

亲和层析凝胶 Protein A 4FF 使用说明书

为确保产品的性能和无忧的操作，使用前请仔细阅读本手册，有任何疑问请咨询本公司售后技术支持或销售人员。

1. 产品介绍

Protein A 4FF 适用于分离出腹水、细胞培养上清、血清来源的单抗、多抗及 Fc 标签蛋白等。特点如下：

- 快速、简单（一步纯化）。
- 载量高、流速快、易于放大。
- 与 Protein G 4FF 相比，结合力相对较弱，更容易洗脱，也能更好的维持抗体的滴度。（见表 2）。

表1：介质性能参数

基质	高度交联 4%的琼脂糖
粒径范围	45-165 μm
平均粒径	90 μm
结合载量	20mg(人 IgG)/ml(介质)
pH 稳定性	3-9(长期) 2-10(短期)
化学稳定性	所有常用缓冲溶液中稳定 70% 乙醇、6M 盐酸胍（8 天）
流速	300cm/h
操作压力	$\leq 0.3\text{MPa}$
贮存溶液	20% 乙醇
贮存温度	4-8 $^{\circ}\text{C}$

备注：

- 介质的结合载量会因样本的来源和亚型的变化而变化。
- 介质如果长时间浸泡在洗脱液中，会导致配基水解，最终影响介质载量。

表2：Protein A和 Protein G与不同种属IgG的结合强度

种类	亚类	Protein A	Protein G
人	IgA	可变	-
	IgD	-	-
	IgE	-	-
	IgG ₁	++++	++++
	IgG ₂	++++	++++
	IgG ₃	-	++++
	IgG ₄	++++	++++

	IgM	可变	-
豚鼠	IgG ₁	++++	++
	IgG ₂	++++	++
仓鼠	/	+	++
小鼠	IgG ₁	+	++++
	IgG _{2a}	++++	++++
	IgG _{2b}	+++	+++
	IgG ₃	++	+++
	IgM	可变	-
大鼠	IgG ₁	-	+
	IgG _{2a}	-	++++
	IgG _{2b}	-	++
	IgG ₃	+	++
兔	/	++++	+++
禽蛋黄	IgY	-	-
狗	/	++	+
猪	/	+++	+++
马	/	++	++++
牛	/	++	++++
绵羊	/	-/+	++
山羊	/	-	++
猴子	/	++++	++++
骆驼	/	-	+
<p>“-”：不结合</p> <p>“+”：弱结合</p> <p>“++”：结合</p> <p>“+++”：中等结合</p> <p>“++++”：强结合</p>			

2. 使用（以 HT 1ml 和 HT 5ml 为例）

a. 水洗

用 5-10CV 纯化水以 0.5ml/min(HT 1ml)或 2.0ml/min(HT 5ml)清洗介质。

备注：此步骤用于去除介质中 20% 乙醇。

b. 平衡

用 5-10CV 平衡液以 0.5ml/min(HT 1ml)或 2.0ml/min(HT 5ml)平衡介质，直至基线平稳后调零。

备注：此步骤用于平衡介质，保证介质中的溶液的组分和 pH 与样本一致。

c. 上样

样品经过离心、过滤（0.45um）后以 0.5ml/min(1ml)或 2.0ml/min(5ml)进行上样，上样完成后用平衡液清洗直至基线为零。

备注：蛋白的结合能力随着 IgG 物种来源、亚型、样品浓度、流速、pH 变化而变化，低流速常常能增加样本的结合效率。腹水必须要经过高速离心（至少 11500rpm*30min，去除大量脂类）、稀释（至少 3 倍，推荐 5-10 倍-洗脱样本纯度会更高）、过滤后上样；血清必须要经过稀释（至少 2 倍，推荐 5-10 倍-洗脱样本纯度会更高）、过滤后上样。

d. 洗脱

用 5-10CV 洗脱液以 0.5ml/min(1ml)或 2.0ml/min(5ml)进行洗脱，收集洗脱液，洗脱完成后用中和液（50-200ul 中和液/ml 洗脱液）将洗脱液 pH 调节至中性（也可以预先加在收集管中）。

备注：低流速常常能增加洗脱液中目标蛋白的浓度。

e. 水洗

用 5-10CV 纯化水以 0.5ml/min(1ml)或 2.0ml/min(5ml)清洗介质。

备注：此步骤用于去除介质中洗脱液。

f. 保存

用 5-10CV 20%乙醇以 0.5ml/min(1ml)或 2.0ml/min(5ml)清洗介质后 4-8℃保存。

备注：20%乙醇可以防止微生物的生长。

g. 溶液配制

平衡液：0.02M PB，调节 pH 7.0-7.4，4-8℃保存。

备注：平衡液配制完成后务必确保 pH 为 7.0，当样本所在溶液的 pH 较低时，一些来源的样本与介质作用较弱甚至是无效的（见表 2）；若洗脱液中有杂质蛋白时，建议在平衡液中添加 0.3M NaCl；一般来说，此平衡液可以适用绝大多数的目标物的分离纯化（如有特殊情况，可以根据样本的来源和亚型，可以有针对性的调整平衡液的 pH 和盐浓度）。

