



# MabCap At 4FF

## 目录

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

## 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-融合蛋白的亲亲和层析介质。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一种耐碱蛋白 A(Alkaline tolerate, 故缩写为 At)。**Protein At Beads 4FF** 配体脱落量低 (小于 10 ng/mg IgG)，该产品可以耐受 0.1 M-0.5 M NaOH 的在位清洗，更加方便客户尤其是工业客户的清洗操作。

**MabCap At 4FF** 是一种中压预装柱，有 1 ml 和 5 ml 两种规格的预装柱，分别灌装 1 ml 和 5 ml **Protein At Beads 4FF**，共有 5 种不同包装规格的产品。预装柱具有标准接口，可以适配商品化的各类中压色谱系统，如 AKTA 等，方便客户操作。

表 1. MabCap At 4FF 产品性能

指标	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 Rabbit 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°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。

**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 样品纯化

**MabCap At 4FF** 是一种分离和纯化单克隆抗体、多克隆抗体或 Fc-融合蛋白的预装柱，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。再折断下口，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存储缓冲液。
- 3) 使用至少 5 倍柱床体积的平衡液平衡色谱柱。1 ml 预装柱推荐流速为 1 ml/min，5 ml 预装柱推荐流速为 3 ml/min。
- 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) 用 5 倍柱体积洗脱液洗脱，收集样品，中和液中和至中性保存。



注：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。

7) 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 20%的乙醇中，置于 2-8℃，防止填料被细菌污染。

### 2.4 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，可进行低流速反向冲洗。

### 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 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0.45μm）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