

苯甲脒琼脂糖凝胶6B

货号：AC15808

规格：25mL

保存：在20%乙醇中，4℃下长期保存。

产品简介：

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。

苯甲脒琼脂糖凝胶由于应用新的活化方法所以流速高，非特异吸附少，而且填料粒度均匀，所以分离效果好，是纯化丝氨酸蛋白酶类最适合的填料。

亲和填料特征：

特点	载量大，分辨率好，流速高，使用方便。
基质	6%的交联琼脂糖凝胶
配基	苯甲脒
配基密度	7 μ mol/ml
吸附载量	13 mg胰蛋白酶/ml
填料的颗粒大小	45-165 μ m
最大流速	300cm/h
pH范围	3-10，在位清洗时pH范围可到2-11
保存温度	+4~8℃
保存液体	20%乙醇

适用范围：

一步从各种样品中纯化丝氨酸蛋白酶类物质。

应用实例：

实验名称：苯甲脒琼脂糖凝胶6B分离尿激酶。

实验步骤：

- (1) 苯甲脒琼脂糖凝胶6B装柱，1.6 \times 20m，柱床体积为10ml
- (2) 用缓冲液1平衡2-5个床体积，流速为2ml/min
- (3) 取尿激酶粗品200mg溶解在20ml的缓冲液1中，用0.45 μ m的滤膜过滤，上样，流速为1ml/min
- (4) 用缓冲液1再洗2-5个床体积，流速为2ml/min
- (5) 最后缓冲液2进行洗脱，流速为2ml/min，收集洗脱峰，用SDS-PAGE纯化后的效果。
- (6) 用纯水洗5个柱床体积，然后分别用100mM，pH8.0Tris-HCl缓冲液含1M NaCl和100mM，pH4.0的醋酸缓冲液含1M NaCl交替洗涤3次，再用纯水洗3个柱床体积，然后再用20%的

乙醇冲洗3个柱床体积，流速为2ml/min，柱子置于+4~8℃环境中保存。

缓冲液组成：缓冲液1：100mM pH7.4的PBS缓冲液；缓冲液2：100mM醋酸缓冲液，pH4.0。

也可以用这个填料特异去除各种融合蛋白酶切后的丝氨酸蛋白酶，例如凝血酶以及胰蛋白酶类蛋白酶。例如去除凝血酶上样缓冲液为：50mM pH7.4的PBS缓冲液含0.15M NaCl,洗脱缓冲液为：50mM pH7.4的PBS缓冲液含1M NaCl。

应用的注意事项：

1. 色谱柱装填

- (1) 所有需要用到的材料的温度要与色谱操作的温度一样，液体最好做脱气处理。
- (2) 在柱子下端加入蒸馏水，以除去柱子中的空气，关闭柱子出口，在柱内保留少量的蒸馏水。
- (3) 将琼脂糖凝胶连续倒入柱子时，要用玻璃棒的紧靠柱子内壁引流，以减少气泡的产生，让填料先自然沉降。
- (4) 柱压不超过0.3MPa，如果装柱系统中无法测柱压，则控制流速高于300cm/h，但是在使用中一般只用最大流速的75%。

2. 蛋白的结合

平衡缓冲液可以采用如下配方：100mM pH7.4的PBS缓冲液，0.1M NaCl，pH8.0。上样完毕后，继续用平衡缓冲液洗柱子，直到基线平稳。

3. 蛋白的洗脱

- (1) 洗脱可以采取特异性或者非特异性洗脱。
- (2) 特异性洗脱可以用目标分子的竞争剂，对氨基苯甲脒的抑制剂。对非特异性洗脱而言，可以选用以下几种方法：
 - a 改变离子强度，通常加入1M的NaCl，必要的话可以采用阶段洗脱或线性梯度洗脱。
 - b 改变pH，可采用阶段洗脱或线性梯度洗脱来达到目的。
 - c 降低洗脱缓冲液的极性。如可以在洗脱缓冲液中加入10%的二氧六环等。
 - d 使用变性剂。如在洗脱缓冲液中加入尿素、盐酸胍等。

再生、清洗:

1. 再生

用纯水洗5个柱床体积，然后分别用100mM，pH8.0Tris-HCl缓冲液含1M NaCl和100mM,pH4.0的醋酸缓冲液含1M NaCl交替洗涤3次，再用水洗3个柱床体积，然后再用20%的乙醇流洗3个柱床体积，流速为2ml/min，柱子置于+4~8℃环境中。

如果在色谱操作过程中用到了变性剂或者去污剂，也可以用上述方法洗柱子。

2. 清洗

在应用中，柱子上结合的一些物质如变性蛋白和脂质等不能通过再生过程去除，这种情况下，可以用去污剂如0.1% Triton X-100在37℃洗柱子1min。之后立即用5个床体积的平衡液洗柱子。

注意事项：

上样之前，样品必须去除色素，否则色素会被吸附到填料上，影响填料的正常使用。