

Protein A/G 琼脂糖凝胶

Cat# : A0134

(本品仅用于科学研究,不可用于诊断及治疗)

1. 背景信息

本产品由高品质的 Protein A/G 蛋白质与琼脂糖凝胶共价偶联制成,可用于免疫沉淀 (IP),也可用于免疫共沉淀 (Co-IP)、染色质 IP (ChIP) 或 RNA IP (RIP)。本产品具有高载量 (可进行 50 次常规 IP 操作);操作迅速便捷 (最短可在 40 分钟内完成一个 IP 流程);特异性强,非特异性吸附低;可结合范围广 (与常见哺乳动物的 IgG 均可以结合) 等特点。

2. 性能指标

应用范围: 来源于细胞裂解液、细胞分泌液上清、血清、动物腹水等样品的多个物种的 IgG 类蛋白质 (包含大部分 IgG 亚型) 的免疫 (共) 沉淀。

偶联物属性: 高纯度的重组 Protein A/G 蛋白质

凝胶属性: 琼脂糖凝胶颗粒,平均粒径 50um。

强度: 采用酸性洗脱法,可反复使用 5 次以上。

成分: 2mL PBS (含 0.02% 叠氮钠) 悬液中,含有 0.5mL 共价偶联 Protein A/G 的凝胶。

保存方法: 在加入了 0.02% 叠氮钠和 50%甘油的 PBS 保存液中,-20°C可保存 1 年。

3. 用前必读

以下试剂及设备,需要客户自备,试剂推荐配方见说明书附件 1,推荐抗原制备方案见 3。

重力纯化柱 1 个, 1.5mL 离心管若干, 离心机

细胞裂解液, 酸性洗脱液, 中和液, PBS, PBST, 2x 蛋白上样缓冲液

待测抗原样品及检测抗体

注意事项 (开箱前必读)

3.1 本产品-20°C可保存 1 年,冷藏条件下运输。

3.2 各物种的抗体 (IgG, IgM, IgA, IgD) 与 Protein A/G 结合亲和力不同,使用请认真阅读本说明书附件 2。

3.3 勿冷冻、干燥凝胶,勿使用超声处理凝胶。勿使酸处理凝胶时间超过 10min。

3.4 以下操作步骤,使用凝胶悬液用量为 40 μ l (含 10 μ l 凝胶),可从 15 μ l 血清或者 100 μ l 细胞上清中结合 20ug IgG,请根据待结合抗体量,调节凝胶使用量。

4. 使用方法 (所有步骤尽可能在冰上进行,以避免目标蛋白质降解。)

4.1 血清及分泌表达抗原处理

如果目标蛋白质含量较高,建议用 1xPBS 稀释样品至目标蛋白质终浓度为 10-100 μ g/mL, -20°C 保存使用。

4.2 细胞裂解液制备

3.2.1 悬浮细胞和半贴壁细胞从细胞培养瓶上吹下来后放入离心管中, 1000rpm 离心 5 分钟。贴壁细胞用细胞刮子轻轻从瓶壁上刮下来, 放入离心管中 1000rpm 离心 5 分钟。

- 3.2.2 预冷的 1xPBS 重悬细胞，1000rpm 离心 3min，弃上清。重复一次。
- 3.2.3 根据细胞的量加入相应体积的细胞裂解液，(例如：T75 细胞瓶底部细胞汇合度大于 90%，一般约 $0.5-1 \times 10^7$ 细胞，需要加入 1mL 细胞裂解液)。反复吹打后冰上放置 10-20min，让细胞充分裂解。
- 3.2.4 用超声破碎仪将细胞裂解液超声，直至细胞裂解液透明，不再粘稠。冰上放置 30min 之后，12000rpm，4°C 离心 10min。取上清，-80°C 冷冻保存。

5. 操作过程

4.3 装柱及孵育

- 4.3.1 处理检测抗体：根据实验目的，用 1xPBS 将抗体总体积调整至 500 μ L。
- 4.3.2 将凝胶充分混悬，取 20 μ L 凝胶悬液 (含 5 μ L 凝胶)，置于 1.5 mL EP 管中，加入 250 μ L 1xPBS，充分混悬，置于 1.5ml 离心管中，1000rpm x 30sec，离心弃上清；重复以上洗涤步骤 2 次。
- 4.3.3 将稀释好的抗体加入预洗好的凝胶，轻柔混匀，在摇床上室温孵育 10min。
- 4.3.4 1000rpm x 30sec，离心，保存上清液至新的 EP 管中，以备后续继续使用。
- 4.3.5 加入 250 μ L 1xPBS，温和混匀，清洗凝胶，1000rpm x 30sec，弃上清。重复四次。

