

rProtein G Agarose Beads

1. 产品介绍.....	1
2. 纯化流程.....	2
3. 填料清洗.....	3
4. 问题及解决方案.....	3
5. 订购信息及相关产品.....	3

1. 产品介绍

rProtein G Agarose Beads 是用于分离和纯化 IgG 的亲层析介质，具体性能见表 1。Protein G 是一种分离自 G Streptococci 的细胞壁蛋白，它可通过其 Fc 片段结合哺乳动物 IgG。重组 protein G 含有高亲和结合位点，减少了非特异性吸附。Protein G 和 Protein A 有不同的 IgG 结合特性，相比 Protein A，Protein G 对牛、羊、马等多克隆抗体有更强的结合力，它还可以结合不能与 Protein A 很好结合的大鼠 IgG、人 IgG3 和小鼠 IgG1，具体结合能力见表 2。

表 1. rProtein G Agarose Beads 产品性能

项目	性能
基质	4%琼脂糖微球
配体	重组蛋白 G
载量	>30 mg Goat IgG/ml 介质
粒径范围	45-165 μm
最大压力	0.1 MPa, 1 bar
pH 稳定范围	3-10
储存缓冲液	含 20%乙醇的 1XPBS
储存温度	2-8°C

表 2. Protein A 和 Protein G 对不同抗体的结合能力

种属	亚型	Protein A	Protein G
Human	IgA	variable	—
	IgD	—	—
	IgE	—	—
	IgG1	++++	++++
	IgG2	++++	++++
	IgG3	—	++++
	IgG4	++++	++++
	IgM	variable	—
Avian egg yolk	IgY	—	—
Cow		++	++++
Dog		++++	++
Goat		—	++++
Guinea pig	IgG1	++++	++
	IgG2	++++	++
Hamster		+	++
Horse	Total IgG	++	++++
Koala		—	+
Llama		—	+
Monkey(rhesus)		++++	++++
Mouse	IgG1	+	++++
	IgG2a	++++	++++
	IgG2b	+++	+++

	IgG3	++	+++
	IgM	variable	—

表 2. Protein A 和 Protein G 对不同抗体的结合能力 (续)

Pig		+++	+++
Rabbit	Total IgG	++++	+++
Rat	IgG1	—	+
	IgG2a	—	++++
	IgG2b	—	++
	IgG3	+	++
Sheep	Total IgG	+/-	++

++++=结合能力强; ++=结合能力中等; —=结合能力弱或没有结合

2. 纯化流程

2.1 缓冲液的准备

所用水和缓冲液在使用之前建议用 0.22 μ m 或 0.45 μ m 滤膜过滤。

平衡/洗杂液: 0.15 M NaCl, 20 mM Na₂HPO₄, pH 7.0

洗脱液: 0.1 M 甘氨酸, pH 3.0

中和液: 1 M Tris-HCl, pH8.5

2.2 样品准备

上柱前要确保样品溶液有合适的离子强度和 pH 值, 可以用平衡/洗杂液对血清样品、腹水或细胞培养液稀释, 或者样品用平衡/洗杂液透析。

样品在上样前建议离心或用 0.22 μ m 或 0.45 μ m 滤膜过滤, 减少杂质, 提高蛋白纯化效率和防止堵塞柱子。

2.3 rProtein G Agarose Beads 装填

2.3.1 重力柱的装填

- 1) 取合适规格的重力层析柱, 装入下垫片, 加入适量纯水润洗柱管和垫片, 关闭下出口。
- 2) 将 **rProtein G Agarose Beads** 混合均匀, 用枪头吸取适量浆液加入至重力柱中 (介质实际体积占悬液的一半), 打开下出口流干保护液。
- 3) 加入适量纯水冲洗介质, 待柱管中液体重力流干后, 关闭下出口。
- 4) 装入润洗后的上垫片, 确保垫片与填料之前没有空隙, 且保持水平。
- 5) 装填好的重力柱可以直接加入平衡液进行平衡, 暂不使用时则加入保护液, 2-8 $^{\circ}$ C 保存。

