

A 琼脂糖凝胶

Protein A-Agarose Protein

CAT#: RP0082

产品规格: 5ml

保存条件: 20%乙醇中2-8℃保存。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
RP0080	rProtein A Beads	5 mL
—	说明书	1 份

产品简介:

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。天然 Protein A 有五个 IgG 结合区域和一些未知功能的区域, 重组 rprotein 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。

支持物: 4%琼脂糖微球

载量: >40mg 人 IgG/ml 介质

粒径: 45-165 μm

注意事项

1. 凝胶从冷室或冰箱中取出后在室温下缓慢振摇恢复到室温, 装柱, 避免产生气泡影响柱效。
2. 装柱时尽可能维持凝胶长径比为 5: 3-2: 1, 长径比过大将导致洗脱峰拖尾, 洗脱体积增大; 长径比过小将导致样品不填料接触时间短, 吸附不充分, 填料吸附蛋白量小。
3. 若上样液中抗体浓度过高, 应使用平衡缓冲液稀释至 1-2 mg/ml, 以免上样浓度过高影响柱效。
4. 可以采用降低上样时的流速来增加样品不填料接触时间从而提高纯化抗体量。
5. 凝胶用低 pH 缓冲液洗脱时间应尽可能短, 洗脱后用中性缓冲液尽快中和至 pH 中性, 以延长亲和介质的使用寿命。
6. 洗脱后, 应立刻用如中和缓冲液将收集到的抗体溶液中和到中性 (pH7.4 左右), 以利于维持抗体的生物活性, 避免抗体失活。
7. 填料使用后应用 0.1M 柠檬酸钠缓冲液 (pH3.0) 做再生处理, 长期采用极端的洗脱条件将缩短亲和介质的使用寿命。
8. 其它柱再生处理方法: 本产品使用 10 次以上后先用 20%乙醇洗 5 个柱床体积, 再用 70%乙醇洗脱 5-10 个柱床体积, 可洗脱脂类和疏水性较强的蛋白质, 避免使亲和介质的载量下降、干扰亲和介质的应用效果。

操作步骤

I 缓冲液的准备

1. 平衡缓冲液: 20mM 磷酸盐缓冲液, 150mM NaCl, pH 7.4-8.5。
2. 洗脱缓冲液: 0.1M glycine, pH2.5-3.0。
3. 再生缓冲液: 1M NaCl。
4. 中和缓冲液: 1M Tris-Cl, pH9.0。

注意:

- 1) 对于某些纯化载量较少的抗体, 可适当提高平衡缓冲液中的盐浓度 (最高可达 3M) 和 pH 值 (最高可达 8.2), 以提高抗体和介质的吸附力。但是有时高 pH 会使杂蛋白吸附增加, 使用者应根据实际使用状况适当调节。
- 2) 以上缓冲液使用前均需 0.45 μ m 滤膜过滤。

II 样品的准备

1. 样品最好用平衡缓冲液稀释 5-10 倍, 以保证样品液的成分及 pH 和平衡缓冲液接近。若上样体积过大, 可以采取调节上样液 pH 和盐浓度的方式, 使样品的 pH 和电导不平衡液接近, 并使样品中的缓冲体系不平衡缓冲液相同。
2. 细胞培养液中大量的血清蛋白会对亲和层析造成一定的干扰, 去血清处理或稀释样品将提高纯化抗体收率。

注意: 样品在上柱前需 0.45 μ m 微孔滤膜过滤。

III 操作步骤

1. 填料装柱后, 用超纯水流洗 3-5 个柱床体积以洗掉乙醇, 用平衡缓冲液流洗 5-10 个柱床体积平衡柱子。
2. 将样品上柱, 上样流速 60cm/h。
3. 平衡缓冲液再洗 5-10 个柱床体积, 直至基线平稳。
4. 洗脱缓冲液洗脱, 收集洗脱峰, 用中和缓冲液将洗脱收集样品中和到中性。
5. 立即用 5-10 个柱床体积平衡缓冲液平衡柱子到中性。
6. 再生缓冲液流洗 3-5 个柱床体积。先后用纯水、20%乙醇分别流洗 3-5 个柱床体积。柱子置于 4~8°C 保存。

注意: 操作中如果没有实时的蛋白监测系统, 收集洗脱峰时可以分阶段收集到多个管中, 最后根据测定结果重新调整收集方式。