



High Ficin Agarose Beads 6FF

货号: QS01094

一、产品描述

High Ficin Agarose Beads 6FF由巯基特异性蛋白酶（无花果蛋白酶）组成，该酶固定在微珠状琼脂糖树脂上，以实现受控的抗体片段化（尤其是小鼠 IgG₁）。

无花果蛋白酶与木瓜蛋白酶相似，是一种从无花果乳胶中分离出的非特异性、巯基蛋白酶。无花果蛋白酶的分子量约为 25,000，在 pH 值 4-9.5 下有效，更佳 pH 值为 6.5。在存在半胱氨酸的条件下将 IgG 分子与无花果蛋白酶一起孵育时，铰链区的一个或多个肽键分离，产生 Fab 片段或 F(ab')₂ 片段。使用木瓜蛋白酶或胃蛋白酶明显难以将小鼠 IgG₁ 酶切为功能性 Fab 或 F(ab')₂ 片段，然而，得率和免疫反应性优于使用无花果蛋白酶酶切小鼠 IgG₁。High Ficin Agarose Beads 6FF 专门设计用于将小鼠 IgG₁ 切割为 Fab 或 F(ab')₂ 片段，且具有优势，因为它几乎无需自溶、消除了样品中的蛋白酶污染，还可以通过去除无花果蛋白酶或控制样品在 High Ficin Agarose Beads 6FF 柱中的流速来控制酶切。

High Ficin Agarose Beads 6FF 与游离酶相比能够更加稳定地抵抗热诱导的变性，从而延长活性维持时间。Fab 和 F(ab')₂ 制备试剂盒包含 High Ficin Agarose Beads 6FF、其他必要试剂和用于小鼠 IgG₁ 酶切的优化方案。无花果蛋白酶分别在存在 1 mM 半胱氨酸和 10 mM 半胱氨酸的条件下生成小鼠 IgG₁ F(ab')₂ 和 Fab 片段。通过修饰半胱氨酸浓度和其他酶切参数，也可以从其他物种和同种型中生成片段。

表 1 High Ficin Agarose Beads 6FF 产品性质

基质	6%高流速琼脂糖
配基	Ficin（无花果蛋白酶）
粒径	45-165 μm
配基偶联密度	4-5mg/mL 基质
酶解能力	>50 mg IgG/mL 基质
耐受压力	0.3 Mpa
储存缓冲液	50% 甘油, 50mM 磷酸钠, 10mM EDTA, pH 7

二、使用说明:

1、IgG 水解生成 Fab 片段的操作流程



本操作流程适用于消化多克隆鼠源性和人源性 IgG。当尝试消化非鼠或非人物种的 IgG 时，可能需要进行优化。文献中报道了用非固定化和固定化胰蛋白酶消化不同 IgG 类型的情况。某些 IgG 类型，如兔源性 IgG，难以消化，需要的酶与底物的比例（酶：底物，1:10 w/w），而其他 IgG 类型，如大鼠源性 IgG，容易被这种酶变性，需要较少的酶或更短的消化时间。

2、需要的额外材料

F(ab') ₂ 酶解缓冲液母液	10X 酶解缓冲液 (50mM EDTA, 40mM 半胱氨酸)：将 18.6 毫克 EDTA 溶解于 1 毫升 0.1M 磷酸盐缓冲液 (pH 6.0) 中。向 EDTA/磷酸盐缓冲液中加入 7 毫克半胱氨酸。
Fab 酶解缓冲液母液	10X酶解缓冲液 (50mM EDTA, 250mM半胱氨酸)：将18mg EDTA溶解于1mL 0.1M柠檬酸缓冲液中，pH 6.0。将43.9mg半胱氨酸添加到EDTA/柠檬酸缓冲液中。pH调至6.0。
Ficin 平衡缓冲液	将1份Fab或F(ab') ₂ 酶解缓冲液加入10份0.1M柠檬酸缓冲液，pH 6.0或其他低盐缓冲液 (例如，50mM磷酸盐，氯化钠 < 100mM，pH 6.0) 中。
小鼠 IgG ₁	在pH 6.0的0.1M柠檬酸缓冲液或其他低盐缓冲液中制备1mL小鼠IgG ₁ (适当浓度见表1)，并将其添加到100μL Fab或F(ab') ₂ 酶解缓冲液中。

3、准备工作

- 1) 如果小鼠 IgG₁ 已经纯化并冻干，那么继续进行步骤2。如果 IgG 仍处于溶液状态，则用样品缓冲液进行透析。将小鼠 IgG₁ 浓缩至约 20mg/mL 的浓度。浓度较低时，需要更高的酶与底物的比例或更长的消化时间。
- 2) 使用前，先准备好酶解缓冲液。
- 3) 通过倒置或轻轻摇晃的方式混合 High Ficin Agarose Beads 6FF，以获得均匀的悬浮液。向一个玻璃试管或其他合适的反应容器中加入 0.5 毫升 50% 的 High Ficin Agarose Beads 6FF。为确保胶浆的正确分配，请使用细长的或切割过的移液管尖端。
- 4) 为了使凝胶达到平衡状态，向凝胶浆中加入 4.0 毫升酶解缓冲液。用树脂分离器或离心法将凝胶与缓冲液分离。再用另外 4.0 毫升酶解缓冲液重复上述洗涤步骤。将两次洗涤液一并丢弃。
- 5) 将凝胶重新悬浮于 0.5 毫升的酶解缓冲液中。

4、片段生成

1. 将不超过 10 毫克的小鼠 IgG₁ 溶解于 1.0 毫升的消化缓冲液中。
2. 将 1.0 毫升样品加入装有含 0.2 毫升平衡好的凝胶的试管或容器中。
3. 在 37°C 的水浴振荡器中高速振荡孵育 5 小时。孵育期间保持凝胶持续搅拌。具体酶解时间见下表。

酶解片段	浓度 (mg/mL)	时间
Mouse IgG ₁ Fab	0.5-10	3-5
Mouse IgG ₁ F(ab') ₂	0.5-3	20
Mouse IgG ₁ F(ab') ₂	5-10	40



4. 如果这些片段要在蛋白 A 转移柱上进行纯化, 那么要用蛋白 A 结合缓冲液来冲洗从固定化纤蛋白酶上洗脱下来的消化产物。使用体积为消化混合物体积 3 至 4 倍的体积缓冲液, 以促进未消化的 IgG 和 Fc 与蛋白 A 的后续结合。

5. 要再生 High Ficin Agarose Beads 6FF, 需用含有 10mM EDTA 的中性 pH 缓冲液洗涤。将树脂存放在含有 10mM EDTA 和 50% 甘油的中性 pH 缓冲液中。固定化的 Ficin 可重复使用多达五次, 其活性保留率约为 85%。

三、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 Resins 4FF	QS01011