碧云天 Beyotime

碧云天网站 微信公众号

碧云天生物技术/Beyotime Biotechnology
订货热线: 400-1683301或800-8283301
订货e-mail: order@beyotime.com
技术咨询: info@beyotime.com
网址: http://www.beyotime.com

Protein G Agarose (Fast Flow, 5ml)预装柱

产品编号	产品名称	包装
P2027	Protein G Agarose (Fast Flow, 5ml)预装柱	1个

产品简介：

- 碧云天的Protein G Agarose (Fast Flow)预装柱(Protein G Agarose Prepacked Column, Fast Flow)是一种简便、快速、高效的用于抗体纯化、免疫沉淀(Immunoprecipitation, IP)或免疫共沉淀(Co-IP)的即用型预装柱，也称层析柱(Chromatography column)或纯化柱(Purification column)。本产品也可用于实验中抗原抗体复合物的分离纯化。**特别注意：**使用本产品对结合的抗体或抗体复合物进行洗脱时，会有微量Protein G脱落，洗脱后的样品不适合用于Western等需要二抗的检测，但适合用于抗原蛋白复合物的质谱分析等不需要使用二抗的检测。
- Protein A是一种发现于金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的细胞壁表面蛋白，分子量为42kDa；Protein G是C型或G型链球菌(Streptococcal bacteria)表达的免疫球蛋白结合蛋白。Protein A和Protein G功能相似，能特异性地与哺乳动物免疫球蛋白(Immunoglobulin, Ig)结合，结合的部位通常为免疫球蛋白的Fc区，但有资料显示Protein A也会和人VH3家族的Fab区结合，而Protein G有时与Fab区也有一定结合。同时，两者对于不同的免疫球蛋白亚类的结合能力有所不同。适当重组改造的Protein A、G与琼脂糖凝胶(agarose)以一定的方式结合，可用于免疫沉淀或抗体的纯化。
- **使用本品经过一步亲和层析，即可从样品中得到高纯度的抗体，应用广泛。**本产品为即用型预装柱，适合于培养液、血清、腹水或杂交瘤细胞培养上清中的IgG的纯化，或含Fc片段的重组蛋白的纯化。Protein G Agarose适合于免疫沉淀human IgG_1、IgG_2、IgG_3、IgG_4，mouse IgG_1、IgG_{2a}、IgG_{2b}、IgG_3，rat IgG_1、IgG_{2a}、IgG_{2b}、IgG_{2c}，以及rabbit、goat多克隆抗体。下表是碧云天Protein A、Protein G、Protein A+G Agarose产品与人、小鼠、大鼠常见的免疫球蛋白亚类的结合能力及不同物种的总结合能力情况表。

Species	Ig	Protein A	Protein G	A+G
Human	IgG_1	++++	++++	++++
	IgG_2	++++	++++	++++
	IgG_3	-	++++	++++
	IgG_4	++++	++++	++++
	IgA	++	-	++
	IgD	++	-	++
	IgE	++	-	++
	IgM	++	-	++
Mouse	IgG_1	+	++++	++++
	IgG_{2a}	++++	++++	++++
	IgG_{2b}	+++	+++	+++
	IgG_3	++	+++	+++
	IgM	+/-	-	+/-
Rat	IgG_1	-	+	+
	IgG_{2a}	-	++++	++++
	IgG_{2b}	-	++	++
	IgG_{2c}	+	++	++
	IgM	+/-	-	+/-

Total Ig	Protein A	Protein G	A+G
Human	++++	++++	++++
Mouse	+++	+++	+++
Rat	+/-	++	++
Rabbit	++++	+++	++++
Goat	-	++	++
Chicken	-	+	+
Cow	++	++++	++++
Guinea Pig	++++	++	++++
Hamster	+	++	++
Horse	++	++++	++++
Pig	+++	+++	+++
Sheep	+/-	++	++

++++: Strong Binding
++~+++: Medium Binding
+: Weak Binding
+/-: Weak or No Binding
-: No Binding