2.4 样品纯化

2.4.1 孵育法纯化

- 1) 根据纯化的样品量, 取适量 **rProtein G Agarose Beads** 加入离心管中, 1000 rpm 离心 1 min, 吸弃上清; 也可加入重力柱中, 流干保护液。
- 2) 向离心管中加入 5 倍介质体积的平衡液清洗介质, 1000 rpm 离心 1 min, 吸弃上清; 如使用重力柱, 则直接在重力柱中清洗, 直接重力流干平衡液; 重复两次以上。
- 3) 加入样品, 封闭离心管或重力柱管, 4 $^{\circ}$ C 振荡孵育 2-4 h 或者 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min-2 h。
- 4) 孵育结束后, 1000 rpm 离心 1 min, 吸弃上清, 或过滤收集介质, 上清保留作为流穿, 用于电泳鉴定。
- 5) 用 5 倍介质体积的洗杂液清洗介质, 1000 rpm 离心 1 min 或重力柱管过滤, 去除上清 (注意不要吸到介质), 重复 3-5 次, 中间建议更换新离心管。
- 6) 加入 3-5 倍柱体积的洗脱液进行洗脱, 室温孵育 5min, 1000 rpm 离心 1 min 或重力柱管收集洗脱液, 可重复 2-3 次。洗脱组分需要立即调成中性, 一般建议使用洗脱组分的 1/10 的中和液进行中和。

2.4.2 重力柱法纯化

- 1) 将装填好的 **rProtein G Agarose Beads** 重力柱用 5 倍柱体积平衡液进行平衡, 使填料处于与目的蛋白相同的缓冲液体系下, 重复 2-3 次。
- 2) 将样品加到平衡好的重力柱中, 样品保留时间至少 2 min, 保证样品和介质充分接触, 收集流出液, 可以反复上样增加结合效率。

- 3) 用 10-15 倍柱体积的洗杂液进行洗杂, 去除非特异性吸附的杂蛋白, 收集洗杂液。
- 4) 使用 5-10 倍柱体积的洗脱液洗脱, 分段收集, 每一个柱体积收集一管, 分别检测, 既可以保证所有结合的目的蛋白被洗脱, 又可以得到高纯度和高浓度的蛋白。洗脱组分需要立即调成中性, 一般建议使用洗脱组分数目 1/10 的中和液进行中和。
- 注: 上述步骤介质洗脱结束后, 先用平衡液冲洗 3 倍柱体积, 然后用纯水冲洗 5 倍柱体积, 再用 20%乙醇冲洗 2 个柱体积, 然后将介质置于 2-8°C 保存。

2.4 SDS-PAGE 检测

将使用纯化产品得到的样品 (包括流出组分、洗杂组分和洗脱组分) 以及原始样品使用 SDS-PAGE 检测纯化效果。

3. 填料清洗

rProtein G Agarose Beads 可以重复使用而无需再生, 但随着一些变性物质的沉淀和蛋白的聚集, 往往造成流速和结合载量都下降, 严重影响柱子的性能, 这时需要对填料进行清洗。

去除一些沉淀或变性物质

用 2 倍柱体积的 6 M 盐酸胍溶液进行清洗, 然后立即用 5 倍柱体积的 PBS, pH 7.4 清洗。

去除一些疏水性吸附造成的非特异性吸附物质

用 3-4 倍柱体积的 70%乙醇或 2 倍柱体积的 1% Triton™ X-100 清洗, 然后立即用 5 倍柱体积的 PBS, pH 7.4 清洗。

4. 问题及解决方案

问题	原因分析	推荐解决方案
柱子反压过高	填料被堵塞	按照第 3 部分进行填料清洗 裂解液中含有微小的固体颗粒, 建议上柱前使用滤膜 (0.22 或 0.45μm) 过滤, 或者离心去除。
样品纯化过程中曲线不稳	样品或缓冲液中有气泡	去除样品或柱子中的气泡 样品和缓冲液进行脱气
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 G 结合能力较弱	更换介质, 如 rProtein A Agarose Beads 进行纯化
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	按照第 3 部分进行填料 CIP 清洗

5. 订购信息及相关产品

产品名称	货号	规格
rProtein G Agarose Beads 重组蛋白 G 抗体纯化琼脂糖微球	NBS0160	5 ml
	NBS0160	25 ml
	NBS0160	100 ml