AbPur rProtein G Kit

目录

1. 产品介绍.....1
2. 纯化流程.....2
3. 在位清洗.....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 Beads 是用于分离和纯化 IgG 的亲和层析介质，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。

AbPur rProtein G Kit 提供 3 ml **rProtein G Beads** 重力预装柱，抗体纯化所需的缓冲液，方便客户使用，操作简单，纯化效率高。试剂盒详细组分见表 3。

表 1. **rProtein G 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 Human 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 1×PBS
储存温度	2 - 8℃

表 2. Protein A 和 Protein G 对不同抗体的结合能力

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

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

Mouse	IgG2b	+++	+++
	IgG3	++	+++
	IgM	variable	—
Pig		+++	+++
Rabbit	no distinction	++++	+++
Rat	IgG1	—	+
	IgG2a	—	++++
	IgG2b	—	++
	IgG3	+	++
Sheep		+/-	++

++++=结合能力强; ++=结合能力中等; —=结合能力弱或没有结合

表 3. AbPur rProtein G Kit 组分

组分名称	货号	规格	数量
AbPur rProtein G Column	SA016GC03	3 ml	1
Ab Binding/Wash Buffer	SLB017100	100 ml	2
Ab Elution Buffer	SLB018100	100 ml	1

2. 纯化流程

2.1 样品准备

上柱之前要确保样品溶液有合适的离子强度和 pH 值，可以用 Binding/Wash Buffer 对血清样品、腹水或细胞培养液稀释，或者样品用 Binding/Wash Buffer 透析。

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

2.2 样品纯化

AbPur rProtein G Kit 提供 1 根填装 3 ml **rProtein G Beads** 的重力预装柱（AbPur rProtein A Column），2 瓶 100 ml 的 Binding/Wash Buffer 和 1 瓶 100 ml 的 Elution Buffer。不需要再进行填料填装和缓冲液配制。整个纯化流程大约需要 30 min（主要取决于样品体积和溶液的粘稠性），操作快捷。使用时参考下面操作说明。

1）将 AbPur rProtein G Column 固定在铁架台上，依次去掉下端塞和上端塞，流干预装柱的保护液。

2）向柱管中加入 5 ml Binding/Wash Buffer 平衡柱子，流干后，再重复 2 次，共使用 15 ml Binding/Wash Buffer。

3）将处理好的样品加入柱管，收集流出液，用于 SDS-PAGE 分析蛋白质的结合情况，在出现问题时，更方便寻找解决问题的方案。

4）向柱管中加入 5 ml Binding/Wash Buffer，进行洗杂，去除非特异性吸附的杂蛋白，收集洗杂液，目的与收集流出液的目的相同，Binding/Wash Buffer 流干后，再重复 5 次，共使用 30 ml Binding/Wash Buffer。

5）使用 15-30 ml 的 Elution Buffer 进行洗脱目的蛋白，分段收集，每 5 ml 收集一管，分别检测，这样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。

注：洗脱组分 pH 需要立即调成中性，一般建议使用洗脱组分体积 1/10 的中和液 1 M Tris-HCl，pH 8.5 进行中和。

6）依次使用 5 ml Binding/Wash Buffer 和 5 ml 去离子水交替平衡填料，重复 2 次，最后再用 5 ml 20%的乙醇平衡填料，重复 1 次，然后保存在等体积的 20%的乙醇中，置于 2-8 ℃保存，防止填料被细菌污染。

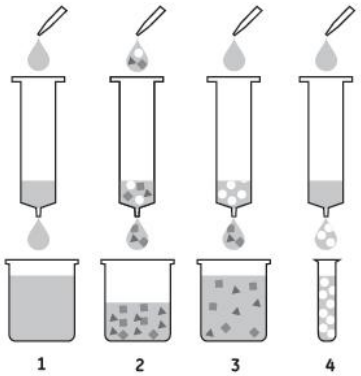

图 1. 使用 AbPur rProtein G Column 纯化蛋白流程

Step 1：柱子平衡；Step 2：上样；Step 3：洗杂；Step 4：洗脱

2.3 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. 在位清洗

rProtein G 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，这时需要对介质进行清洗。

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
柱子流速慢	筛板被堵塞	清洗或更换筛板。
	填料被堵塞	按照第3部分进行介质清洗。
		样品中含有微小的固体颗粒，建议上柱前使用滤膜（0.22或0.45 μm）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 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部分进行介质清洗。

5. 订购信息及相关产品

产品名称	货号	规格
rProtein G Beads	SA016005	5 ml
	SA016025	25 ml
	SA016100	100 ml
	SA016500	500 ml
	SA01601L	1 L
	SA01610L	10 L
AbPur rProtein G Kit	SA016K03	3 次
rProtein G Beads 4FF	SA020005	5 ml
	SA020025	25 ml
	SA020100	100 ml
	SA020500	500 ml
	SA02001L	1 L
	SA02010L	10 L
AbCap G 4FF	SA020C11	1 X 1 ml
	SA020C51	5 X 1 ml
	SA020C15	1 X 5 ml
	SA020C55	5 X 5 ml
	SA020CS	3X1 ml+1X5 ml