



Phenyl Beads HF (High Sub)

目录

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

1. 产品介绍

Phenyl Beads HF (High Sub) 是一款高取代的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流速的琼脂糖微球上,通过分子表面疏水性差别对样品进行分离纯化。高刚性的琼脂糖微球较传统工艺可以耐受更高的流速并提供更高的化学稳定性,广泛用于生物制药和生物工程下游蛋白质和多肽的分离纯化。具体性能见表 1。

表 1. Phenyl Beads HF (High Sub) 产品性能

性能	指标
基质	高刚性琼脂糖微球
配体	苯基
载量	≥36 mg BSA/ml 介质
微球粒径	85-95 μm
建议流速	≥600 cm/h
pH 稳定范围	3-13
储存缓冲液	20%乙醇 (2%苯甲醇可选)
储存温度	4-30℃

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

下面以 **Phenyl Beads HF (High Sub)** 为例介绍填装重力柱的方法。

- 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 **Phenyl Beads HF (High Sub)** 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

Phenyl Beads HF (High Sub) 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,下面为层析柱的装填方法。

- 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 样品纯化流程

2.4.1 孵育法纯化

- 1) 根据纯化的样品量, 取适量 **Phenyl Beads HF (High Sub)** 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°C 振荡孵育 2-4 h 或者 37°C 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 **Phenyl Beads HF (High Sub)** 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

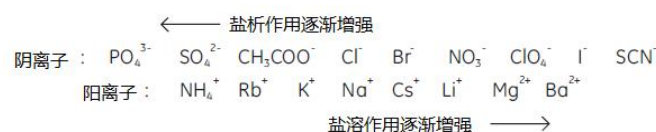
Phenyl Beads HF (High Sub) 装填好后, 可以用于各种常规的中低压色谱系统。

- 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, 再用储存缓冲液冲洗 2 个柱体积, 然后将介质置于 2-8°C 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

疏水层析填料每次使用后可以用分别用 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 倍柱体积的平衡液进行平衡。





CIP (Cleaning-In-Place) 清洗

疏水层析填料可以重复使用,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填料进行 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 1 M NaOH 溶液进行清洗 (至少浸泡 4 h),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 0.1 M 醋酸盐清洗 (至少 1-2 h),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。

4. 订购信息及相关产品

名称	货号	规格
Phenyl Beads HF (High Sub)	SH015025	25 ml
	SH015100	100 ml
	SH015500	500 ml
	SH01501L	1 L
	SH01510L	10L
PreCap Phenyl HF (HS)	SH015C11	1×1 mL
	SH015C51	5×1 mL
	SH015C15	1×5 mL
	SH015C55	5×5 mL
Phenyl Beads HF (Low Sub)	SH018025	25 ml
	SH018100	100 ml
	SH018500	500 ml
	SH01801L	1 L
	SH01810L	10L
PreCap Phenyl HF (LS)	SH018C11	1×1 mL
	SH018C51	5×1 mL
	SH018C15	1×5 mL
	SH018C55	5×5 mL
Butyl Beads HF	SH016025	25 ml
	SH016100	100 ml
	SH016500	500 ml
	SH01601L	1 L
	SH01610L	10L
Phenyl Beads 6FF (High Sub)	SH006025	25 ml
	SH006100	100 ml
	SH006500	500 ml
	SH00601L	1 L
Phenyl Beads 6FF (Low Sub)	SH004025	25 ml
	SH004100	100 ml
	SH004500	500 ml
	SH00401L	1 L
Butyl Beads 4FF	SH001025	25 ml
	SH001100	100 ml
	SH001500	500 ml
	SH00101L	1 L
Octyl Beads 4FF	SH003025	25 ml
	SH003100	100 ml
	SH003500	500 ml
	SH00301L	1 L

