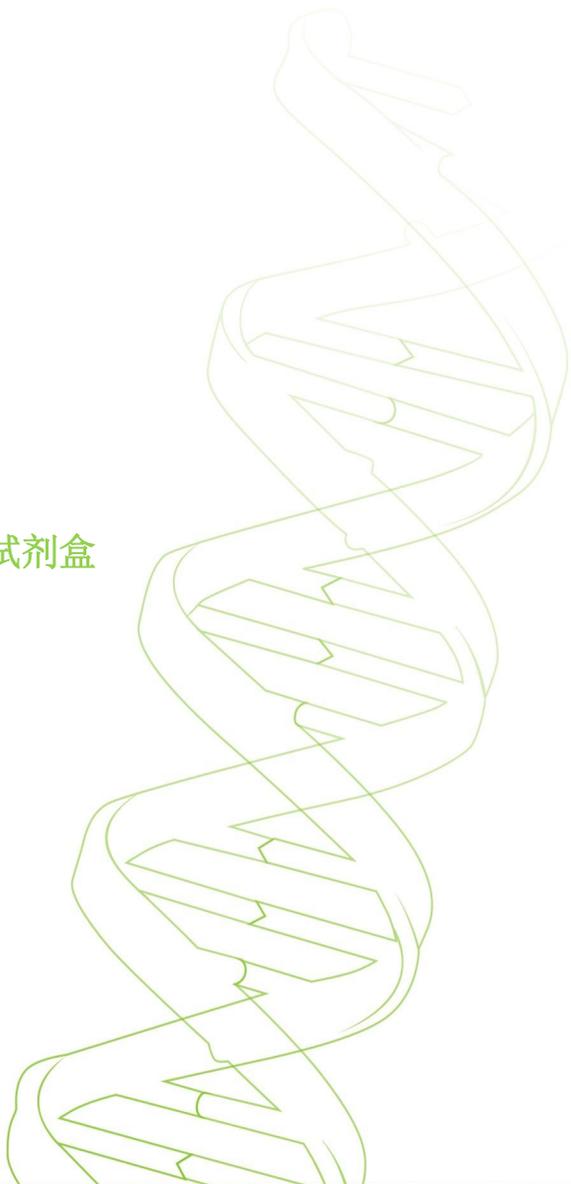


Imagene[®]

Protein A 4FF 蛋白纯化试剂盒



CODONX
RESEARCH & ANSWER MORE

FOR RESEARCH USE ONLY
NOT INTENDED FOR DIAGNOSTIC PURPOSES

Protein A 4FF 蛋白纯化试剂盒

目录号: IM-001K01

目录编号	包装单位
IM-001K01-5/30	5×1ml/30×1ml

1/产品介绍

Protein A 4FF蛋白纯化试剂盒, 用于纯化和分离IgG。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片段与哺乳动物的IgG 结合, 用于分离和纯化单克隆抗体或者多克隆抗体。Protein A 4FF蛋白纯化试剂盒包含重力预装柱, 抗体纯化所需的缓冲液, 使实验操作简单, 纯化效率更高。

2/试剂盒组成、储存、稳定性

试剂盒组成	储存	IM-001K01-5	IM-001K01-30
Protein A 4FF 预装重力柱	2-8°C	1ml×5	1ml×30
Protein A Elution Buffer	2-8°C	500ml	500ml×6
Protein A Binding/Wash Buffer	2-8°C	500ml×2	500ml×12
Protein A Neutralizing Buffer	2-8°C	50ml	500ml

本试剂盒在 2-8°C 储存, 不可冷冻。

3/特征参数

配体	在大肠杆菌中产生的重组葡萄球菌 Protein A
IgG 结合位点数量	5 个
分子量 MW	约 34 kDa

等电点 pI	5.1
含量	约 5~8 mg Protein A/mL
耐压	0.3MPa, 3 bar
载量	>40 mg 人 IgG/mL 介质
pH 稳定范围	3~10
基质	琼脂糖微球, 4%交联
平均粒径	90 μ m (45~165 μ m)
保存 Buffer	1X PBS (含 20%乙醇)

4/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 Binding/Wash Buffer 对血清样品、腹水或细胞培养液稀释，或者样品用 Binding/Wash Buffer 透析。样品在上样前建议离心或用 0.22 μ m 或 0.45 μ m 滤膜过滤，减少杂质，提高蛋白纯化效率和防止堵塞柱子。

5/Protein A 4FF 装填

重力柱装填：

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 Protein A 4FF 混合均匀，用枪头吸取适量浆液加入至重力柱中（填料实际体积占悬液的一半），打开下出口流干保护液。
3. 加入适量纯水冲洗填料，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（Binding/Wash Buffer）进行平衡，暂不使用时则加入保护液（20%乙醇的 1X PBS），2-8 $^{\circ}$ C 保存。

