

## 链霉亲和素琼脂糖 6FF Streptavidin Agarose 6FF

### 产品描述

链霉亲和素-生物素 (SA-Biotin) 系统因其极高的结合亲和力 ( $K = 10^{15}$ ) 在生物领域有着广泛的应用。TargetMol 的链霉亲和素琼脂糖 6FF 是一种亲和层析介质, 将链霉亲和素与琼脂糖微珠连接, 可以用于纯化生物素或生物素化的蛋白质、抗体等。由于链霉亲和素与生物素之间的亲和力极高, 因此通常需要在变性条件下才能进行洗脱。而链霉亲和素对亚氨基生物素的亲和力较弱, 可在 pH 9.5-11.0 范围内结合, 在 pH 4.0 时洗脱, 无需使用变性剂, 从而更好地保持亲和素偶联物的活性。

TargetMol 的链霉亲和素琼脂糖 6FF 采用高度交联的 6% 琼脂糖基质, 使其能够耐受较高的流速并具备良好的化学稳定性, 非常适合用于大规模纯化。

### 产品特点

- 生物素分子结合能力优秀
- 非特异性吸附极低
- 化学稳定性良好
- 适应广泛的实验条件

### 产品信息

链霉亲和素琼脂糖 6FF	特性
基质	高度交联的6%琼脂糖微球
粒径	45-165 $\mu\text{m}$
配体	链霉亲和素
载量	>200 nmol Biotin /mL介质
最大压力	0.3 MPa, 3 bar
pH 稳定范围	4-9
保存溶液	1 $\times$ PBS, 含20%乙醇

### 操作说明

#### 1. 缓冲液准备

以下为常用的缓冲液成分, 使用前建议用 0.22  $\mu\text{m}$  或 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜过滤:

#### A. 生物素或生物素化物质的纯化

- 1) 平衡/洗杂液: 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.15 M NaCl, pH7.4
- 2) 洗脱液: 8 M 盐酸胍, pH1.5

#### B. 亚氨基生物素标签物质的纯化

- 1) 平衡/洗杂液: 50 mM 碳酸铵, 0.5 M NaCl, pH10.0
- 2) 洗脱液: 50 mM 碳酸铵, 0.5 M NaCl, pH4.0

#### 2. 样品准备

- 1) 在上柱之前, 应确保样品溶液的离子强度和pH值适当。可以使用平衡液或洗杂液对血清样品、腹水或细胞培养液进行稀释, 或者通过透析将样品与平衡液或洗杂液进行平衡处理。
- 2) 为了减少杂质、提高蛋白纯化效率并防止柱子堵塞, 建议在上样前对样品进行离心处理或使用0.22  $\mu\text{m}$ 或0.45  $\mu\text{m}$ 滤膜进行过滤。

#### 3. 链霉亲和素琼脂糖 6FF 装填

##### A. 重力柱的装填

- 1) 选择合适规格的重力层析柱, 装入下垫片, 加入适量纯水以润洗柱管和垫片, 然后关闭下出口。
- 2) 将链霉亲和素琼脂糖 6FF 充分混匀后, 使用枪头吸取适量的悬液加入至重力柱中 (介质实际体积占悬液的一半), 打开下出口让保护液流尽。
- 3) 加入适量纯水冲洗介质, 待柱管中的液体通过重力流干后, 关闭下出口。
- 4) 装入已经润洗的上垫片, 确保垫片与填料之间没有空隙, 并保持水平。
- 5) 装填完成的重力柱可以直接加入平衡液进行平衡。如果暂时不使用, 可加入保护液并在 2-8°C 条件下保存。

##### B. 中压层析柱的装填

链霉亲和素琼脂糖 6FF 广泛应用于工业纯化, 因此常涉及各种中压色谱柱的装填。以下介绍了层析柱的装填方法。装柱前, 需要根据层析柱的直径计算柱子的底面积, 并根据所需的装柱高度计算所需的介质体积, 计算公式为:  $V = 1.15\pi r^2 h$ 。

( $V$ : 所需凝胶的体积 mL; 1.15: 压缩系数;  $r$ : 柱管半径 cm;  $h$ : 柱子所需装填的高度 cm。)

注: 所取的悬液体积应为介质体积的两倍, 因为介质只占悬液总量的一半, 另一半为保护液。

- 1) 使用去离子水冲洗层析柱的底部筛板和接头, 确保筛板上没有气泡, 然后关闭柱底出口, 并在柱底部留出1-2 cm的去离子水。
- 2) 将介质悬液充分混合均匀, 然后小心地将悬液连续倒入层析柱中。可以使用玻璃棒沿柱壁引导悬液以减少气泡的产生。
- 3) 如果使用储液器, 应立即在层析柱和储液器中加满水, 将进样分配器放置在浆液表面, 并连接至泵上, 确保分配器或进样管中不会产生气泡。
- 4) 打开层析柱底部出口, 启动泵, 使缓冲液按照设定的流速通过层析柱。最初应让缓冲液以较慢的流速流过柱子, 然后逐渐增加到最终流速, 以避免液柱对柱床的冲击, 确保柱床的均匀性。如果无法达到推荐的压力或流速, 可使用泵的最大流速, 这样仍能得到理想的装填效果。

