

此说明仅限参考

肝素-琼脂糖凝胶 CL-6B

肝素是一种含硫酸酯的酸性多糖，将它偶联到活化的琼脂糖凝胶上，该填料具有很高的物理化学稳定性。肝素能和凝血因子和其他血浆蛋白，脂蛋白，蛋白质合成因子，作用于核酸和类固醇受体的酶，所以肝素琼脂糖凝胶可以用于这类物质的纯化。

1 亲和填料特性

基质	6%的交联琼脂糖凝胶
配基密度	约2 mg/ml
吸附载量	约2mg 抗凝血因子III (AT III) /ml
亲和填料的颗粒大小	45-165 μ m
最大流速*	150cm/h
pH范围	5-10
使用温度	4 $^{\circ}$ C~常温

*层析柱16mm*10cm，柱床高度5cm，25 $^{\circ}$ C

2 使用方法

肝素-琼脂糖凝胶 CL-6B 对于不同的样品的亲和力不同，吸附载量取决于流速、pH、缓冲液组成和温度等参数。

2.1 装柱

(1) 让所有的材料和试剂均平衡至层析实验的温度。配制缓冲液，对所有的缓冲液进行脱气处理（填料不可以超声）。

(2) 检查层析柱所有部件，特别是过滤网，密封圈，螺旋塞是否紧密，玻璃管是否干净和完整。

(3) 根据需要量取相应量的凝胶，用去离子水清洗掉 20%乙醇。

(4) 将柱子底端用水或缓冲液润湿并保持一小段液位，务必使底端无气泡。

(5) 用玻璃棒引导匀浆沿着柱内壁一次性倒入柱内，注意勿使产生气泡。打开柱子出液口，使凝胶在柱内自由沉降，连结好柱子顶端柱头。

(6) 打开蠕动泵，让缓冲液用使用时流速的 1.33 倍的流速流过，使柱床稳定（注意压力不要超过填料最大耐压）。

2.2 样品的制备

样品应完全溶解，并且与结合缓冲液的pH值相同。为了避免堵塞层析柱，我们建议通过0.45 μ m过滤器

进行离心和过滤，以去除细胞碎片或其他颗粒物质。

2.3 平衡色谱柱

用5-10个柱体积的结合缓冲液平衡该柱，直到流出液电导和pH不变。

用于纯化血浆蛋白质的常用结合缓冲液是10-20mM柠檬酸钠缓冲液，pH 7.4。由于在这些情况下肝素配体充当亲和配体，因此缓冲液中加入低浓度的NaCl以消除非特异性离子相互作用。在其他应用中，通常推荐使用10 mM磷酸钠，pH 7.0或20 mM Tris-HCl，pH 8.0作为结合缓冲液。

2.4 上样

(1) 样品用平衡液配制，样品一定要离心或过滤后上样。盐浓度太大的样品需要处理后再配。

(2) 一般情况是让目标产品结合在柱子上，用平衡液洗去杂质和没有结合的蛋白，再选择一种洗脱液洗下目标产品。

2.5 洗脱

不同的样品，吸附和洗脱方法不相同，可以根据相关的文献进行。通常通过增加缓冲液的离子强度来进行洗脱，最常使用1.5-2 M NaCl，KCl梯度洗脱。

特异性结合物质可通过包括含肝素（1-5 mg/ml）的结合缓冲液洗脱。

3 在线清洗

先用0.1M Tris-HCl pH7.0缓冲液洗3个柱床体积，然后用0.1M NaOH含2M NaCl流洗3个柱床体积，最后用水彻底冲洗干净，保存在20%乙醇中即可。长时间用酸碱洗填料会是填料的吸附能力下降，所以清洗要尽量缩短时间。

根据样品的性质，可通过使用3倍柱床体积的高pH（0.1 M Tris-HCl，0.5 M NaCl，pH 8.5），水洗，然后低pH（0.1 M醋酸钠，0.5 M NaCl，pH 5.0）缓冲液交替清洗填料以再生，该循环应重复3次。

4 保存

4-8℃密闭保存。使用完的填料，用纯水彻底冲洗，最后保存在20%乙醇中，4℃保存。

5 注意事项：

(1) 上样之前，样品必须经过膜过滤及去除色素，否则杂质及色素会被吸附到填料上，影响填料的正常使用。所有的缓冲液均需要用0.45um的过滤器过滤。

(2) 在使用过程中，避免使用高浓度的强酸强碱，酸和碱的浓度应低于0.1摩尔。碱会使流速变慢。

(3) 不同的样品，吸附和洗脱方法不相同，可以根据相关的文献进行。