量	$\geq 33 \text{ mg BSA/ml}$ 介质
推荐流速	$< 600 \text{ cm/h}$
pH 稳定范围	4-12
储存缓冲液	$0.1 \text{ M KH}_2\text{PO}_4$, 20% 乙醇, pH8.0
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 $0.22 \mu\text{m}$ 或 $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜过滤。

平衡/洗杂液: $50 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$, 50 mM 柠檬酸钠, pH7.0

洗脱液: $50 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$, 50 mM 柠檬酸钠, $1-2 \text{ M NaCl}$, 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 $0.22 \mu\text{m}$ 或 $0.45 \mu\text{m}$ 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 介质装填

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 Blue** 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 Blue 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, 下面介绍填装层析柱的方法。

- 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 $1-2 \text{ cm}$ 的去离子水。
- 2) 将树脂悬浮起来, 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 Blue** 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 Blue** 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 Blue 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 0.1 M K₃PO₄，20%乙醇，pH8.0 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 Blue 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 3-4 倍柱体积的 0.1 M NaOH，然后用 3-4 倍柱体积的 70%乙醇或 2 M 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。

4. 订购信息及相关产品

名称	货号	规格
Smac Blue	SA128005	5 ml
	SA128025	25 ml
	SA128100	100 ml
	SA128500	500 ml
	SA12801L	1 L
	SA12810L	10 L

