

Con A 层析介质

Con A Beads

货号	规格
BDTL0017-5	5ml

1. 产品介绍

Con A 层析介质是一种将伴刀豆球蛋白 A(简称 Con A)与琼脂糖偶联纯化一些糖蛋白的亲亲和层析介质。Con A 是从巨豆 (Jack bean, *Canavalia ensiformis*) 中分离出来的一种植物血凝素, 能与含有 α -D-吡喃甘露糖基、 α -D-吡喃葡萄糖基以及与其空间位置相关的分子基团的结合。Con A 与糖类分子结合主要在 C-3、C-4 及 C-6 的羟基部分。Con A 与 D-吡喃甘露糖的结合比与 D-吡喃葡萄糖要强些。Con A 层析介质主要用来分离和纯化一些糖蛋白、膜蛋白、糖脂、多糖、带甘露糖苷或葡糖苷残基的膜囊泡、IgM、激素脂蛋白等。例如人血清中胰蛋白酶抑制剂、碱性磷酸酯酶、小牛脾磷酸二酯酶、不同变种的甲胎球蛋白和某些激素如绒毛膜促性腺激素 (HCG)、促黄体激素 (LH) 等物质都可以用它纯化。Con A 层析介质应用范围广, 具体性能见表 1。

表 1. Con A Beads 产品性能

性能	指标
基质	4% 琼脂糖微球
配体	Con A
载量	>20mg 甲状腺球蛋白 /ml 介质
粒径 (μm)	45-165
最大流速	0.1 MPa, 1 bar
pH 稳定范围	4-9
储存缓冲液	0.1M 醋酸盐, 1MNaCl, 1mM CaCl_2 , 1mM MnCl_2 , 1mM MgCl_2 20% 乙醇, pH6.0
储存温度	2-8 $^{\circ}\text{C}$

2. 纯化流程

2.1 Buffer 的准备

所用水和 Buffer 在使用之前建议用 0.22 μm 或 0.45 μm 滤膜过滤。

Con A 层析介质在 pH 小于 5.0, Mn^{2+} 和 Ca^{2+} 的存在时具有吸附活性。

- **结合/洗杂 Buffer:** 20mM Tris-HCl, 0.5M NaCl, 1mM CaCl₂, 1mM MnCl₂, pH7.4
- **洗脱 Buffer:** 20mM Tris-HCl, 0.5M NaCl, 1mM CaCl₂, 1mM MnCl₂, 0.1M-0.2M α-D-甲基甘露糖苷或 α-D-甲基葡萄糖苷, pH7.4

注：洗脱液中 α-D-甲基甘露糖苷或 α-D-甲基葡萄糖苷浓度可根据物质吸附能力进行线性或梯度洗脱。甘露糖和葡萄糖亦可以做洗脱物质，但洗脱能力较弱。

结合能力较强的物质可采用降低洗脱液 pH 洗脱，但不要低于 pH4.0。可采用硼酸盐作为洗脱液，如 0.1M 硼酸盐，pH6.5。

2.2 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 0.22μm 或 0.45μm 滤膜过滤，减少杂质，提高蛋白纯化效率和防止堵塞柱子。

2.3 样品纯化

1. 将 Con A 层析介质装入合适的层析柱，层析用 5 倍柱体积的结合 Buffer 进行平衡，使层析介质处于与目的蛋白相同的缓冲体系下，起到保护蛋白的作用。
2. 将样品加到平衡好的 Con A 层析介质中（保证目的蛋白与 Con A 层析介质充分接触，提高目的蛋白的回收率），收集流出液。
3. 用 10-15 倍柱体积的洗杂 Buffer 进行清洗，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 Buffer，收集洗脱液，即目的蛋白组分。
5. 依次使用 3 倍柱体积的结合 Buffer 和 5 倍柱体积的去离子水平衡层析介质，最后再用 5 倍柱体积的 20% 的乙醇平衡，然后保存在等体积的 20% 的乙醇中，置于 4°C 保存，防止层析介质被细菌污染。

2.4 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. 层析介质清洗

Con A 层析介质可以重复使用而无需再生，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层析介质进行清洗。

用 3-4 倍柱体积的含有 0.5M NaCl 的 pH8.5 或 pH4.5 的缓冲液清洗，然后立即用 5 倍柱体积的结合液平衡。

➤ 结合力较强物质的去除

用 2 倍柱体积的含 1% Triton™ X-100, pH6.5 的 0.1M 硼酸盐缓冲液清洗，或 20% 乙醇或 50% 乙二醇溶液清洗，然后立即用 5 倍柱体积的 PBS, pH 7.4 清洗。