



rProtein A Beads

目录

1. 产品介绍.....	1
2. 纯化流程.....	2
3. 填料清洗.....	3
4. 问题及解决方案.....	3
5. 订购信息及相关产品.....	3

1. 产品介绍

rProtein A Beads 是用于分离和纯化单克隆抗体、多克隆抗体或 Fc-融合蛋白的通用性亲和层析介质, 具体性能见表 1。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, 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, 具体见表 2。天然 Protein A 有五个 IgG 结合区域和一些未知功能的区域, 重组 protein A 去除了与白蛋白及细胞表面结合位点, 只含有五个 IgG 结合区域, 减少了非特异性吸附。

表 1. rProtein A Beads 产品性能

项目	性能
基质	4%琼脂糖微球
配体	重组蛋白 A
载量	>40 mg Human IgG/ml 介质
粒径范围	45-165 μ m
最大压力	0.1 MPa, 1 bar
pH 稳定范围	3-10
储存缓冲液	含 20%乙醇的 1XPBS
储存温度	2 - 8 $^{\circ}$ C

表 2. 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		—	+
Llama		—	+
Monkey(rhesus)		++++	++++
Mouse	IgG1	+	++++
	IgG2a	++++	++++
	IgG2b	+++	+++
	IgG3	++	+++
	IgM	variable	—





表 2. Protein A 和 Protein G 对不同抗体的结合能力 (续)

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

2. 纯化流程

2.1 缓冲液的准备

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

平衡/ 洗杂液: 0.15 M NaCl, 20 mM Na_2HPO_4 , pH 7.0

洗脱液: 0.1 M 甘氨酸, pH 3.0

中和液: 1 M Tris-HCl, pH 8.5

2.2 样品准备

上柱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 μm 或 0.45 μm 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 rProtein A Beads 装填

2.3.1 重力柱的装填

- 1) 取合适规格的重力层析柱, 装入下垫片, 加入适量纯水润洗柱管和垫片, 关闭下出口。
- 2) 将 **rProtein A Beads** 混合均匀, 用枪头吸取适量浆液加入至重力柱中 (介质实际体积占悬液的一半), 打开下出口流干保护液。
- 3) 加入适量纯水冲洗介质, 待柱管中液体重力流干后, 关闭下出口。
- 4) 装入润洗后的上垫片, 确保垫片与填料之前没有空隙, 且保持水平。
- 5) 装填好的重力柱可以直接加入平衡液进行平衡, 暂不使用时则加入保护液, 2-8 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

2.4 样品纯化

2.4.1 孵育法纯化

- 1) 根据纯化的样品量, 取适量 **rProtein A Beads** 加入离心管中, 1000 rpm 离心 1 min, 吸弃上清; 也可加入重力柱中, 流干保护液。
- 2) 向离心管中加入 5 倍介质体积的平衡液清洗介质, 1000 rpm 离心 1 min, 吸弃上清; 如使用重力柱, 则直接在重力柱中清洗, 直接重力流干平衡液; 重复两次以上。
- 3) 加入样品, 封闭离心管或重力柱管, 4 $^{\circ}\text{C}$ 振荡孵育 2-4 h 或者 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min-2 h。
- 4) 孵育结束后, 1000 rpm 离心 1 min, 吸弃上清, 或过滤收集介质, 上清保留作为流穿, 用于电泳鉴定。
- 5) 用 5 倍介质体积的洗杂液清洗介质, 1000 rpm 离心 1 min 或重力柱管过滤, 去除上清 (注意不要吸到介质), 重复 3-5 次, 中间建议更换新离心管。
- 6) 加入 3-5 倍柱体积的洗脱液进行洗脱, 室温孵育 5 min, 1000 rpm 离心 1 min 或重力柱管收集洗脱液, 可重复 2-3 次。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。

2.4.2 重力柱法纯化

- 1) 将装填好的 **rProtein A Beads** 重力柱用 5 倍柱体积平衡液进行平衡, 使填料处于与目的蛋白相同的缓冲液体系下, 重复 2-3 次。
- 2) 将样品加到平衡好的重力柱中, 样品保留时间至少 2 min, 保证样品和介质充分接触, 收集流出液, 可以反复上样增加结合效率。
- 3) 用 10-15 倍柱体积的洗杂液进行洗杂, 去除非特异性吸附的杂蛋白, 收集洗杂液。
- 4) 使用 5-10 倍柱体积的洗脱液洗脱, 分段收集, 每一个柱体积收集一管, 分别检测, 既可以保证所有结合的目的蛋白被洗脱, 又可以得到高纯度和高浓度的蛋白。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: 上述步骤介质洗脱结束后, 先用平衡液冲洗 3 倍柱体积, 然后用纯水冲洗 5 倍柱体积, 再用 20% 乙醇冲洗 2 个柱体积, 然后将介质置于 2-8 $^{\circ}\text{C}$ 保存。





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. 填料清洗

rProtein A Beads 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，这时需要对填料进行清洗。

去除一些沉淀或变性物质

用 2 倍柱体积的 6 M 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4部分进行填料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 μm）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	按照第3部分进行填料CIP清洗

5. 订购信息及相关产品

产品名称	货号	规格
rProtein A Beads	SA012005	5 ml
	SA012025	25 ml
	SA012100	100 ml
	SA012500	500 ml
	SA01201L	1 L
	SA01210L	10 L
AbPur rProtein A Kit	SA012K03	3 次
rProtein A Beads 4FF	SA015005	5 ml
	SA015025	25 ml
	SA015100	100 ml
	SA015500	500 ml
	SA01501L	1 L
	SA01510L	10 L
AbCap A 4FF	SA015C11	1 X 1 ml
	SA015C51	5 X 1 ml
	SA015C15	1 X 5 ml
	SA015C55	5 X 5 ml
	SA015CS	3X1 ml+1X5 ml

