

## rProtein A Beads 4FF 的预装柱说明书

货号: AC17635

规格: 1\*1mL / 1\*5mL / 5\*1mL / 3\*1mL+1\*5mL / 5\*5mL

保存: 2-8°C

### 产品说明:

**rProtein A Beads 4FF** 是用于分离和纯化单克隆抗体、多克隆抗体或 Fc-融合标签的通用性亲和层析介质。Protein A 是一种分离自金黄色葡萄球菌的细胞壁蛋白, 主要通过 Fc 片段结合哺乳动物 IgG, 但是不与狗 IgG 结合, 不结合人 IgM、IgD 和 IgA。蛋白 A 与蛋白 G 与不同来源及亚类的免疫球蛋白结合能力不一样。天然 Protein A 有五个 IgG 结合区域和一些未知功能的区域, 重组 protein A 去除了与白蛋白及细胞表面结合位点, 只含有五个 IgG 结合区域, 减少了非特异性吸附。

**rProtein A Beads 4FF** 是以高度交联的 4%琼脂糖凝胶为基质, 可以在相对较高的流速下进行单克隆抗体和多克隆抗体的纯化, 被工业客户普遍接受。

表 1: 介质性能参数

基质	高度交联 4%的琼脂糖微球
粒径范围	45-165 $\mu$ m
配体	重组蛋白 A
结合载量	>40mg 人 IgG /ml(介质)
PH 稳定范围	3-10
操作压力	$\leq$ 0.3MPa, 3bar
贮存溶液	20%乙醇

表 2: Protein A 和 Protein G 对不同抗体的结合能力:

种属	亚型	Protein A	Protein G	种属	亚型	Protein A	Protein G
Human	IgA	variable	—	Mouse	IgG1	+	++++
	IgD	—	—		IgG2a	++++	++++
	IgE	—	—		IgG2b	+++	++++
	IgG1	++++	++++		IgG3	++	+++
	IgG2	++++	++++		IgM	variable	—
	IgG3	—	++++	Rat	IgG1	—	+
	IgG4	++++	++++		IgG2a	—	++++
	IgM	variable	—		IgG2b	—	++
Avian egg yolk	IgY	—	—		IgG3	+	++
Cow		++	++++	Liama		—	+
Dog		++	+	Sheep		+/-	++
Hamster		+	++	Monkey(rhesus)		++++	++++
Horse		++	++++	Pig		+++	+++
Koala		—	+	Rabbit	no distinction	++++	+++

++++=结合能力强；++=结合能力中等；—=结合能力弱或没有结合

## 纯化流程：

### 1、Buffer 的准备

所用水和缓冲液在使用之前建议用 0.22 $\mu$ m 或 0.45  $\mu$ m 滤膜过滤。

平衡/洗杂液：: 20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.15M NaCl, pH 7.0

洗脱液: 0.1M 甘氨酸, pH 3.0

中和液: 1M Tris-HCl, pH8.5

### 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，可以用平衡/洗杂液对血清样品、腹水或细胞培养液稀释，或者样品用平衡/洗杂液透析。

样品在上样前建议离心或用 0.22 $\mu$ m 或 0.45 $\mu$ m 滤膜过滤，减少杂质，提高蛋白纯化效率和防止堵塞柱子。

### 3、样品纯化

1. 上柱：将泵管道中注满去离子水。去掉上塞子，将层析柱连接至色谱系统中。再折断下口，将预装柱接到色谱系统中，并旋紧。

2. 水洗：用 3-5 倍柱体积的去离子水冲洗出存储缓冲液。

3. 平衡：使用至少 5 个柱床体积的平衡液平衡色谱柱。

*备注：此步骤用于平衡介质，保证介质中的溶液的组分和 pH 与样本一致。*

4. 利用泵或注射器上样。

*备注：样品的粘度增加使得即使上样体积很少，也会导致层析柱很大的反压。上样量不要超过柱子的结合能力。大量的样品体积也可能造成很大的反压，使得进样器更难使用。*

5. 洗杂：用洗杂液冲洗柱子，直到紫外吸收达到一个稳定的基线（一般至少 10-15 个柱体积）。

6. 洗脱：使用 5-10 倍柱体积的洗脱液洗脱，收集洗脱液，即目的蛋白组分。洗脱组分需要立即调成中性，一般建议使用洗脱组分体积 1/10 的中和液进行中和

7. 水洗：依次使用 3 倍柱体积的平衡液和 5 倍柱体积的去离子水平衡填料，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 $^{\circ}$ C 保存，防止填料被细菌污染

### 4、SDS-PAGE 检测

将纯化过程中收集的样品（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。

#### 填料清洗

rProtein A Beads 4FF 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，往往造成流速和结合载量都下降，严重影响柱子的性能，这时需要对树脂进行清洗。

#### 1. 去除一些沉淀或变性物质

用 2 倍柱体积的 6M 盐酸胍溶液进行清洗，然后立即用 5 倍柱体积的 PBS, pH 7.4 清洗。

#### 2. 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% TritonX-100 清洗，然后然后立即用 5 倍柱体积的 PBS, pH 7.4 清洗。

## 常见问题

**表 1：常见问题及解决方案**

问题	可能原因	解决方案
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
洗脱时没有收集到目标物或只收集到少量目标物	1.样品中抗体浓度太低	使用其抗原做配体的介质
	2.洗脱时间不够	降低流速，延长洗脱液的保留时间
	3.抗体被降解降解	适当的提高洗脱 pH
	4.洗脱体积过小	加大洗脱体积
柱子反压过高	1.填料被堵塞	样品上柱前使用滤膜(0.22 或 0.45 $\mu$ m)过滤，或者离心去除。
	2.样品粘度过高	有机溶剂或者蛋白稳定试剂（如甘油等）可能会引起反压增高，降低操作流速。
介质载量下降	1.上样速度过快	降低上样流速
	2.使用次数过多	更换新介质
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