

蛋白 A 高速耐碱层析介质（4FF）

Protein A Alkaline-tolerate Beads 4FF

货号	规格
BDTL0005-10	10ml
BDTL0005-50	50ml
BDTL0005-500	500ml

1. 产品介绍

本品是以高度交联的 4% 琼脂糖凝胶为基质，以耐碱蛋白 A 为配体（在天然蛋白 A 的基础上进行生物工程突变得到的）的层析介质，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，适用于工业化抗体的大规模生产。（产品性能见表 1）

研究表明，本品以 0.1M NaOH 进行 200 次在位清洗，介质载量几乎不变，以 0.5M NaOH 进行 100 次在位清洗，载量仍可达到最初载量的 80%，满足客户尤其是工业客户的清洗操作需求。（见图 1）。本品采用较稳定的定向偶联，脱落量低（小于 10ng/mg IgG，见图 2）。其耐压性能见图 3。

表 1. 蛋白 A 高速耐碱层析介质（4FF）性能

项目	性能
介质	高度交联的 4% 琼脂糖
平均粒径	~ 90 μ m
配体	耐碱性 Protein A
结合载量	> 40 mg 人 IgG/ml 介质
化学稳定性	可耐受抗体纯化过程中的所有试剂
工作 pH	3-12
在线清洗	0.1-0.5M NaOH
线性流速	50-300cm/h
保存	20% 乙醇， 2-8 $^{\circ}$ C

