



Smac Phenyl 40

目录

1. 产品介绍.....	1
2. 纯化流程.....	1
3. 填料清洗.....	2

1. 产品介绍

Smac Phenyl 40 是芳香族疏水层析介质，苯基通过不带电、化学性质稳定的醚键连接至高度交联的 6% 琼脂糖微球上，具体性能见表 1。该色谱填料具有高结合力和小珠粒尺寸，是工业纯化中可靠的理想选择。

表 1. Smac Phenyl 40 产品性能

性能	指标
基质	高交联琼脂糖微球
配体密度	苯基
动态结合载量	25-35mg BSA/ml 介质
平均粒径	35-45 μm
建议流速	<220cm/h
pH 稳定范围	3-13
储存缓冲液	20% 乙醇
储存温度	4 $^{\circ}\text{C}$ - 30 $^{\circ}\text{C}$
化学稳定性	常用水性缓冲液、1 M 氢氧化钠

2. 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。

平衡/洗杂液: 0.05 M 磷酸盐, 1.7 M 硫酸铵, pH7.0

洗脱液: 0.05 M 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。

2.2 样品准备

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。

样品中盐浓度跟平衡液相同, 通常为 0.5-2.0 M 硫酸铵。

2.3 介质装填

2.3.1 重力柱的装填

- 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 **Smac Phenyl 40** 混合均匀, 用枪头吸取适量浆液加入至重力柱中 (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, 暂不使用时则加入保护液, 2-8 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

2.3.2 中压层析柱的装填

Smac Phenyl 40 被广泛应用于工业纯化, 因此, 涉及到各种中低压色谱层析柱的装填, 下面介绍填装层析柱的方法。

- 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) 将介质悬浮起来, 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。

2.4 样品纯化

2.4.1 孵育法纯化

- 1) 根据纯化的样品量, 取适量 **Smac Phenyl 40** 加入离心管中, 1000 rpm 离心 1 min, 吸弃上清; 也可加入重力柱中, 流干保护液。
- 2) 向离心管中加入 5 倍介质体积的平衡液清洗介质, 1000 rpm 离心 1 min, 吸弃上清; 如使用重力柱, 则直接在重力柱中清洗, 直接重力流干平衡液; 重复两次以上。
- 3) 加入样品, 封闭离心管或重力柱管, 4℃振荡孵育 2-4 h 或者 37℃孵育 30 min-2 h。
- 4) 孵育结束后, 1000 rpm 离心 1 min, 吸弃上清, 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, 1000 rpm 离心 1 min 或重力柱管过滤, 去除上清 (注意不要吸到介质), 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, 室温孵育 10-15 min, 1000 rpm 离心 1 min 或重力柱管收集洗脱液, 可重复 2-3 次。

2.4.2 重力柱法纯化

- 1) 将装填好的 **Smac Phenyl 40** 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, 重复 2-3 次。
- 2) 将样品加到平衡好的重力柱中, 样品保留时间至少 2 min, 保证样品和介质充分接触, 收集流出液, 可以反复上样增加结合效率。
- 3) 用 10-15 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 5-10 倍柱体积的洗脱液洗脱, 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。

2.4.3 中压层析柱法纯化

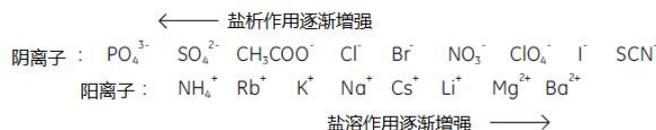
Smac Phenyl 40 装填好后, 可以用各种常规的中低压色谱系统。

- 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) 用洗脱液采用一步法或线性梯度洗脱。一步洗脱中, 通常 5 倍柱体积洗脱液就足够了。梯度洗脱可以用一个小的梯度, 例如 20 倍柱体积或更多, 来分离不同结合强度的蛋白质。

上述步骤介质洗脱结束后, 先用平衡液冲洗 3 倍柱体积, 然后用纯水冲洗 5 倍柱体积, 再用 20%乙醇冲洗 2 个柱体积, 然后将介质置于 2-8℃保存。

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



2.5 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。

3. 填料清洗

疏水层析介质每次使用后可以分别用 2-3 倍柱体积的 30%异丙醇、3 倍去离子水清洗, 然后用至少 3 倍柱体积的 Buffer 进行平衡。

CIP (Cleaning-In-Place) 清洗

疏水层析介质可以重复使用, 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介质进行 CIP 清洗。

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 3-4 倍柱体积的去离子水清洗, 然后用至少 3 倍柱体积的平衡液进行平衡。

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 3-4 倍柱体积的去离子水清洗, 然后用至少 3 倍柱体积的平衡液进行平衡。

