

# IgG 抗体纯化

本 Protocol 为实验室保留 protocol (Batch 法, Modify from Zoltan's), 该方法通过 Protein A 或 Protein G Agarose Beads 结合、富集抗体, 是收到抗体血清后需要立即做的工作

## 收到血清当天:

1. 将血清分装到新的离心管中, 使用水平转子 4°C, 4000 rpm 离心 20 分钟, 去除血细胞等沉淀物, 使用预冷的 10 mL、1.5 mL 管分装 8 mL 或 1 mL, 注意用 Parflim 膜封口并做好标记(日期、种属、抗原、分装人等)

PS: 如果需要, 这里可以保留 50  $\mu$ L 血清直接兑 50  $\mu$ L 灭菌甘油保存在 -20°C, 亦可以保留 200  $\mu$ L 暂存于 4°C 冰箱用于接下来的抗体纯化

## 抗体纯化前一天:

! 准备试剂, 抗体为长期保存试剂, 本实验所有溶液需要用超纯水新鲜配制并灭菌

2. 配制 PBS 4 L, 高压灭菌, 降至室温后温后放入 4°C 冰箱预冷(其中 3 L 用于三轮透析)
3. 配制 10 mL PBST (PBS + 0.05% Triton X-100):
  - 该试剂用于洗 Beads, 每次实验提前新鲜配制, 每个样品约使用 10 mL
  - 取 10 mL 灭菌后的室温 PBS 加入 5  $\mu$ L Triton X-100, 室温 rotor 过夜, 彻底溶解后放冰箱预冷
4. 配制 50 mL 0.1M Glycine-HCl (pH=2.7): 用 40 mL H<sub>2</sub>O 溶解 0.375 g Glycine, 用盐酸调 pH 至 2.7, 定容至 50 mL, 0.22  $\mu$ m 过滤除菌, 分装至 1.5 mL 小离心管中, -20°C 保存, 每个样品使用量约 1 mL
5. 100 mL 1M Tris-Cl (pH=8.8): 用 80 mL H<sub>2</sub>O 溶解 12.1 g Tris, 加盐酸调 pH 至 8.8, 加 H<sub>2</sub>O 定容至 100 mL, 分装到 50 mL 管中高压蒸汽灭菌, 降温后冻 -20°C 保存, 每个样品使用量约 50  $\mu$ L

! 不要使用配制蛋白胶时的 Tris·HCl pH=8.8 试剂

## 实验当天:

5. 洗 Beads: 用 1 mL 冰 PBST 洗 Beads, 50  $\mu$ L Protein A 或 Protein G Agarose Beads, 4°C, 500 g, 低升降速, Soft 模式离心 3 min。移去上清, 共洗 3 次, 最后一次剩余的 PBST 正好没过 Beads(不用吸干, 防止 Beads 干掉)

Protein A/G 可以特异结合 IgG, 结合能力约为 50 mg IgG/mL

对于兔子血而言, 选择 Protein A

！本实验中凡是对 Beads 的离心要选择 low deceleration, Eppendorf 5424R Soft 模式(在最初这次洗 Beads 时, 可以不用 4°C, 掌上离心机 20 秒就可以)

！取出 Beads 后, 原装 Beads 的瓶子用 Parfilm 膜封口, 防止挥发

6. 稀释血清: 将血清与冰 PBS 1:1 混合, 700  $\mu$ l + 700  $\mu$ l, 4°C, 13200 rpm, 5 min, 取上清, 去除杂质

实际上**使用 200 $\mu$ L 血清+200 $\mu$ L PBS**, 可以饱和 Beads, 得到足够量的抗体

7. 将血清稀释液的上清加入洗好的 Beads 后, parafilm 封口, 放入 50 mL 套管中, 4°C 15 rpm rotor 1 小时
8. 结合完成后, 将上述混合液离心 4°C, 500 g, 3 min, 将上清转移入另一个干净的离心管中, 4°C 保存, 不要丢弃, **取样 A 15  $\mu$ L**
9. Wash Beads: 将留下的 Beads 用 1 mL 的冰 PBST 重悬, 4°C, rotor 5 min。4°C, 500 g, 离心 3 min。共洗 5 次, 最后一次用 200  $\mu$ L 的枪尽量将残余的 Buffer 吸走
10. 洗脱: 用 100  $\mu$ L 0.1M Glycine-HCl(pH=2.7)加入 Beads 中, 冰上放置 5 min, 每分钟混匀一下(温和混匀, 防止 Beads 挂壁), 离心 4°C, 500 g, 3 min, **上清即为 E1** (浓度高)
11. 将 E1 加入含有 6  $\mu$ L Tris-Cl(1M pH=8.8)的新的离心管中进行中和, 用 pH 试纸检测 pH 是否在 7.5 左右  
！历史经验: 每次先加入 6  $\mu$ L, 检测 pH 是否在 7.5 左右, 若不行, 再酌情加入。加入 8  $\mu$ L 后 pH 为 8.0, 加入 6  $\mu$ L 后 pH 为 7.7
12. 使用 SigmaPrep™ spin column 将 E1 过滤  
先使用 **500  $\mu$ L 的洗脱液(500  $\mu$ L Glycine-HCl+30  $\mu$ L Tris-Cl)**洗柱子, 4°C, 8200g 离心 1 min 将柱子放入新的 1.5 mL 管中, 加入 E1, 离心 4°C, 8200 g, 1 min, 进行过滤
13. 重复洗脱和过滤的步骤, **洗脱得到上清 E2** (浓度低), 用同一个 SigmaPrep™ spin column 将 E2 过滤,
14. 在余下的 Beads 加 100  $\mu$ L PBST, **取样 B 1.5  $\mu$ L**
15. 用 NanoDrop 初步检测纯化的 IgG 的浓度, 用 280 nm 波长进行测量, 一般浓度约 5-20 mg/mL, 根据浓度将 E1、E2 稀释到 2 mg/mL 后, 加入透析袋中使用 PBS 进行三轮透析
16. 收集透析袋中的 IgG, 再次测浓度(将浓度稀释至 1 mg/mL), **取样 C 1.5  $\mu$ L**
17. 向 IgG 中加入 NaN<sub>3</sub> (母液为 10%, 终浓度为 0.04 %, 250 $\times$ )、BSA(母液 3%, 终浓度为 1 mg/mL, 30 $\times$ )后即可储存在 4°C 冰箱, 进行后续抗体检测(WB 及 IF), 如抗体可以使用, 每管 30  $\mu$ L 分装, 液氮速冻后保存于 -80°C  
！从 -80°C 新取出的抗体, 加等体积的 100% 灭菌甘油后可储存在 -20°C 冰箱
18. 对所收取的样品做 10% SDS-PAGE 检测(IgG 的重链在约 55 kDa 的位置, 轻链在约 25 kDa 的位置), 样品 A、B、C 都全部上样, 上样 0.5  $\mu$ g 和 1  $\mu$ g BSA 作为对照, 考染

修订日期 2024-04-23

**JWangL5**