

rProtein A 4FF Chromatography Column, 1 mL

蛋白 A 纯化预装柱, 1 mL

产品信息

产品名称	产品编号	规格
rProtein A 4FF Chromatography Column, 1 mL 蛋白 A 纯化预装柱, 1 mL	36409ES03	1 mL
	36409ES08	5×1 mL

产品描述

天然蛋白 A (Protein A) 是一种发现于金黄色葡萄球菌的细胞壁表面蛋白, 与分离自 G 型或 C 型链球菌属的蛋白 G 类似, 主要通过与免疫球蛋白 (Ig) 的 Fc 区相互作用, 结合大多数哺乳动物的 IgG, 可用于多种抗体 (单抗和多抗) 的分离纯化。在与不用的免疫球蛋白亚类的结合特性上, Protein A 和 Protein G 结合性能不太一样 (详见附录 1)。

本品使用的是基因改造后的蛋白 A, 不仅维持其本身的 Ig 亲和特性, 同时也去除了天然蛋白本身的非主要结合域以降低非特异性结合, rProtein A Agarose Resin 4FF 以高度交联的琼脂糖凝胶为基质, 重组 Protein A 为配基, 具有很高的物理化学稳定性, 可以在相对较高的流速下进行抗体的纯化, 适用于工业客户。利用本品经过一步亲和和层析, 即可从腹水、血清和培养液等样品中得到高纯度的抗体, 使用方便, 应用广泛。

本品 rProtein A 4FF Chromatography Column, 1 mL 是一种装填了 rProtein A Agarose Resin 4FF 的中压预装柱, 规格 1 mL, 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。

产品性质

基质 (Matrix)	高度交联的 4% 琼脂糖微球
配体 (Ligand)	重组蛋白 A
孔径 (Bead size)	45-165 μm
最大流速 (Flow _{max})	0.3 MPa, 3 bar
储存缓冲液 (Buffer)	含 20% 乙醇的 1×PBS
载量 (Capacity)	>40 mg Rabbit IgG/mL 基质
pH 范围 (pH range)	3-12

运输与保存方法

冰袋运输。2~8°C 保存, 有效期 2 年。

需准备试剂

【注】建议以下缓冲液在使用前用 0.22 μm 或 0.45 μm 滤膜过滤。

结合/洗杂缓冲液: 0.15 M NaCl, 20 mM Na₂HPO₄, pH 7.0

洗脱缓冲液: 0.1 M 甘氨酸, pH 3.0

中和液: 1 M Tris-HCl, pH 8.5

使用方法

【注】上柱之前要确保样品溶液有合适的离子强度和 pH 值，可以用结合/洗涤缓冲液对血清样品、腹水或细胞培养液稀释，或者样品用结合/洗涤缓冲液透析。

1 样品纯化（以 Akta 系统为例）

- 1) **准备:** 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。再折断下口，将预装柱接到色谱系统中，并旋紧。
- 2) **清洗:** 3-5 倍柱体积去离子水冲洗层析柱中储存液。
- 3) **平衡:** 用 5 倍柱体积的结合 Buffer 平衡层析柱，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。
- 4) **上样:** 将样品加到平衡好的层析柱中，推荐流速 1 mL/min，保证目的蛋白与树脂充分接触，提高目的蛋白的回收率，收集流出液，待检测。

【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) **洗杂:** 用 10-15 倍柱体积的洗杂 Buffer 进行清洗，直到紫外吸收达到一个稳定的基线，去除非特异性吸附的杂蛋白，收集洗杂液。
- 6) **洗脱:** 用洗脱 Buffer 采用一步法或线性梯度洗脱。一步洗脱中，通常 5 倍柱体积洗脱液足够将目的蛋白洗脱下来。也可以用一个小梯度，例如 20 倍柱体积或更多，来分离不同结合强度的蛋白质。
- 7) **清洗及保存:** 依次使用 3 倍柱体积的结合 Buffer 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 20% 的乙醇平衡，然后保存在等体积的 20% 的乙醇中，置于 4 度保存，防止填料被细菌污染。

2 SDS-PAGE 检测

将纯化过程中得到的样品（包括原始样品、流出组分、洗杂及洗脱组分等）利用 SDS-PAGE 进行检测，判定其纯化效果。

3 树脂清洗

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下降，影响柱子的性能，这时需对柱子进行清洗：

1) 去除沉淀或变性物质

- ① 用 2 倍柱体积的 6 M 盐酸胍溶液进行清洗；
- ② 用 5 倍柱体积的 PBS, pH 7.4 清洗。

2) 去除由于疏水性吸附造成的非特异吸附物质

- ① 用 3-4 倍柱体积的 70%乙醇或 2 倍柱体积的 1% Triton™ X-100 清洗；
- ② 用 5 倍柱体积的 PBS, pH 7.4 清洗。

注意事项

- 1) 请勿冷冻保存本产品。
- 2) 所有操作过程中，样本需要在 4°C 或冰上操作。
- 3) 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
- 4) 本产品仅作科研用途！

附录 1. 蛋白 A, G 对不同物种 Ig 的结合能力总表

免疫球蛋白亚型	Protein A	Protein G	免疫球蛋白亚型	Protein A	Protein G
Human IgG	++++	++++	Mouse IgG	++++	++++
Human IgG1	++++	++++	Mouse IgG1	+	++++
Human IgG2	++++	++++	Mouse IgG2a	++++	++++
Human IgG3	+	++++	Mouse IgG2b	+++	+++
Human IgG4	++++	++++	Mouse IgG3	++	+++
Human IgM	Use anti-Human IgM		Mouse IgM	Use anti-Mouse IgM	
Human IgE	NR	NR	Chicken IgG (IgY)	NR	NR
Human IgA	+	NR	Cow IgG	++	++++
Human IgA1	+	NR	Goat IgG	+	++++
Human IgA2	+	NR	Goat IgG1	+	++++
Human IgD	Use anti-Human IgD		Goat IgG2	++++	++++
Rat IgG	+	++	Goat IgM	NR	NR
Rat IgG1	NR	+	Guinea Pig IgG	++++	++
Rat IgG2a	NR	++++	Guinea Pig IgG1	++++	++
Rat IgG2b	NR	+	Guinea Pig IgG2	++++	++
Rat IgG3	+	++	Hamster IgG	+	++
Sheep IgG	+	++	Horse IgG	+	++++
Sheep IgG1	+	++	Rabbit IgG	++++	+++
Sheep IgG2	+	++	Rabbit IgM	NR	NR
Sheep IgM	NR	NR	Rabbit All isotypes	+++	++
Pig IgG	+++	+++	Monkey IgG	++++	++++
Cat IgG	++++	+	Donkey IgG	++	++++
Dog IgG	++++	+			

(+)= weak binding; (++)= moderate binding; (++++)= strong binding; NR= not recommended; (-)= not tested;

附录 2 常见问题与解答

问题	可能原因	推荐解决方法
柱子反压过高	填料被堵塞	清洗填料
		裂解液中含有微笑的固体颗粒, 建议上柱前使用 0.22 μm/0.45 μm 滤膜过滤。
样品纯化过程中曲线不稳	样品或 buffer 中有气泡	赶出气泡
		样品和 buffer 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
	样品与 Protein A 结合力低	换用 Protein G 或 Protein A/G 树脂纯化
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	清洗树脂