

# Protein A Agarose Beads

## 产品简介：

**Protein A Agarose Beads** 是用于分离和纯化单克隆抗体的亲和层析介质，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。**Protein A Agarose Beads** 的配体蛋白 Protein A 是在天然蛋白 A 的基础上进行生物工程突变得到的耐碱蛋白 A(Alkaline tolerate，故缩写为 At)。

该产品以 0.1M NaOH 进行 200 次在位清洗，介质载量几乎不变，以 0.5M NaOH 进行 100 次在位清洗，载量仍可达到最初载量的 80%，更加方便客户尤其是工业客户的清洗操作。该产品采用较稳定的定向偶联，脱落量低（小于 10ng/mg IgG,见图 1）。

**Protein A Agarose Beads** 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，其耐压性能见图 2，因此 **Protein A Agarose Beads** 适用于工业化抗体的大规模生产。

表 1. Protein A Agarose Beads 产品性能

项目	性能
介质	高度交联的 4%琼脂糖
平均粒径	~ 90 $\mu$ m
配体	耐碱性 Protein A
结合载量	> 40 mg 人 IgG/ml 介质
化学稳定性	可耐受抗体纯化过程中的所有试剂
工作 pH	3-12
在线清洗	0.1-0.5M NaOH
线性流速	50-300cm/h
保存	20% 乙醇， 2 $^{\circ}$ C - 8 $^{\circ}$ C

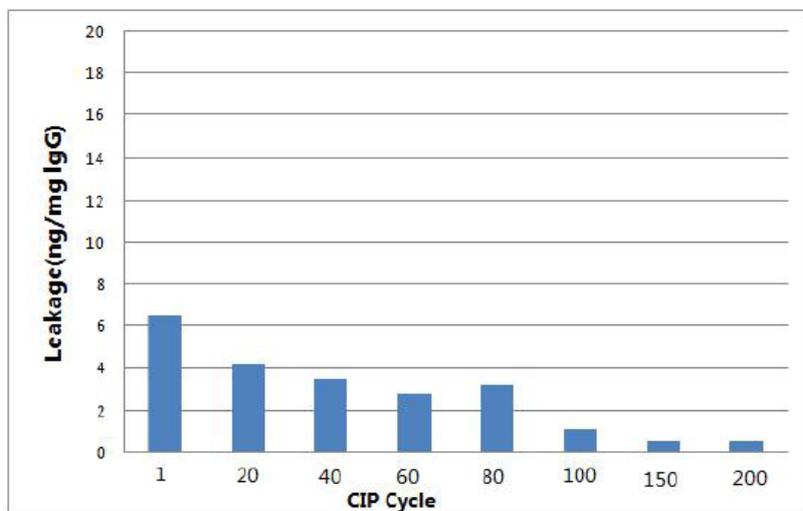


图 1. CIP 清洗后 Protein At 脱落量

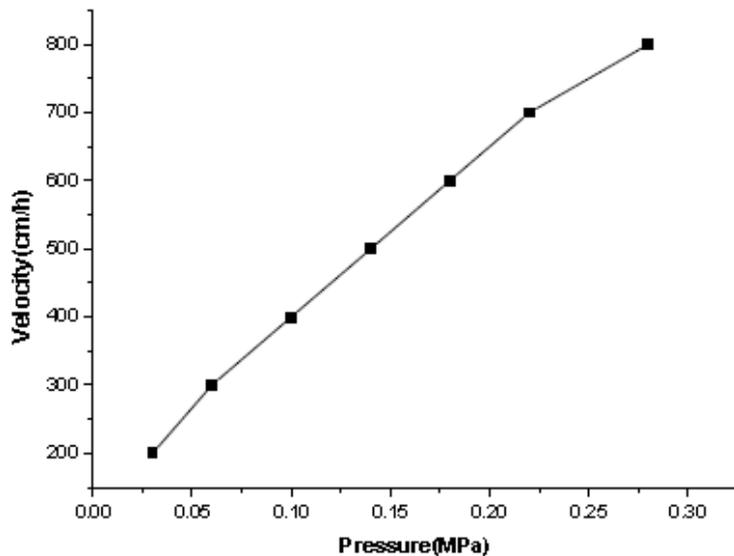


图 2.介质的压力/流速曲线 (层析柱 BPG300,柱高 20cm)

