

# 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 $\mu\text{m}$  |
| 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 $\mu$ m 或 0.45 $\mu$ m 滤膜过滤。

**平衡/洗杂液:** 0.15 M NaCl, 20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 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 $\mu$ m 或 0.45 $\mu$ 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数 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 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<br>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<br>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 | PGAB005 | 5 ml   |
|                          | PGAB025 | 25 ml  |
|                          | PGAB100 | 100 ml |