



# HiPur 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。

**HiPur A/G 4FF** 是一种中压预装柱，填充 20 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AKTA 等，方便客户操作。

表 1. HiPur A/G 4FF 产品性能

项目	性能
规格	20 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)	1.6×10 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 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

**HiPur 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

HiPur 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
HiPur A/G 4FF	SA032C20	1×20 ml
HiSelect A/G 4FF	SA032C47	1×4.7 ml