LCA Beads 4FF

目录

1. 产品介绍......1
2. 纯化流程......1
3. 填料清洗......3
4. 订购信息及相关产品......3

1. 产品介绍

LCA Beads 4FF 是一种将小扁豆凝集素（Lens Culinaris Agglutinin, 简称 LCA）与琼脂糖偶联，纯化一些糖蛋白的亲和层析介质。LCA 是从小扁豆中分离出来的一种金属蛋白，能与含有α-D-吡喃甘露糖基、α-D-吡喃葡萄糖基以及与其空间位置相关的分子基团结合。**LCA Beads 4FF** 主要用来分离和纯化一些糖蛋白、膜蛋白、糖脂、多糖、带甘露糖苷或葡糖苷残基的膜囊泡、IgM、激素脂蛋白等。**LCA Beads 4FF** 应用范围广，具体性能见表 1。

表 1. LCA Beads 4FF 产品性能

性能	指标
基质	高度交联的 4%琼脂糖微球
配体	Lens Culinaris Agglutinin
载量	＞13 mg 甲状腺球蛋白/ml 介质
粒径范围	45-165 μm
最大压力	0.3 MPa，3 bar
储存缓冲液	150 mM NaCl，1 mM $CaCl_2$，1 mM $MnCl_2$，20% 乙醇
储存温度	2 - 8℃

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。

LCA Beads 4FF 在缓冲液 pH 小于 5.0 时，必须添加 Mn^{2+}和 Ca^{2+}以保证吸附活性。我们推荐使用以下缓冲液纯化。

平衡/洗杂液：20 mM Tris-HCl，0-0.5 M NaCl，1 mM $CaCl_2$，1 mM $MnCl_2$，pH7.4

洗脱液：20 mM Tris-HCl，0.5 M NaCl，1 mM $CaCl_2$，1 mM $MnCl_2$，0.1 M-0.2 M α-D-甲基甘露糖苷或α-D-甲基葡萄糖苷，pH7.4

注：洗脱液中α-D-甲基甘露糖苷或α-D-甲基葡萄糖苷浓度可根据物质吸附能力进行线性或梯度洗脱。甘露糖和葡萄糖亦可以做洗脱物质，但洗脱能力较弱。

结合能力较强的物质可采用降低洗脱液 pH 洗脱，但不要低于 pH3.0。

也可采用硼酸盐作为洗脱液，如 0.1 M 硼酸盐，pH6.5。

对于强结合的蛋白，可以在洗脱缓冲液中加入 1%的脱氧胆酸钠或者其他去污剂，以促进洗脱。

2.2 样品准备

上柱前要确保样品溶液有合适的离子强度和 pH 值，可以用平衡/洗杂液对血清样品、腹水或细胞培养液稀释，或者样品用平衡/洗杂液透析。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。

2.3 LCA Beads 4FF 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 **LCA Beads 4FF** 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℃保存。

2.3.2 中压层析柱的装填

LCA Beads 4FF 被广泛应用于工业纯化，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 **LCA Beads 4FF** 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 5min，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 **LCA Beads 4FF** 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

LCA Beads 4FF 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。

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。

2.5 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

LCA Beads 4FF 纯化产品可以重复使用而无需再生，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填料进行清洗。

用 3-4 倍柱体积的含有 0.5 M NaCl 的 pH8.5 和 pH4.5 的缓冲液交替清洗三次，然后立即用 5 倍柱体积的结合液平衡。

结合力较强物质的去除

用 2 倍柱体积的含 0.1% Triton™ X-100，pH6.5 的 0.1 M 硼酸盐缓冲液低流速清洗，也可用 20%乙醇或最高 50%乙二醇溶液清洗，然后立即用 5 倍柱体积的 PBS, pH 7.4 清洗。

4. 订购信息及相关产品

名称	货号	规格
LCA Beads 4FF	SA097005	5 ml
	SA097025	25 ml
	SA097100	100 ml
	SA097500	500 ml
	SA09701L	1 L
PreCap LCA	SA097C11	1X1 ml
	SA097C51	5x1 ml
	SA097C15	1X5 ml
	SA097C55	5X5 ml
	SA097CS	3X1 ml+1X5 ml