

SulfoLink Beads 4FF

产品简介

SulfoLink Beads 4FF是-类预活化的琼脂糖微球，可以通过与巯基的反应实现抗原的固定化,进而对免疫血清中的抗体进行纯化。

SulfoLink Beads 4FF可以得到高效价的目标抗体，是多克隆抗体生产中不可缺少的纯化介质。具体性能见表1。

表1. SulfoLink Beads 4FF产品性能

项目	性能
基质	高度交联的 4%琼脂糖微球
粒径	45-165um
配体	碘乙酸衍生物
载量	>3mg hIgG/ml介质
工作pH	5-10
最大压力	0.1MPa,1bar
保存	1M NaCl 2-8°C

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 μm 或 0.45 μm 滤膜过滤。

偶联液: 50 mM Tris, 5 mM EDTA-Na, pH 8.5

封闭液: 50 mM Tris, 5 mM EDTA-Na, 50 mM L-半胱氨酸, pH 8.5

保护液:含 20%乙醇的 1xPBS

2.2 抗原准备

纯化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。

偶联样品使用前务必须确保其巯基处于还原状态。如果巯基已经氧化，必须对偶联样品进行还原(可以使用 Ellman's Reagent 检测自由巯基的含量)，一般推荐使用还原剂 TCEP (Tris(2-carboxyethyl)phosphine)，TCEP 溶液很稳定，可以选择性的、高效的打开二硫键，并且不影响偶联样品与填料的偶联反应，每毫克偶联样品中 TCEP 的添加量不超过 12 mg,需要自己进行优化。如果使用 DTT 等含有巯基的还原剂，处理完偶联样品必须要将还原剂去除，否则会影响偶联样品与填料的偶联效率。

使用偶联液溶解或透析偶联样品，制备成终浓度为 1-3 mg/ml 的样品溶液。建议该溶液现用现配，储存时间过长会影响偶联效果。

2.3 样品偶联

下面以偶联抗体纯化抗原为例，介绍偶联及后续纯化步骤。

1)取适量的 SulfoLink Beads 4FF,加入合适的重力柱中，靠重力流干保护液，用 3 倍柱体积的偶联液平衡填料，待偶联液流干，再加入 3 倍柱体积的偶联液，重复操作 2 遍。共使用 9 倍柱体积的偶联液。

2)关闭柱子的下端出口，加入等体积的含巯基的抗体(用偶联液溶解)，封闭柱子上端，置于 28°C震荡孵育 30 min。

注:确保填料充分悬浮起来，否则将大大影响偶联效率。

3)将上述反应体系取出，流干其中溶液，并收集流出，再用 3 倍柱体积的偶联液清洗填料，合并两次流出。

注:如有需要，可以使用 Ellman's Reagent 检测其中巯基含量，得出抗体残留量，从而计算偶联效率。

4)关闭柱子的下端出口，加入等体积的封闭液，封闭柱子上端，置于 28°C震荡孵育 30 min。

5)将上述反应体系取出，流干其中的封闭液。

6)用 3 倍柱体积的平衡液清洗填料，然后保存在等体积的保护液中，于 2-8°C保存。

2.4 重力层析柱的装填

- 1)取合适规格的重力层析柱，装入下垫片，加入适量纯水润洗柱管和垫片，关闭下出口。
- 2)将偶联好的填料混合均匀，用枪头吸取适量浆液加入至重力柱中，打开下出口流干保护液。
- 3)加入适量纯水冲洗介质，待柱管中液体重力流干后，关闭下出口。
- 4)装入润洗后的上垫片，确保垫片与填料之前没有空隙，且保持水平。
- 5)装填好的重力柱可以直接加入平衡液进行平衡。