- **本预装柱中使用的Protein G为重组蛋白，特异性强。**本产品中的重组Protein G可与多数哺乳动物IgG的Fc端特异性结合，分子量为22.5kDa。该重组Protein G通过改造，仅保留了与IgG Fc端结合相关的氨基酸序列，去除了结合位点以外可能导致非特异性结合的序列，从而可以有效减少非特异性结合。每个Protein G分子可以结合2个IgG。
- **本预装柱中的琼脂糖物理化学稳定，有相对较高的线性流速。**本产品中的Protein G共价连接到4%的高交联度、高流速琼脂糖(cross-linked, 4% Agarose, Fast Flow)上。每毫升Protein G agarose beads (沉淀物)中共偶联有约4mg的重组Protein G。每毫升Protein G agarose beads (沉淀物)可以结合约18-40mg human IgG。本产品中agarose beads的平均直径为90μm，蛋白纯化时的推荐线性流速为50-400cm/h，耐压指数为0.008MPa。
- **本预装柱可重复次数多。**本预装柱再生后，重复使用3-5次几乎不影响其结合能力。

- **本预装柱具有标准接口，使用方便。**本类型的预装柱为高纯度聚丙烯柱体，低吸附，规格有1ml和5ml两种，鲁尔接口，可适配商品化的各类中压液相纯化系统，如ÄKTA系统(也被称为AKTA系统)等；如果使用注射器或蠕动泵，需要相应的接头进行连接，否则容易出现预装柱内部压力过高而导致推不动甚至漏液的情况，如果没有相应的接头，不推荐连接注射器或蠕动泵使用。
- 本类型的预装柱有1ml和5ml两种，相应的体积为Protein G Agarose在预装柱中压实后的体积，并保存在20%乙醇溶液中。

包装清单：

产品编号	产品名称	包装
P2027	Protein G Agarose (Fast Flow, 5ml)预装柱	1个
—	说明书	1份

保存条件：

4℃保存，一年有效。请勿冷冻。

注意事项：

- 请勿冷冻保存本产品。
- 包装中的下堵头请保存好，用于预装柱再生后的密封。
- 从蛋白样品收集开始，所有步骤中蛋白样品都必须在4℃或冰上操作。
- 请按照IgG最大结合量的80%以内准备样品，抗体纯化效果更佳。一般血清的总IgG含量在10-15mg/ml。细胞培养上清中的抗体浓度与杂交瘤克隆密切相关，胎牛血清(FBS)中的抗体也同时会被纯化。
- 无论是首次使用预装柱，还是再生后使用，都需要严格按照使用说明充分平衡预装柱。平衡不充分会严重影响预装柱的蛋白结合量。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明：

1. 需要用户自己准备的试剂

a. Binding buffer (结合缓冲液)：碧云天的PBS (C0221A)或PBS pH7.4
b. Elution buffer (洗脱液)：100mM glycine, pH2-3
c. Neutralization buffer (中和缓冲液)：碧云天的1M Tris-HCl, pH8.8 (ST788)
d. Storage solution (凝胶保存液)：20%乙醇

2. 准备工作

a. 用0.45微米或0.2微米孔径的滤膜过滤所用的溶液。
b. 所有的溶液必须用超声等方法脱气(degas)。
c. 将预装柱和所有溶液平衡至室温。

3. 抗体纯化

a. **稀释：**为确保样品溶液有合适的离子强度和pH值，上柱之前先用Binding buffer至少按1:1比例稀释血清、腹水或细胞培养液样品；也可将样品装入截留分子量为3.5kDa的透析袋中，于4℃冰箱中用Binding buffer透析过夜。
注意：血浆样品在稀释过程中有可能由于血浆中的脂蛋白沉淀而浑浊，只需10,000g离心20分钟取上清即可。

b. **平衡：**安装好预装柱，打开预装柱上面的帽子(上堵口)，连接纯化系统的Binding buffer，折断或剪断下口，用10倍柱体积的Binding buffer洗涤并平衡预装柱。对于规格为1ml的预装柱，流速可以控制为1ml/min；对于规格为5ml的预装柱，流速可以控制为5ml/min。使预装柱中的琼脂糖凝胶处于与目的蛋白相同的缓冲体系下，起到保护蛋白的作用。在洗涤和平衡过程中勿使预装柱滴干。

c. **上样：**混匀稀释的样品，避免产生气泡。把样品从预装柱的上端加入，建议流速为1ml/min (1ml预装柱)或5ml/min (5ml预装柱)，这样能保证目的蛋白与琼脂糖凝胶充分接触，提高目的蛋白的回收率。同时收集穿流液(flow-through)，待检测。为了获得更好的抗体结合效果可将穿流液再上样，重复2遍(或将样品1次性加入层析柱后置于摇床上，轻轻摇动，结合30min)。
注意：如果样品的粘度比较大，即使上样体积比较少，也会造成预装柱有很大的反压，所以如果样品粘度大，需要适当稀释。同时，上样量勿超过柱子的最大结合能力，一般不超过80%为宜，而且大量的样品体积也可能造成很大的反压，使得进样器较难使用。

