

## rProtein A/G Beads

货号: R8281

规格: 2ml/5ml

保存: 2-8°C

指标	性能
基质	4%琼脂糖微球
配体	重组蛋白A/G
载量	>30mg 人 IgG/ml 介质
粒径( $\mu\text{m}$ )	45-165
最大流速	0.1MPa, 1bar
pH 稳定范围	3-10
储存缓冲液	20%乙醇
储存温度	2°C-8°C

### 纯化流程:

本产品分为两种应用: 抗体纯化流程和免疫沉淀流程, 免疫沉淀流程还分为直接法和间接法。下面操作就从这三个方面详细介绍。

#### 1、Buffer 的准备

所用水和 Buffer 在使用之前建议用0.22 $\mu\text{m}$  或0.45 $\mu\text{m}$  滤膜过滤。

结合/洗杂 Buffer: 0.15MNaCl, 20mMNa<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH7.0

洗脱 Buffer: 0.1M 甘氨酸, pH3.0

中和液: 1MTris-HCl pH8.5

交联 Buffer: 0.2M 三乙醇胺, pH8.2

终止液: 50mMTris, pH7.5

#### 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/洗杂缓冲液对血清样品、腹水或细胞培养液稀释, 或者样品用结合/洗杂缓冲液透析。

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

#### 3、抗体纯化流程操作方法

- 1) 将 rProtein A/G Beads 装入合适的层析柱, 层析用 5 倍柱体积的结合 Buffer 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 A/G Beads 中 (保证目的蛋白与 rProtein A Beads 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 Buffer 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 Buffer, 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Buffer 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。
- 6)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。

#### 4、免疫沉淀直接法操作流程

##### 4.1 抗体吸附

- 1)取适量的 rProtein A/G Beads 加入到 2ml 离心管中,500 转离心 1min,吸弃上清。
- 2)加入 0.5ml 结合 Buffer,悬浮填料(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)500 转离心 1min,吸弃上清。再重复两次。
- 3)向步骤 2)平衡的填料中加入抗体溶液,悬浮填料,室温下置于翻转混合仪或者手工轻轻翻转离心管,约 30min后,500 转离心 1min,收集上清液,留待检测。
- 4)向3)的填料中加入 0.5ml 的洗杂 Buffer,悬浮填料,进行清洗,去除非特异性吸附的杂蛋白,500 转离心 1min,吸弃上清。再重复两次。

##### 4.2 抗体交联(备选)

如果需要将抗体和目标抗原复合物共同洗脱,请忽略本步骤,直接进行 4.3。

- 1)向清洗过的填料中加入 1ml 交联 Buffer,500 转离心 1min,吸弃上清。
- 2)再向其中加入 1ml20mMDMP(dimethylpimelimidatedihydrochloride)的交联 Buffer,此试剂需要现用现配,悬浮填料,在室温下置于翻转混合仪或者手工轻轻翻转离心管,促使 Buffer 和填料充分接触,约 30min 后,500 转离心1min,吸弃上清。
- 3)再向其中加入 1ml 终止液,悬浮填料,终止交联反应,在室温下置于翻转混合仪或者手工轻轻翻转离心管,约15min 后,500 转离心 1min,再吸弃上清。
- 4)加入 0.5ml 的洗杂 Buffer,悬浮填料,进行清洗,500 转离心 1min,吸弃上清。再重复两次。

##### 4.3 抗原沉淀反应

- 1)抗原吸附:加入含有抗原的样品,用移液器轻轻吹打使抗原与填料-抗体复合物均匀分散。在室温下置于翻转混合仪或者手工轻轻翻转离心管 10min,使抗原与抗体充分结合,如结合力较弱则可在室温下反应 1h 或者在 4℃下反应过夜。
- 2)洗杂:将上述完成抗原吸附的填料-抗体-抗原复合物进行离心,500 转离心 1min,收集上清液,置于冰上以备后续检测。向离心管中加入 1ml 洗杂 Buffer,用移液器轻轻吹打使填料-抗体-抗原复合物均匀
- 3)分散,然后进行离心分离,500 转离心 1min,弃上清液。再重复洗涤两次。最后加入 1ml 洗杂液,用移液器将填料-抗体-抗原复合物悬液转移至新的 1.5ml 离心管中,并进行离心分离,500 转离心 1min,弃上清液。
- 4)抗原洗脱:提供以下两种抗原洗脱方案,可根据后期检测的需要选择不同的抗原洗脱方法。

变性洗脱法:此方法洗脱的样品适用于 SDS-PAGE 检测。向离心管中加入 25 $\mu$ l SDS-PAGE Loading Buffer 混合均匀,95℃加热 5min。然后进行离心,500 转离心 1min,收集上清液,进行 SDS-PAGE 检测。

