

rProtein A/G Agarose Beads 4FF (QS01011)

目录

一、 产品介绍.....	1
二、 纯化流程.....	1
三、 订购信息.....	4

一、 产品介绍

千株松rProtein A/G Agarose Beads 4FF (QS01011) 是一种能从生物体液、细胞培养基中便捷、一站式纯化免疫球蛋白及其子类或片段的亲和层析介质。rProtein A/G 配体与 4% 交联度的琼脂糖偶联，能够较好地吸附和纯化免疫球蛋白。rProtein A/G 亲和层析介质的静态吸附能力 10-15 mg IgG/mL 介质，其动态吸附能力会受到目的抗体浓度、上样流速等因素影响而产生变化。

本产品主要用于免疫沉淀(IP)以及免疫共沉淀(Co-IP)研究，也可用于抗体固定及其它相关研究。用户可根据目标抗体的种属来源及亚型选择微球的类别，Protein A，Protein G 和 Protein A/G 与不同抗体的亲和性比较参见表 2

表1、 rProtein L Agarose Beads 4FF产品特点

基质	4% 高刚性琼脂糖
粒径范围	45-165 μ m
平均粒径	70 \pm 5 μ m
结合载量	10-15mg IgG/mL 填料
化学稳定性	所有常用缓冲溶液中稳定
流速	\leq 500cm/h
操作压力	\leq 0.3MPa
贮存溶液	20% 乙醇
贮存温度	4-8 $^{\circ}$ C

二、 纯化流程

本产品主要应用于免疫沉淀(IP)以及免疫共沉淀(Co-IP)研究。

2.1 缓冲液的准备

所用水和缓冲液在使用之前建议用 0.22 μ m 或 0.45 μ m 滤膜过滤。

平衡/洗杂液：0.15 M NaCl, 20 mM Na₂HPO₄, pH 7.0

洗脱液：0.1 M 甘氨酸, pH 3.0

中和液：1 M Tris-HCl, pH 8.5

交联液：0.2 M 三乙醇胺, pH 8.2

交联剂：DMP (dimethyl pimelimidate dihydrochloride)

终止液：50 mM Tris, pH 7.5

2.2 样品准备

上柱前要确保样品溶液有合适的离子强度和 pH 值，可以用平衡/洗杂液对血清样品、腹水或细胞培养液稀释，或者样品用平衡/洗杂液透析。对于 100 mm 培养皿中的贴壁细胞，吸除细胞培养液，使用预冷 PBS 洗涤一次后加入 2 mL 细胞裂解液裂解细胞。对于悬浮细胞，离心收集细胞后，PBS 洗涤一次后参考贴壁细胞的裂解方法进行裂解。植物或动物组织样品可以使用液氮研磨方法裂解。具体的裂解方法请参考不同裂解液的使用说明，裂解液最终总蛋白浓度选择在 0.5-1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 范围内较为合适。通常针对目标蛋白的表达量不同，需要对总蛋白浓度进行预实验调整。

2.3 去除非特异性结合（可选）

1) 取 200 μL 至 1 mL 蛋白样品，加入约 1 μg 和免疫沉淀时使用的 IgG 种属相同的 Normal IgG 和 20 μL 充分重悬的 rProtein A/G Agarose Beads 4FF，4 $^{\circ}\text{C}$ 缓慢摇动 30 min。

2) 2500 rpm (约 1000 \times g) 离心 1 min，取上清用于后续的免疫沉淀。注：哺乳动物细胞内有多种成分可以和 IgG 发生结合，可能会在后续免疫印迹中出现非特异性条带。使用 normal IgG 和 rProtein A/G Agarose Beads 4FF 对裂解液预处理可以降低非特异性吸附。

2.4 免疫沉淀操作流程

2.4.1 抗体吸附

1) 取适量的 rProtein A/G Beads 4FF 加入到 2 ml 离心管中，800 rpm 离心 1 min，吸弃上清。

2) 加入 0.5 ml 平衡液，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），800 rpm 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 30 min 后，800 rpm 离心 1 min，收集上清液，留待检测。

4) 向 3) 的填料中加入 0.5 ml 的洗杂液，悬浮填料，进行清洗，去除非特异性吸附的杂蛋白，800 rpm 离心 1 min，吸弃上清。再重复两次。

2.4.2 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 2.4.3。50 μL -1 mL 填料量均可以按照以下步骤操作，无需额外增加交联液体积。

1) 向清洗过的填料中加入 1 ml 交联液，800 rpm 离心 1 min，吸弃上清。

2) 再向其中加入 1 ml 含 20 mM DMP (dimethyl pimelimidate dihydrochloride) 的交联液，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，促使缓冲液和填料充分接触，约 30 min 后，800 rpm 离心 1 min，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 15 min 后，800 rpm 离心 1 min，再吸弃上清。

4) 加入 0.5 mL 的洗杂液，悬浮填料，进行清洗，800 rpm 离心 1 min，吸弃上清。再重复两次。

2.4.3 抗原沉淀反应

1) 抗原吸附：加入含有抗原的样品（来源 2.2 或 2.3），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 10 min，使抗原与抗体充分结合，如结合力较弱则可在室温下反应 1 h 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，800 rpm 离心 1 min，收集上清液，置于冰上以备后续检测。向离心管中 加入 1 ml 洗杂液，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，800 rpm 离心 1 min，弃上清液。再重复洗涤 两次。最后加入 1 mL 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，800 rpm 离心 1 min，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 25 μ l 1 \times SDS-PAGE Loading Buffer 混合均匀，95℃ 加热 5 min。然后进行离心，800 rpm 离心 1 min，收集上清液，进行 SDS-PAGE 电泳，转膜后进行 Western 分析。

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 倍柱体积的洗脱液，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，10 min 后，离心，800 rpm 离心 1 min，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。

2.5 免疫沉淀操作流程

1) 抗体与抗原混合：将抗体与含有目的蛋白的裂解液（来源 2.2 或 2.3）混合，室温震荡孵育 30 min-60 min，或者 2-8℃ 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 4FF 加入到 2 mL 离心管中，800 rpm 离心 1 min，吸弃上清。加入 0.5 mL 平衡液，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），800 rpm 离心 1 min，吸弃上清。再重复两次。

3) 抗原-抗体混合物的吸附：将步骤 1) 中得到的抗原-抗体混合物加入到处理好的填料

中，混合均匀，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 30 min 后，800 rpm 离心 1 min，收集上清液，留待检测。

4) 洗杂：向上述离心管中加入 0.5 ml 的洗杂液，悬浮填料，进行清洗，去除非特异性吸附的杂蛋白，800 rpm 离心 1 min，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 25 μ L 1 \times SDS-PAGE Loading Buffer 混合均匀，95 $^{\circ}$ C 加热 5 min。然后进行离心，800 rpm 离心 1 min，收集上清液，进行 SDS-PAGE 电泳，转膜后进行 Western 分析。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 倍柱体积的洗脱液，用移液器吹打 5 次，混合均匀，然后在室温下置于翻转混合仪或者手工轻轻翻转离心管，10 min 后，800 rpm 离心 1 min，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。

三、订购信息

产品名称	货号
耐碱 rProtein A Agarose Resins 4FF	QS01007
rProtein A Agarose Resins 4FF	QS01008
rProtein G Agarose Resins 4FF	QS01009
rProtein L Agarose Resins 4FF	QS01010
rProtein A/G Agarose Resins4FF	QS01011