**rProtein G Beads MPB10-2**

**Technical literature is available at:** [**www.mesgenbio.com**](http://www.mesgenbio.com)**. E-mail MesGen Technical Services if you have questions on use of this system: tech@mesgenbio.com**

**产品包装：1×5ml （1×10ml 50% slurry）□ 2×5ml （2×10ml 50% slurry） □**

1. **产品简介**

rProtein G Beads是用于分离和纯化lgG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lgG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lgG、人lgG3和小鼠lgG1，具体结合能力见**表2**。本产品具有很高的物理化学稳定性，配基不易脱落，寿命长，使用方便，应用广泛。

**表1. rProtein G Beads产品性能**

|  |  |
| --- | --- |
| **指标** | **性能** |
| 基质 | 4%琼脂糖微球 |
| 形状 | 球形 |
| 配体 | 重组蛋白G |
| 载量 | >30mg 人lgG/ml介质 |
| 粒径 (μm) | 90（45-165） |
| 最大压力 | 0.1 MPa, 1 bar |
| 最高流速25°C | 450cm/h |
| 推荐流速25°C | <150cm/h |
| pH 稳定范围 | 3-10（长时间）；2-11（短时间）； |
| 储存缓冲液 | 含20% 乙醇的1XPBS |
| 储存温度 | 2°C - 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 结合力** | **Protein G 结合力** |
| Human | IgA | varible | — |
| IgD | — | — |
| IgE | — | — |
| IgG1 | ++++ | ++++ |
| IgG2 | ++++ | ++++ |
| IgG3 | — | ++++ |
| IgG4 | ++++ | ++++ |
| IgGM | varible | — |
| Avian egg yolk | IgY | — | — |
| Cow |  | ++ | ++++ |
| Dog |  | ++ | + |
| Goat |  | — | ++ |
| Guinea pig | IgG1 | ++++ | ++ |
| IgG2 | ++++ | ++ |
| Hamster |  | + | ++ |
| Horse |  | ++ | ++++ |
| Koala |  | — | + |
| Liama |  | — | + |
| Monkey(rhesus) |  | ++++ | ++++ |
| Mouse | IgG1 | + | ++++ |
| IgG2a | ++++ | ++++ |
| IgG2b | +++ | +++ |
| IgG3 | ++ | +++ |
| IgGM | varible | — |
| 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**

1. **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0.22μm或0.45μm滤膜过滤。

**结合/ 洗杂缓冲液 :** 0.15M NaCl, 20 mM Na2HPO4, pH 7.0 **洗脱缓冲液 :** 0.1M甘氨酸，pH 3.0 **中和液 :** 1M Tris-HCl，pH8.5

2.2 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。

2.3 样品纯化

1) 将rProtein G Beads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中（保证目的蛋白与rProtein G 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，最后用5倍柱体积的20%的乙醇平衡，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。

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。

1. **填料清洗**

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。

1. **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 | 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 (0.22或0.45μm) 过滤，或者离心去除。 |
| 样品流速过低 | 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部分进行树脂清洗 |

**仅供研究，不得用于临床诊断**