

Gravity-flow Column Kit

Cat No: BSK-313

组分名称	规格	数量
重力预装柱	3ml	1
结合/洗杂 Buffer	100ml	2
洗脱 Buffer	100ml	1

1. 产品介绍

本试剂盒提供 1 根填装 3ml 层析介质的重力预装柱，2 瓶 100ml 的结合/洗杂 Buffer 和 1 瓶 100ml 的洗脱 Buffer。不需要再进行介质填装和缓冲液配制。整个纯化流程大约需要 30min（主要取决于样品体积以及溶液的粘稠性）。

层析介质性能表

指标	性能
基质	4%琼脂糖微球
载量	>40mg Rabbit IgG/ml 介质
粒径 (μm)	45-165
最大流速	0.1 MPa, 1 bar
pH 范围	3-10
储存缓冲液	含 20%乙醇的 1×PBS
储存温度	2-8℃

2. 纯化流程

2.1 样品准备

上柱之前要确保样品溶液有合适的离子强度和 pH 值，可以用结合/洗涤缓冲液对血清样品、腹水或细胞培养液稀释，或者样品用结合/洗涤缓冲液透析。

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。

北京百欧泰生物科技有限公司

Tel: 010-5365 2239 Email: info@biotyscience.com

Address: 北京市房山区良乡凯旋大街建设路 18 号

2.2 样品纯化

- 将预装柱固定在铁架台上，依次去掉下端塞和上端塞，流干预装柱的保护液。
- 向柱管中加入 5ml 结合 Buffer，平衡柱子，流干结合 Buffer 后，再重复 2 次，共使用 15ml 结合 Buffer 平衡。
- 将处理好的样品加入柱管，收集流出液，用于 SDS-PAGE 分析蛋白质的结合情况，在出现问题时，更方便寻找解决问题的方案。
- 向柱管中加入 5ml 洗杂 Buffer，进行洗杂，去除非特异性吸附的杂蛋白，收集洗杂液目的与收集穿出液的目的相同，洗杂 Buffer 流干后，再重复 5 次，共使用 30ml 洗杂 Buffer 洗杂。
- 使用 15-30ml 的洗脱 Buffer 进行洗脱目的抗体，分段收集，每 5ml 收集一管，分别检测，这样既可以保证所有结合的目的抗体被洗脱，又可以得到高纯度和高浓度的抗体。洗脱组分为酸性环境，可依据纯化样品需要调整洗脱组分 PH 值。若纯化样品无特殊需要，一般建议使用洗脱组分体积的 1/10 的中和液（1M Tris-HCl PH8.5）进行中和，调整为中性。
- 依次使用 5ml 结合 Buffer 和 5ml 去离子水交替平衡介质，重复 2 次，最后再用 5ml 20% 的乙醇平衡介质，重复 1 次，然后保存在等体积的 20% 的乙醇中，置于 4℃ 保存，防止介质被细菌污染。

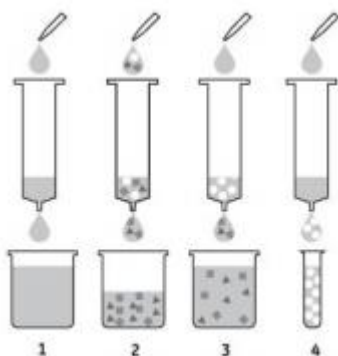


图 1. 使用蛋白 A 重力预装柱纯化抗体流程

Step 1: 柱子平衡; Step 2: 上样; Step 3: 洗杂; Step 4: 洗脱

2.3 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. 介质清洗

北京百欧泰生物科技有限公司

Tel: 010-5365 2239 Email: info@biotyscience.com

Address: 北京市房山区良乡凯旋大街建设路 18 号

本预装柱可以重复使用而无需再生，但随着一些变性物质的沉淀和蛋白的聚集，可能造成流速和结合载量都下降，严重影响柱子的性能，这时需要对层析介质进行清洗。

4. 问题及解决方

➤ 去除一些沉淀或变性物质

用 2 倍柱体积的 6M 盐酸胍溶液清洗，然后立即用 5 倍柱体积的 PBS (pH 7.4) 清洗。

➤ 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 2 倍柱体积的 1% Triton TM X-100 清洗，然后立即用 5 倍柱体积的 PBS (pH 7.4) 清洗。