



蛋白 A 重力预装柱套装

Protein A Gravity-flow Column Kit

货号	规格
BDTL0001-K	套

组分名称	规格	数量
蛋白 A 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 蛋白 A 层析介质(主要性能见下表)的重力预装柱, 2 瓶 100ml 的结合/洗杂 Buffer 和 1 瓶 100ml 的洗脱 Buffer。不需要再进行填料填装和缓冲液配制。整个纯化流程大约需要 30min (主要取决于样品体积和溶液的粘稠性), 操作快捷。

蛋白 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(见附表)。天然蛋白 A 有五个 IgG 结合区域和一些未知功能的区域, 重组蛋白 A 去除了白蛋白及细胞表面结合位点, 只含五个 IgG 结合区域, 减少了非特异性吸附。

重组蛋白 A 层析介质性能表

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

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

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。
- 将样品加入柱管, 自然流速流出, 收集穿出液, 以备检测。
- 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。
- 依次使用 5ml 结合 Buffer 和 5ml 去离子水交替平衡填料, 重复 2 次, 最后再用 5ml 20% 的乙醇平衡填料, 重复 1 次, 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。

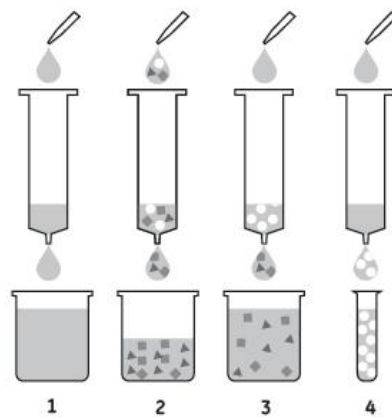


图 1. 使用蛋白 A 重力预装柱纯化抗体流程

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. 填料清洗

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。

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

4. 问题及解决方案

问题	原因分析	推荐解决方案
柱子反压过高	筛板被堵塞	清洗或更换筛板
	填料被堵塞	按照第3部分进行层析介质清洗 裂解液中含有微小的固体颗粒，建议过滤
样品纯化过程中曲线不稳	样品或 buffer 中有气泡	去除样品或柱子中的气泡
		样品和buffer进行脱气
洗脱组分中没有目的蛋白	样品中抗体浓度太低	使用其抗原做配体的介质
	抗体被降解	适当的提高洗脱pH
回收率逐渐减低	上样量太多	减少上样量
	柱子太脏，载量降低	按照第3部分进行层析介质清洗

5. 抗体纯化介质一览表

通用性抗体纯化产品		
蛋白 A 层析介质 (普通型、高载量、特异性优良)	BDTL0001-1	1ml
	BDTL0001-5	5ml
	BDTL0001-25	25ml
	BDTL0001-100	100ml
蛋白 A 重力预装柱套装	BDTL0001-K	套

蛋白 A 高速层析介质 (4FF) (高流速、高载量、特异性优良、耐压)	BDTL0002-5	5ml
	BDTL0002-25	25ml
	BDTL0002-100	100ml
蛋白 A 高速层析介质 (4FF) 预装柱 (预装柱、高流速、高载量、配套 BioRad 和 GE 等公司机器)	BDTL0002-11	1×1ml
	BDTL0002-51	5×1ml
	BDTL0002-15	1×5ml
	BDTL0002-55	5×5ml
	BDTL0002-3115	3×1ml+1×5ml
蛋白 G 层析介质 (普通型、高载量、特异性优良)	BDTL0003-1	1ml
	BDTL0003-5	5ml
	BDTL0003-25	25ml
	BDTL0003-100	100ml
蛋白 G 重力预装柱套装	BDTL0003-K	套
蛋白 G 高速层析介质 (4FF) (高流速、高载量、特异性优良、耐压)	BDTL0004-5	5ml
	BDTL0004-25	25ml
	BDTL0004-100	100ml
蛋白 G 高速层析介质 (4FF) 预装柱 (预装柱、高流速、高载量、配套 BioRad 和 GE 等公司机器)	BDTL0004-11	1×1ml
	BDTL0004-51	5×1ml
	BDTL0004-15	1×5ml
	BDTL0004-55	5×5ml
	BDTL0004-3115	3×1ml+1×5ml
蛋白 A/G 高速层析介质 (4FF) (用于 IP、Co-IP 实验)	BDTL0021-5	5ml
	BDTL0021-25	25ml
	BDTL0021-200	200ml
蛋白 L 层析介质 (结合更广泛来源及亚类的抗体)	BDTL0022-5	5ml
	BDTL0022-25	25ml
	BDTL0022-200	200ml
单克隆抗体纯化产品		
蛋白 A 高速耐碱层析介质 (4FF) (耐碱、高流速、高载量、特异性优良、耐压、高稳定性)	BDTL0005-10	10ml
	BDTL0005-100	100ml
	BDTL0005-500	500ml

蛋白 A 高速耐碱层析介质 (4FF) 预装柱 (预装柱、耐碱、高流速、高载量、耐压、高稳定性、配套 BioRad 和 GE 等公司机器)	BDTL0005-11	1×1ml
	BDTL0005-51	5×1ml
	BDTL0005-15	1×5ml
	BDTL0005-55	5×5ml
	BDTL0005-3115	3×1ml+1×5ml
多克隆抗体纯化产品		
预活化层析介质 (抗原偶联专用) (预活化层析介质, 可以和氨基、巯基反应, 用来偶联蛋白、核酸、小分子等。适合偶联抗原纯化多克隆抗体)	BDTL0006-5	5ml
	BDTL0006-25	25ml
	BDTL0006-100	100ml
亲疏层析介质 (快速从血清、腹水或组织培养液中纯化抗体)	BDTL0025-5	5ml
	BDTL0025-10	10ml
	BDTL0025-50	50ml
	BDTL0025-250	250ml

附表 Protein A 和 Protein G 对不同抗体的结合能力

种属	亚型	Protein A 结合力	Protein G 结合力
Human	IgA	Variable	-
	IgD	-	-
	IgE	-	-
	IgG1	++++	++++
	IgG2	++++	++++
	IgG3	-	++++
	IgG4	++++	++++
	IgM	Variable	-
Avian egg yolk	IgY	-	-
Cow		++	++++
Dog		++	+
Goat		-	++
Guinea pig	IgG1	++++	++
	IgG2	++++	++
Hamster		+	++
Horse		++	++++

Koala		-	+
Liama		-	+
Monkey(rhesus)		++++	++++
Mouse	IgG1	+	++++
	IgG2a	++++	++++
	IgG2b	+++	+++
	IgG3	++	+++
	IgM	Variable	-
Pig		+++	+++
Rabbit	No distinction	++++	+++
Rat	IgG1	-	+
	IgG2a	-	++++
	IgG2b	-	++
	IgG3	+	++
Sheep		+/-	++

++++: 结合能力强; ++: 结合能力中等; -: 结合能力弱或没有结合