

rProtein G Beads 4FF

产品简介：

rProtein G Beads 4FF是用于分离和纯化IgG的亲合层析介质，具体性能见表1。ProteinG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。rProtein G Beads 4FF是以高度交联的4%琼脂糖凝胶为基质，可以在相对较高的流速下进行单克隆抗体和多克隆抗体的纯化

表1. rProtein G Beads 4FF产品性能

指标	性能
介质	高度交联的 4%琼脂糖
平均粒径	~ 45-165
配体	重组蛋白 G
结合载量	> 30 mg 人 IgG/ml 介质
工作 pH	3-10
最大压力	0.3MPa 3bar
储存温度	20% 乙醇， 2℃ - 8℃

纯化流程：

1. Buffer 的准备

所用水和 Buffer 在使用之前建议用 0.22μm 或 0.45μm 滤膜过滤。

结合缓冲液/洗涤缓冲液：0.15 M 氯化钠、20 mM 磷酸氢二钠，pH7.0

洗脱液：0.1 M 甘氨酸，pH 3.0

中和液：1 M Tris-HCl 缓冲液，pH 8.5 。

2. 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，可以用结合/洗涤缓冲液对血清样品、腹水或细胞培养液稀释，或者样品用结合/洗涤缓冲液透析。样品在上样前建议离心或用 0.22μm 或 0.45μm 滤膜过滤，减少杂质，提高蛋白纯化效率和防止堵塞柱子。

3.rProtein G Beads 4FF 装填

rProtein G Beads 4FF 被广泛应用于工业纯化，因此，涉及到各种中压色谱层析柱的填装，下面介绍使用 rProtein G Beads 4FF 填装层析柱的方法。

层析柱的装填（使用储液器装填）

- 1) 用去离子水冲洗层析柱底筛板与接头，确保柱底筛板上无气泡，关闭柱底出口，并在柱底部留出 1-2cm 的去离子水。
- 2) 将树脂悬浮起来，小心的将浆液连续地倒入层析柱中。用玻璃棒沿着柱壁倒入浆液可减少气泡的产生。
- 3) 如果使用储液器，应立即在层析柱和储液器中加满水，将进样分配器放置于浆液表面，连接至泵上，避免在分配器或进样管中产生气泡。
- 4) 打开层析柱底部出口，开起泵，使其在设定的流速下进行。最初应让缓冲液缓慢流过层析柱，然后缓慢增加至最终流速，这样可避免液压对所形成柱床的冲击，也可以避免柱床形成的不均匀。如果达不到推荐的压力或流速，可以用你所使用泵的最大流速，这样也可以得到一个很好的装填效果。（注意：在随后的色谱程序中，不要超过最大装柱流速的 75%）当柱床高度稳定后，在最后的装柱流速下至少再上 3 倍柱床体积的去离子水。标上柱床高度。
- 5) 关闭泵，关闭层析柱出口。
- 6) 如果使用储液器，去除储液器，将分配器至于层析柱中。
- 7) 将分配器推向柱子至标记的柱床高度处。允许装柱液进入分配器，锁紧分配器接头。
- 8) 将装填好的层析柱连接至泵或色谱系统中，开始平衡。如果需要可以重新调整分配器。

4. 样品纯化

- 1) 将 rProtein G Beads 4FF 装入合适的层析柱，层析用 5 倍柱体积的结合液进行平衡，使填料处于与目的蛋白相同的缓冲体系下，起到保护蛋白的作用。
- 2) 将样品加到平衡好的 rProtein G Beads 4FF 中（保证目的蛋白与 rProtein G Beads 4FF 充分接触，提高目的蛋白的回收率），收集流出液。
- 3) 用 10-15 倍柱体积的洗杂液进行清洗，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，收集洗脱液，即目的蛋白组分。
- 5) 依次使用 3 倍柱体积的结合液和 5 倍柱体积的去离子水平衡填料，最后再用 5 倍柱体积的 20% 的乙醇平衡，然后保存在等体积的 20% 的乙醇中，置于 4 度保存，防止填料被细菌污染。

5. 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。

填料清洗：

rProtein G Beads 4FF 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，这时需要对树脂进行清洗。去除一些沉淀或变性物质用 2 倍柱体积的 6M 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。

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。

问题及解决方法：

问题	原因分析	推荐解决方案
柱子反压过高	筛板被堵塞	清洗或更换筛板
	填料被堵塞	按照第 3 部分进行树脂 CIP 清洗
		裂解液中含有微小的固体颗粒，建立上柱前过滤
样品纯化过程中曲线不稳	样品或 buffer 中有气泡	取出样品或柱子中的气泡
		样品和 buffer 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
回收率逐渐减低	上样量太多	减少上样量
	柱子太脏	按照第 3 部分进行树脂 CIP 清洗