



rProtein A Agarose Beads 4FF

货号: QS01008

版本: V2.0

发布日期: 2026.08

一、产品简介与作用原理

蛋白 A 为金黄色葡萄球菌来源重组蛋白, 含 5 个 IgG 高亲和力结合结构域, 可特异性结合多种哺乳动物 IgG Fc 段。本产品将重组蛋白 A 共价偶联于 4FF 琼脂糖微球, 机械强度高、非特异性吸附低, 既可用于生物制药级抗体批量纯化, 也适配细胞 / 组织样本 Co-IP 蛋白互作验证实验。

二、核心技术参数表

项目	技术指标
基质	4% 高交联琼脂糖
粒径范围	45–165 μm
动态结合载量	≥ 30 mg 人 IgG/mL 填料
pH 稳定范围	短期 0–14; 长期 2–12; 可耐受 0.1 M NaOH 在位清洗
化学稳定性	PBS、Tris、醋酸盐、尿素、盐酸胍、乙醇等常规缓冲液稳定; 避免强氧化剂、高浓度阴离子去污剂
最大操作流速	≤ 500 cm/h
最大操作压力	≤ 0.3 MPa
贮存体系	20% 乙醇水溶液
储存温度	4–8 $^{\circ}\text{C}$, 严禁冷冻

三、产品规格与储存条件

4.1 包装规格

5 mL、10 mL、50 mL、100 mL、500 mL

4.2 储存要求

- 未开封: 4–8 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存, 禁止冻存, 冻融将破坏琼脂糖微球刚性结构;
- 开封使用后: 补加 20% 乙醇至终浓度, 4–8 $^{\circ}\text{C}$ 密封存放;
- 长期不用填料: 每 3 个月更换一次 20% 乙醇保护液。

四、产品优势



1. 高特异性：重组蛋白 A 纯度高，杂蛋白污染低，Co-IP 实验背景条带少；
2. 超高载量： ≥ 30 mg 人 IgG/mL 填料，少量珠子即可完成 IP/Co-IP；
3. 机械性能优异：4% 高刚性琼脂糖，耐受高速离心、反复洗涤不易破碎；
4. 耐强碱清洗：0.1 M NaOH 在位再生，可重复使用数十次，降低实验成本；
5. 通用性强：适配人、兔、猪、小鼠等多物种 IgG，兼顾纯化与互作实验。

五、应用场景

1. 哺乳动物单克隆 / 多克隆抗体规模化分离纯化；
2. 免疫沉淀 IP：单一靶蛋白富集；
3. 免疫共沉淀 Co-IP：验证细胞内蛋白-蛋白相互作用。

六、标准操作方案

6.1 抗体大规模纯化方案

本方案适用于重力柱、低压层析系统，处理细胞上清、血清、腹水等含 IgG 样品。

6.1.1 试剂准备

1. 结合缓冲液 (Binding Buffer)：20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.4；
2. 洗涤缓冲液 (Wash Buffer)：同结合缓冲液；
3. 洗脱缓冲液 (Elution Buffer)：0.1 M Glycine-HCl, pH 2.7-3.0；
4. 中和缓冲液：1 M Tris-HCl, pH 8.0；
5. 在位清洗液 (CIP)：0.1 M NaOH；
6. 储存液：20% (v/v) 乙醇水溶液。

6.1.2 填料装柱与平衡

1. 充分颠倒摇匀 rProtein A Agarose Beads 4FF 悬液，按照目标柱体积取出填料；
2. 将填料缓慢倒入层析柱，让填料自然沉降；重力柱可依靠重力沉降；层析系统可低流速压实，操作压力不超过 0.3 MPa；
3. 去掉 20% 乙醇保护液，使用 5-10 倍柱体积结合缓冲液平衡层析柱，流速控制 ≤ 500 cm/h，流出液 pH 与电导率与结合缓冲液一致即平衡完成。

小提示：柱体积 V，5V 代表 5 倍柱体积；例如 5 mL 填料，5V 即为 25 mL 缓冲液。

6.1.3 上样

1. 样品预处理：细胞上清、腹水、血清建议 12000 g 离心除去沉淀，0.45 μ m 滤膜过滤；样品 pH 尽量调至 7.0-7.8；含盐量偏低样品可补加 NaCl 至 150 mM；
2. 将样品上柱，控制流速；根据载量，每毫升填料上样总 IgG 不高于 50 mg；
3. 收集穿透液，可留样检测 IgG 是否穿透，判断填料是否过载。