中压层析柱的装填：

Protein A 4FF 被广泛应用于工业纯化，下面介绍使用 Protein A 4FF 填装层析柱的方法。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填料体积，公式如下：

$V = 1.15\pi r^2 h$ (V: 所需填料体积 mL, 1.15: 填料压缩系数, r: 柱管半径 cm, h: 装

填高度 cm)

注意：所取悬液体积应为填料体积的两倍，因为填料体只占悬液总体积的一半，另一半为保护液。层析柱的装填（使用储液器装填）

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. 将树脂悬浮起来，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。

6/样品纯化

孵育法纯化：

1. 根据纯化的样品量，取适量 Protein A 4FF 填料加入离心管中，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 倍填料体积的 Binding/Wash Buffer 清洗填料进行平衡，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 Binding/Wash Buffer；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填料, 上清保留作为流穿, 用于电泳鉴定。
5. 用 5 倍填料体积的 Binding/Wash Buffer 清洗填料进行洗杂, 1000 rpm 离心 1 min 或重力柱管过滤, 去除上清 (注意不要吸到填料), 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 Elution Buffer 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。洗脱组分需要立即用中和液 (Neutralizing Buffer) 调成中性, 一般建议使用洗脱组分的体积 1/10 的中和液进行中和。

重力柱法纯化:

1. 将装填好的 Protein A 4FF 重力柱用 5 倍柱体积 Binding/Wash Buffer 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, 保证样品和填料充分接触, 收集流穿液, 可以反复上样增加结合效率。
3. 用 10~15 倍柱体积的 Binding/Wash Buffer 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 Elution Buffer 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。洗脱组分需要立即用中和液 (Neutralizing Buffer) 调成中性, 一般建议使用洗脱组分的体积 1/10 的中和液进行中和。

7/纯化后的填料处理方法

上述步骤填料洗脱结束后, 先用 Binding/Wash Buffer 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, 然后将填料置于保护液 (20%乙醇的 1X PBS) 于 2-8°C 保存, 不可冻存。

填料清洗:

Protein A 4FF 纯化产品可以重复使用而无需再生, 但随着非特异性结合的蛋白的增多和蛋白的聚集, 往往造成流速和结合载量都下降, 这时可按照下面方法对树脂进行清洗。

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 1X 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，然后然后立即用 5 倍柱体积的 1X PBS，pH7.4 清洗。

8/常见问题及解决方案

问题	原因分析	推荐解决方案
样品流速过低（即 <0.5mL /分钟）	缓冲液或样品中有气泡，阻塞凝胶孔	对缓冲液或样品脱气，去除柱子中气泡
没有检测到特定蛋白	浓度过低	使用无血清培养基作为细胞上清液样品
		使用偶联到亲和载体上的特定抗原来纯化抗体
特定蛋白被降解	对低 pH 洗脱缓冲液敏感	提高洗脱缓冲液 pH
	对中和的洗脱缓冲液敏感	脱盐或透析，将样品洗脱到合适的缓冲液中
任何洗脱组分中均未检测到蛋白	样品没有能够与 Protein A 结合的蛋白种类或亚类	请参阅 Protein A 的结合特征表

Protein A、Protein G、Protein A/G 和 Protein L 对不同抗体的结合能力表

种属	亚型	Protein A	Protein G	Protein A/G	Protein L
	lgG(常规)	+++++	++++	++++	++++
	lgG1	+++++	++++	++++	++++
	lgG2	+++++	++++	++++	++++
	lgG3	—	++++	++++	++++
	lgG4	++++	++++	++++	++++

Human	IgM	—	—	++	++++
	IgA	—	—	++	++++
	IgE	—	—	—	++++
	IgD	—	—	—	++++
	Fab	++	++	—	++++
	K light chain	—	—	—	++++
	L light chain	—	—	—	—
	ScFv	++	—	—	++++
Avian egg yolk	IgY	—	—	—	—
Chicken	IgG	—	+	—	++
Cow	IgG	++	++++	++++	—
Dog	IgG	++++	++++	++++	+
Goat	IgG	+/-	++	++++	—
Guinea pig	IgG1	+++	++	++++	++
	IgG2	+++	++	++++	++
Hamster	IgG	+	++		+++
Horse	IgG	+	++	++++	++++
Koala	IgG	—	+		+
Camel		—	+	—	+
Monkey(rhesus)	IgG	++++	++++	++++	++++
Mouse	IgG1	+	++++	++	++++
	IgG2a	++++	++++	++++	++++
	IgG2b	+++	+++	+++	++++
	IgG3	++	+++	+++	++++
	IgM	variable	—	—	++++

Pig	IgG	++	++++	++++	+/-
Rabbit	IgG	++++	+++	++++	+
Rat	IgG1	—	+	++	++++

++++结合能力强 ++结合能力中等 —结合能力弱或没有结合能力

