



# Protein At Beads 4FF

## 目录

|                   |   |
|-------------------|---|
| 1. 产品介绍.....      | 1 |
| 2. 纯化流程.....      | 2 |
| 3. 残留配体的去除.....   | 3 |
| 4. 填料清洗.....      | 3 |
| 5. 问题及解决方案.....   | 4 |
| 6. 订购信息及相关产品..... | 4 |

## 1. 产品介绍

**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，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。**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一种耐碱蛋白 A(Alkaline tolerate, 故缩写为 At)。该产品以 0.1 M NaOH 进行 200 次在位清洗，介质载量几乎不变，以 0.5 M NaOH 进行 100 次在位清洗，载量仍可达到最初载量的 80%，更加方便客户尤其是工业客户的清洗操作，具体性能见图 1。该产品采用较稳定的定向偶联，脱落量低（小于 10 ng/mg IgG,见图 2）。

**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，其耐压性能见图 3，因此 **Protein At Beads 4FF** 适用于工业化抗体的大规模生产。

表 1. Protein At Beads 4FF 产品性能

| 项目    | 性能                       |
|-------|--------------------------|
| 介质    | 高度交联的 4%琼脂糖              |
| 平均粒径  | ~ 90 μm                  |
| 配体    | 耐碱性 Protein A            |
| 结合载量  | > 40 mg Human 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  | 0.1-0.5 M NaOH           |
| 线性流速  | 50-300 cm/h              |
| 保存    | 含 20% 乙醇的 1XPBS, 2℃ - 8℃ |

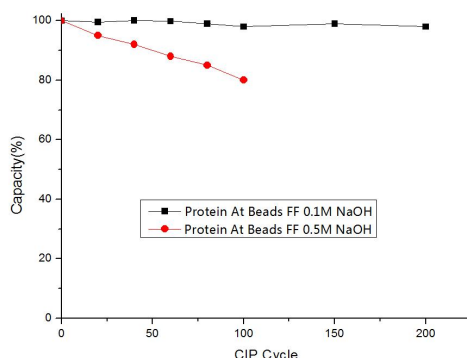


图 1. Protein At Beads 4FF 的 CIP 清洗

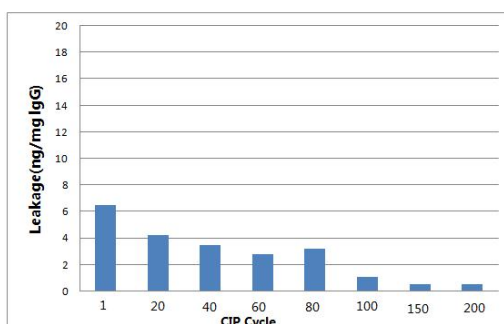


图 2. CIP 清洗后 Protein At 脱落量



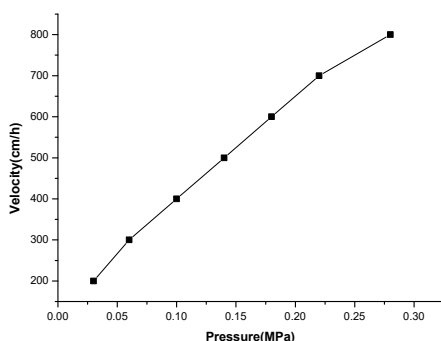


图 3. 介质的压力/流速曲线 (层析柱 BPG300, 柱高 20cm)

## 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<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 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 Protein At Beads 4FF 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 **Protein At Beads 4FF** 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, 4-30℃ 保存。

#### 2.3.2 中压层析柱的装填

**Protein At Beads 4FF** 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填装, 下面介绍填装层析柱的方法。

装柱前根据层析柱直径计算柱子底面积, 根据所需装柱高度计算所需介质体积, 公式如下:

$$V = 1.15\pi r^2 h$$

V: 所需介质体积 ml

1.15: 压缩系数

r: 柱管半径 cm

h: 装填高度 cm

**注意:** 所取悬液体积应为介质体积的两倍, 因为介质体积只占悬液总体积的一半, 另一半为保护液。

- 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 1-2 cm 的去离子水。
- 2) 将介质悬浮起来, 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, 开启泵, 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, 将分配器置于层析柱中。
- 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

### 2.4.1 孵育法纯化

- 1) 根据纯化的样品量, 取适量 **Protein At Beads 4FF** 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℃振荡孵育 2-4 h 或者 37℃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 5min, 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 **Protein At Beads 4FF** 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。

### 2.4.3 中压层析柱法纯化

**Protein At Beads 4FF** 装填好后, 可以用各种常规的中低压色谱系统。

- 1) 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, 打开下出口, 将预装柱接到色谱系统中, 并旋紧。
- 2) 用 3-5 倍柱体积的去离子水冲洗出储存缓冲液。
- 3) 使用至少 5 倍柱床体积的平衡液平衡色谱柱。
- 4) 利用泵或样品环上样。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) 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) 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:** 1. 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℃保存。

2. 首次使用时, 可先按照 4 填料清洗中 CIP 清洗一遍, 避免脱落的配体残留。

## 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. 残留配体的去除

**Protein At Beads 4FF** 配体的脱落很低, 小于 10 ng/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介质、阴离子交换介质和凝胶过滤介质的使用。

## 4. 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, 这时需要对填料进行清洗。

### CIP 清洗

**Protein At Beads 4FF** 是一种耐碱亲和介质, 可以耐受 0.1 M-0.5 M NaOH 溶液的清洗, 成本低, 效果好, 具体操作:

- 3 倍柱体积的平衡液;
- 至少 2 倍柱体的 0.1-0.5 M NaOH, 接触时间为 10-15 minutes;
- 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。





## 5. 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<br>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4部分进行填料CIP清洗                                                    |

## 6. 订购信息及相关产品

| 产品名称                 | 货号       | 规格            |
|----------------------|----------|---------------|
| Protein At Beads 4FF | SA023005 | 5 ml          |
|                      | SA023025 | 25 ml         |
|                      | SA023100 | 100 ml        |
|                      | SA023500 | 500 ml        |
|                      | SA02301L | 1 L           |
|                      | SA02310L | 10 L          |
| MabCap At 4FF        | SA023C11 | 1X1 ml        |
|                      | SA023C51 | 5X1 ml        |
|                      | SA023C15 | 1X5 ml        |
|                      | SA023C55 | 5X5 ml        |
|                      | SA023CS  | 3X1 ml+1X5 ml |