6.1.4 洗涤除杂

上样结束后，使用 8-10 倍柱体积的洗涤缓冲液冲洗柱子，洗去未结合、非特异性吸附的



杂蛋白，直到流出液 OD280 回到基线附近。

6.1.5 抗体洗脱

1. 加入洗脱缓冲液洗脱结合的 IgG；一般使用 3-5 倍柱体积洗脱液；
2. 提前在收集管中加入 1/10 体积 1 M Tris-HCl pH 8.0 中和缓冲液，收集洗脱组分，避免抗体长时间处于低 pH 导致变性；
3. 监测 OD280，合并高吸收峰组分，即为粗纯化 IgG；
4. 洗脱后立即用结合缓冲液把柱子 pH 回调至中性。

6.1.6 样品后处理

收集得到的抗体组分，可以透析、超滤置换到 PBS 或者目标储存缓冲液；0.22 μm 过滤除菌后 4°C 短期保存或者 -20°C 分装冻存。

6.2 Co-IP 免疫共沉淀完整实验方案

6.2.1 实验试剂与耗材准备

1. 试剂配制（临用现加 PMSF / 蛋白酶抑制剂鸡尾酒）
 - 裂解缓冲液（Lysis Buffer，温和型，保护蛋白互作）：50 mM Tris-HCl pH7.5、150 mM NaCl、1% Triton X-100、1 mM EDTA、1 mM NaF、1 mM Na_3VO_4 ；临用前加 1 mM PMSF、1× 蛋白酶抑制剂；
 - 洗涤缓冲液 Wash Buffer：同裂解液，不含抑制剂；
 - 中和液：1 M Tris-HCl pH8.0；
 - 酸性洗脱液：0.1 M Glycine-HCl pH2.7；
 - 5×SDS 蛋白上样缓冲液；
 - 同型对照 IgG（与 IP 一抗宿主种属一致）；
 - 特异性靶蛋白一抗；
2. 耗材：1.5 mL 低温离心管、剪去尖端宽口枪头、4°C 旋转混匀仪、低速离心机；
3. 填料预处理：充分颠倒混匀 rProtein A Agarose Beads 4FF，吸取所需体积（常规每样本 20-40 μL 填料悬液），用裂解缓冲液洗涤 3 次，每次 1000 g 离心 1 min，弃上清备用。

6.2.2 细胞 / 组织蛋白样本制备

1. 细胞：弃培养基，预冷 PBS 洗细胞 2 次，加入裂解液冰上裂解 20-30 min，每 5 min 轻晃一次；
2. 组织：剪碎后加裂解液冰上充分研磨，裂解 30 min；
3. 裂解液 4°C、12000 g 离心 15 min，小心吸取上清（避免吸入沉淀）；
4. BCA 法测定蛋白浓度，取 20-30 μL 上清作为 Input 对照，加入 5× 上样缓冲液煮沸 5 min，-20°C 保存备用。



6.2.3 预清除 (Pre-clearing, 降低非特异性结合, 推荐必做)

1. 剩余蛋白上清加入等量同种属普通 IgG (1 μ g/1 mg 总蛋白) + 预处理好的 Protein A 琼脂糖珠 (20 μ L) ;
2. 4 $^{\circ}$ C 旋转摇床温和孵育 30-120 min;
3. 1000 g 离心 3 min, 小心吸取上清至新离心管, 弃去珠子沉淀, 完成预清除。

6.2.4 抗体结合与免疫共沉淀

1. 将预清除后的上清分为两组: IP 实验组、IgG 阴性对照组;
2. 实验组加入特异性一抗 (0.5-2 μ g 抗体 / 1 mg 总蛋白), 对照组加入等量同种属普通 IgG;
3. 4 $^{\circ}$ C 旋转混匀过夜孵育;
4. 向两组体系中分别加入预处理完成的 rProtein A Agarose Beads 4FF (20-40 μ L) ;
5. 4 $^{\circ}$ C 旋转摇床孵育 2-4 h, 使抗体-靶蛋白-互作蛋白复合物结合至填料。

6.2.5 填料洗涤 (去除非特异杂蛋白)

