Beijing Solarbio Science & Technology Co., Ltd
Tel: 010-56371207
Fax: 010-56371281/82
Http://www.solarbio.cn

rProtein A/G Beads

货号：R8280

规格：5ml

保存：2-8℃

产品介绍：

rProtein A/G Beads 是将 rProtein A/G 高密度定向偶联到琼脂糖凝胶微球表面，该产品具有更高的抗体结合能力和较低的蛋白非特异吸附率，洗脱条件更均一，一步纯化即可从血清样品中分离出纯度大于 90%的抗体。

rProtein A/G Beads 产品性能：

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

Protein A 和 Protein G 对不同抗体的结合能力 ：

种属	亚型	Protein A	Protein G	Protein A/G
Human	**IgA**	varible	—	++
	IgD	—	—	—
	IgE	—	—	—
	IgG1	++++	++++	++++
	IgG2	++++	++++	++++
	IgG3	—	++++	++++
	IgG4	++++	++++	++++
	IgM	varible	—	++
Avian egg yolk	**IgY**	—	—	—
Cow		++	++++	++++
Dog		++++	++	++++

Goat		—	++++	++++
Guinea pig	**IgG1**	++++	++	++++
	IgG2	++++	++	++++
Hamster		+	++	
Horse	**Total IgG**	++	++++	++++
Koala		—	+	
Liama		—	+	
Monkey(rhesus)		++++	++++	++++
Mouse	**IgG1**	+	++++	++
	IgG2a	++++	++++	++++
	IgG2b	+++	+++	+++
	IgG3	++	+++	+++
	IgM	variable	—	—
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

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 0.22μm 或 0.45 μm 滤膜过滤。

结合/ 洗杂 Buffer： 0.15M NaCl，20 mM Na_2HPO_4，pH 7.0

洗脱 Buffer： 0.1M 甘氨酸，pH 3.0

中和液： 1M Tris-HCl，pH8.5

交联 Buffer：0.2M 三乙醇胺，pH 8.2

终止液： 50 mM Tris，pH 7.5

2、样品准备

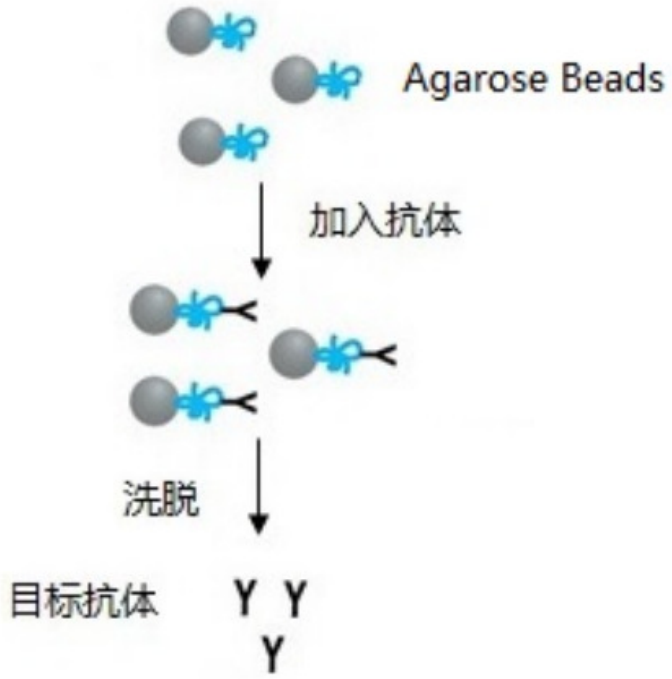
上柱之前要确保样品溶液有合适的离子强度和 pH 值，可以用结合/洗杂缓冲液对血清样

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 0.22μm 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、抗体纯化流程操作方法

