

Dextrin Pharose FF

MBP 标签亲和填料使用说明书

1、产品介绍

Dextrin Pharose FF 是一种将糊精键合在 Pharose 琼脂糖基球上形成的亲和层析分离介质。糊精配基可与麦芽糖结合蛋白 (MBP) 特异性结合, 因而可纯化带 MBP 标签的融合蛋白。本产品可在接近生理条件下纯化目标蛋白, 可最大程度保留目标蛋白的活性。

MBP 标签较大, 分子量约为 42 kDa。MBP 标签的主要作用有促进目标蛋白正确折叠, 增加蛋白的表达水平, 提高目标蛋白的可溶性。同时带 MBP 标签的融合蛋白特定的亲和填料, MBP 标签在大肠杆菌体系中经常使用, 亲和层析后通常利用特异性酶去除标签。

2、产品特点与技术指标

产品名称	Dextrin Pharose FF
产品货号	BN26147
基质	6%交联琼脂糖
配基	糊精
粒径范围 ^a	45~165 μm
平均粒径	~90 μm
动态结合载量 ^b	>3 mg 麦芽糖结合蛋白 (约 42kDa) /mL
推荐工作流速	60~150 cm/h
最大流速与压力	>900 cm/h, 0.3 MPa
使用 pH	7~9 (推荐的工作 pH), 2~13 (CIP 清洗)
化学稳定性	在以下溶液中稳定: 常用的水相缓冲液、0.5 mol/L NaOH。
储存与运输	20%乙醇, 2~8 °C (储存), 2~30 °C (保存)
保质期	有效期见外包装

注: ^a90%体积以上的微球在此粒径范围; ^bDBC_{10%}测试条件为: 10%流穿, 6 min 停留时间。

3、使用方法参考

3.1 色谱柱装填

以下阐述与层析系统连接时，填料的色谱柱装填方法。

(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) 填料用量计算：通过沉降定量填料体积，需要的沉降填料体积=柱体积×压缩比（也称压缩因子）。沉降体积是指填料在 20%乙醇保存液中自然沉降完全读取的稳定体积。Dextrin Pharose FF 的压缩比为 1.15。为使达到装柱比，可通过柱头下压的方法，也可以通过高流速压柱。

(3) 填料清洗：将填料悬液充分摇匀后量取相应体积，抽滤除去液体，并用约 3 倍填料体积的纯化水洗涤，重复 3 次，以除去保存液。

(4) 装柱填料悬液准备：将填料转移到适当的容器中，加入适量的装柱液，制成 50~75 v%的装柱填料悬液，使用前搅匀。

(5) 装填前准备：在清洗干净的层析柱下端加入装柱液，以除去下垫片及层析柱下端的空气，在柱内保留少量的蒸馏水，拧紧下堵头，调整柱子使其垂直于地面。

(6) 装填：将搅匀后的填料悬液一次性缓慢倒入层析柱内（必要时使用装柱器），为避免引入气泡，应使之沿层析柱内壁自然流下。将所有填料加入后，用装柱液将装柱器加满，拧紧装柱器上盖，将柱子与层析系统连接。

(7) 压柱：使柱内填料自然沉降（或 50~150 cm/h 的低流速下沉降），待填料沉降完全后（填料与液体的界面清晰），去除装柱器，装上上柱头，并将柱头下降至界面处；通过高流速（推荐流速见下表，注意柱压不超过 0.3 MPa），继续压柱至界面清晰稳定，标记界面稳定时的柱高。停泵，打开柱头上的阀门/堵头，关闭柱底的阀门/堵头，下压柱头至标记位置下方与压缩比对应的位置，旋紧柱头，装柱完成。装柱完成后，需用高流速平衡柱内的填料。

装柱条件	Dextrin Pharose FF
压缩比	1.15
装柱流速	600 cm/h

3.2 柱效测定和评价

完成装柱后、使用前可通过柱效测定和评价可以确认层析柱装填质量。柱效通常用理论塔板高度（HETP）和非对称因子（As）来评价。

柱效测定可以采用丙酮或者 NaCl 作为样品进行，按照下表配制样品溶液和流动相。

样品	1.0%丙酮	0.8~1.0 M NaCl
样品体积	1.0%柱体积	1.0%柱体积
流动相	纯水	0.4 M NaCl
流速	30 cm/h	30 cm/h
检测器	UV-280 nm	电导

根据 UV 或者电导率曲线计算理论塔板高度 (HETP)、理论塔板数 (N) 和非对称因子 (As), 公式如下:

$$\text{HETP} = L/N$$

$$N = 5.54(V_R/W_h)^2$$

$$A_s = a/b$$

其中: L 为柱高; V_R 为保留体积; W_h 为半高峰宽; a 为在 10%峰高处的第一个半峰宽; b 为在 10%峰高处的第二个半峰宽。

一般来说, HETP 的数值应小于填料平均粒径的三倍 (即 $\text{HETP}/D_{50} < 3$, D_{50} 为填料的平均粒径), A_s 应在 0.8~1.5 之间。

3.3 推荐缓冲液

推荐用以下缓冲液结合带 MBP 标签的融合蛋白。

结合缓冲液: 20 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.4

洗脱缓冲液: 结合缓冲液 + 10 mM 麦芽糖

再生缓冲液: 0.5 M NaOH

3.4 样品纯化

(1) 平衡: 再用结合缓冲液平衡 5 个柱体积, 建议流速为~150 cm/h。

(2) 上样: 将准备好的样品上柱, 建议流速为 20~100 cm/h, 可根据实际结合情况选择流速, 能获得较好的效果。上柱的样品应尽量保持与结合缓冲液一致。通常可用透析、超滤、稀释等方法处理样品。并且上柱前应过 0.45 μ m 滤膜或高速离心去除不溶物。

(3) 再平衡: 上样后用结合缓冲液平衡 5~10 个柱体积, 或平衡至基线, 洗去杂质, 推荐流速为~150 cm/h。

(4) 洗脱: 用洗脱缓冲液洗 6~10 个柱体积, 建议流速为~150 cm/h, 根据需要置换缓冲液。

(5) NaOH 再生: 洗脱目的蛋白后的柱子用纯水清洗 3-5 个柱体积, 并用 0.5 M NaOH 再生 3-5 个柱体积, 再用纯水清洗至中性, 用 20%乙醇保存柱子, 或用结合缓冲液平衡后进行下一次纯化, 建议流速为 75~150 cm/h。

3.5 填料保存

填料的初始保存液为 20%乙醇，使用过后可继续用 20%乙醇保存。保存温度在 2~8 °C 为宜，不可冻存。