

## CNBr-Activated Agarose 4FF

编号： PH-20

### 产品介绍：

CNBr Focurose 4FF 是经过溴化氰活化后含有氰酸酯基团的快流速纯化介质，适用于偶联蛋白质、多肽、核酸等含有氨基的生物分子。在生物医药纯化工艺中经过反复的验证，得到了广泛的应用。

特点如下：

- a.应用广泛，可适用于偶联含氨基的生物类大分子。
- b.多点偶联，简单、灵活、快速、有效，能高效的维持生物分子的生物学活性及稳定性。
- c.流速快、产率高、易于放大。

表1：介质性能参数

基质	高度交联 4%的琼脂糖
粒径范围	45-165μm
平均粒径	90μm
结合载量	30mg(Trypsinogen)/ml(介质)
pH 稳定性	3-11 (长期) 2-11 (短期)
最大流速	700cm/h
操作压力	≤0.3MPa
贮存溶液	100%丙酮
贮存温度	4-8℃

### 一、偶联条件

#### 1. (A 液) 清洗

取适量的沉降胶（0.83g 清洗完成后约为1.0ml），用5 倍体积的A 液将介质重悬，5min 后将溶液抽干。重复此步骤5 次。

备注：此步骤用于激活介质，要保证A 液的清洗体积要充足、清洗时间固定在0.5h 左右（时间太久介质上面的基团会水解）。

#### 2. 配基溶液的制备

将要偶联的生物分子用B 液溶解或者将生物分子置换到B 液中（生物分子浓度为1-10mg/ml,建议为5mg/ml）。

备注：确保偶联时的pH 和盐浓度与B 液一致。

#### 3. 偶联

将清洗完的介质和准备好的样品按等比例（体积比）混合，室温条件下温和混匀3-4h。确定偶联成功（通过测定偶联前后生物分子含量确定偶联效率）后，将溶液抽干。

备注：偶联建议在室温条件下偶联3-4h。对于不稳定的配基，建议4-8℃偶联过夜。

#### 4. (C 液) 清洗

用5 倍体积的C 液将偶联后的介质重悬，再将溶液抽干。再重复此步骤3 次。

备注：此步骤用于清洗介质中残留的生物分子，清洗要彻底。

## 5. 封闭

用5 倍体积的C 液进行重悬，室温条件下温和混匀3-4 小时后，将溶液抽干。

备注：此步骤用于封闭介质上面的基团，室温条件下温和混匀3-4 小时即可。

## 6. (D 液和E 液) 清洗

用5 倍体积的D 液将封闭后的介质重悬，5min 后将溶液抽干；再用5 倍体积的E 液将介质重悬，5min 后将溶液抽干。重复此步骤3 次。

备注：此步骤用于酸碱清洗掉偶联不够紧密的生物分子。

## 7. 保存

用5 倍体积的纯化水将介质重悬后抽干，再用5 倍体积的20%乙醇将介质重悬后抽干，最后用20%乙醇浸泡保存。

备注：此步骤用于保存介质，避免微生物生长。

## 8. 溶液配制

A 液：0.001M HCl、0.5M NaCl，调节pH 3.0，4-8℃保存（A 液使用前要进行预冷处理）。

B 液：0.2M NaHCO<sub>3</sub>、0.5 M NaCl，调节pH 8.3（如果要偶联的生物分子为IgG 时，pH=8.5-9.0），室温保存。

C 液：0.1M Tris-HCl，调节pH 8.3，室温保存。

D 液：0.05M Tris-HCl、0.5M NaCl，调节pH 8.5，室温保存。

E 液：0.05M 甘氨酸、0.5M NaCl，调节pH 3.5，室温保存。

F 液：1.0M NaCl，室温保存。

## 二、清洗

清洗后可以去除一些强结合性物质（例如一些强结合的蛋白、变性蛋白、脂类等），从而达到恢复介质的优良性能（例如载量、流动性、柱效等）。

建议每使用5 次后进行一次清洗，具体清洗频率需根据纯化的初始样品的洁净度进行调整。

### A 常规清洗

1. 用5-10 倍柱体积的纯化水冲洗。
2. 用5-10 倍柱体积的D 液冲洗。
3. 用5-10 倍柱体积的E 液冲洗。
4. 用5-10 倍柱体积的F 液冲洗。
5. 用5-10 倍柱体积的纯化水冲洗。
6. 用5-10 倍柱体积的20%乙醇冲洗后保存。

