



# Protein At Beads 4FF 重力柱

## 目录

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

## 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。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)。该产品以 0.1M NaOH 进行 200 次在位清洗，介质载量几乎不变，以 0.5M NaOH 进行 100 次在位清洗，载量仍可达到最初载量的 80%，更加方便客户尤其是工业客户的清洗操作，具体性能见图 1。该产品采用较稳定的定向偶联，脱落量低（小于 10ng/mg IgG，见图 2）。

Protein At Beads 4FF 是以高度交联的 4%琼脂糖凝胶为基质，可以在相对较高的流速下进行单克隆抗体和多克隆抗体的纯化，其耐压性能见图 3，因此 Protein At Beads 4FF 适用于工业化抗体的大规模生产。

**Protein At Beads 4FF 重力柱**以 Protein At Beads 4FF 为装填材料，提供 1ml 和 5ml 两种规格产品，方便客户使用，操作简单，纯化效率高。

表 1. Protein At Beads 4FF 产品性能

项目	性能
基质	高度交联的 4%琼脂糖微球
平均粒径	~90 μm
配体	耐碱性蛋白 A
载量	>40 mg Rabbit IgG/ml 基质
工作稳定 pH	3-12
CIP	0.1-0.5 M NaOH
线性流速	50-300 cm/h
储存缓冲液	含 20%乙醇的 1×PBS
储存温度	2-8℃

