Protein SupAt Beads

目录

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

1. 产品介绍

Protein SupAt Beads 是新一代 Protein A 亲和纯化介质，可以用于分离和纯化单克隆抗体、多克隆抗体或 Fc-融合蛋白，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 SupAt Beads** 的配体经特殊设计增强了对碱和蛋白酶的稳定性，可以使用 0.1-0.5 M NaOH 进行 CIP 清洗。**Protein SupAt Beads** 在延长保留时间后，具有很高的动态结合载量，专门为高滴度抗体纯化设计开发。耐碱性、高载量、低配体脱落以及高度交联的琼脂糖凝胶刚性基质，使得该填料特别适合工业化抗体或临床应用抗体的大规模纯化。

表 1. Protein SupAt Beads 产品性能

项目	性能
介质	高度交联的琼脂糖微球
平均粒径	~ 60 μm
配体	超耐碱 Protein A
结合载量*	> 80 mg Rabbit IgG/ml 介质
化学稳定性	可耐受抗体纯化过程中的常用试剂
工作 pH	3-10
在线清洗	0.1-0.5 M NaOH
推荐线性流速	100-500 cm/h
保存	含 20% 乙醇的 1XPBS， 2 - 8℃

*注：目标抗体的动态结合载量，需要使用实际样品进行前端分析来确定。动态结合载量是一个样品保留时间的函数，因此需要在样品的不同保留时间范围内来定义。

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，pH7.0

洗脱液：0.1 M 甘氨酸，pH 3.0-3.6

中和液：1 M Tris-HCl，pH 8.5

2.2 样品准备

上柱之前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 0.22μm 或 0.45μm 滤膜过滤，减少杂质，提高蛋白纯化效率和防止堵塞柱子。

2.3Protein SupAt Beads 装填

Protein SupAt Beads 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。

层析柱的装填（使用储液器装填）

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) 将树脂悬浮起来，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

Protein SupAt Beads 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，保证样品保留时间大于 6 分钟。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）线性洗脱：0-100% 洗脱液洗脱 10 个柱体，收集洗脱液，即目的蛋白组分。建议首次纯化使用线性洗脱，从而选择最佳的洗脱 pH，有利于保护易失活抗体的活性。

等度洗脱：首次测试后，后续放大纯化，可使用 5-10 倍柱体积的选定 pH 洗脱液洗脱，该方法有利抗体在一个比较集中的浓度洗脱，从而减少洗脱液使用和循环纯化时间。

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：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）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。

2.5 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. 残留配体去除

Protein SupAt Beads 配体的脱落很低。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树脂、阴离子交换树脂和凝胶过滤树脂的使用。

4. 填料清洗

Protein SupAt 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，压力升高，或者在后续纯化中脱落，严重影响柱子的性能，这时需要对树脂进行清洗，以保证填料的载量、流速和一般性能

CIP 清洗

Protein SupAt Beads 是一种耐碱亲和介质，可以耐受 0.1-0.5 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 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部分进行树脂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部分进行树脂CIP清洗

6. 订购信息及相关产品

名称	货号	规格
Protein SupAt Beads	SA095005	5 ml
	SA095025	25 ml
	SA095100	100 ml
	SA095500	500 ml
	SA09501L	1 L