**Protein A 亲和层析材料**

**1、产品描述**

Geneharbor Protein A 亲和层析材料适用于从生物体液或细胞培养液中快速、简便和特异地纯化单抗或多抗免疫球蛋白及其亚基或者片段，特别适合人IgG1、IgG2、IgG4和小鼠IgG2A的纯化。

本产品创新性地采用无机材料作为基质，可以比琼脂耐受更大的压力尤其是亲和层析柱层析，价格大幅低于市售同类产品，可一次性使用，操作方便成本低廉亦可再生反复使用 。

|  |  |
| --- | --- |
| **产品性质** | |
| 基质 | 无机材料 |
| 粒径 | 700-1000目，~10-50μm |
| 亲和材料 | 重组 Protein A |
| pH 范围 | 3-10 |
| 温度 | 4 ℃ ~ 室温 |
| 静态吸附能力 | ＞40 mg IgG/g |
| 动态吸附能力 | 动态吸附能力因目标抗体、流速等因素而异 |
| Protein A 流失率 | <10μg/g |
| 储存缓冲液 | 0.2M 磷酸钠缓冲液 pH 7.2 w/ 0.02% 叠氮化钠 |

**运输与保存方法**

冰袋运输。4℃保存，1年有效。

**2、纯化步骤**

**缓冲液制备：**

建议以下缓冲液使用前用0.45μm 滤膜过滤一遍，用于配制的水和试剂需要高纯度。

* 结合液： 0.1M 磷酸钠缓冲液 + 0.15M 氯化鈉 pH 7.2
* 清洗液： 0.05M 甘氨酸-盐酸缓冲液 pH 5
* 洗脱液： 0.1M 甘氨酸-盐酸缓冲液 pH 3.3
* 储存缓冲液： 0.2M 磷酸钠缓冲液 pH 7.2 w/ 0.02% 叠氮化钠

**样品制备：**

上柱之前要确保样品溶液有合适的离子强度和pH值，可以用结合液对血清样品、腹水或细胞培养液稀释，或者样品用结合缓冲液透析。

**柱层析纯化：**

1. 将样品上样至层析柱中，收集流出液，待检测。流速 1ml/min（1ml 预装柱）或 5ml/min（5ml 预装柱）
2. 用10-15体积的清洗液洗涤层析柱，去除非特异性吸附的杂蛋白，收集洗液。
3. 用5‐10体积洗脱缓冲液洗脱抗体，收集含有目的免疫球蛋白的洗脱液。

**层析柱再生：**

1. 用5体积 洗脱液洗涤柱子。
2. 用5体积 结合液洗涤柱子。

**注：**再生后的层析柱如短期不用，加入0.2M 磷酸钠缓冲液 pH 7.2 w/ 0.02% 叠氮化钠储存缓冲液置于2‐8℃保存。注意：不能冷冻。

**可能遇到的问题及解决办法**

|  |  |
| --- | --- |
| 出现的问题 | 引起原因及解决措施 |
| 使用过程中柱压升高 | 柱子堵塞引起  清洗柱子, 清洗或更换筛板, 进样液中含有固体颗粒，建议上柱前使用0.22μm/0.45μm滤膜过滤。 |
| 上样过程中压力波动较大 | 使用黏度高的溶液时，应降低流速。  样品中的有气泡,如果可能应对样品进行真空脱气 |
| 洗脱峰变宽 | 洗脱缓冲液强度不够或污染物在柱子中积累所 引起 优化洗脱条件及清洗条件，提高清洗频率 |
| 产率下降 | 洗脱强度及清洗不够引起， 优化洗脱条件及清洗条件，提高清洗频率 |
| 洗脱过程中出现沉淀 | 洗脱条件及清洗不够理想引起， 优化洗脱条件及清洗条件，提高清洗频率 |
| 清洗过程中压力过高 | 柱子中的蛋白沉淀引起 优化洗脱条件和/或在清洗前用酸性溶液（pH3 或更低）进行再生，采用低流速 |
| 柱效下降，优化洗脱条件及清洗无效 | 更换新柱子，柱子的寿命主要取决于样品及样品 预处理。 |
| 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  样品与Protein A结合力低，换用Protein G或Protein A/G树脂纯化 |
| 回收率逐渐减低 | 上样量太多减少上样量  柱子太脏，载量降低清洗树脂 |

**蛋白A，G对不同物种Ig的结合能力总表**

| **免疫球蛋白类型** | **Protein A** | **Protein G** | **免疫球蛋白类型** | **Protein A** | **Protein G** |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Human IgG | ++++ | ++++ | Mouse IgG | ++++ | ++++ |
| Human IgG1 | ++++ | ++++ | Mouse IgG1 | + | ++++ |
| Human IgG2 | ++++ | ++++ | Mouse IgG2a | ++++ | ++++ |
| Human IgG3 | **+** | ++++ | Mouse IgG2b | +++ | +++ |
| Human IgG4 | ++++ | ++++ | Mouse IgG3 | ++ | +++ |
| Human IgM | - | - | Mouse IgM | + | - |
| Human IgE | + | + | Chicken IgY | - | - |
| Human IgA | **+** | - | Goat IgG | + | ++++ |
| Human IgA1 | **+** | - | Goat IgG1 | + | ++++ |
| Human IgA2 | **+** | - | Goat IgG2 | ++++ | ++++ |
| Human IgD | **+** | - | Guinea Pig IgG | ++++ | ++ |
| Rat IgG | + | ++ | Guinea Pig IgG1 | ++++ | ++ |
| Rat IgG1 | + | + | Guinea Pig IgG2 | ++++ | ++ |
| Rat IgG2a | - | ++++ | Rat IgG3 | + | ++ |
| Rat IgG2b | - | **+** | Horse IgG | + | ++++ |
| Rat IgG2c | ++++ | ++++ | Rabbit IgG | ++++ | +++ |
| Bovine IgG1 | + | ++++ | Rabbit All isotypes | **+++** | **++** |
| Sheep IgG | + | ++ | Monkey IgG | ++++ | ++++ |
| Sheep IgG1 | + | ++ | Donkey IgG | ++ | ++++ |
| Sheep IgG2 | + | ++ | Hamster IgG | **+** | **++** |
| Pig IgG | +++ | ++ | Dog IgG | +++ | **+** |
| Cat IgG | ++++ | **+** | Koala IgG |  | + |
| Cow IgG | ++ | ++++ | Llama IgG |  | **+** |
| Cow IgG1 | + | +++ |  |  |  |
| (+)= weak binding; (++)= moderate binding; (++++)= strong binding; (-)= no binding; | | | | | |