

rProtein A Beads

货号: CS20513

保存: 4°C

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 不同来源及亚类的免疫球蛋白结合能力不一样, 具体见表。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 产品性能:

指标	性能
基质	4%琼脂糖微球
配体	重组蛋白 A
载量	>40mg 人 IgG/mL 介质
粒径(μm)	45-165
最大流速	0.1MPa, 1bar
pH 稳定范围	3-10
储存缓冲液	含 20%乙醇的 1×PBS
储存温度	2-8°C

ProteinA 和 **ProteinG** 对不同抗体的结合能力:

种属	亚型	Protein A	Protein G
Human	IgA	variable	—
	IgD	—	—
	IgE	—	—
	IgG1	++++	++++
	IgG2	++++	++++
	IgG3	—	++++
	IgG4	++++	++++

	IgM	variable	—
Avianegg yolk	IgY	—	—
Cow		++	++++
Dog		++	+
Goat		—	++
Guineapig	IgG1	++++	++
	IgG2	++++	++
Hamster		+	++
Horse	TotalIgG	++	++++
Koala		—	+
Llama		—	+
Monkey(rhesus)		++++	++++
Mouse	IgG1	+	++++
	IgG2a	++++	++++
	IgG2b	+++	+++
	IgG3	++	+++
	IgM	variable	—
Pig		+++	+++
Rabbit	TotalIgG	++++	+++
Rat	IgG1	—	+
	IgG2a	—	++++
	IgG2b	—	++
	IgG3	+	++
Sheep	TotalIgG	+/-	++

++++=结合能力强；++=结合能力中等；—=结合能力弱或没有结合

1、Buffer 的准备

所用水和 Buffer 在使用之前建议用 0.22 μ m 或 0.45 μ m 滤膜过滤。

结合/ 洗杂 Buffer: 0.15MNaCl, 20mMNa₂HPO₄, pH7.0

洗脱 Buffer: 0.1M 甘氨酸, pH3.0

中和液: 1MTris-HCl, pH8.5

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，可以用结合/洗杂缓冲液对血清样品、腹水或细胞培养液稀释，或者样品用结合/洗杂缓冲液透析。

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。

3、样品纯化

- 1) 将 rProtein A Beads 装入合适的层析柱，层析用 5 倍柱体积的结合 Buffer 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。
- 2) 将样品加到平衡好的 rProtein A Beads 中（保证目的蛋白与 rProtein A Beads 充分接触，提高目的蛋白的回收率），收集流出液。
- 3) 用 10-15 倍柱体积的洗杂 Buffer 进行清洗，去除非特异性吸附的杂蛋白，收集洗杂液。
- 4) 使用 5-10 倍柱体积的洗脱 Buffer，收集洗脱液，即目的蛋白组分。
- 5) 依次使用 3 倍柱体积的结合 Buffer 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，然后保存在等体积的 20%的乙醇中，置于 4 度保存，防止填料被细菌污染。

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。

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，这时需要对树脂进行清洗。

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,pH7.4 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%TritonX-100 清洗，然后然后立即用 5 倍柱体积的 PBS,pH7.4 清洗。

	原因分析	推荐解决方案
柱子反压过高	筛板被堵塞	清洗或更换筛板
	填料被堵塞	按照填料清洗部分进行树脂清洗
		裂解液中含有微小的固体颗粒，建议上柱前使用滤膜(0.22or0.45 μ m)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 buffer 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
		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	按照填料清洗部分进行树脂清洗