

rProtein A-ME Beads 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.....	4

1. 产品介绍

rProtein A-ME Beads 4FF 主要用于单克隆抗体、多克隆抗体或 Fc-融合蛋白的纯化。常规蛋白 A 填料结合抗体后需要低 pH 洗脱 (pH3.0, 甚至更低), 容易造成抗体聚集或变性。rProtein A-ME 是在野生型蛋白 A 基础上进行重组改造, 抗体可以在相对高 pH 条件下洗脱 (pH5.0), 保证了抗体活性。

表 1. rProtein A-ME Beads 4FF 产品性能

项目	性能
基质	高度交联的 4%琼脂糖微球
配体	重组蛋白 A
载量	>15 mg 人 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
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: 25 mM NaH₂PO₄, 0.1 M NaCl, pH 8.2

洗脱液: 25 mM NaH₂PO₄, 0.5 M NaCl, pH 5.0

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 A-ME 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 A-ME 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, 2-8℃保存。

2.3.2 中压层析柱的装填

rProtein A-ME 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 A-ME 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 A-ME 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 A-ME 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 A-ME 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4部分进行填料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0.45 μm) 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 A-ME Beads 4FF	SA073005	5 ml
	SA073025	25 ml
	SA073100	100 ml
	SA073500	500 ml
	SA07301L	1 L

