



Protein At Beads 4FF 的预装柱说明书

货号：YA2471

规格：1*1mL / 1*5mL / 5*1mL / 3*1mL+1*5mL / 5*5mL

保存：2-8°C

产品说明：

Protein At Beads 4FF 是用于分离和纯化单克隆抗体、多克隆抗体或 Fc-融合蛋白的亲合层析介质。Protein 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。Protein At Beads 4FF 的配体蛋白 Protein At 是在天然蛋白 A 的基础上进行生物工程突变得到的耐碱蛋白 A(Alkaline tolerate, 故缩写为 At)。Protein At Beads 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。

表 1: 介质性能参数

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

纯化流程：

1、Buffer 的准备

所用水和缓冲液在使用之前建议用 0.22 μ m 或 0.45 μ m 滤膜过滤。

平衡/洗杂液：0.15 M NaCl、20 mM Na₂HPO₄，pH7.0

洗脱液：0.1 M 甘氨酸，pH 3.0

中和液：1 M Tris-HCl，pH 8.5。

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，可以用平衡/洗杂液对血清样品、腹水或细胞培养液稀释，或者样品用平衡/洗杂液透析。

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。

3、样品纯化

1. 上柱：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. 水洗：用 3-5 倍柱体积的去离子水冲洗出存储缓冲液。

3. 平衡：使用至少 5 倍柱床体积的平衡液平衡色谱柱。

备注：此步骤用于平衡介质，保证介质中的溶液的组分和 pH 与样本一致。

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. 洗杂:用洗杂液冲洗柱子,直到紫外吸收达到一个稳定的基线(一般至少 10-15 个柱体积)。

6. 洗脱:使用 5-10 倍柱体积的洗脱液洗脱,收集洗脱液,即目的蛋白组分。洗脱组分需要立即调成中性,一般建议使用洗脱组分体积 1/10 的中和液进行中和。

注:首次使用时,可先按照填料清洗中 CIP 清洗一遍,避免脱落的配体残留。

7. 水洗:依次使用 3 倍柱体积的平衡液和 5 倍柱体积的去离子水平衡填料,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℃ 保存,防止填料被细菌污染。

4、SDS-PAGE 检测

将纯化过程中收集的样品(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。

残留配体去除

Protein At Beads 4FF 配体的脱落很低,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树脂、阴离子交换树脂和凝胶过滤树脂的使用。

填料清洗

Protein At Beads 4FF 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,这时需要对树脂进行清洗。

CIP 清洗

Protein At Beads 4FF 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:

- 1、3 倍柱体积的平衡液;
- 2、至少 2 倍柱体的 0.1-0.5 M NaOH,接触时间为 15 min;
- 3、5 倍柱体积的平衡液冲洗。

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。

常见问题

表 1: 常见问题及解决方案

问题	原因分析	推荐解决方案
柱子反压过高	1.筛板被堵塞	清洗或更换筛板
	2.填料被堵塞	进行树脂 CIP 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 或 0.45 μ m) 过滤,或者离心去除。
样品纯化过程中曲线不稳	样品或缓冲液中有气泡	去除样品或柱子中的气泡
		样品和缓冲液进行脱气
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	进行树脂 CIP 清洗