2.4.2 中压层析柱的装填

偶联好的填料也可用于大体积样品的纯化，因此，涉及到各种中压色谱层析柱的填装，下面介绍填装层析柱的方法。

装柱前根据层析柱直径计算柱子底面积，根据所需装柱高度计算所需介质体积，公式如下：

$$V = 1.15\pi r^2 h$$

V:所需介质体积 ml

1.15:压缩系数

r:柱管半径 cm

h:装填高度 cm

注意:所取悬液体积应为介质体积的两倍，因为介质体积只占悬液总体积的一半,另一半为保护液。

- 1)用去离子水冲洗层析柱底筛板与接头，确保柱底筛板上无气泡，关闭柱底出口，并在柱底部留出 1-2 cm 的去离子水。
- 2)将填料悬浮起来，小心的将浆液连续地倒入层析柱中。用玻璃棒沿着柱壁倒入浆液可减少气泡的产生。
- 3)如果使用储液器，应立即在层析柱和储液器中加满水，将进样分配器放置于浆液表面,连接至泵上,避免在分配器或进样管中产生气泡。
- 4)打开层析柱底部出口，开启泵，使其在设定的流速下进行。最初应让缓冲液缓慢流过层析柱，然后缓慢增加至最终流速，这样可避免液压对所形成柱床的冲击，也可以避免柱床形成的不均匀。如果达不到推荐的压力或流速，可以用你所使用泵的最大流速，这样也可以得到一个很好的装填效果。(注意:在随后的色谱程序中，不要超过最大装柱流速的 75%)当柱床高度稳定后,在最后的装柱流速下至少再上 3 倍柱床体积的去离子水。标上柱床高度。
- 5)关闭泵，关闭层析柱出口。
- 6)如果使用储液器，去除储液器，将分配器置于层析柱中。
- 7)将分配器推向柱子至标记的柱床高度处。允许装柱液进入分配器，锁紧分配器接头。
- 8)将装填好的层析柱连接至泵或色谱系统中，开始平衡。如果需要可以重新调整分配器。

2.5 样品纯化

2.5.1 缓冲液的准备

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

平衡/洗杂液: 0.15 M NaCl, 20 mM Na₂HPO₄, pH 7.0

洗脱液: 0.1 M 甘氨酸, pH 3.0

中和液: 1 M Tris-HCl, pH 8.5

2.5.2 孵育法纯化

- 1)根据纯化的样品量，取适量偶联好的填料加入层析柱中，重力流干保护液。
- 2)加入 5 倍介质体积的平衡液清洗介质，重力流干。
- 3)加入样品，封闭柱管两端，4℃ 振荡孵育 2-4 h 或者 37℃ 孵育 30 min-2 h。
- 4)孵育结束后，离心或过滤收集介质，上清保留作为流穿，用于电泳鉴定。
- 5)用 5 倍介质体积的洗杂液清洗介质，离心或过滤去除上清，重复 3-5 次，中间建议更换新离心管。
- 6)加入 3-5 倍柱体积的洗脱液进行洗脱，孵育 10-15 min,离心或过滤收集洗脱液，可重复 2-3 次。洗脱组分需要立即调成中性，一般建议使用洗脱组分体积 1/10 的中和液进行中和。

2.5.3 重力柱法纯化

- 1)将装填好的重力柱用 5 倍柱体积平衡液进行平衡，使填料处于与目的蛋白相同的缓冲液体系下。
- 2)将样品加到平衡好的重力柱中，收集流出液，可以反复上样增加结合效率。
- 3)用 10 倍柱体积的洗杂液进行洗杂，去除非特异性吸附的杂蛋白，收集洗杂液。

4)使用 5 倍柱体积的洗脱液洗脱，分管收集。洗脱组分需要立即调成中性，一般建议使用洗脱组分体积 1/10 的中和液进行中和。

2.5.4 中压层析柱法纯化

中压层析柱装填好后，可以用各种常规的中低压色谱系统。

1)将泵管道中注满去离子水。去掉上塞子，将层析柱连接至色谱系统中，打开下出口，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储存缓冲液。

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)使用 5-10 倍柱体积的洗脱液洗脱，收集洗脱液，即目的蛋白组分。洗脱组分需要立即调成中性，一般建议使用洗脱组分体积 1/10 的中和液进行中和。

介质洗脱结束后，用平衡液冲洗 5-10 柱体积，然后用纯水冲洗 5-10 个柱体积，再用 20%乙醇冲洗 2 个柱体积，置于 2-8℃保存。

介质洗脱结束后，用平衡液冲洗 5-10 柱体积，然后用纯水冲洗 5-10 个柱体积，再用 20%乙醇冲洗 2 个柱体积，置于 2-8℃保存。

2.6 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。

常见问题及解决方案

问题	原因分析	推荐解决方案
柱子流速低	筛板被堵塞	清洗或更换筛板
	样品或填料中有气泡	轻轻搅拌填料或敲击层析柱去除气泡
偶联液中蛋白或多肽沉淀	蛋白或多肽不溶	偶联液中加入小于 30%的 DMSO 或 DMF 或 6M 盐酸胍促进样品溶解
偶联效率低	样品无巯基被氧化	加入 DTT 或 TCEP 后立即交联
洗脱组分纯度低	填料没有彻底清洗	增加结合/洗杂液体积

***本试剂仅供实验室研究使用**