4.4 抗原与抗体-凝胶复合物结合

- 4.4.1 加入 200 μ L 准备好的抗原样品 (见 4.1 和 4.2)，轻柔混匀，在摇床上室温孵育 10min (如果抗体亲和力不够，4°C 孵育 2hr 以上)。
- 4.4.2 1000rpm x 30sec，离心弃上清。加入 250 μ L 1xPBST，温和混匀，清洗凝胶，1000rpm x 30sec，离心弃上清。重复四次。

4.5 抗原洗脱

本说明书提供以下两种抗原洗脱方案，请根据后期检测的需要选择不同的抗原洗脱方法。

- 4.5.1 变性洗脱法：此方法洗脱的样品适用于 SDS-PAGE 检测。
步骤：将凝胶移至 1.5ml 离心管分离凝胶，离心，弃上清，向凝胶中加入 10 μ L 2x 上样缓冲液，按体积调整至 1x，混合均匀，95°C 煮样 5 mins。分离凝胶，收集上清，进行 SDS-PAGE。
- 4.5.2 酸性洗脱法：此方法洗脱的抗原，可用于后期功能分析。
步骤：向凝胶中加入 100-200 μ L 酸性洗脱液，室温孵育 10 mins；换新的收集管，1000rpm x 30sec，收集上清至新的收集管，并立即滴入总体积 1/10 体积的中和缓冲液，将洗脱产物 pH 调节至中性，样品用于后期功能分析。
注意：酸性环境会缩短凝胶的使用寿命，应尽量缩短凝胶与酸性洗脱液的接触时间，不超过 10min。

注：本步骤洗脱的抗原为抗原-抗体复合物，如操作者需要单独洗脱目标抗原，推荐使用交联剂，并按相关实验说明操作。

附件 1. 推荐试剂配方

组分	内容物/配方
细胞裂解液	50 mM Tris HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, and 1% Triton X-100 (使用说明见 3.2)
酸性洗脱液	0.15M Glycin-HCl 缓冲液, pH2.5-3.0
中和液	1M Tris HCl 缓冲液, pH8.0
2x 上样缓冲液	125mM Tris HCl, pH6.8, with 4% SDS, 20%glycerol and 0.004% bromphenol blue
10xPBS, pH7.5	Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O 35.8g, NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O 2.8g, NaCl 89g, 溶于 1L dd H ₂ O, 加入 0.02% Azide (使用时须用双蒸水稀释 10 倍成 1xPBS)
1xPBST	1xPBS, 0.1% Tween-20, pH7.5

附件 2 Protein A/G 与各物种 IgG 结合的亲和力

Human	Total IgG	+++++
	IgG1	+++++
	IgG2	+++++
	IgG3	+++++
	IgG4	+++++
	IgM	+
	IgD	-
	IgA	+
	IgE	+++
	Fab	+
	ScFv	+
Mouse	Total IgG	+++++
	IgM	-
	IgG1	+++
	IgG2a	+++++
	IgG2b	+++++
	IgG3	+++++
Rat	Total IgG	+++
	IgG1	+++
	IgG2a	+++++
	IgG2b	+
	IgG2c	+++++

Cow	Total IgG	+++++
	IgG1	+++++
	IgG2	+++++
Goat	Total IgG	+++++
	IgG1	+++++
	IgG2	+++++
Shhep	Total IgG	+++++
	IgG1	+++++
	IgG2	+++++
Horse	Total IgG	+++++
	IgG(ab)	+
	IgG(c)	+
	IgG(T)	+++++
Rabbit	Total IgG	+++++
Guinea Pig	Total IgG	+++++
Hamster	Total IgG	+++
Pig	Total IgG	+++++
Donkey	Total IgG	+++++
Cat	Total IgG	+++++
Dog	Total IgG	+++++
Monkey	Total IgG	+++++
Chicken	Total IgY	-