洗脱液：0.1M 柠檬酸缓冲液，pH 3.0，4-8℃保存。

备注：洗脱液极易滋生微生物，最好现配现用，4-8℃保存。

中和液：1.0M Tris-HCl，pH 9.0。

备注：中和液用于调节 pH，避免抗体在过酸环境中失活，室温保存。

3. 清洗

清洗后可以去除一些强结合性物质（例如极少量强结合的抗体、变性蛋白、脂类等），从而达到恢复介质的优良性能（例如载量、流动性、柱效等）。

建议每使用 10-20 次后进行清洗（常规清洗流程：a→b→c；剧烈清洗流程：a→b→c→d→e），具体清洗频率需根据纯化的初始样品的洁净度进行调整。

a. 用 10-20 倍柱体积的酸清洗液（0.05M 甘氨酸、0.5M NaCl，pH 2.5）冲洗后，立即用 5-10 倍柱体积纯化水冲洗。

备注：用于去除强结合的抗体、变性蛋白等。

b. 用 10-20 倍柱体积的碱清洗液（0.1M Tris-HCl、0.5M NaCl, pH 9.0）冲洗后，立即用 5-10 倍柱体积纯化水冲洗。

备注：用于去除聚集在介质中的沉淀、变性蛋白。

c. 用 5-10 倍柱体积的 6M 盐酸胍冲洗后，立即用 5-10 倍柱体积纯化水冲洗。

d. 用 5-10 倍柱体积的 70%乙醇冲洗后，立即用 5-10 倍柱体积纯化水冲洗。

e. 用 5-10 倍柱体积的 20%乙醇冲洗后 4-8℃ 保存。

备注：20%乙醇可以防止微生物的生长。

4. 常见问题

表3: 常见问题及解决方案

问题	可能原因	解决方案
纯化时目标物不与介质结合或结合量较低	1.上样量过载	降低上样量
	2.上样速度过快	降低上样流速
	3.蛋白或脂类在介质中聚集	及时有效地清洗介质或更换新的介质
	4.目标物和介质结合力弱	确认IgG来源及亚型,选择正确的介质
	5.纯化时选择的缓冲液不合适	确认样本中的pH,结合力弱的目标物可以通过调高pH(8-9)和增加盐浓度(1-3M NaCl)来提高样本和介质的结合力
洗脱时没有收集到目标物或只收集到少量目标物	1.目标物没有与介质结合或结合量较少	先确认目标物是否与介质结合
	2.洗脱条件不合适	降低洗脱液pH至2.5-3.0
	3.洗脱时间不够	降低流速,延长洗脱液的保留时间
	4.洗脱体积过小	加大洗脱体积
目标物纯度较低	1.样品没有经过前处理	根据样品的来源,上柱前必须要经过离心、过滤或稀释
	2.样品粘度过高	用平衡液适当的稀释样品,降低样品粘度和浓度。
	3.洗杂不彻底	加大洗杂体积直至基线平稳并与平衡液一致
	4.杂质蛋白或脂类在介质中聚集沉淀	及时有效地清洗介质
	5.目标物出现降解	注意样本纯化前后的保存条件,不得在高温、过酸、过碱条件长时间放置
	6.柱料装填效果不佳	重新装填或购买

	7.分离柱顶部有较大储样体积	重新装柱或降低储样体积
	8.介质中有微生物生长	介质使用完后, 请及时正确保存介质
介质载量下降	1.上样速度过快	降低上样流速
	2.蛋白或脂类在介质中聚集, 导致载量下降	及时清洗介质
	3.使用次数过多, 配基逐渐脱落	更换新介质
色谱峰上升缓慢	介质装填过紧	重新装柱
色谱峰拖尾	介质装填太松	重新装柱
柱床有裂缝或干涸	出现泄露或大体积气泡引入	检查管路是否有泄露或气泡, 重新装柱
液流较慢	1.蛋白或脂类聚集	及时清洗介质或滤膜
	2.分离柱中微生物生长	所用试剂必须经过过滤和脱气; 样品上柱前必须离心或过滤

5. 订购信息

表4: 订购信息表

产品	规格(ml)	货号
Protein A 4FF	5	HZ1011-2
Protein A 4FF	25	HZ1011-2
Protein A 4FF	100	HZ1011-2
Protein A 4FF	500	HZ1011-2
Protein A 4FF	1000	HZ1011-2