注: 在随后的色谱过程中, 流速不应超过最大装柱流速的75%。

- 5) 当柱床高度稳定后, 在最终装柱流速下至少再通过3倍柱床体积的去离子水, 并标记柱床高度。
- 6) 关闭泵并关闭层析柱出口。
- 7) 如果使用储液器, 移除储液器, 将分配器放回层析柱中。
- 8) 将分配器推至标记的柱床高度处, 允许装柱液进入分配器, 然后锁紧分配器接头。
- 9) 最后, 将装填好的层析柱连接到泵或色谱系统中, 开始平衡过程。如有需要, 可重新调整分配器。

## 4. 样品纯化

### A. 孵育法纯化

- 1) 根据待纯化样品的量, 将链霉亲和素琼脂糖 6FF充分混匀后, 取适量加入离心管, 1000 rpm离心1 min, 弃去上清; 也可以将其加入重力柱中, 待保护液流尽。
- 2) 向离心管中加入5倍介质体积的平衡液以清洗介质, 1000 rpm离心1 min, 弃去上清。如使用重力柱, 直接在柱中清洗并流尽平衡液。此操作需重复两次以上。
- 3) 加入样品, 封闭离心管或重力柱, 4°C振荡孵育2-4 h, 或在37°C孵育30 min-2 h。
- 4) 孵育结束后, 1000 rpm离心1 min, 弃去上清, 或通过过滤收集介质。保留上清以作为流穿样用于电泳鉴定。
- 5) 用5倍介质体积的洗杂液清洗介质, 1000 rpm离心1 min, 或在重力柱中过滤去除上清(注意不要吸到介质), 重复3-5次, 建议中途更换新的离心管。
- 6) 加入3-5倍柱体积的洗脱液进行洗脱, 室温孵育5 min, 1000 rpm离心1 min, 或通过重力柱收集洗脱液。可重复2-3次。

### B. 重力柱法纯化

- 1) 将装填好的链霉亲和素琼脂糖 6FF重力柱用5倍柱体积的平衡液进行平衡, 使填料与目标蛋白的缓冲液体系相同, 重复2-3次。
- 2) 将样品加入已平衡的重力柱中, 确保样品在柱中至少保留2 min, 以确保与介质充分接触。收集流出液, 可以反复上样以增加结合效率。
- 3) 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, 并收集洗杂液。
- 4) 使用5-10倍柱体积的洗脱液进行洗脱, 分段收集洗脱液。每个柱体积收集一管, 以检测洗脱效率, 确保所有结合的目标蛋白被洗脱, 同时获得高纯度和高浓度的蛋白。

### C. 中压层析柱法纯化

链霉亲和素琼脂糖 6FF装填好后, 可使用常规的中低压色谱系统进行纯化。

- 1) 确保泵管道中注满去离子水。移除上塞, 将层析柱连接至色谱系统, 打开下出口, 将预装柱接入系统并旋紧。
- 2) 用3-5倍柱体积的去离子水冲洗柱内储存的缓冲液。
- 3) 使用至少5倍柱床体积的平衡液平衡色谱柱。
- 4) 使用泵或样品环上样。

注: 如果样品粘度较高, 即使上样体积较小, 也可能导致层析柱出现较大反压。上样量不应超过柱子的结合能力。大体积样品可能会引起较大的反压, 使进样器使用困难。

- 5) 用洗杂液冲洗柱子, 直至紫外吸收达到稳定的基线(通常需要至少10-15倍柱体积)。
- 6) 使用5-10倍柱体积的洗脱液进行洗脱, 收集洗脱液, 即为目标蛋白组分。洗脱结束后, 用平衡液冲洗5-10倍柱体积, 再用纯水冲洗5-10倍柱体积, 最后用20%乙醇冲洗2倍柱体积, 置于2-8°C保存。

## 5. SDS-PAGE检测

使用SDS-PAGE对纯化过程中得到的样品(包括流出组分、洗杂组分和洗脱组分)以及原始样品进行检测, 以评估纯化效果。

## 6. 填料清洗

链霉亲和素琼脂糖 6FF可以重复使用而无需再生处理, 但随着非特异性结合蛋白的增多和蛋白聚集, 可能会导致流速和结合载量的下降。此时可以按照以下方法对填料进行清洗:

- 1) 为去除沉淀或变性物质, 建议使用2倍柱体积的0.1 M NaOH、6 M盐酸胍或8 M尿素溶液进行清洗, 随后立即用5倍柱体积的PBS (pH 7.4) 清洗。
- 2) 为去除因疏水性吸附而导致的非特异性吸附物质, 可使用3-4倍柱体积的70%乙醇或2倍柱体积的1% Triton X-100清洗, 随后立即用5倍柱体积的PBS (pH 7.4) 清洗。

## 保存条件

4°C 2年

## 注意事项

1. 避免冷冻本产品。
2. 在实验过程中, 样本需要在4°C或放置在冰上进行操作。
3. 本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品, 不得存放于普通住宅内。
4. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