## 纯化流程

### 1. Buffer 的准备

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

**结合缓冲液/洗涤缓冲液** : 0.15 M 氯化钠、20 mM 磷酸氢二钠, pH7.0

**洗脱液** : 0.1 M 甘氨酸, pH 3.0

**中和液** : 1 M Tris-HCl 缓冲液, pH 8.5 。

### 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/洗涤缓冲液对血清样品、腹水或细胞培养液稀释, 或者样品用结合/洗涤缓冲液透析。样品在上样前建议离心或用 0.22 $\mu$ m 或 0.45 $\mu$ 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. Protein A Agarose Beads 装填

**Protein A Agarose Beads** 被广泛应用于工业纯化, 因此, 涉及到各种中压色谱层析柱的填装, 下面介绍使用 **Protein A Agarose Beads** 填装层析柱的方法。

#### 层析柱的装填 (使用储液器装填)

- 1). 用去离子水冲洗层析柱底筛板与接头, 确保柱底筛板上无气泡, 关闭柱底出口, 并在柱底部留出 1-2cm 的去离子水。
- 2). 将树脂悬浮起来, 小心的将浆液连续地倒入层析柱中。用玻璃棒沿着柱壁倒入浆液可减少气泡的产生。

- 3). 如果使用储液器，应立即在层析柱和储液器中加满水，将进样分配器放置于浆液表面，连接至泵上，避免在分配器或进样管中产生气泡。
- 4). 打开层析柱底部出口，开起泵，使其在设定的流速下进行。最初应让缓冲液缓慢流过层析柱，然后缓慢增加至最终流速，这样可避免液压对所形成柱床的冲击，也可以避免柱床形成的不均匀。如果达不到推荐的压力或流速，可以用你所使用泵的最大流速，这样也可以得到一个很好的装填效果。（注意：在随后的色谱程序中，不要超过最大装柱流速的75%）当柱床高度稳定后，在最后的装柱流速下至少再上3倍柱床体积的去离子水。标上柱床高度。
- 5). 关闭泵，关闭层析柱出口。
- 6). 如果使用储液器，去除储液器，将分配器至于层析柱中。
- 7). 将分配器推向柱子至标记的柱床高度处。允许装柱液进入分配器，锁紧分配器接头。
- 8). 将装填好的层析柱连接至泵或色谱系统中，开始平衡。如果需要可以重新调整分配器。

#### 4.样品纯化

- 1). 将 **Protein A Agorase 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 **Protein A Agorase Beads** 中（保证目的蛋白与 **Protein A Beads4FF** 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。

**注：**首次使用时，可先按照4 填料清洗中 CIP 清洗一遍，避免脱落的配体残留。

#### 5.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。

#### 残留配体去除

**Protein A Agorase Beads** 配体的脱落很低，小于10ng/mg 抗体。但是很多产品需要完全去除，可采用阳离子交换、阴离子交换或凝胶过滤等方法去除，具体参照阳离子交换树脂、阴离子交换树脂和凝胶过滤树脂的使用。

#### 填料清洗

**Protein A Agorase 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。

**Protein A Agorase Beads** 是一种耐碱亲和介质，可以耐受0.1M-0.5M NaOH 溶液的清洗，成本低，效果好，具体操作：

- 1.3 倍柱体积的结合液；
- 2.至少 2 倍柱体的 0.1–0.5 M NaOH，接触时间为 15 minutes；
- 3.5 倍柱体积的结合液冲洗。

注：因 0.1–0.5 M NaOH 粘度大易造成压力增加，可进行反向冲洗。

#### 常见问题及解决方案

问题	原因分析	推荐解决方案
柱子反压过高	筛板被堵塞	清洗或更换筛板
	填料被堵塞	按照第 4 部分进行树脂 CIP 清洗 裂解液中含有微小的固体颗粒，建立上柱前过滤
样品纯化过程中曲线不稳	样品或 buffer 中有气泡	取出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
	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	按照第 4 部分进行树脂 CIP 清洗