AbPur rProtein A Kit

目录

1. 产品介绍.....1
2. 纯化流程.....2
3. 在位清洗.....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。

AbPur rProtein A Kit 提供 3 ml **rProtein A Beads** 重力预装柱，抗体纯化所需的缓冲液，方便客户使用，操作简单，纯化效率高。试剂盒组分见表 3。

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 μm
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 1×PBS
储存温度	2 - 8℃

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	++++	++++

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

	IgG2b	+++	+++
	IgG3	++	+++
	IgM	variable	—
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

表 3. AbPur rProtein A Kit 组分

组分名称	货号	规格	数量
AbPur rProtein A Column	SA012GC03	3 ml	1
Ab Binding/Wash Buffer	SLB017100	100 ml	2
Ab Elution Buffer	SLB018100	100 ml	1

2. 纯化流程

2.1 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 Binding/Wash Buffer 对血清样品、腹水或细胞培养液稀释，或者样品用 Binding/Wash Buffer 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。

2.2 样品纯化

AbPur rProtein A Kit 提供 1 根填装 3 ml **rProtein A Beads** 的重力预装柱（AbPur rProtein A Column），2 瓶 100 ml 的 Binding/Wash Buffer 和 1 瓶 100 ml 的 Elution Buffer。不需要再进行填料填装和缓冲液配制。整个纯化流程大约需要 30 min（主要取决于样品体积和溶液的粘稠性），操作快捷。使用时参考下面操作说明。

1）将 AbPur rProtein A Column 固定在铁架台上，依次去掉下端塞和上端塞，流干预装柱的保护液。

2）向柱管中加入 5 ml Binding/Wash Buffer 平衡柱子，流干后，再重复 2 次，共使用 15 ml Binding/Wash Buffer。

3）将处理好的样品加入柱管，收集流出液，用于 SDS-PAGE 分析蛋白质的结合情况，在出现问题时，更方便寻找解决问题的方案。

4）向柱管中加入 5 ml Binding/Wash Buffer，进行洗杂，去除非特异性吸附的杂蛋白，收集洗杂液，目的与收集流出液的目的相同，Binding/Wash Buffer 流干后，再重复 5 次，共使用 30 ml Binding/Wash Buffer。

5）使用 15-30 ml 的 Elution Buffer 进行洗脱目的蛋白，分段收集，每 5 ml 收集一管，分别检测，这样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。

注：洗脱组分 pH 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 1 M Tris-HCl，pH 8.5 进行中和。

6）依次使用 5 ml Binding/Wash Buffer 和 5 ml 去离子水交替平衡填料，重复 2 次，最后再用 5 ml 20%的乙醇平衡填料，重复 1 次，然后保存在等体积的 20%的乙醇中，置于 2-8℃保存，防止填料被细菌污染。

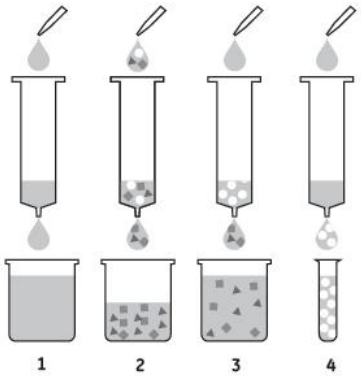

图 1. 使用 AbPur rProtein A Column 纯化蛋白流程

Step 1：柱子平衡；Step 2：上样；Step 3：洗杂；Step 4：洗脱

2.3 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. 在位清洗

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，这时需要对介质进行清洗。

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
柱子流速慢	筛板被堵塞	清洗或更换筛板。
	填料被堵塞	按照第3部分进行介质清洗。
		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部分进行介质清洗。

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