

蛋白 A 高速层析介质（4FF）预装柱

Protein A Beads 4FF Column

| 货号 | 规格 |
|---------------|-------------|
| BDTL0002-11 | 1×1ml |
| BDTL0002-51 | 5×1ml |
| BDTL0002-15 | 1×5ml |
| BDTL0002-55 | 5×5ml |
| BDTL0002-3115 | 3×1ml+1×5ml |

1. 产品介绍

本品是一种中压预装柱，有 1ml 和 5ml 两种规格，分别填装 1ml 和 5ml 蛋白 A 高速层析介质（4FF）。预装柱具有标准接口，可以适配商品化的各类中压色谱系统，如 ÄKTA 等，方便客户操作。

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。蛋白 A 高速层析介质（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（具体性能见下表）。

蛋白 A 高速层析介质（4FF）性能表

| 指标 | 性能 |
|---------|-------------------|
| 基质 | 高度交联的 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 | 0.3 MPa, 3 bar |
| pH 稳定范围 | 3-12 |
| 储存缓冲液 | 20% 乙醇 |
| 储存温度 | 2-8°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 μ m 或 0.45 μ m 滤膜过滤。

结合/洗杂 Buffer: 0.15M NaCl, 20 mM Na₂HPO₄, pH 7.0

洗脱 Buffer: 0.1M 甘氨酸, pH 3.0

中和液: 1M Tris-HCl, pH8.5

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 0.22 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。

2.3 样品纯化

本品是一种分离和纯化单克隆抗体和多克隆抗体的预装柱, 可以用各种常规的中压色谱系统, 以 ÄKTA 仪器使用为例。

1. 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. 用 3-5 倍柱体积的去离子水冲洗出存储缓冲液。
3. 使用至少 5 倍柱床体积的结合 Buffer 平衡色谱柱。1ml 预装柱推荐流速为 1ml/min, 5ml 预装柱推荐流速为 1-5ml/min。

4. 利用泵或注射器上样。

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. 用洗杂 Buffer 冲洗柱子, 直到紫外吸收达到稳定的基线 (一般至少 10-15 个柱体积)。
6. 用洗脱 Buffer 采用一步法或线性梯度洗脱。一步洗脱中, 通常 5 倍柱体积洗脱液就足够了。可以用一个小的梯度, 例如 20 倍柱体积或更多, 来分离不同结合强度的蛋白质。

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. 填料清洗

本品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 盐酸胍溶液进行清洗, 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 |

3 / 6

| | | |
|--|---------------|-------------|
| 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、 | BDTL0006-5 | 5ml |
| | BDTL0006-25 | 25ml |

| | | |
|---------------------------------|--------------|-------|
| 核酸、小分子等。适合偶联抗原纯化多克隆抗体) | 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