



## Iodoacetyl Agarose Beads 4FF (QS01043)

### 一、 产品描述

**Iodoacetyl Agarose Beads 4FF** 是一类预活化树脂，其纯化原理在于可以通过与巯基或者氨基的反应实现抗原的固定化，进而利用抗原抗体的特异性反应对免疫血清中的抗体进行高效纯化，是多克隆抗体生产中不可缺少的纯化介质。

表 1 Iodoacetyl Agarose Beads 4FF 产品性质

基质	4% 高流速琼脂糖
配体	碘乙酸
粒径	45-165 $\mu\text{m}$
载量	>3 mg IgG/mL 基质
耐受压力	0.3 Mpa
pH 范围	5-10
储存缓冲液	1 M NaCl

### 二、 偶联方法

针对巯基和氨基的偶联条件有所差异，请分别进行选择。

#### 1 含巯基抗原的偶联流程

##### 1.1 缓冲液准备

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

偶联液: 50 mM Tris, 5 mM EDTA-Na, pH 8.5

封闭液: 50 mM Tris, 5 mM EDTA-Na, 50 mM L-半胱氨酸, pH 8.5

保护液: 20 mM PBS, 20% 乙醇, pH 8.0

结合/洗杂液: 20 mM PBS, pH 8.0

洗脱液: 100 mM 甘氨酸, pH 2.5-3.0

中和液: 1 M Tris-HCl, pH 8.5

##### 1.2 抗原准备

使用偶联液溶解抗原，制备成终浓度为 1-3 mg/mL 的抗原溶液。建议该溶液现用现配，储存时间过长会影响偶联效果。

注: ① 抗原样品使用前务必确保其巯基处于还原状态。如果巯基已经氧化，必须对抗原进行还原，一般推荐使用还原剂 TCEP，可以选择性的、高效的打开抗原中的二硫键，并且不影响抗原与树脂的偶联反应，每毫克抗原中 TCEP 的添加量不超过 12 mg，具体使用量需要自行优化。



② 如果使用 DTT 等含有巯基的还原剂，处理完样品必须要将还原剂去除，否则会影响抗原与树脂的偶联效率。

### 1.3 抗原偶联

1) 取适量 Iodoacetyl Agarose Beads 4FF，加入到合适的重力柱中，靠重力流干保护液，用 3 倍柱体积的偶联液平衡树脂，待偶联液流干，再加入 3 倍柱体积的偶联液，重复操作 2 遍。共使用 9 倍柱体积的偶联液。

2) 关闭柱子的下端出口，加入等体积的含巯基的抗原，混匀，取出至合适的离心管中，置于 28°C 震荡孵育 30 min。

注：确保树脂充分悬浮起来，否则将大大影响偶联效率。

3) 将上述反应体系取出，转移至重力柱中，流干其中溶液，并收集流出液，再用 3 倍柱体积的偶联液清洗树脂，合并两次流出液。

注：如有需要，可以使用 Ellman's Reagent 检测其中巯基含量，得出抗原残留量，从而计算偶联效率。

4) 关闭柱子的下端出口，加入等体积的封闭液，混匀，转移至合适的离心管中，于 28°C 震荡孵育 30 min。

5) 将上述反应体系取出，转移至重力柱中，流干其中的封闭液。

注：如果立即使用，可以参考【抗体纯化】操作。如果以后使用，可以用 3 倍柱体积的结合液清洗树脂，然后保存在等体积的保护液中，于 4°C 冰箱保存。

### 1.4 抗体纯化

1) 将偶联了抗原的树脂装入合适的层析柱，用 5 倍柱体积的结合液进行平衡，使填料处于与抗体更易结合环境中，一方面保护目标抗体，另一方面提高抗体结合效率。

2) 将含有抗体的样品加到平衡好树脂中，为了保证抗体与树脂充分接触，提高目标抗体的回收率，可以控制上样流速在 0.5-1 mL/min，并收集流出液。

3) 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，提高目的抗体的纯度，收集洗杂液。

4) 使用 5-10 倍柱体积的洗脱液，收集洗脱组分，即目的抗体。

注：为了保持抗体活性，需要立即将洗脱组分透析至 pH 7.0-8.0 的缓冲液中，或者先加入 1/10 倍洗脱组分体积的中和液，将洗脱组分进行中和，再透析。

5) 依次使用 3 倍柱体积的结合液和 5 倍柱体积的去离子水平衡树脂，最后再用 5 倍柱体积的保护液平衡，然后保存在等体积的保护液中，置于 4°C 保存，防止填料被细菌污染。

