

产品 HiBond Protein A

产品描述

HiBond Protein A 是一种预装柱, 其填料中以重组蛋白 A 作为配体, 用于分离和纯化单克隆抗体、多克隆抗体或 Fc-融合标签。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AKTA等, 方便客户操作。重组蛋白 A 与不同来源及亚类的免疫球蛋白结合能力不一样, 具体见下表1。

种属	亚型	Protein A 结合力
Pig		+++
Rabbit	no distinction	++++
Rat	IgG1	—
	IgG2a	—
	IgG2b	—
	IgG3	+
Sheep		+/-
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

表1:++++=结合能力强; ++=结合能力中等; —=结合能力弱或没有结合

纯化流程

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: 150 mM NaCl, 20 mM Na₂HPO₄, pH 7.0

洗脱液: 100 mM 甘氨酸, pH 3.0

中和液: 1 M Tris-HCl, pH 8.5

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。

3. 样品纯化

(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倍柱体积的平衡液平衡色谱柱。5ml 预装柱推荐流速为5 ml/min。

(4) 利用样品泵或样品环上样。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。

(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) 使用 5-10 倍柱体积的洗脱液洗脱, 收集洗脱液, 即目的蛋白组分。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。

(7) 上述步骤介质洗脱结束后, 先用平衡液冲洗 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, 然后将介质置于 2-8°C 保存。

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。

在位清洗

当填料使用过程中发现反压过高或者填料上面出现明显的污染时, 需要进行在位清洗操作 (Cleaning- in-Place, CIP)。建议按照下面操作去除填料上残留的污染物, 如沉淀蛋白、疏水蛋白和脂蛋白等。

a. 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。

b. 去除强疏水结合的蛋白, 脂蛋白和脂类

方案一: 使用70%乙醇或 1% Triton™ X-100 清洗3-4个柱体积, 接触时间为15-20 min 可以去除此类污染物。然后立即用 5 倍柱体积的 PBS, pH 7.4 清洗。

问题及解决方案

问题	原因	推荐的解决方案
柱子反压过高	填料被堵塞	对柱子进行在位清洗
		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0.45μm)过滤, 或者离心去除。
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
回收率逐渐减低	上样量太多, 抗体流穿	减少上样量
	柱子太脏, 载量降低	对柱子进行在位清洗