



## 苯甲脒-琼脂糖凝胶 6B

苯甲脒类物质是丝氨酸蛋白酶的广谱抑制剂，所以将这类物质偶联到琼脂糖凝胶6B上，可以从各种来源的样品中一步纯化胰蛋白酶、凝血酶、尿激酶、激肽释放酶、前激肽释放酶等丝氨酸蛋白酶。

### 1 亲和填料特征

基质	6%的琼脂糖凝胶
配基	苯甲脒
配基密度	5-7 $\mu\text{mol} / \text{ml}$
吸附载量	8-15 mg胰蛋白酶/ml
填料的颗粒大小	45-165 $\mu\text{m}$
最大流速*	75cm/h
pH范围	2-8
保存温度	+4~8 $^{\circ}\text{C}$
保存液体	20%乙醇

\* 层析柱16mm\*10cm，柱床高度5cm，20  $^{\circ}\text{C}$

### 2 使用方法

苯甲脒-琼脂糖凝胶 6B 对于不同的样品的亲和力不同，吸附载量取决于流速、pH、缓冲液组成和温度等参数。

#### 3.1 装柱

- (1) 让所有的材料和试剂均平衡至层析实验的温度。配制缓冲液，对所有的缓冲液进行脱气处理。
- (2) 检查层析柱所有部件，特别是过滤网，密封圈，螺旋塞是否紧密，玻璃管是否干净和完整。
- (3) 根据需要量取相应量的凝胶，用去离子水清洗掉 20%乙醇。
- (4) 将柱子底端用水或缓冲液润湿并保持一小段液位，务必使底端无气泡。
- (5) 用玻璃棒引导匀浆沿着柱内壁一次性倒入柱内，注意勿使产生气泡。打开柱子出液口，使凝胶在柱内自由沉降，连结好柱子顶端柱头。
- (6) 打开蠕动泵，让缓冲液用使用时流速的 1.33 倍的流速流过，使柱床稳定（注意压力不要超过填料最大耐压）。

#### 3.2 样品的制备

样品应完全溶解，并且pH值应与结合缓冲液pH值相同。为了避免堵塞层析柱，我们建议通过0.45  $\mu\text{m}$ 过滤器进行离心和过滤，以去除细胞碎片或其他颗粒物质。

#### 3.3 平衡色谱柱



用5-10个柱体积的结合缓冲液平衡该柱，直到流出液电导和pH不变。参考结合缓冲液：0.05M Tris-HCl, 0.5M NaCl, pH 7.4。

### 3.4 上样

(1) 样品用平衡液配制，样品一定要离心或过滤后上样。盐浓度太大的样品需要处理后再配。

(2) 一般情况是让目标产品结合在柱子上，用平衡液洗去杂质和没有结合的蛋白，再选择一种洗脱液洗下目标产品。

### 3.5 洗脱

洗脱条件因样品而异，具体参考文献。

参考洗脱缓冲液：0.05M甘氨酸，pH 3.0或10mM HCl, 0.5M NaCl, pH2.0，可以往收集到的洗脱液中加入pH9 1M Tris-HCl，这将防止洗脱蛋白质由于pH低而变性。

## 4 再生

根据样品的性质，可以通过用2-3床体积的高pH (0.1M Tris-HCl + 0.5M NaCl, pH8.5) 和低pH值(0.1M 乙酸钠+ 0.5M NaCl, pH 4.5) 缓冲液交替洗涤填料，来再生苯甲脒-琼脂糖凝胶 6B，该循环应重复3次，然后用5-10倍柱床体积的结合缓冲液重新平衡。

## 5 保存

2-8℃密闭保存。使用完的填料，用纯水彻底冲洗，最后保存在 20%乙醇中，4℃保存。

## 6 注意事项：

(1) 上样之前，样品必须经过膜过滤及去除色素，否则杂质及色素会被吸附到填料上，影响填料的正常使用。所有的缓冲液均需要用 0.45um 的过滤器过滤。

(2) 在使用过程中，避免使用高浓度的强酸强碱，酸和碱的浓度应低于 0.1 摩尔。碱会使流速变慢。

(3) 不同的样品，吸附和洗脱方法不相同，可以根据相关的文献进行。