

# rProtein A Beads 重力柱

## 目录

1. 产品介绍.....	1
2. 纯化流程.....	2
3. 在位清洗.....	3
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 A Beads 是用于分离和纯化单克隆抗体、多克隆抗体或 Fc-融合标签的通用性亲和层析介质，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，但是不与狗 IgG 结合，不结合人 IgM、IgD 和 IgA。蛋白 A 与蛋白 G 与不同来源及亚类的免疫球蛋白结合能力不一样，具体见表 2。天然 Protein A 有五个 IgG 结合区域和一些未知功能的区域，重组 protein A 去除了与白蛋白及细胞表面结合位点，只含有五个 IgG 结合区域，减少了非特异性吸附。

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

表 1. rProtein A Beads 产品性能

项目	性能
基质	4%琼脂糖微球
粒径	45-165 μm
配体	重组蛋白 A
载量	>40 mg Rabbit IgG/ml 基质
工作稳定 pH	3-10
最大压力	0.1 MPa, 1 bar
储存缓冲液	含 20%乙醇的 1×PBS
储存温度	2-8°C

表 2. Protein A 和 Protein G 对不同抗体的结合能力

种属	亚型	Protein A 结合力	Protein G 结合力
Human	IgA	variable	—
	IgD	—	—
	IgE	—	—
	IgG1	++++	++++
	IgG2	++++	++++
	IgG3	—	++++
	IgG4	++++	++++
	IgM	variable	—
Avian egg yolk	IgY	—	—
Cow		++	++++
Dog		++	+
Goat		—	++
Guinea pig	IgG1	++++	++
	IgG2	++++	++
Hamster		+	++
Horse		++	++++
Koala		—	+
Llama		—	+
Monkey(rhesus)		++++	++++
Mouse	IgG1	+	++++
	IgG2a	++++	++++
	IgG2b	+++	+++
	IgG3	++	+++
	IgM	variable	—
Pig		+++	+++
Rabbit	no distinction	++++	+++





(续表)

种属	亚型	Protein A 结合力	Protein G 结合力
Rat	IgG1	—	+
	IgG2a	—	++++
	IgG2b	—	++
	IgG3	+	++
Sheep		+/-	++

++++=结合能力强; ++=结合能力中等; —=结合能力弱或没有结合

## 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 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 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 0.22μm 或 0.45μm 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

**rProtein A Beads 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 1。

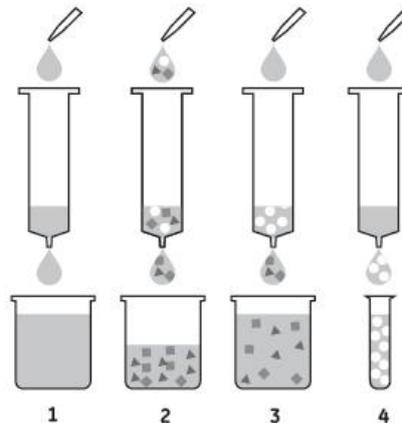


图 1. 使用 rProtein A Beads 重力柱纯化蛋白流程示意图

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

- 1) 将 **rProtein A Beads 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. 在位清洗

rProtein A Beads 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, 这时需要对介质进行清洗。

#### 去除一些沉淀或变性物质

用 2 倍柱体积的 6M 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
流速变慢	筛板被堵塞	清洗或更换筛板。
	填料被堵塞	按照第 3 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 $\mu\text{m}$ ) 过滤, 或者离心去除。
	样品太粘稠	有机溶剂或者蛋白稳定试剂 (如甘油等) 可能会引起反压增高, 降低操作流速。
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 3 部分对填料进行在位清洗。

### 5. 订购信息及相关产品

名称	货号	规格
rProtein A Beads 重力柱	SA012GC01	1 ml
	SA012GC05	5 ml
rProtein A Beads 4FF 重力柱	SA015GC01	1 ml
	SA015GC05	5 ml

