

产品介绍

本产品是重组偶联有**Protein A/G**的beads, 可以与大部份哺乳动物免疫球蛋白Fc结合, 本产品结合力高, 载量高, 可应用于免疫沉淀/免疫共沉淀实验以及抗体的纯化。

| 指标 | 性能 |
|---------|----------------------|
| 基质 | 高度交联的4%琼脂糖微球 |
| 配体 | 重组蛋白A/G |
| 载量 | >15mg 人IgG/mL微球(干体积) |
| 粒径(um) | 45-165 |
| 最大压力 | 0.3 MPa, 3 bar |
| pH 稳定范围 | 3-10 |
| 储存缓冲液 | 含20%乙醇的1×PBS |
| 储存温度 | 2℃-8℃ |

包装规格

25% beads悬液 2mL/5mL

保存条件

Beads保存在含20%乙醇的PBS中, 2℃-8℃保存, 有效期2年。不可低于0度保存。

使用方法

使用本产品前, 先确认一抗种属和亚型, 参考下表确认本产品与之兼容。如不确定亚型或出于兼容考虑, 可以考虑**Protein A/G beads**, 其结合能力参考下表。

| 种属 | 亚型 | Protein A | Protein G | Protein A/G |
|----------------|----------------|-----------|-----------|-------------|
| Human | IgA | variable | — | ++ |
| | IgD | — | — | — |
| | IgE | — | — | — |
| | IgG1 | ++++ | ++++ | ++++ |
| | IgG2 | ++++ | ++++ | ++++ |
| | IgG3 | — | ++++ | ++++ |
| | IgG4 | ++++ | ++++ | ++++ |
| | IgM | variable | — | ++ |
| Avian egg yolk | IgY | — | — | — |
| Cow | | ++ | ++++ | ++++ |
| Dog | | ++ | + | ++++ |
| Goat | | — | ++ | ++++ |
| Guinea pig | IgG1 | ++++ | ++ | ++++ |
| | IgG2 | ++++ | ++ | ++++ |
| Hamster | | + | ++ | — |
| Horse | | ++ | ++++ | ++++ |
| Koala | | — | + | — |
| Llama | | — | + | — |
| Monkey(rhesus) | | ++++ | ++++ | ++++ |
| Mouse | IgG1 | + | ++++ | ++ |
| | IgG2a | ++++ | ++++ | ++++ |
| | IgG2b | +++ | +++ | +++ |
| | IgG3 | ++ | +++ | +++ |
| | IgM | variable | — | — |
| Pig | | +++ | +++ | ++++ |
| Rabbit | no distinction | ++++ | +++ | ++++ |

| | | | | |
|-------|-------|-----|------|------|
| Rat | IgG1 | — | + | ++ |
| | IgG2a | — | ++++ | ++++ |
| | IgG2b | — | ++ | ++ |
| | IgG3 | + | ++ | ++ |
| Sheep | | +/- | ++ | ++ |

++++=结合能力强；++=结合能力中等；—=结合能力弱或没有结合。

免疫沉淀

方式一（SDS Sample buffer洗脱法）

1. 用预冷的含蛋白酶抑制剂的RIPA buffer裂解细胞或组织。取1-3 mg总蛋白的裂解物（体积控制在200-400 uL），加入1-4 ug特异性抗体以及150-300 uL Incubation buffer。4℃旋转过夜。
2. 吸取等量蛋白裂解物，加入等量Incubation buffer并加入同种属等量的IgG孵育作为Control IgG对照组。4℃旋转过夜。
3. 加入80-100 uL重悬的Protein A/G beads（预先用PBS低速离心洗涤3次），4℃旋转孵育1-4 h。
4. 用1 × Washing buffer（现加蛋白酶抑制剂）洗涤沉淀复合物，4℃ 500 g离心30 s，弃上清，重复洗涤5次。最后一次洗涤后留约80 uL Washing buffer。
5. 加入20 uL 5 × Sample Buffer，重悬IP复合物beads，沸水浴加热5 min。
6. 8000 g-10000 g离心3 min，小心吸取上清转入新的EP管中。取20-40 uL样品进行免疫印迹检测，设置Control IgG对照和Input对照。

方式二（酸洗法）

1. 用预冷的含蛋白酶抑制剂的RIPA buffer裂解细胞或组织。取1-3 mg总蛋白的裂解物200-400 uL，加入下端带有堵帽的纯化柱中，同时加入1-4 ug特异性抗体以及150-300 uL Incubation buffer。4℃旋转过夜。
2. 吸取等量蛋白裂解物，加入等量Incubation buffer并加入同种属等量的IgG孵育作为Control IgG对照组。4℃旋转过夜。
3. 向纯化柱中加入80-100 uL重悬的Protein A/G beads（已预先用PBS低速离心洗涤3次），4℃旋转孵育1-4 h。
4. 打开纯化柱末端堵帽，将上清自然流出弃除。用1 × Washing buffer（现加蛋白酶抑制剂）洗涤沉淀复合物5次。洗涤结束后，将纯化柱置入收集管中4℃ 500g离心30s，弃收集管以及离心产物。
5. 用堵帽堵住纯化柱下端出口，向纯化柱中加入80 uL Elution buffer，盖上盖子，室温静置5-10 min，期间可以轻轻摇晃2-3次，重悬沉淀复合物，以达到更好的洗脱效果。洗脱完成，取下堵帽，将纯化柱置入新的离心管，4℃ 8000-10000 g离心1 min收集产物。
6. 向洗脱产物中加入10 uL 碱中和液以及23 uL 5 × Sample Buffer，沸水浴加热5 min。
7. 取20-40 uL样品进行免疫印迹检测，设置Control IgG对照和Input对照。

