

rProtein L Beads 4FF 的重力柱说明书

货号: AC17642

规格: 1*1mL / 1*5mL / 5*1mL / 3*1mL+1*5mL / 5*5mL

保存: 2-8°C

产品说明:

rProtein L Beads 4FF 是用于分离和纯化单克隆抗体的通用性亲和层析介质。**Protein L** 经过基因重组, 由大肠杆菌表达, 保留了与抗体κ链结合的特性, 同时不会影响抗体的抗原结合位点。**Protein L** 与人、小鼠的 kappa 轻链有较好的结合力, 也可能与其他物种的某些 kappa 亚型有特异性结合。**Protein L** 与兔免疫球蛋白结合力很弱, 不结合牛、山羊或绵羊来源的免疫球蛋白。

rProtein L Beads 4FF 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。

表 1: 介质性能参数

基质	高度交联 4%的琼脂糖微球
粒径范围	45-165μm
配体	重组蛋白 L
结合载量	>15mg 人 IgG/ml(介质)
pH 稳定性	3-10
操作压力	≤0.3MPa, 3bar
贮存溶液	20%乙醇

纯化流程:

1、Buffer 的准备

所用水和缓冲液在使用之前建议用 0.22μm 或 0.45μm 滤膜过滤。

平衡/ 洗杂液: 0.15M NaCl, 20mM Na₂HPO₄, pH 7.0

洗脱液: 0.1M 甘氨酸, pH 3.0

中和液: 1M Tris-HCl, pH 8.5

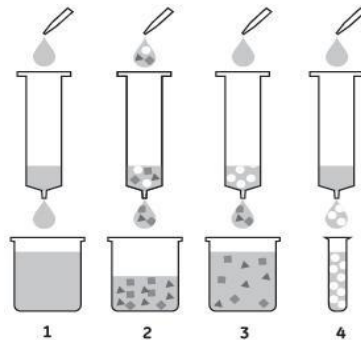
2、样品准备

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 0.22μm 或 0.45μm 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

rProtein L Beads 4FF 重力柱使用请参考以下说明, 各溶液用量均按照柱体积计算 (柱体积是指填料体积)。



使用流程请参考此图。 Step 1: 柱子平衡; Step 2: 上样; Step 3: 洗杂; Step 4: 洗脱

1) 水洗: 将 rProtein L Beads 4FF 重力柱固定在铁架台上, 依次去掉上端塞和下端塞, 使液体流出。当柱内剩余液面略高于上筛板, 向管中加入 5-10 个柱体积的去离子水, 去除残留的保护液。

2) 平衡: 当液面略高于上筛板, 向柱管中加入 5 个柱体积的平衡液, 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。

3) 上样: 将样品加到平衡好的重力柱中, 样品保留时间至少 2min, 保证目的蛋白与介质充分接触, 提高目的蛋白的回收率。收集流出液, 用于 SDS-PAGE 分析蛋白质的结合情况, 在出现问题时, 更方便寻找解决问题的方案。

4) 洗杂: 用 10-15 倍柱体积的洗杂液进行清洗, 去除非特异性吸附的杂蛋白, 收集洗杂液。

5) 洗脱: 使用 5-10 倍柱体积的洗脱液进行目的蛋白的洗脱, 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蛋白。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。

6) 水洗: 依次使用 3 倍柱体积的平衡液和 5 倍柱体积的去离子水平衡填料。将重力柱保存在等体积的 20%乙醇中, 置于 2-8°C 保存, 防止填料被细菌污染。

4、SDS-PAGE 检测

将纯化过程中收集的样品 (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。

5、填料清洗

rProtein L Beads 4FF 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。

1. 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。

2. 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, pH 7.4 清洗。

常见问题

表 1: 常见问题及解决方案

问题	可能原因	解决方案
柱子反压过高	1. 筛板被堵塞	清洗或更换筛板
	2. 填料被堵塞	样品上柱前使用滤膜 (0.22 或 0.45 μ m) 过滤, 或者离心去除。
		进行树脂清洗
样品纯化过程中曲线不稳	样品或缓冲液中有气泡	去除样品或柱子中的气泡
		样品和缓冲液进行脱气
洗脱组分中没有目的蛋白	1. 样品中抗体浓度太低	使用其抗原做配体的介质
	2. 抗体被降解	适当的提高洗脱 pH
回收率逐渐减低下降	1. 上样量太多	减少上样量
	2. 柱子太脏, 载量降低	进行树脂清洗
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