### B 剧烈清洗

1. 用2-5 倍柱体积0.2%非离子型去污剂冲洗后，立即用5-10 倍柱体积纯化水冲洗。
2. 用2-5 倍柱体积6M 盐酸胍冲洗后，立即用5-10 倍柱体积纯化水冲洗。
3. 用5-10 倍柱体积的20%乙醇冲洗后保存。

备注：剧烈清洗条件是否适用主要取决于偶联的生物分子的稳定性，采用此条件清洗前，建议先做一个小规模의 预实验验证生物分子的稳定性。

### 三、常见问题及解决方案

问题	可能原因	解决方案
偶联效率较低	1.B 液盐浓度或 pH 不对	检测 B 液配制是否正确
	2.偶联时间不够	延长偶联时间
	3.预活化填料不合适	尝试其它种类的预活化填料
纯化时目标物不与介质结合或结合量较低	1.上样量过载	降低上样量
	2.上样速度过快	降低上样流速
	3.蛋白或脂类在介质中聚集	及时有效地清洗介质
	4.样品在储存或上样过程中失活	正确储存待纯化样品以维持样品的活性
	5.配基和目标物结合比例比较低	尝试加大偶联时配基浓度
	6.配基在偶联或清洗过程中降解	检测配基在偶联或清洗中的稳定性
洗脱时没有收集到目标物或只收集到少量目标物	1.目标物没有与介质结合或结合量较少	降低上样流速并检查介质的结合能力
	2.洗脱条件不合适	更改相应洗脱条件或增强洗脱液的洗脱能力
	3.目标物在洗脱液条件下出现聚集沉淀	检测目标物在洗脱液条件（盐浓度和 pH 等）下的稳定性
目标物纯度较低	1.样品没有经过前处理	样品上柱前必须要经过离心或过滤
	2.样品粘度过高	用平衡液适当的稀释样品，降低粘度。
	3.洗杂不彻底	加大洗杂体积直至基线平稳并与平衡液一致
	4.杂质蛋白或脂类在介质中聚集沉淀	及时有效地清洗介质
	5.洗脱条件不佳，洗脱速度太快、梯度太陡。	调整洗脱条件
	6.目标物出现降解	检测目标物的稳定性
	7.柱料装填效果不佳	重新装填或购买
	8.杂质出现非特异性吸附	适当选择添加剂降低非特异性吸附
	9.分离柱顶部有较大储样体积	重新装柱或降低储样体积
	10.介质中有微生物生长	介质使用完后，请及时正确保存介质
介质载量下降	1.上样速度过快	降低上样流速
	2.蛋白或脂类在介质中聚集，导致载量下降。	及时清洗介质
	3.使用次数过多，配基出现脱落	重新偶联新的介质
	4.样品在储存或上样过程中失活，不能较好的与配基结合	正确储存待纯化样品以维持样品的活性
色谱峰上升缓慢	介质装填过紧	重新装柱
色谱峰拖尾	介质装填太松	重新装柱
柱床有裂缝或干涸	出现泄露或大体积气泡引入	检查管路是否有泄露或气泡，重新装柱
液流较慢	1.蛋白或脂类聚集	及时清洗介质或滤膜
	2.蛋白沉淀在介质中	调整平衡液和洗脱液组分，以维持目标物的稳定性和介质的结合效率
	3.分离柱中微生物生长	所用试剂必须经过过滤和脱气；样品上柱前必须离心或过滤