

Butyl-Sepharose 4FF 的重力柱说明书

货号：AC17666

规格：1*1mL / 1*5mL / 5*1mL / 3*1mL+1*5mL / 5*5mL

保存：2-8°C

产品说明：

Butyl-Sepharose 4FF 属于脂肪族疏水作用介质，配基通过不带电和化学性质十分稳定的醚键连接到琼脂糖微球上，疏水作用介质主要通过分子表面疏水性差别进行分离纯化。广泛用于生物制药和生物工程下游蛋白质和多肽的分离纯化。

表 1：介质性能参数

基质	高度交联的 4%琼脂糖微球
配体	丁基
载量(/ml 介质)	约 7mg IgG; 26mg HSA
粒径 (µm)	45-165
建议流速 (cm/h)	300
pH 稳定范围	3-13
储存缓冲液	20%乙醇

纯化流程：

1、Buffer 的准备

所用水和缓冲液在使用之前建议用 0.22µm 或 0.45 µm 滤膜过滤。

平衡/洗杂液：0.05M 磷酸盐，1.7M 硫酸铵，pH7.0

洗脱液：0.05M 磷酸盐，pH7.0

注：疏水层析介质缓冲液可根据不同介质及纯化物质不同做适当改变，原则上高盐上样低盐洗脱。

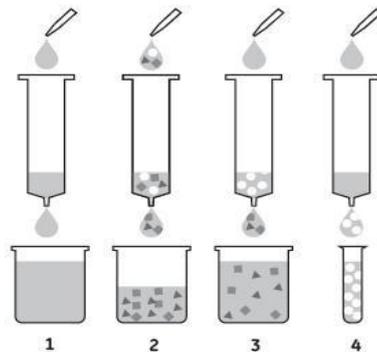
2、样品准备

样品在上样前建议离心或用 0.22µm 或 0.45µm 滤膜过滤，减少杂质，提高蛋白纯化效率和防止堵塞柱子。

样品中盐浓度跟平衡液相同，通常为 0.5-2.0M 硫酸铵。

3、样品纯化

Butyl-Sepharose 4FF 重力柱使用请参考以下说明，各溶液用量均按照柱体积计算（柱体积是指填料体积）。使用流程请参考下图。



Step 1: 柱子平衡； Step 2: 上样； Step 3: 洗杂； Step 4: 洗脱

1)水洗: 将 Butyl-Sepharose 4FF 重力柱固定在铁架台上, 依次去掉上端塞和下端塞, 使液体流出。当柱内剩余液面略高于上筛板, 向管中加入 5-10 个柱体积的去离子水, 去除残留的保护液。

2) 平衡: 当液面略高于上筛板, 向柱管中加入 5 个柱体积的平衡液, 进行平衡, 使填料处于与目的蛋白相同的缓冲体系下, 起到保护蛋白的作用。

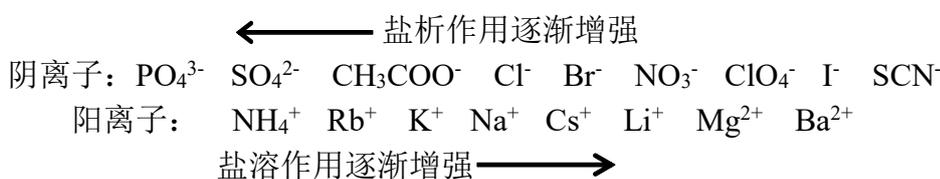
3) 上样: 将样品加到平衡好的重力柱中, 样品保留时间至少 2min, 保证目的蛋白与介质充分接触, 提高目的蛋白的回收率。收集流出液, 用于 SDS-PAGE 分析蛋白质的结合情况, 在出现问题时, 更方便寻找解决问题的方案。

4) 洗杂: 用 10-15 倍柱体积的洗杂液进行清洗, 去除非特异性吸附的杂蛋白, 收集洗杂液。

5) 洗脱: 使用 5-10 倍柱体积的洗脱液进行目的蛋白的洗脱, 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。

注: 疏水作用随着温度的降低而降低。可采用非极性有机溶剂如 40-50%乙二醇、30%异丙醇或 1% 去污剂 (Triton X-100) 洗脱。

不同离子有盐溶与盐析作用强弱不同, 如下图



6)水洗: 依次使用 2-3 倍柱体积的 30%异丙醇和 5-10 倍去离子水清洗, 最后再用 5 倍柱体积的 20% 的乙醇平衡, 然后保存在等体积的 20%的乙醇中, 置于 4°C 保存, 防止填料被细菌污染。

4、SDS-PAGE 检测

将纯化过程中收集的样品 (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。

填料清洗

CIP (Cleaning-In-Place) 清洗

疏水层析树脂可以重复使用, 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树脂进行 CIP 清洗。

A、去除一些沉淀或变性物质, 建议使用下面的方法

用 2 倍柱体积的 1M NaOH 溶液进行清洗 (至少浸泡 4 小时), 用 5-10 倍柱体积的去离子水清洗。

B、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 3-4 倍柱体积的 1% Triton X-100 的 0.1M 醋酸盐清洗 (至少 1-2 小时), 用 5-10 倍柱体积的去离子水清洗。