

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 (0.1M Tris-HCl，0.5M NaCl，pH 8.5)，水洗，然后低 pH (0.1M 醋酸钠，0.5M 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。