

Biolinkedin® 耐碱 Protein A 琼脂糖凝胶

包装清单

名称	货号	包装
耐碱 Protein A 琼脂糖凝胶	L-2205	2mL (1mL 实体积)
	L-2205A	10mL (5mL 实体积)
	L-2205B	25mL (12.5mL 实体积)

产品概述

Biolinkedin® 耐碱 Protein A 琼脂糖凝胶是以自制的琼脂糖凝胶为介质,以耐碱 Protein A 蛋白为配体,具有很高的物理化学稳定性,配基不易脱落,寿命长,使用方便。耐碱 Protein A 蛋白改造了天然 Protein A 的抗体结合域,显著提高了耐碱性能,允许 0.1~0.5M NaOH 的在位清洗。

该产品具有更高的抗体结合能力和较低的非特异吸附率,洗脱条件均一,一步纯化即可从血清样品中分离出纯度大于 90%的抗体。本产品适用于血浆、腹水、组织培养上清液等样品中的抗体纯化,也可用于免疫沉淀及其它相关研究。

产品特性

基质	4%高度交联的琼脂糖凝胶 (4FF)
配体	重组 Protein A 蛋白
平均粒径	30~100 μ m
浓度	凝胶体积占悬浮液体积的 50%
抗体结合能力	>60mg Human IgG/mL 凝胶
耐压	0.5MPa
pH 稳定性	3~12 (工作) 2~14 (CIP)
耐碱性能	0.1~0.5M NaOH
化学稳定性	常见水相溶液: 10mM HCl、0.1M 柠檬酸 (pH3)、6M 尿素、6M 盐酸胍、30%异丙醇、20%乙醇
保质期	在 2~8 $^{\circ}$ C 稳定保存两年

操作流程

(以纯化人血清 IgG 为例)

推荐缓冲液:

Binding/Washing buffer	0.15M NaCl, 20 mM Na ₂ HPO ₄ , pH 7.0
Elution buffer	100 mM Gly, pH 3.0
Neutrilization buffer	1.0 M Tris-HCl, pH 8.5

1. 样品准备

上样之前要确保样品溶液有合适的离子强度和 pH 值,用 **Binding/Washing buffer** 对血清样品、腹水或细胞培养液稀释,或者将样品置于 **Binding/Washing buffer** 透析。样品在上样前建议离心并用 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。

2. 凝胶装填

- 1) 取合适规格的亲和层析柱,装入垫片,加入适量去离子水润洗柱管和垫片,关闭下出口。
- 2) 将耐碱 Protein A 琼脂糖凝胶混合均匀,用移液器吸取适量浆液加入至层析柱中(凝胶实际体积占悬液的一半),打开下出口流出保护液。
- 3) 加入适量去离子水冲洗凝胶,待柱中液体流出后,关闭下出口。
- 4) 装填好的层析柱加入 **Binding/Washing buffer** 进行平衡,暂不使用时则加入保护液,2~8 $^{\circ}$ C 保存。

3. 样品纯化

3.1 孵育法纯化

- 1) 根据纯化的样品量,取适量耐碱 Protein A 琼脂糖凝胶加入离心管中,1000rpm 离心 1min,去除上清;
- 2) 向离心管中加入 5 倍凝胶体积的 **Binding/Washing buffer** 清洗凝胶,1000rpm 离心 1min,去除上清,重复 2 次以上。
- 3) 加入样品,置于旋转混匀仪,2~8 $^{\circ}$ C 孵育 2~4h 或者过夜孵育。
- 4) 孵育结束后,1000rpm 离心 1min,吸取上清至新离心管,上清保留作为流穿,用于电泳鉴定。
- 5) 用 5 倍凝胶体积的 **Binding/Washing buffer** 清洗凝胶,1000rpm 离心 1min,去除上清(注意不要吸到凝胶),重复 3~5 次,中间建议更换新离心管。
- 6) 加入 3~5 倍凝胶体积的 **Elution buffer** 进行洗脱,室温孵育 5~15min,1000rpm 离心 1min 收集洗脱液,可重复 2~3 次。洗脱液需要立即调成中性,一般建议使用洗脱组分体积 1/10 的 **Neutrilization buffer** 进行中和。

3.2 层析柱法纯化

溶液用量按柱体积计算（例如 5 倍柱体积，1mL 规格对应为 5mL 溶液，10mL 规格对应为 50mL 溶液）。

- 1) 将装填好的耐碱 Protein A 琼脂糖凝胶层析柱用 5 倍柱体积 Binding/Washing buffer 进行平衡，使凝胶处于与目的蛋白相同的缓冲液体系下，重复 2~3 次。
- 2) 将样品加到平衡好的层析柱中，置于旋转混匀仪孵育 30~60min 后，收集流出液，可以反复上样增加结合效率。
- 3) 用 10~15 倍柱体积的 Binding/Washing buffer 进行洗杂，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 Elution buffer 洗脱，分段收集，每一个柱体积收集一管，分别检测，既可以保证所有结合的目的蛋白被洗脱，又可以得到高纯度和高浓度的抗体。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 Neutrization buffer 进行中和。

3.3 SDS-PAGE 检测

将使用纯化产品得到的样品（包括流穿组分、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。

4. 凝胶清洗

耐碱 Protein A 琼脂糖凝胶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，这时需要对凝胶进行清洗。

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 (pH 7.4) 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% Triton X-100 清洗，然后立即用 5 倍柱体积的 PBS (pH 7.4) 清洗。

注意事项

1. 进行实验操作之前，请务必认真阅读本操作说明书。
2. 琼脂糖凝胶使用前应充分混合均匀。凝胶应保存在储存溶液中，防止干燥。
3. 本产品仅供科学研究使用。

相关产品

货号	产品名称
L-2201	Protein A Plus 琼脂糖凝胶
L-2202	Protein G Plus 琼脂糖凝胶
L-2203	Protein L Plus 琼脂糖凝胶
L-2204	Protein A/G Plus 琼脂糖凝胶
L-2205	耐碱 Protein A 琼脂糖凝胶