

rProtein G Agarose Beads 4FF (QS01009)

目录

一、	产品介绍.....	1
二、	溶液制备.....	1
三、	样品制备.....	1
四、	纯化流程.....	2
五、	清洗.....	2
六、	常见问题.....	2
七、	订购信息.....	3

一、 产品介绍

千株松rProtein G Agarose Beads 4FF (QS01009) 是一种能从生物体液、细胞培养基中便捷、一站式纯化免疫球蛋白及其子类或片段的亲和层析介质。它是由重组的 Protein G 蛋白结合到 4% 的琼脂糖构成。每 ml 的 Protein G 亲和层析介质可以结合超过 20mg 的 IgG。层析介质的吸附总量主要由几个因素决定, 如目的抗体的总量, 流速等。

Protein G 蛋白发现于 G 类链球菌细胞壁, 它可以通过 Fc 片段与哺乳动物的 IgGs 结合。天然的 Protein G 有 3 个 IgGs 结合位点, 同时还有白蛋白和细胞表面结合位点。重组 Protein G 去除了这些多余的结合位点, 只保留 IgGs 结合位点, 减少了交叉反应和非特异性吸附。虽然 Protein G 和 Protein A 的三级结构非常相似, 但是他们的氨基酸序列却有很大的差别, 因此它们的特征也截然不同。Protein G 能够用于纯化一些不能与 Protein A 很好结合的哺乳动物单克隆或多克隆 IgGs。对于多数的哺乳动物 Protein G 蛋白比 Protein A 有着更高的亲和力, 如人 IgG3, 鼠 IgG1 和兔 IgG2a。与 Protein A 不同, Protein G 不能和人的 IgM, IgD 和 IgA 结合。

表1、rProtein G Agarose Beads 4FF产品特点

基质	4%高刚性琼脂糖
粒径范围	45-165 μ m
平均粒径	70 \pm 5 μ m
结合载量	\geq 30mg 山羊IgG/mL填料
化学稳定性	所有常用缓冲溶液中稳定
流速	\leq 500cm/h
操作压力	\leq 0.3MPa
贮存溶液	20%乙醇
贮存温度	4-8 $^{\circ}$ C

二、 溶液配置

使用的试剂和水必须比较洁净, 配制完成后请用0.45 μ m 的滤器进行过滤。

Binding/Wash Buffer: 20 mM Na₂HPO₄, 0.15 M NaCl, PH=7.0

Elution Buffer: 0.1 M 甘氨酸, PH=2.5

中和 Buffer: 1 M Tris-HCl, PH=8.5样品制备

- 1、样品所在溶液要和平衡液保持一致，可以用平衡液进行裂解、透析/超滤/G25进行缓冲液置换。
- 2、样品过滤（平均粒径 $<45\mu\text{m}$ ，用 $0.22\mu\text{m}$ 过滤； $45\mu\text{m}<$ 平均粒径 $<165\mu\text{m}$ ，用 $0.45\mu\text{m}$ 过滤；平均粒径 $>165\mu\text{m}$ ，用 $0.8\mu\text{m}$ 过滤）。

三、纯化流程

下面的步骤是以 0.5ml 的柱体积为例，使用其他的柱体积，使用的 Buffer 体积可以按照比例扩大或者缩小。样品准备 为了确保一定的离子强度和适当的PH 值使抗体能够更加有效的结合在 Protein G 亲和层析介质上，需要适当的使用 Binding/Wash Buffer 稀释血清或者腹水，比例至少 1:1。或者把样品在 Binding/Wash Buffer 中透析过夜。

层析柱填充

- 1) 充分摇匀，取 1mL 匀浆到一个预先装有 1 mL Binding/Wash Buffer 的层析柱中。
- 2) 让填料自然沉降到柱子底部。
- 3) 加入 5 mL Binding/Wash Buffer 到柱中，让 Buffer 缓慢的流出，流速大约为 1 mL/min。

过柱纯化

- 1) 加入样品，让样品缓慢的流出，流速大约为 0.2-0.5 mL/min。收集流出液，待后续可使用 SDS-PAGE 检测纯化效率。如有必要，可以重复或循环上样。
- 2) 使用大约 30 mL Binding/Wash Buffer 洗涤，流速大约为 2mL/min，或者使用紫外检测仪直到A280 值稳定为止。
- 3) 洗杂完毕后，加入 10-15 ml Elution Buffer，使用较低流速大约 1mL/min，收集洗脱液，加入中和 Buffer（1/10 洗脱液体积）调节 PH 到 7.4。

填料再生

加入 10 mL 的 Elution Buffer 洗涤，或者使用 10mL 的 6M 盐酸胍（PH 8.0）洗涤，再加入 5 mL Binding/Wash Buffer 重新平衡填料。填料能够重复再生 10 次，配体脱落率低。储存 Protein G 亲和层析介质需保存在含有 20%乙醇的 Binding/Wash Buffer 中，2-8℃保存。严禁冻结。

清洗

- 1、用 0.1M NaOH 缓慢冲洗不低于 5CV
- 2、用纯化水冲洗至 pH 中性。
- 3、用 20%乙醇冲洗 3CV，4℃保存。

四、常见问题

问题	可能原因	解决方案
纯化时目标物不与介质结合或结合量较低	1.上样量过载	降低上样量
	2.上样流速过快	降低上样流速
	3.蛋白或脂类在介质中聚集	及时有效地清洗介质或更换新的介

		质
	4.目标物和介质结合力弱	确认IgG来源及亚型，选择正确的介质
	5.纯化时选择的缓冲液不合适	确认样本中的pH，结合力弱的目标物可以通过调高pH（8-9）和增加盐浓度（1-3M NaCl）来提高样本和介质的结合力
洗脱时没有收集到目标物或只收集到少量目标物	1.目标物没有与介质结合或结合量较少	先确认目标物是否与介质结合
	2.洗脱条件不合适	降低洗脱液pH至2.5-3.0
	3.洗脱时间不够	降低流速，延长洗脱液的保留时间
	4.洗脱体积过小	加大洗脱体积
目标物纯度较低	1.样品没有经过前处理	根据样品的来源，上柱前必须要经过离心、过滤或稀释
	2.样品粘度过高	用平衡液适当的稀释样品，降低样品粘度和浓度。
	3.洗杂不彻底	加大洗杂体积直至基线平稳并与平衡液一致
	4.杂质蛋白或脂类在介质中聚集沉淀	及时有效地清洗介质
	5.目标物出现降解	注意样本纯化前后的保存条件，不得在高温、过酸、过碱条件长时间放置
	6.柱料装填效果不佳	重新装填或购买
	7.分离柱顶部有较大储样体积	重新装柱或降低储样体积
	8.介质中有微生物生长	介质使用完后，请及时正确保存介质
介质载量下降	1.上样流速过快	降低上样流速
	2.蛋白或脂类在介质中聚集，导致载量下降	及时清洗介质
	3.使用次数过多，配基逐渐脱落	更换新介质
色谱峰上升过陡	介质装填过紧	重新装柱
色谱峰上升过缓或拖尾	介质装填太松	重新装柱
柱床有裂缝或干涸	出现泄露或大体积气泡引入	检查管路是否有泄露或气泡，重新装柱
液流较慢	1.蛋白或脂类聚集	及时清洗介质或滤膜

五、 订购信息

产品名称	货号
耐碱 rProtein A Agarose Resins 4FF	QS01007
rProtein A Agarose Resins 4FF	QS01008
rProtein G Agarose Resins 4FF	QS01009
rProtein L Agarose Resins 4FF	QS01010
rProtein A/G Agarose Resins4FF	QS01011