

预活化层析介质（抗原偶联专用）

Pre-activated Beads (For Antigen Conjugating)

货号	规格
BDTL0006-5	5ml
BDTL0006-25	25ml
BDTL0006-100	100ml

1. 产品介绍

本品通过与巯基或者氨基的反应实现抗原的偶联，进而对免疫血清中的抗体进行纯化，可以得到高效价的目标抗体，是多克隆抗体生产中不可缺少的纯化介质。具体功能见下表。

预活化层析介质性能表

性能	指标
基质	4% 琼脂糖微球
配体	碘乙酸（EDC 活化）
载量	>3mg IgG/ml 介质
粒径 (μm)	45-165
最大流速	0.1MPa, 1 bar
pH 稳定范围	5-10
储存缓冲液	20% 乙醇
储存温度	2-8℃

2. 纯化流程

本预活化层析介质针对巯基和氨基的偶联条件有所差异，对于含有巯基抗原偶联请参考 2.1 流程，对于含有氨基抗原偶联请参考 2.2 流程，

2.1 含巯基抗原的偶联流程

2.1.1 缓冲液准备

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

- 偶联液：50 mM Tris，5 mM EDTA-Na，pH 8.5
- 封闭液：50 mM Tris，5 mM EDTA-Na，50 mM L-半胱氨酸，pH 8.5
- 保护液：20 mM 磷酸盐缓冲液，20% 乙醇，pH 8.0

- 结合/洗杂液：20 mM 磷酸盐缓冲液，pH 8.0
- 洗脱液：100 mM 甘氨酸，pH 2.5-3.0
- 中和液：1 M Tris-HCl，pH 8.5

2.1.2 抗原准备

抗原样品使用前务必确保其巯基处于还原状态（可以使用 Ellman's Reagent 检测自由巯基的含量）。如果巯基已经氧化，必须对抗原进行还原，一般推荐使用还原剂 TCEP (Tris (2-carboxyethyl) phosphine)，TCEP 溶液很稳定，可以选择性的、高效的打开抗原中的二硫键，并且不影响抗原与层析介质的偶联反应，每 mg 抗原中 TCEP 的添加量不超过 12mg，需要自己进行优化。如果使用 DTT 等含有巯基的还原剂，处理完样品必须要将还原剂去除，否则会影响抗原与层析介质的偶联效率。

使用偶联液溶解抗原，制备成终浓度为 1-3 mg/ml 的抗原溶液。建议该溶液现用现配，储存时间过长会影响偶联效果。

2.1.3 抗原偶联

1. 取适量的预活化层析介质，加入合适的重力柱中，靠重力干保护液，用 3 倍柱体积的偶联液平衡层析介质，待偶联液流干，再加入 3 倍柱体积的偶联液，重复操作 2 遍。共使用 9 倍柱体积的偶联液。
2. 关闭柱子的下端出口，加入等体积的含巯基的抗原，混匀，取出至于合适的离心管中，置于 28℃ 震荡孵育 30min。

注：确保层析介质充分悬浮起来，否则将大大影响偶联效率。

3. 将上述反应体系取出，转移至重力柱中，流干其中溶液，并收集流出，再用 3 倍柱体积的偶联液清洗层析介质，合并两次流出。

注：如有需要，可以使用 Ellman's Reagent 检测其中巯基含量，得出抗原残留量，从而计算偶联效率。

4. 关闭柱子的下端出口，加入等体积的封闭液，混匀，转移至合适的离心管中，置于 28℃ 震荡孵育 30min。
5. 将上述反应体系取出，转移至重力柱中，流干其中的封闭液。

注：如果立即使用，可以参考 2.1.4 操作。如果以后使用，可以用 3 倍柱体积的结合液清洗层析介质，然后保存在等体积的保护液中，于 2-8℃ 保存。

2.1.4 抗体纯化

1. 将偶联了抗原的层析介质装入合适的层析柱，用 5 倍柱体积的结合液进行平衡，使层析介质处于与抗体更易结合环境中，一方面保护目标抗体，另一方面提高抗体结合效率。
2. 将含有抗体的样品加到平衡好层析介质中，为了保证抗体与层析介质充分接触，提高目标抗体的回收率，可以控制上样流速在 0.5-1 ml/min，并收集流出液。
3. 用 10-15 倍柱体积的洗杂液进行清洗，去除非特异性吸附的杂蛋白，提高目的抗体的纯度，收集洗杂液。
4. 使用 5-10 倍柱体积的洗脱液，收集洗脱组分，即目的抗体。

