

SulfoLink Coupling Resin

货号：S4530

规格：5ml/25ml

保存：2℃-8℃

产品介绍

SulfoLink Coupling Resin 是一类预活化树脂，可以通过与巯基或者氨基的反应实现抗原的固定化，进而对免疫血清中的抗体进行纯化。SulfoLink Coupling Resin 可以得到高效价的目标抗体，是多克隆抗体生产中不可缺少的纯化介质。

产品性能：

性能	指标
基质	4%琼脂糖微球
配体	碘乙酸
载量	>3mg
粒径(μm)	45-165
最大流速	0.1MPa
pH	稳定范围
储存缓冲液	1M NaCl

纯化流程

SulfoLink Coupling Resin 针对巯基和氨基的偶联条件有所差异，对于含有巯基抗原偶联请参考1.1 流程，对于含有氨基抗原偶联请参考1.2 流程。

1.1 含巯基抗原的偶联流程

1.1.1 缓冲液准备

所用水和Buffer 在使用之前建议用0.22 μm 或0.45 μm 滤膜过滤。

偶联液：50 mMTris，5 mMEDTA-Na，pH 8.5

封闭液：50 mMTris，5 mMEDTA-Na，50 mM L-半胱氨酸，pH 8.5

保护液：20 mM 磷酸盐缓冲液，20% 乙醇，pH 8.0

结合/洗杂液：20 mM 磷酸盐缓冲液，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

1.1.2 抗原准备

抗原样品使用前务必确保其巯基处于还原状态（可以使用Ellman's Reagent 检测自由巯基的含量）。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（Tris(2-carboxyethyl) phosphine），TCEP 溶液很稳定，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12mg，需要自己进行优化。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。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。

1.1.3 抗原偶联

1) 取适量的SulfoLink Coupling Resin, 加入合适的重力柱中, 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, 取出至于合适的离心管中, 置于28℃震荡孵育30min。

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, 再用3 倍柱体积的偶联液清洗树脂, 合并两次流出。

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, 置于28℃震荡孵育30min。

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1.1.4 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2℃-8℃保存。

1.1.4 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2℃-8℃保存, 防止填料被细菌污染。

1.2 含氨基酸抗原偶联流程

1.2.1 缓冲液准备

所用水和Buffer 在使用之前建议用0.22 μ m 或0.45 μ m 滤膜过滤。

偶联液: 0.1MNaHCO₃, 0.5MNaCl, pH 8.5

封闭液: 50 mMTris, 5 mMEDTA-Na, 50 mM L-半胱氨酸, pH 8.5

保护液: 20 mM 磷酸盐缓冲液, 20% 乙醇, pH 8.0

结合/洗杂液: 20 mM 磷酸盐缓冲液, 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

1.2.2 抗原准备

氨基是一种比较稳定的基团, 所以, 对于含有氨基酸的抗原没有太特殊的要求。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。

1.2.3 抗原偶联

- 1) 取适量的SulfoLink Coupling Resin，加入合适的重力柱中，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，加入等体积的含氨基的抗原，混匀，取出转移至合适的离心管中，置于28℃震荡孵育3-5 小时，或者2-8℃震荡孵育过夜（12-15 小时）。
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，其中的抗原溶液，并收集流出，再用3 倍柱体积的偶联液清洗树脂，合并两次流出，留待测试。
- 4) 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℃震荡孵育30min。
- 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1.2.4 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2℃-8℃保存。

1.2.4 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2℃-8℃保存，防止填料被细菌污染。

1.3 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检测纯化效果。

问题及解决方案

问题	原因分析	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	偶联液中加入小于30%的DMSO或DMF或6M 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