

Protein G 亲和层析介质

1、产品描述

金斯瑞 Protein G 亲和层析介质 (L00209) 适用于从生物体液或细胞培养液中一步纯化免疫球蛋白及其亚基或片段。重组 Protein G 配体偶联在 4% 交联度的琼脂糖上, 能够较好地吸附纯化免疫球蛋白。Protein G 亲和层析介质的静态吸附能力 > 20 mg 羊 IgG/ml 介质, 其动态吸附能力会受到目的抗体浓度、上样流速等因素影响而产生变化。表 1 列出了 Protein G 亲和层析介质的主要特点。

Protein G 最早被发现于 G 类链球菌的细胞壁中, 它可与哺乳动物 IgG 上的 Fc 片段结合。天然的 Protein G 有 3 个 IgG 结合位点, 同时还存在白蛋白和细胞表面结合位点。重组 Protein G 去除了多余的结合位点, 只保留 IgG 结合位点, 从而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, 但是它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 比 Protein A 有着更高的亲和力, 如人 IgG3、小鼠 IgG1 和大鼠 IgG2a。与 Protein A 不同, Protein G 不能和人的 IgM、IgD 和 IgA 结合。

表 1:

柱体积	5 ml (10 ml 的 50% 悬浆液)
配体	大肠杆菌中表达的重组 Protein G
IgG 结合位点数量	3
配体相对分子量	约 22 kDa
配体等电点	4.69
偶联密度	约 2 mg 重组 Protein G/ml 介质
吸附量	> 20 mg 羊 IgG/ml 介质
平均粒径	90 μm (45-165 μm)
保护液	1 \times PBS (含 20% 乙醇)
储存&稳定性	2-8 $^{\circ}\text{C}$ 储存 18 个月

2、纯化步骤

试剂准备:

所用缓冲液需采用高纯水配制, 使用前建议用 0.45 μm 滤膜过滤

平衡缓冲液: 20 mM Na_2HPO_4 , 0.15 M NaCl, pH 7.0

洗脱缓冲液: 0.1 M glycine, pH 2.5

中和缓冲液: 1 M Tris, pH 8.5

该纯化步骤以 0.5 ml 柱体积为例, 试剂的用量可以按照实际的树脂量等比例增减。

样品制备:

为有效结合抗体, 上样的样品需要确保一定的离子强度和 pH 值, 通常对血清样品进行稀释处理。腹水或者细胞培养液上清用平衡缓冲液至少进行 1:1 稀释, 或者将样品用平衡缓冲液透析过夜。

装柱操作:

- 1) 充分摇匀重悬树脂, 在新的层析柱中预先加入 1 ml 平衡缓冲液, 然后再吸取 1 ml 浆液至该层析柱中。
- 2) 让树脂自然沉降, 流出平衡缓冲液。
- 3) 加入 5 ml 平衡缓冲液至层析柱中平衡树脂, 按约 1 ml/min 的流速流出平衡缓冲液。

层析纯化：

- 1) 将样品按照约 1 ml/min 的流速上样至层析柱中，收集流出液，用于后续测定树脂的结合能力，如 SDS-PAGE。
- 2) 用 30 ml 的平衡缓冲液洗涤树脂，流速维持约 2 ml/min，或洗至流出液的 A280 吸光度达到稳定。
- 3) 用 10-15 ml 洗脱缓冲液洗脱抗体，流速维持约 1 ml/min，收集含有目的免疫球蛋白的洗脱液，并立刻加入 1/10 洗脱液体积的中和缓冲液，调节 pH 至 7.4。

树脂再生：

再生树脂先用 10 ml 洗脱缓冲液洗涤树脂，再用 5 ml 平衡缓冲液洗涤树脂。层析柱可以再生 10 次而不会有明显的吸附量下降。

树脂储存：

再生后的树脂加入含 20%乙醇的平衡缓冲液置于 2-8℃ 保存。

注意：不能冷冻。

3、故障排除

问题	可能原因	解决方法
层析柱的流速很低 (<0.5 ml/min)	溶液中有小气泡或样品中的颗粒堵塞柱孔	通过离心或过滤去除样品和溶液中的气泡或颗粒；避免树脂干涸。
大量的上样样品已经流出，但是没有检测到特异性的抗体	样品中抗体的浓度太低	建议另选用亲和性树脂纯化（如高亲和力巯基偶联树脂，产品编号：L00403）。
抗体发生降解	抗体对于低 pH 环境很敏感	在洗脱前的接收管中提前加入中和缓冲液。
洗脱液中没有检测到抗体	IgG 亚类不能和 Protein G 结合	尝试其他的亲和层析介质进行抗体纯化，如 Protein A 亲和层析介质或 Protein L 亲和层析介质。

4、相关产品

高亲和 Protein A 亲和层析介质	产品编号：L00400
Protein A 亲和层析介质	产品编号：L00210
Protein L 亲和层析介质	产品编号：L00239
高亲和力巯基偶联树脂	产品编号：L00403
高亲和力巯基偶联试剂盒	产品编号：L00404

南京金斯瑞生物科技有限公司

江苏省南京市江宁科学园雍熙路28号，邮编211100

客服热线：025-58897288-5810

订购邮箱：product@genscript.com.cn

公司主页：<http://www.genscript.com.cn>