注：为了保持抗体活性，需要立即将洗脱组分透析至 pH 7.0-8.0 的缓冲液中，或者先加入 1/10 倍洗脱组分体积的中和液，将洗脱组分进行中和，再透析。

- 依次使用 3 倍柱体积的结合液和 5 倍柱体积的去离子水平衡层析介质，最后再用 5 倍柱体积的保护液平衡，然后保存在等体积的保护液中，置于 2-8℃ 保存，防止层析介质被细菌污染。

2.1.5 SDS-PAGE 检测

将纯化抗体样品得到的流出组分、洗杂组分和洗脱组分以及原始含抗体样品使用 SDS-PAGE 检测纯化效果。

2.2 含氨基抗原偶联流程

2.2.1 缓冲液准备

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

- 偶联液：0.1 M NaHCO₃，0.5 M NaCl，pH 8.3
- 封闭液：50 mM Tris，5 mM EDTA-Na，50 mM L-半胱氨酸，pH 8.5
- 保护液：20 mM 磷酸盐缓冲液，20% 乙醇，pH 8.0
- 结合/洗杂液：20 mM 磷酸盐缓冲液，pH 8.0
- 洗脱液：100 mM 甘氨酸，pH 2.5-3.0
- 中和液：1M Tris-HCl，pH 8.5

2.2.2 抗原准备

氨基是一种比较稳定的基团，所以，对于含有氨基的抗原没有太特殊的要求。使用偶联液溶解抗原，制备成终浓度为 5-10 mg/ml 的抗原溶液。

2.2.3 抗原偶联

- 取适量的预活化层析介质，加入合适的重力柱中，靠重力干保护液，用 3 倍柱体积的偶联液平衡层析介质，待偶联液流干，再加入 3 倍柱体积的偶联液，重复操作 2 遍。共使用 9 倍柱体积的偶联液。
- 关闭柱子的下端出口，加入等体积的含氨基的抗原，混匀，取出转移至合适的离心管中，置于 28℃ 震荡孵育 3-5 小时，或者 2-8℃ 震荡孵育过夜（12-15 小时）。

注：确保层析介质充分悬浮起来，否则将大大影响偶联效率。

- 将上述反应体系取出，转移至重力柱中，其中的抗原溶液，并收集流出，再用 3 倍柱体积的偶联液清洗层析介质，合并两次流出，留待测试。
- 关闭柱子的下端出口，加入等体积的封闭液，混匀，取出转移至合适的离心管中，置于 28℃ 震荡孵育 30min。
- 将上述反应体系取出，转移至重力柱中，流干其中的封闭液。

注：如果立即使用，可以参考 2.2.4 操作。如果以后使用，可以用 3 倍柱体积的结合液清洗层析介质，然后保存在等体积的保护液中，于 2-8℃ 保存。

2.2.4 抗体纯化

- 将偶联了抗原的层析介质装入合适的层析柱，用 5 倍柱体积的结合液进行平衡，使层析介质处于与抗体更易结合环境中，一方面保护目标抗体，另一方面提高抗体结合效率。
- 将含有抗体的样品加到平衡好层析介质中，为了保证抗体与层析介质充分接触，提高目标抗体的回收

率，可以控制上样流速在 0.5-1 ml/min，并收集流出液。

- 用 10-15 倍柱体积的洗杂液进行清洗，去除非特异性吸附的杂蛋白，提高目的抗体的纯度，收集洗杂液。
- 使用 5-10 倍柱体积的洗脱液，收集洗脱组分，即目的抗体。

注：为了保持抗体活性，需要立即将洗脱组分透析至 pH 7.0-8.0 的缓冲液中，或者先加入 1/10 倍洗脱组分体积的中和液，将洗脱组分进行中和，再透析。

- 依次使用 3 倍柱体积的结合液和 5 倍柱体积的去离子水平衡层析介质，最后再用 5 倍柱体积的保护液平衡，然后保存在等体积的保护液中，置于 2℃-8℃ 保存，防止层析介质被细菌污染。

2.2.5 SDS-PAGE 检测

将纯化抗体样品得到的流出组分、洗杂组分和洗脱组分以及原始含抗体样品使用 SDS-PAGE 检测纯化效果。

4. 问题及解决方案

问题	原因分析	推荐解决方案
柱子流速低	筛板被堵塞	清洗或更换筛板
	样品或层析介质中有气泡	轻轻搅拌层析介质或敲击层析柱去除气泡
偶联液中蛋白或多肽沉淀	蛋白或多肽不溶	偶联液中加入小于 30% 的 DMSO 或 DMF 或 6M 盐酸胍促进样品溶解
偶联效率低	样品无巯基被氧化	加入 DTT 或 TCEP 后立即交联
洗脱组分纯度低	层析介质没有彻底清洗	增加结合/洗杂液体积

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)	BDTL0001-5	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)	BDTL0003-5	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
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