



rProtein L Beads 4FF

目录

| | |
|-------------------|---|
| 1. 产品介绍..... | 1 |
| 2. 纯化流程..... | 1 |
| 3. 填料清洗..... | 2 |
| 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 L Beads 4FF 是用于分离和纯化单克隆抗体的通用性亲和层析介质，具体性能见表 1。Protein L 经过基因重组，由大肠杆菌表达，保留了与抗体κ链结合的特性，同时不会影响抗体的抗原结合位点。Protein L 与人、小鼠的 kappa 轻链有较好的结合力，也可能与其他物种的某些 kappa 亚型有特异性结合。Protein L 与兔免疫球蛋白结合力很弱，不结合牛、山羊或绵羊来源的免疫球蛋白。

rProtein L 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。

表 1. rProtein L Beads 4FF 产品性能

| 指标 | 性能 |
|---------|--------------------|
| 基质 | 高度交联的 4%琼脂糖微球 |
| 配体 | 重组蛋白 L |
| 载量 | >15 mg 人 IgG/ml 介质 |
| 粒径 (μm) | 45-165 |
| 最大压力 | 0.3 MPa, 3 bar |
| pH 稳定范围 | 3-10 |
| 储存缓冲液 | 含 20% 乙醇的 1XPBS |
| 储存温度 | 2℃ - 8℃ |

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, pH8.5

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 rProtein L Beads 4FF 装填

2.3.1 重力柱的装填

- 1) 取合适规格的重力层析柱，装入下垫片，加入适量纯水润洗柱管和垫片，关闭下出口。
- 2) 将 rProtein L Beads 4FF 混合均匀，用枪头吸取适量浆液加入至重力柱中（介质实际体积占悬液的一半），打开下出口流干保护液。
- 3) 加入适量纯水冲洗介质，待柱管中液体重力流干后，关闭下出口。
- 4) 装入润洗后的上垫片，确保垫片与填料之前没有空隙，且保持水平。
- 5) 装填好的重力柱可以直接加入平衡液进行平衡，暂不使用时则加入保护液，4-30℃保存。

2.3.2 中压层析柱的装填

rProtein L Beads 4FF 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装填，下面介绍装填层析柱的方法。

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) 将填料悬浮起来，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，也可以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

2.4.1 孵育法纯化

- 1) 根据纯化的样品量，取适量 **rProtein L Beads 4FF** 加入离心管中，1000 rpm 离心 1 min，吸弃上清；也可加入重力柱中，流干保护液。
- 2) 向离心管中加入 5 倍介质体积的平衡液清洗介质，1000 rpm 离心 1 min，吸弃上清；如使用重力柱，则直接在重力柱中清洗，直接重力流干平衡液；重复两次以上。
- 3) 加入样品，封闭离心管或重力柱管，4℃振荡孵育 2-4 h 或者 37℃孵育 30 min-2 h。
- 4) 孵育结束后，1000 rpm 离心 1 min，吸弃上清，或过滤收集介质，上清保留作为流穿，用于电泳鉴定。
- 5) 用 5 倍介质体积的洗杂液清洗介质，1000 rpm 离心 1 min 或重力柱管过滤，去除上清（注意不要吸到介质），重复 3-5 次，中间建议更换新离心管。
- 6) 加入 3-5 倍柱体积的洗脱液进行洗脱，室温孵育 5 min，1000 rpm 离心 1 min 或重力柱管收集洗脱液，可重复 2-3 次。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。

2.4.2 重力柱法纯化

- 1) 将装填好的 **rProtein L Beads 4FF** 重力柱用 5 倍柱体积平衡液进行平衡，使填料处于与目的蛋白相同的缓冲液体系下，重复 2-3 次。
- 2) 将样品加到平衡好的重力柱中，样品保留时间至少 2 min，保证样品和介质充分接触，收集流出液，可以反复上样增加结合效率。
- 3) 用 10-15 倍柱体积的洗杂液进行洗杂，去除非特异性吸附的杂蛋白，收集洗杂液。
- 4) 使用 5-10 倍柱体积的洗脱液洗脱，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。

2.4.3 中压层析柱法纯化

rProtein L Beads 4FF 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。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) 使用 5-10 倍柱体积的洗脱液洗脱，收集洗脱液，即目的蛋白组分。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：上述步骤介质洗脱结束后，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. 填料清洗

rProtein L 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。



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 | 筛板被堵塞 | 清洗或更换筛板 |
| | 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0.45 μm)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 |
|----------------------|----------|---------------|
| rProtein L Beads | SA045005 | 5 ml |
| | SA045025 | 25 ml |
| | SA045100 | 100 ml |
| | SA045500 | 500 ml |
| | SA04501L | 1 L |
| | SA04510L | 10 L |
| rProtein L Beads 4FF | SA033005 | 5 ml |
| | SA033025 | 25 ml |
| | SA033100 | 100 ml |
| | SA033500 | 500 ml |
| | SA03301L | 1 L |
| | SA03310L | 10 L |
| AbCap L 4FF | SA033C11 | 1 X 1 ml |
| | SA033C51 | 5 X 1 ml |
| | SA033C15 | 1 X 5 ml |
| | SA033C55 | 5 X 5 ml |
| | SA033CS | 3X1 ml+1X5 ml |