## 2 含氨基抗原偶联流程

### 2.1 缓冲液准备

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

偶联液：0.1 M NaHCO<sub>3</sub>, 0.5 M NaCl, pH 8.5

封闭液：50 mM Tris, 5 mM EDTA-Na, 50 mM L-半胱氨酸, pH 8.5

保护液：20 mM PBS, 20% 乙醇, pH 8.0

结合/洗杂液：20 mM PBS, pH 8.0

洗脱液：100 mM 甘氨酸, pH 2.5-3.0



中和液：1 M Tris-HCl, pH 8.5

## 2.2 抗原偶联

1) 使用偶联液溶解抗原，制备成终浓度为 5-10 mg/mL 的抗原溶液。

2) 取适量 SulfoLink Coupling Agarose Resin，加入到合适的重力柱中，靠重力流干保护液，用 3 倍柱体积的偶联液平衡树脂，待偶联液流干，再加入 3 倍柱体积的偶联液，重复操作 2 遍。共使用 9 倍柱体积的偶联液。

3) 关闭柱子的下端出口，加入等体积的含氨基的抗原，混匀，取出转移至合适的离心管中，置于 28°C 震荡孵育 3-5 h，或者 4°C 震荡孵育过夜（12-15 h）。

注：确保树脂充分悬浮起来，否则将大大影响偶联效率。

4) 将上述反应体系取出，转移至重力柱中，收集流出液，再用 3 倍柱体积的偶联液清洗树脂，合并两次流出，待测试。

5) 关闭柱子的下端出口，加入等体积的封闭液，混匀，取出转移至合适的离心管中，置于 28°C 震荡孵育 30 min。

6) 将上述反应体系取出，转移至重力柱中，流干其中的封闭液。

注：如果暂不使用，可以用 3 倍柱体积的结合液清洗树脂，然后保存在等体积的保护液中，于 4°C 保存。

## 2.3 抗体纯化

1) 将偶联了抗原的树脂装入合适的层析柱，用 5 倍柱体积的结合液进行平衡，使填料处于与抗体更易结合环境中，一方面保护目标抗体，另一方面提高抗体结合效率。

2) 将含有抗体的样品加到平衡好树脂中，为了保证抗体与树脂充分接触，提高目标抗体的回收率，可以控制上样流速在 0.5-1 mL/min，并收集流出液。

3) 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，提高目的抗体的纯度，收集洗杂液。

4) 使用 5-10 倍柱体积的洗脱液，收集洗脱组分，即目的抗体。

注：为了保持抗体活性，需要立即将洗脱组分透析至 pH 7.0-8.0 的缓冲液中，或者先加入 1/10 倍洗脱组分体积的中和液，将洗脱组分进行中和，再透析。

5) 依次使用 3 倍柱体积的结合液和 5 倍柱体积的去离子水平衡树脂，最后再用 5 倍柱体积的保护液平衡，然后保存在等体积的保护液中，置于 4°C 保存，防止填料被细菌污染。

## 三、 SDS-PAGE 检测

将纯化抗体样品得到的流出组分、洗杂组分和洗脱组分以及原始含抗体样品使用 SDS-PAGE（千株松，QS05046）检测纯化效果。

## 四、 问题与解决方案

出现问题	原因	推荐解决方案
柱子流速低	筛板被堵塞	清洗或更换筛板



	样品或填料中有气泡	轻轻搅拌填料或敲击层析柱去除气泡
偶联液中蛋白或多肽沉淀	蛋白或多肽不溶	偶联液中加入<30%的 DMSO 或 DMF 或 6 M 盐酸胍促进样品溶解
偶联效率低	样品无巯基，被氧化	加入 DTT 或 TCEP 后立即交联
洗脱组分纯度低	树脂没有彻底清洗	增加结合/洗杂液体积

## 五、 相关产品

产品名称	货号
ECH Agarose Beads 4FF	QS01029
EAH Agarose Beads 4FF	QS01041
Heparin Agarose Beads 6FF	QS01040
Streptavidin Agarose Beads 6FF	QS01014
Streptactin XT Agarose Beads 6FF	QS01031
Streptactin Agarose Beads 4FF	QS01015
Dextrin Agarose Beads 4FF	QS01013
Glutathione Agarose Beads 4FF	QS01012
rProtein A/G Agarose Resins4FF	QS01011