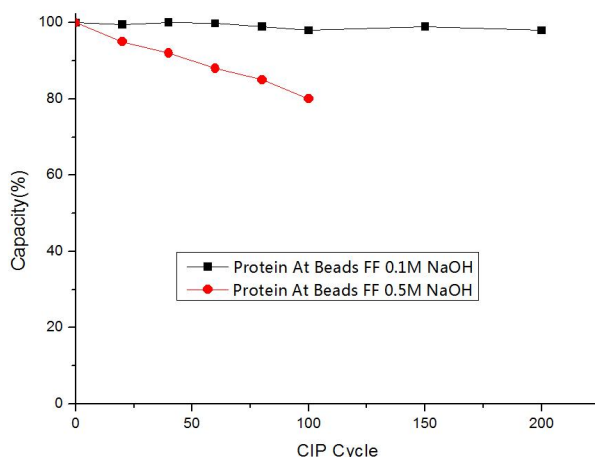


图 1. Protein At Beads 4FF 的 CIP 清洗

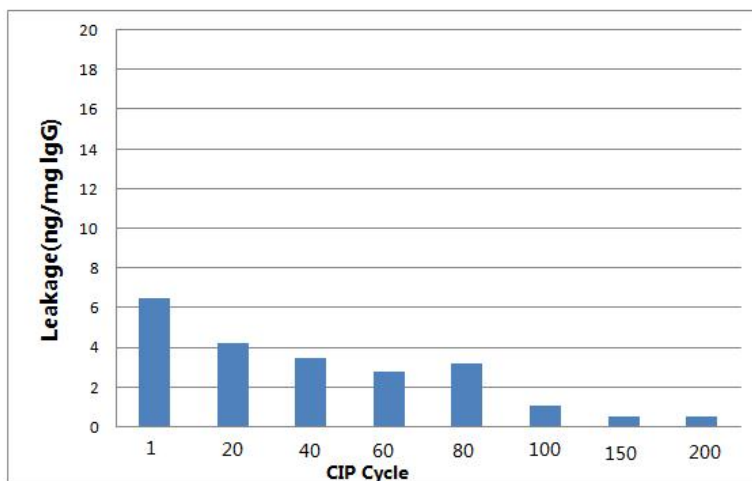


图 2. CIP 清洗后 Protein At 脱落量

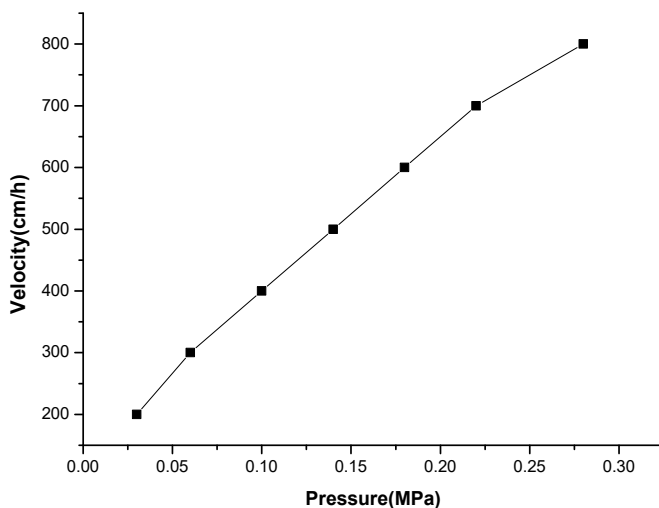


图 3. 介质的压力/流速曲线 (层析柱 BPG300, 柱高 20cm)

## 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  $\mu\text{m}$  或 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜过滤。

**平衡/洗杂液:** 0.15 M NaCl, 20 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH7.0

**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

上柱之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 $\mu\text{m}$  或 0.45 $\mu\text{m}$  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

**Protein At Beads 4FF 重力柱**使用请参考以下说明, 各溶液用量均按照柱体积计算 (例如: 2 个柱体积, 1 ml 规格对应为 2 ml 溶液, 5 ml 规格对应为 10 ml 溶液)。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。使用流程请参考图 4。

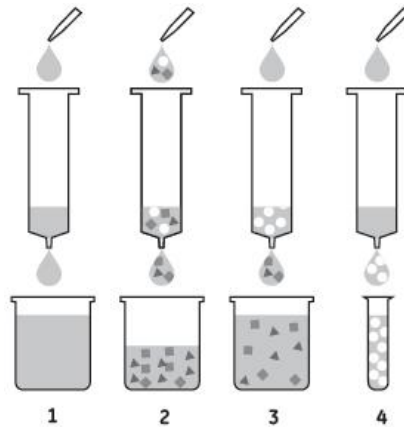


图 4. 使用 Protein At Beads 4FF 重力柱纯化蛋白流程示意图

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

- 1) 将 Protein At Beads 4FF 重力柱固定在铁架台上，依次去掉下端塞和上端塞，流干重力柱的保护液。
- 2) 向柱管中加入 5 个柱体积的平衡液，进行平衡，使填料处于与目的蛋白相同的缓冲体系下，起到保护蛋白的作用。
- 3) 将样品加到平衡好的重力柱中，样品保留时间至少 2min，保证目的蛋白与介质充分接触，提高目的蛋白的回收率。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) 用 10-15 倍柱体积的洗杂液进行清洗，去除非特异性吸附的杂蛋白，收集洗杂液。
- 5) 使用 5-10 倍柱体积的洗脱液进行目的蛋白的洗脱，分段收集，每一个柱体积收集一管，分别检测，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。

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。

- 6) 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。将重力柱保存在等体积的 20%乙醇中，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. 残留配体去除

Protein At Beads 4FF 配体的脱落很低，小于 10ng/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树脂、阴离子交换树脂和凝胶过滤树脂的使用。

## 4. 在位清洗

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，这时需要对树脂进行清洗。

### CIP 清洗

Protein At Beads 4FF 是一种耐碱亲和介质，可以耐受 0.1-0.5 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 min；
- 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
流速变慢	筛板被堵塞	清洗或更换筛板。
	填料被堵塞	按照第 4 部分对填料进行在位清洗。 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。



(续表)

问题	原因分析	推荐解决方案
洗脱组分中没有目的蛋白	样品中抗体浓度太低	减少介质用量，或者使用抗体对应抗原做配体的介质
	抗体降解，或抗体沉淀在介质上	适当调整平衡/洗杂液 pH，使之与样品一致，适当提高洗脱的 pH，在洗脱液中添加终浓度 10% 的甘油。
回收率偏低	上样量太多，抗体流穿	减少上样量。
	介质上杂质太多，载量降低	按照第 4 部分对填料进行在位清洗。

## 6. 订购信息及相关产品

名称	货号	规格
Protein At Beads 4FF 重力柱	SA023GC01	1 ml
	SA023GC05	5 ml