

IgG 高速层析介质 (4FF)

IgG Beads 4FF

货号	规格
BDTL0019-10	10ml

1. 产品介绍

IgG 高速层析介质 (4FF) 是以人 IgG 为亲和配体，一步纯化原核表达系统产生的蛋白 A 融合产品。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。本层析介质是以高度交联的 4% 琼脂糖凝胶为基质，可以在相对较高的流速下进行纯化。具体性能见表 1。

表 1. IgG 高速层析介质 (4FF) 产品性能

指标	性能
基质	高度交联的 4% 琼脂糖微球
配体	人 IgG
载量	>2mg 蛋白 A/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 0.22μm 或 0.45 μm 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 0.22μm 或 0.45μm 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

本层析介质被广泛应用于工业纯化，因此，涉及到各种中压色谱层析柱的装填。

层析柱的装填（使用储液器装填）

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。
4. 使用 5-10 倍柱体积的洗脱 Buffer，收集洗脱液，即目的蛋白组分。
5. 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。

2.5 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. 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。

1. 去除一些沉淀或变性物质

- a) 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

- a) 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
	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
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	样品中蛋白浓度太低	延长接触时间或用层析介质孵育结合
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