

STI Pharose FF

大豆胰蛋白酶抑制剂亲和填料使用说明书

1、产品介绍

STI Pharose FF 是一种将大豆胰蛋白酶抑制剂 (Soybean Trypsin Inhibitor, STI) 键合在琼脂糖凝胶微球上形成的生物亲和层析分离介质。该产品保留了琼脂糖极好的亲水性及大网架结构, 与生物活性大分子有很好的相容性, 具有载量高, 非特异性吸附少, 流速快等特点, 主要用于胰蛋白酶、糜蛋白酶、凝血 X 因子等丝氨酸蛋白酶的提取和纯化, 也可以用于肠激酶的去。

2、产品特点与技术指标

产品名称	STI Pharose FF
目录编号	BN26138 BN26329 (中压) BN26330 (重力)
基质	4%交联琼脂糖
配基	STI (大豆胰蛋白酶抑制剂), ~6 mg/mL
载量	~10 mg 胰蛋白酶/mL
粒径范围 ^a	45~165 μm
平均粒径	~90 μm
推荐工作流速	60~300 cm/h
最大流速与压力 ^b	900 cm/h, 0.3 MPa
使用 pH	3~9
化学稳定性	在温和的水相缓冲液稳定, 避免强酸强碱, 避免有机试剂。
储存与运输	2~8 °C (储存), 2~30 °C (运输)
保质期	3 年

注: ^a90%体积以上的微球在此粒径范围; ^b10 cm 柱高下的最大测试流速。

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。STI 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（原包装中填料体积分数为 67%），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	STI Pharose FF
压缩比	~1.15
装柱流速	600~900 cm/h，依赖于色谱柱尺寸，以压缩比和柱效测试为准

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 NaCl 作为样品进行，按照下表配制样品溶液和流动相。

样品	0.8~1.0 M NaCl
样品体积	1.0%柱体积
流动相	0.4 M NaCl
流速	30 cm/h
检测器	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 (A_s), 公式如下:

$$HETP=L/N$$

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

$$A_s=a/b$$

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 $HETP/D50 < 3$, D50 为填料的平均粒径), A_s 应在 0.8~1.5 之间。

3.3 平衡与上样

在上样前, 可用上样缓冲液 (平衡缓冲液) 在操作流速下平衡层析柱, 观察检测器的变化, 直到电导、pH 等参数不变, 一般需 5~10 个 CV (柱体积)。上样量根据样品的性质和层析介质的量进行选择, 可在预实验中确定, 例如静态吸附实验。

上样前需通过透析或超滤将样品溶剂置换为上样缓冲液 (平衡缓冲液), 然后澄清过滤 (0.45、0.22 μ m)。

上样缓冲液 pH 通常为 7.0~8.0, 可参考使用如下上样缓冲液: 50mM Tris-HCl, 100~500 mM NaCl, pH8.0。

在去除肠激酶的应用中, 目标蛋白在流穿中, 肠激酶被结合在柱上。

3.4 淋洗

用 2-5 个柱体积的平衡缓冲液冲洗上样后的层析柱, 观察检测器的变化, 直到电导、pH 等参数不变, 此时未结合的组分被清洗出去。

3.5 洗脱

亲和层析柱的洗脱可用恒定洗脱、梯度洗脱或者阶跃洗脱。一般用酸性缓冲液进行洗脱。推荐的洗脱缓冲液为: 100 mM Glycine-HCl, 500mM NaCl, pH3.0。洗脱后的样品应尽快调节至中性, 比如加入 1/10 体积的 2M Tris-HCl (pH8.0)。

3.6 再生与在位清洗 (CIP)

可以用平衡缓冲液和洗脱缓冲液反复清洗, 不耐受强酸、强碱、强有机溶剂的清洗。

3.7 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。