

# AbCap A 4FF

## 目录

1. 产品介绍.....	1
2. 纯化流程.....	2
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 A Beads 4FF** 是用于分离和纯化单克隆抗体、多克隆抗体或 Fc-融合蛋白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 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。

**AbCap A 4FF** 是一种中低压预装柱，有 1 ml 和 5 ml 两种规格的预装柱，分别灌装 1 ml 和 5 ml **rProtein A Beads 4FF**，共有 5 种不同包装规格的产品。预装柱具有标准接口，可以适配商品化的各类中低压色谱系统，如 ÄKTA 等，方便客户操作。

表 1. AbCap A 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	>40 mg Rabbit IgG/ml 介质
粒径	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℃

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)		++++	++++





表 2. Protein A 和 Protein G 对不同抗体的结合能力 (续)

Mouse	IgG1	+	++++
	IgG2a	++++	++++
	IgG2b	+++	+++
	IgG3	++	+++
	IgM	variable	—
Pig		+++	+++
Rabbit	no distinction	++++	+++
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>, 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 样品纯化

**AbCap A 4FF** 是一种分离和纯化单克隆抗体、多克隆抗体或 Fc-融合蛋白的预装柱, 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。再折断下口, 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存储缓冲液。
- 3) 使用至少 5 倍柱床体积的结合液平衡色谱柱。1 ml 预装柱推荐流速为 1 ml/min, 5 ml 预装柱推荐流速为 1-5 ml/min。
- 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) 用 3-5 倍柱体积洗脱液洗脱, 收集目的样品, 中和液中性和至中性保存。

- 7) 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, 最后再用 5 倍柱体积的 20% 的乙醇平衡, 然后保存在 20% 的乙醇中, 置于 2-8℃, 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. 填料清洗

**AbCap A 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	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0.45μm)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 A Beads	SA012005	5 ml
	SA012025	25 ml
	SA012100	100 ml
	SA012500	500 ml
	SA01201L	1 L
	SA01210L	10 L
AbPur rProtein A Kit	SA012K03	3 次
rProtein A Beads 4FF	SA015005	5 ml
	SA015025	25 ml
	SA015100	100 ml
	SA015500	500 ml
	SA01501L	1 L
	SA01510L	10 L
AbCap A 4FF	SA015C11	1 X 1 ml
	SA015C51	5 X 1 ml
	SA015C15	1 X 5 ml
	SA015C55	5 X 5 ml
	SA015CS	3X1 ml+1X5 ml