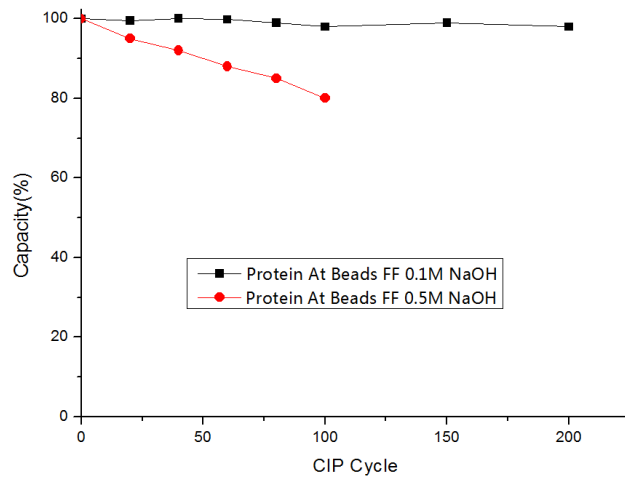


图 1. 蛋白 A 高速耐碱层析介质（4FF）耐碱性能测试

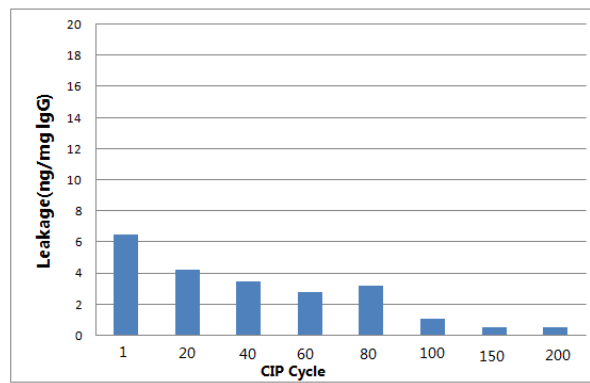


图 2. 蛋白 A 高速耐碱层析介质（4FF）的蛋白 A 脱落测试

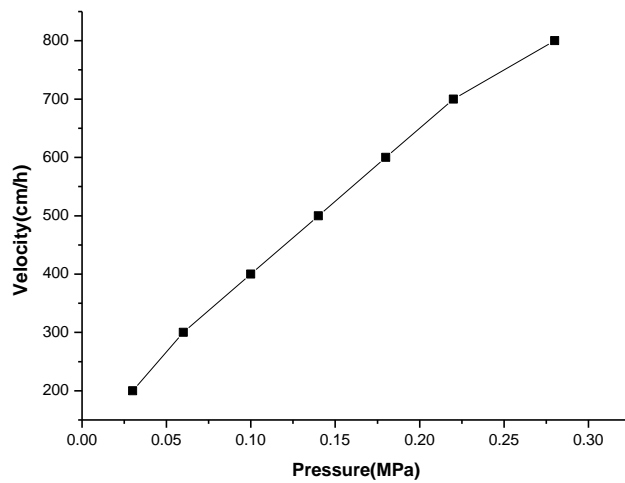


图 3. 蛋白 A 高速耐碱层析介质（4FF）的压力/流速曲线
（层析柱 BPG300，柱高 20cm）

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。

- **结合缓冲液/洗涤缓冲液:** 0.15 M 氯化钠、20 mM 磷酸氢二钠, pH7.0
- **洗脱液:** 0.1 M 甘氨酸, pH 3.0
- **中和液:** 1 M Tris-HCl 缓冲液, pH 8.5 。

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 层析介质装填

1. 用去离子水冲洗层析柱底筛板与接头, 确保柱底筛板上无气泡, 关闭柱底出口, 并在柱底部留出 1-2cm 的去离子水。
2. 将层析介质悬浮起来, 小心的将浆液连续地倒入层析柱中。用玻璃棒沿着柱壁倒入浆液可减少气泡的产生。
3. 如果使用储液器, 应立即在层析柱和储液器中加满水, 将进样分配器放置于浆液表面, 连接至泵上, 避免在分配器或进样管中产生气泡。
4. 打开层析柱底部出口, 开起泵, 使其在设定的流速下进行。最初应让缓冲液缓慢流过层析柱, 然后缓慢增加至最终流速, 这样可避免液压对所形成柱床的冲击, 也可以避免柱床形成的不均匀。如果达不到推荐的压力或流速, 可以用你所使用泵的最大流速, 这样也可以得到一个很好的装填效果。(注意: 在随后的色谱程序中, 不要超过最大装柱流速的 75%) 当柱床高度稳定后, 在最后的装柱流速下至少再上 3 倍柱床体积的去离子水。标上柱床高度。
5. 关闭泵, 关闭层析柱出口。
6. 如果使用储液器, 去除储液器, 将分配器至于层析柱中。
7. 将分配器推向柱子至标记的柱床高度处。允许装柱液进入分配器, 锁紧分配器接头。
8. 将装填好的层析柱连接至泵或色谱系统中, 开始平衡。如果需要可以重新调整分配器。

2.4 样品纯化

1. 将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层析介质中(保证目的蛋白与层析介质充分接触, 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。

- 使用 5-10 倍柱体积的洗脱 Buffer，收集洗脱液，即目的抗体组分。（用中和液将目的蛋白组分调整到 pH 中性，并用聚乙二醇浓缩并透析，以彻底去除不相干离子）
- 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. 残留配体去除

本层析介质配体蛋白 A 的脱落很低，小于 10ng/mg 抗体。但是很多产品需要完全去除，可采用阳离子交换、阴离子交换或凝胶过滤等方法去除，具体参照阳离子交换层析介质、阴离子交换层析介质和凝胶过滤层析介质的使用。

4. 层析介质清洗

本层析介质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。

在线清洗

本层析介质是一种耐碱亲和介质，可以耐受 0.1M-0.5M NaOH 溶液的清洗，成本低，效果好，具体操作：

- 3 倍柱体积的结合液；
- 2 倍以上柱体的 0.1–0.5 M NaOH，接触时间为 15 minutes；
- 5 倍柱体积的结合液冲洗。

注：因 0.1–0.5 M NaOH 粘度大，易造成压力增加，可进行反向冲洗。

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
	层析介质被堵塞	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，建议上柱前使用滤膜 (0.22 or 0.45 μm) 过滤，或者离心去除。
样品流速过低	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
	样品与蛋白G结合能力较弱	更换介质，如蛋白A层析介质进行纯化
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