



HiSelect Con A 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.....	2

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。

HiSelect Con A 4FF 是一种中压预装柱, 填充 4.7 ml 的 **Con A Beads 4FF** 介质。柱管由生物相容性聚丙烯制成, 不与生物分子相互作用。柱管两头都有堵头, 防止保护液的泄露。柱体标签上的箭头表示推荐的流向。预装柱具有标准接口, 可以适配商品化的各类中压色谱系统, 如 ÄKTA 等, 方便客户操作。

表 1. HiSelect Con A 4FF 产品性能

项目	性能
规格	4.7 ml
基质	高度交联的 4% 琼脂糖微球
配体	Con A
载量	30-40mg 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
柱尺寸 (内径×高度)	0.77×10 cm
储存缓冲液	0.1 M 醋酸盐, 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 °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。

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 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 样品纯化

HiSelect Con A 4FF 设计用糖蛋白的亲纯化, 可以用各种常规的中低压色谱系统, 以 ÄKTA 仪器使用为例介绍 **HiSelect Con A 4FF** 使用方法。

- 1) 将泵管道中注满去离子水。去掉上堵头, 将层析柱连接至色谱系统中。再打开下口, 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存储缓冲液。
- 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) 用 5-10 倍柱体积洗脱液洗脱。
- 7) 依次使用 3 倍柱体积的平衡液和 5 倍柱体积的去离子水平衡填料, 后再用 5 倍柱体积的保护液平衡, 然后将预装柱置于 2-8 $^{\circ}\text{C}$ 保存, 防止填料被细菌污染。

2.4 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, pH 6.5 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
HiSelect Con A 4FF	SA028C47	1×4.7 ml
HiPur Con A 4FF	SA028C20	1×20 ml