抗体纯化流程示意图如下：



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。

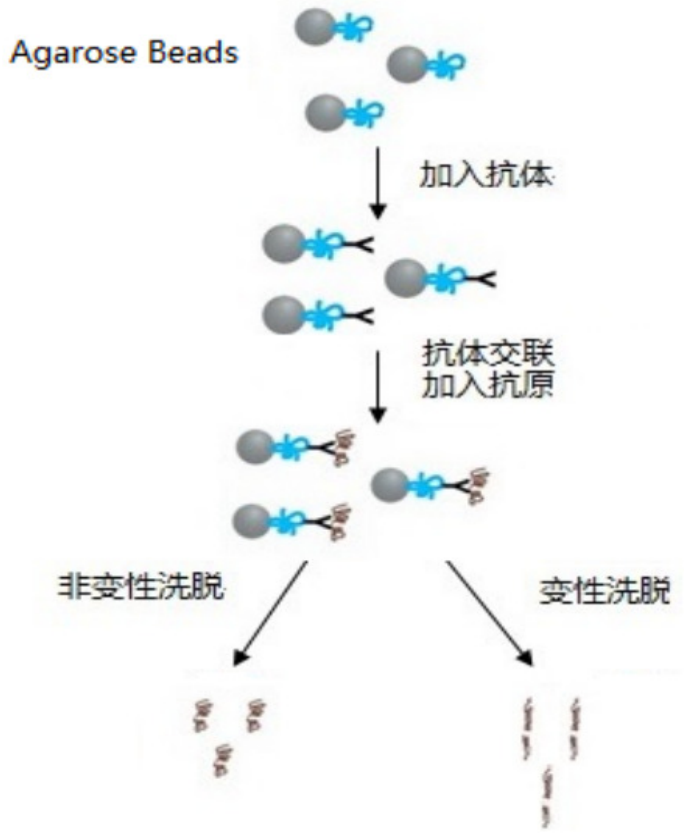
4) 使用 5-10 倍柱体积的洗脱 Buffer，收集洗脱液，即目的蛋白组分。

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

免疫沉淀直接法操作流程示意图如下：



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 1ml 20 mM DMP（dimetyl pimelimidate dihydrochloride）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 1.5 ml 离心管中，并进行离心分离，500 转离心 1min，弃上清液。

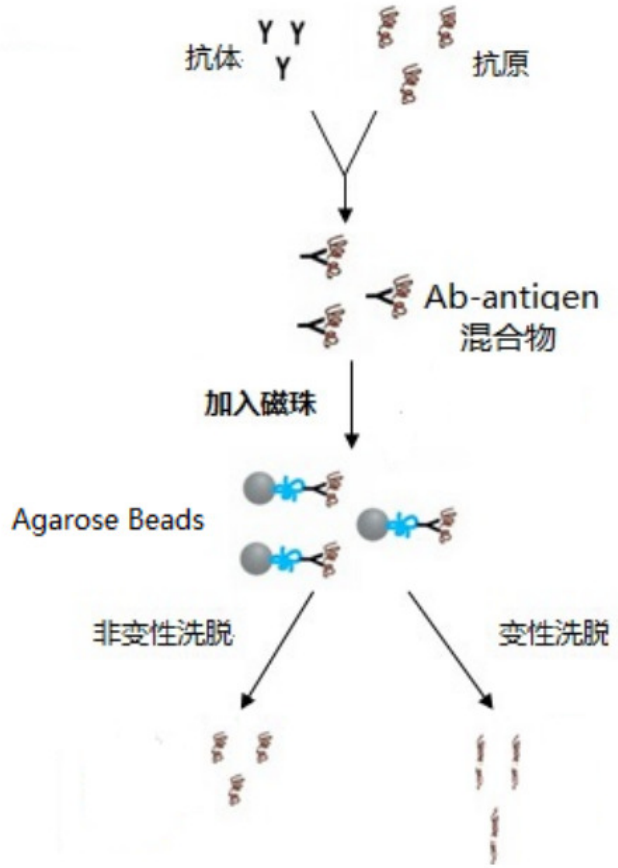
3) 抗原洗脱：提供以下两种抗原洗脱方案，可根据后期检测的需要选择不同的抗原洗脱方法。

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 25μl 1×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

免疫沉淀间接法操作流程示意图如下：



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 25μl 1×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, 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。

问题及解决方案

	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 (0.22 or 0.45 μm) 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