1. 1000 g 离心 1 min, 彻底吸弃上清;
2. 每管加入 1 mL 预冷 Wash Buffer, 轻柔颠倒重悬珠子, 4 $^{\circ}$ C 翻转孵育 5 min;
3. 1000 g 离心 1 min 弃上清, 重复洗涤 4-5 次;

注意: 全程禁止剧烈涡旋, 琼脂糖珠易碎, 导致背景升高。

6.2.6 蛋白复合物洗脱 (两种方案按需选择)

方案 A: 变性洗脱 (直接 WB 检测, 最常用)

1. 洗涤后完全吸净洗涤液, 加入 20-30 μ L 1 $\times$ SDS 上样缓冲液重悬珠子;
2. 95 $^{\circ}$ C 沸水浴煮样 5 min;
3. 瞬时离心取上清, 即可进行 SDS-PAGE 与 Western Blot 检测互作蛋白。

方案 B: 酸性温和洗脱 (保留蛋白天然构象, 用于质谱 / 功能实验)

1. 珠子中加入 50 μ L 0.1 M 甘氨酸洗脱液 (pH2.7), 室温轻摇 5 min;
2. 1000 g 离心 1 min, 吸取上清至新管, 立即加入 1/10 体积 1 M Tris pH8.0 中和;
3. 如需完全洗脱, 重复洗脱 1 次, 合并洗脱液;
4. 洗脱产物可直接用于质谱、体外功能实验, 如需 WB 可加入上样缓冲液煮沸。

6.2.7 Co-IP 实验关键对照设置

1. Input 组: 验证样本内存在靶蛋白与候选互作蛋白;
2. IgG 对照组: 排除填料、抗体非特异性吸附杂蛋白;
3. 空白珠子对照 (可选): 仅填料 + 裂解液, 判断琼脂糖珠本身吸附背景。

七、填料再生、在位清洗与保存

适用于抗体纯化柱以及 Co-IP 回收的琼脂糖珠



1. 完成洗脱之后，使用 3-5 倍柱体积 0.1 M NaOH 进行在位清洗（CIP），接触填料时间控制 30 min；
2. 大量 PBS 或者结合缓冲液冲洗填料，直至流出液 pH 回到中性；
3. 短期待用：可置于 PBS+0.02% 叠氮钠，4-8℃保存；
4. 长期储存：换成 20% 乙醇水溶液，4-8℃避光保存；
5. Co-IP 使用过的珠子：若样品杂质多，建议增加 NaOH 浸泡时间；如果出现大量蛋白沉淀，建议丢弃，不建议重复使用。

重要提醒：不要让 NaOH 长时间（>2h）浸泡填料，会降低蛋白 A 配基活性。

八、注意事项

1. 吸取琼脂糖珠时枪头剪去尖端，防止戳碎微球；
2. Co-IP 全程 4℃低温操作，避免蛋白复合物解离；
3. 高浓度去污剂、强还原剂会破坏蛋白 A 与 IgG 结合；裂解液中 SDS 浓度不可超过 0.1%；
4. 填料严禁冷冻，冻融后微球碎裂，载量大幅下降；
5. Co-IP 洗涤步骤充分，否则会出现大量非特异杂带；
6. 抗体纯化上样样品最好过滤，颗粒杂质会堵塞层析柱，造成压力升高；
7. 不要使用强氧化剂，会破坏蛋白 A 配基和琼脂糖基质。

九、常见问题排查

9.1 抗体纯化相关

1. IgG 收率低：样品 pH 偏离 7.0-7.8、上样过载、配基失活、样品杂质堵塞填料；检查平衡、上样条件，做 NaOH 再生。
2. 洗脱抗体纯度差：洗涤不充分；增加洗涤体积；可适当提高洗涤缓冲液盐浓度。
3. 柱压异常升高：样品未过滤带入颗粒；填料被微生物污染；填料破碎。

9.2 Co-IP 实验相关

1. 无目的条带：抗体效价不足、蛋白互作较弱、裂解液破坏复合物、孵育时间不足；
2. 背景条带极多：未做预清除、洗涤次数不足、珠子破碎、IgG 对照选择错误；
3. 填料载量下降：未定期 NaOH 再生、长期高温存放、反复冻融。

十、售后技术支持

公司：江苏千株松生物科技有限公司

官网：www.qianzhusong.com

技术咨询：17302508337（微信同号）

质保：原装未开封填料 4-8℃储存有效期 12 个月；规范再生条件下填料可重复使用≥20 次。