



HiSelect A/G 4FF

目录

1. 产品介绍.....	1
2. 纯化流程.....	2
3. 填料清洗.....	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/G Beads 4FF 是将 rProtein A/G 高密度定向偶联到琼脂糖凝胶微球表面，该产品具有更高的抗体结合能力和较低的蛋白非特异吸附率，洗脱条件更均一，一步纯化即可从血清样品中分离出纯度大于 90% 的抗体。产品性能见表 1。

本产品主要用于免疫沉淀(IP)以及免疫共沉淀(Co-IP)研究，也可用于抗体固定及其它相关研究。用户可根据目标抗体的种属来源及亚型选择微球的类别，Protein A, Protein G 和 Protein A/G 与不同抗体的亲和性比较参见表 2。

HiSelect A/G 4FF 是一种中压预装柱，填充 4.7 ml 的 **rProtein A/G Beads 4FF** 介质。柱管由生物相容性聚丙烯制成，不与生物分子相互作用。柱管两头都有堵头，防止保护液的泄露。柱体标签上的箭头表示推荐的流向。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 ÄKTA 等，方便客户操作。

表 1. HiSelect A/G 4FF 产品性能

项目	性能
规格	4.7 ml
基质	高度交联的 4% 琼脂糖微球
配体	重组蛋白 A/G
载量	10-15 mg Rabbit IgG/ml 介质
粒径范围	45-165 μm
最大压力	0.3 MPa, 3 bar
pH 稳定范围	3-10
柱尺寸 (内径×高度)	0.77×10 cm
储存缓冲液	含 20% 乙醇的 1×PBS
储存温度	2-8°C

表 2. Protein A、Protein G 和 Protein A/G 对不同抗体的结合能力

种属	亚型	Protein A	Protein G	Protein A/G
Human	IgA	variable	—	++
	IgD	—	—	—
	IgE	—	—	—
	IgG1	++++	++++	++++
	IgG2	++++	++++	++++
	IgG3	—	++++	++++
	IgG4	++++	++++	++++
	IgM	variable	—	++
Avian egg yolk	IgY	—	—	—
Cow		++	++++	++++
Dog		++++	++	++++
Goat		—	++++	++++
Guinea pig	IgG1	++++	++	++++
	IgG2	++++	++	++++



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

Hamster		+	++	
Horse	Total IgG	++	++++	++++
Koala		—	+	
Llama		—	+	
Monkey(rhesus)		++++	++++	++++
Mouse	IgG1	+	++++	++
	IgG2a	++++	++++	++++
	IgG2b	+++	+++	+++
	IgG3	++	+++	+++
	IgM	variable	—	—
Pig		+++	+++	++++
Rabbit	Total IgG	++++	+++	++++
Rat	IgG1	—	+	++
	IgG2a	—	++++	++++
	IgG2b	—	++	++
	IgG3	+	++	++
Sheep	Total IgG	+/-	++	++

++++=结合能力强; ++=结合能力中等; —=结合能力弱或没有结合

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 Na₂HPO₄, 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

HiSelect A/G 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。再打开下口, 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 倍柱床体积的结合液平衡色谱柱。
- 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) 用 3-5 倍柱体积洗脱液洗脱, 收集目的样品, 中和液中和至中性保存。

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 倍柱体积的含 20%乙醇的 1×PBS 平衡, 然后将预装柱置于 2-8℃ 保存, 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. 填料清洗

HiSelect A/G 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。

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
柱子反压过高	填料被堵塞	按照第3部分进行填料清洗
		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 buffer 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部分进行填料CIP清洗

5. 订购信息及相关产品

产品名称	货号	规格
HiSelect A/G 4FF	SA032C47	1×4.7 ml
HiPur A/G 4FF	SA032C20	1×20 ml