d. **洗涤：**样品结合后，用20倍柱体积的Binding buffer洗涤预装柱以去除非特异性吸附的杂蛋白，建议流速为1ml/min，收集洗涤液。洗涤过程中勿让预装柱滴干。洗涤是否完全可以通过测定收集的洗涤液的280nm吸光度，最后的洗涤液的吸光度应该和Binding Buffer的吸光度或通过色谱系统测定紫外吸收达到一个稳定的基线而确定。

e. **洗脱和中和：**按每毫升洗脱液加入100µl Neutralization buffer的比例，在收集管中预先加入适量Neutralization buffer。在上一步洗涤完后，通常按5倍柱体积的Elution buffer洗脱结合的抗体。收集洗脱液，每管0.5ml-1ml。

f. 分管收集洗脱下的抗体，根据蛋白浓度、SDS-PAGE电泳或后续的检测效果确定洗脱峰在哪几个收集管中。

g. 根据使用目的保存样品或将收集的蛋白透析到其目的储存液中。

4. 预装柱的再生

a. 用5倍柱体积的Regeneration Buffer (100mM glycine, pH2.0)洗涤预装柱。
b. 用5倍柱体积去离子水清洗预装柱。
c. 用5倍柱体积的Storage solution平衡预装柱，最后保存在等体积的Storage solution中，下堵口旋紧后4℃保存。

5. 纯化样品的检测

将纯化过程中得到的样品(包括原始样品、穿流液、洗涤液及洗脱液)用SDS-PAGE进行检测，判定其纯化效果。

常见问题：

问题	可能原因	推荐解决方法
预装柱流速过慢(如<0.5ml/min)	样品注射时产生气泡或过柱溶液中有气泡，导致填料孔被微小气泡堵塞	样品注射时严格遵守操作规程以避免气泡产生；对过柱溶液进行脱气处理
没有纯化得到目标抗体或纯化量很少	样品中抗体浓度太低	使用抗原偶联的介质进行目标抗体的纯化；更换培养条件，如使用无血清培养基等
没有纯化得到目标抗体或纯化量很少	选择的预装柱种类不正确	根据抗体的免疫球蛋白亚类选择合适的预装柱产品
目标抗体虽被纯化但发生明显的降解	抗体对低pH的Elution buffer或Neutralization buffer较为敏感	在蛋白收集管中预先加入Neutralization buffer，然后再进行抗体的洗脱和收集；抗体收集好后即时进行脱盐或将其透析到合适的缓冲液中
纯化量逐渐减低	上样量太大；柱子太脏，载量降低	减少上样量；清洗和再生预装柱

相关产品：

产品编号	产品名称	包装
P2006	Protein A Agarose (Fast Flow, 进口分装)	2ml
P2009	Protein G Agarose (Fast Flow, 进口分装)	2ml
P2012	Protein A+G Agarose (Fast Flow, 进口分装)	2ml
P2015-2ml	Protein A Agarose (Fast Flow)	2ml
P2015-10ml	Protein A Agarose (Fast Flow)	10ml
P2015-50ml	Protein A Agarose (Fast Flow)	50ml
P2017-2ml	Protein G Agarose (Fast Flow)	2ml
P2017-10ml	Protein G Agarose (Fast Flow)	10ml
P2017-50ml	Protein G Agarose (Fast Flow)	50ml
P2019-2ml	Protein A+G Agarose (Fast Flow)	2ml
P2019-10ml	Protein A+G Agarose (Fast Flow)	10ml
P2019-50ml	Protein A+G Agarose (Fast Flow)	50ml
P2024	Protein A Agarose (Fast Flow, 1ml)预装柱	1个
P2025	Protein A Agarose (Fast Flow, 5ml)预装柱	1个
P2026	Protein G Agarose (Fast Flow, 1ml)预装柱	1个
P2027	Protein G Agarose (Fast Flow, 5ml)预装柱	1个
P2028	Protein A+G Agarose (Fast Flow, 1ml)预装柱	1个
P2029	Protein A+G Agarose (Fast Flow, 5ml)预装柱	1个

Version 2019.08.06