参考配方：

| RIPA裂解液 | 配制：1000 ml |
|--|------------|
| Tris | 6 g |
| NaCl | 8.76 g |
| 脱氧胆酸钠 | 5 g |
| SDS | 1 g |
| NaF | 0.42 g |
| EDTA.2Na.2H ₂ O | 1.86 g |
| Triton X-100 | 10 ml |
| 盐酸调pH至7.4，补ddH ₂ O定容至1000 ml，4℃保存 | |
| 注：PMSF及其它蛋白酶抑制剂现用现加 | |

| 5X SDS sample buffer | 配制：50 ml |
|--|----------|
| Tris HCl (1M母液, pH 7.0) | 12.5 ml |
| 甘油 | 17.5 ml |
| SDS | 7.5 g |
| 溴酚蓝 | 15 mg |
| 补ddH ₂ O至37.5 ml，分装并保存在-20℃ | |
| 现用现加还原剂：25% DTT(2M母液) | |

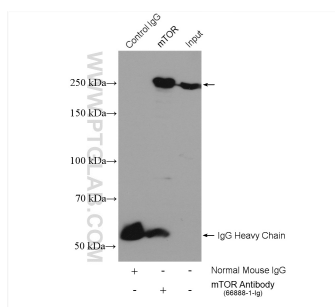
| Incubation buffer | 配制：1000 ml |
|--|------------|
| KCl | 0.2 g |
| KH ₂ PO ₄ | 0.2 g |
| Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O | 1.14 g |
| NaCl | 8 g |

| | |
|---|-------------|
| NaF | 0.42 g |
| EDTA.2Na.2H ₂ O | 1.86 g |
| 盐酸调pH至7.4, 补ddH ₂ O定容至1000 ml, 4°C保存 | |
| Washing buffer (1 x TBST) 配制: 1000 ml | |
| Tris | 2.42 g |
| NaCl | 8.76 g |
| KCl | 0.373 g |
| Tween-20 | 2 ml |
| 盐酸调pH至7.4, 补ddH ₂ O定容至1000 ml | |
| 洗脱液 (Elution buffer) 配制: 500 ml | |
| NaCl | 14.6 g |
| Glycine | 5.625 g |
| 调pH至1.5-2.0, 补ddH ₂ O定容至500 ml, 4°C保存 | |
| 碱中和液 (Alkali neutralization buffer) | |
| NaOH溶液 | 0.9 M-1.3 M |
| The final concentration is adjusted according to Elution buffer | |

抗体纯化

- 根据抗体的亚型确定填料的种类。对于IgG1亚型的小鼠单抗一般采用Protein G beads (货号: [PR40024](#)) 纯化, 对于兔IgG类单抗、小鼠IgG2a、IgG2b、IgG2c、IgG3亚型的抗体、兔和鼠来源的多抗可采用Protein A beads (货号: [PR40023](#)) 纯化。其他亚型的抗体参考上面的结合特性表选用填料。
- 填料的预处理。根据粗原料中抗体抗体以及纯化规模大致估计所需要的填料体积, 摇匀本产品后立即取出所需体积的填料。用填料30倍体积的PBS洗涤以去除保存液。洗涤可以在纯化柱中进行, 也可以用离心管进行1000 g 离心洗涤 (每轮离心5-10分钟)。
- 粗原料的处理。为了得到高纯度的产品, 同时让填料发挥最大性能, 粗原料要求清澈均匀, 待纯化的粗原料可以用0.2 um膜过滤或10000g离心10分钟以去除不溶成份。如果粗原料是动物腹水或抗血清, 澄清后用PBS稀释 2 - 3 倍后再进行下一步可以有效降低非特异性结合。
- 抗体的结合。结合可以用静态法, 也可以用动态法。
静态法: 将待纯化的粗原料与填料混合 (可以用瓶子或离心管盛装), 密封好后在旋转器上旋转反应, 反应可以在室温或37°C进行2-4小时, 也可以4°C过夜反应。反应结束后1000 g 离心5-10分钟分离填料和上清 (流穿液)。
动态法: 将填料装在空的层析柱中, 接至纯化仪或蠕动泵上, 再使粗原料反复流经纯化柱进行结合反应, 反应可以在室温或37°C进行2-4小时, 也可以4°C过夜反应。反应结束后放出管路和层析柱中液体 (流穿液)。
- 杂质的洗涤。用30倍填料体积的PBS洗涤填料以去除非特异结合以及未结合的杂质。操作同第2步。
- 抗体的洗脱。将填料转移至合适大小的层析柱内, 转移后填料高度为1-5cm为宜。用洗脱液洗脱, 洗脱液可以用pH 2.0-2.5 0.2M Glycine, 也可以用pH 2.0-2.5 HCl + 150mM NaCl。洗脱过程可以连续洗脱也可以用不连续洗脱。用UV法或其他快速定量方法判断洗脱峰。
- 抗体的保存。洗脱下来的抗体立即用1M Tris或饱和磷酸氢二钠中和至中性。注意中和完后可能部份抗体在等电点处沉淀形成浑浊, 此时可以将pH调至8.0左右使之溶解。最后终产品于-80°C长期保存, 为了减少反复冻融可以适当分装。也可以加甘油和防腐剂后于-20°C保存。
- 填料重生和保存。纯化后的填料可以用酸碱交替洗涤各30倍柱体积, 最后用PBS洗涤至中性, 4度保存在20%乙醇中。

Validation Data



IP result of anti-mTOR(IP:66888-1-Ig, 5 ug;
Detection:66888-1-Ig 1:20000) with HeLa cells
lysate 640 ug.

For technical support and original validation data for this product please contact

T: 027-87531629

E: Proteintech-CN@ptglab.com

W: ptgcn.com

This product is exclusively available under
Proteintech Group brand and is not available
to purchase from any other manufacturer.