



PabPur SulfoLink Beads

目录

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

1. 产品介绍

PabPur SulfoLink Beads 是一类预活化的琼脂糖微球，可以通过与巯基的反应实现抗原的固定化，进而对免疫血清中的抗体进行纯化。**PabPur SulfoLink Beads** 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。具体性能见表 1。

表 1. PabPur SulfoLink Beads 产品性能

项目	性能
基质	4%琼脂糖微球
配体	碘乙酸衍生物
偶联量	5.0-7.0 mg HC-7 多肽/ml 介质
粒径范围	45-165 μm
最大压力	0.1 MPa, 1 bar
pH 稳定范围	5-10
储存缓冲液	1 M NaCl 溶液
储存温度	2-8 $^{\circ}\text{C}$

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。

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：含 20% 乙醇的 1×PBS

2.2 抗原准备

纯化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。

偶联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，必须对偶联样品进行还原，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、高效的打开二硫键，并且不影响偶联样品与填料的偶联反应，每毫克偶联样品中 TCEP 的添加量不超过 12 mg，需要自己进行优化。如果使用 DTT 等含有巯基的还原剂，处理完偶联样品必须要将还原剂去除，否则会影响偶联样品与填料的偶联效率。

使用偶联液溶解或透析偶联样品，制备成终浓度为 1-3 mg/ml 的样品溶液。建议该溶液现用现配，储存时间过长会影响偶联效果。

2.3 样品偶联

下面以偶联抗体纯化抗原为例，介绍偶联及后续纯化步骤。

1) 取适量的 **PabPur SulfoLink Beads**，加入合适的重力柱中，靠重力流干保护液，用 3 倍柱体积的偶联液平衡填料，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，加入含巯基的抗体（用偶联液溶解），封闭柱子上端，置于 28 $^{\circ}\text{C}$ 震荡孵育 30 min。

注：确保填料充分悬浮起来，否则将大大影响偶联效率。

3) 将上述反应体系取出，流干其中溶液，并收集流出，再用 3 倍柱体积的偶联液清洗填料，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，得出抗体残留量，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，封闭柱子上端，置于 28 $^{\circ}\text{C}$ 震荡孵育 30 min。

5) 将上述反应体系取出，流干其中的封闭液。

6) 用 3 倍柱体积的平衡液清洗填料，然后保存在等体积的保护液中，于 2-8 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

2.4 重力层析柱的装填





- 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) 将偶联好的填料混合均匀，用枪头吸取适量浆液加入至重力柱中，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。

2.5 样品纯化

2.5.1 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

2.5.2 孵育法纯化

- 1) 根据纯化的样品量，取适量偶联好的填料加入层析柱中，重力流干保护液。
- 2) 加入 5 倍介质体积的平衡液清洗介质，重力流干。
- 3) 加入样品，封闭柱管两端，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，离心或过滤收集介质，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，离心或过滤去除上清，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，孵育 10-15 min，离心或过滤收集洗脱液，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。

2.5.3 重力柱法纯化

- 1) 将装填好的重力柱用 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。
 - 2) 将样品加到平衡好的重力柱中，收集流出液，可以反复上样增加结合效率。
 - 3) 用 10 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 倍柱体积的洗脱液洗脱，分管收集。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。
- 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。

2.6 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. 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
	样品或填料中有气泡	轻轻搅拌填料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 6 M 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	填料没有彻底清洗	增加结合/洗杂液体积

4. 订购信息及相关产品

名称	货号	规格
PabPur SulfoLink Beads 4FF	SA069005	5 ml
	SA069025	25 ml
	SA069100	100 ml
	SA069250	250 ml
PabPur SulfoLink Beads	SA018005	5 ml
	SA018025	25 ml
	SA018100	100 ml
	SA018250	250 ml