非变性洗脱法:此方法洗脱的样品保持原有的生物活性,可用于后期功能分析。向离心管中加入 5 倍柱体积的洗脱 Buffer,用移液器吹打 5 次,混匀,然后在室温下置于翻转混合仪或者手工轻轻翻转离心管,10min 后,离心,500 转离心 1min,吸取上清液,收集洗脱组分,即为目标抗原,收集上清液至新的离心管中,并立即加入十分之一体积的中和液,将洗脱组分 pH 调节至 7.0-8.0,用于后期功能分析。

##### 5 免疫沉淀间接法操作流程

1)抗体与抗原混合：将抗体与含有目的蛋白的裂解液混合，室温震荡孵育 30min-60min，或者 2-8 度孵育过夜，取决于抗体与抗原的结合效率以及抗原的稳定性，需要自己优化结合条件。形成抗原-抗体混合物。

**注意：**抗体的加入量要考虑到下面填料的量，抗体的加入量过多会影响到抗原-抗体混合物与填料的结合。建议抗体加入量为填料 80%的最大载量。

2)填料准备：取适量的 rProtein A/G Beads 加入到 2ml 离心管中，500 转离心 1min，吸弃上清。加入 0.5ml 结合Buffer，悬浮填料（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）500 转离心1min，吸弃上清。再重复两次。

3)抗原-抗体混合物的吸附：将步骤 2.5.1 中得到的抗原-抗体混合物加入到处理好的填料中，均匀，在室温下置于翻转混合仪或者手工轻轻翻转离心管，促使样品和填料充分接触并吸附，约 30min 后，约 30min 后，500 转离心1min，收集上清液，留待检测。

4)洗杂：向上述离心管中加入 0.5ml 的洗杂 Buffer，悬浮填料，进行清洗，去除非特异性吸附的杂蛋白，500 转离心 1min，吸弃上清。再重复两次。

5)抗原洗脱：提供以下两种抗原洗脱方案，可根据后期检测的需要选择不同的抗原洗脱方法。

**变性洗脱法：**此方法洗脱的样品适用于 SDS-PAGE 检测。向离心管中加入 25μl1×SDS-PAGE Loading Buffer 混合均匀，95℃加热 5min。然后进行离心，200 转离心 1min，收集上清液，进行 SDS-PAGE 检测。

**非变性洗脱法：**此方法洗脱的样品保持原有的生物活性，可用于后期功能分析。向离心管中加入 5 倍柱体积的洗脱 Buffer，用移液器吹打 5 次，混匀，然后在室温下置于翻转混合仪或者手工轻轻翻转离心管，10min 后，离心，500 转离心 1min，吸取上清液，收集洗脱组分，即为目标抗原，收集上清液至新的离心管中，并立即加入十分之一体积的中和液，将洗脱组分 pH 调节至 7.0-8.0，用于后期功能分析。

### 填料清洗

rProtein A/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,pH7.4 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%TritonX-100 清洗，然后然后立即用 5 倍柱体积的 PBS,pH7.4 清洗。

常见问题:	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	按照填料清洗部分进行树脂清洗 裂解液中含有微小的固体颗粒，建议上柱前使用滤膜 (0.22or0.45μm)过滤，或者离心去除。
样品纯化过程中曲线不稳	样品或buffer 中有气泡	去除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，载量降低	按照填料清洗部分进行树脂清洗

**ProteinA** 和 **ProteinG** 对不同抗体的结合能力:

种属	亚型	Protein A	Protein G	Protein A/G
<b>Human</b>	<b>IgA</b>	variable	—	++
	<b>IgD</b>	—	—	—
	<b>IgE</b>	—	—	—
	<b>IgG1</b>	++++	++++	++++
	<b>IgG2</b>	++++	++++	++++
	<b>IgG3</b>	—	++++	++++
	<b>IgG4</b>	++++	++++	++++
	<b>IgM</b>	variable	—	++
<b>Avianeggolk</b>	<b>IgY</b>	—	—	—
<b>Cow</b>		++	++++	++++
<b>Dog</b>		++++	++	++++
<b>Goat</b>		—	++++	++++
<b>Guineapig</b>	<b>IgG1</b>	++++	++	++++
	<b>IgG2</b>	++++	++	++++
<b>Hamster</b>		+	++	
<b>Horse</b>	<b>TotalIgG</b>	++	++++	++++
<b>Koala</b>		—	+	
<b>Liama</b>		—	+	
<b>Monkey(rhesus)</b>		++++	++++	++++
<b>Mouse</b>	<b>IgG1</b>	+	++++	++
	<b>IgG2a</b>	++++	++++	++++
	<b>IgG2b</b>	+++	+++	+++
	<b>IgG3</b>	++	+++	+++
	<b>IgM</b>	variable	—	—
<b>Pig</b>		+++	+++	++++
<b>Rabbit</b>	<b>TotalIgG</b>	++++	+++	++++
<b>Rat</b>	<b>IgG1</b>	—	+	++
	<b>IgG2a</b>	—	++++	++++
	<b>IgG2b</b>	—	++	++
	<b>IgG3</b>	+	++	++
<b>Sheep</b>	<b>TotalIgG</b>	+/-	++	++

++++ =结合能力强; ++ =结合能力中等; — =结合能力弱或没有结合