

rProtein A/G Agarose Resin 蛋白 A/G 琼脂糖纯化树脂

产品简介

天然蛋白 A (Protein A) 是一种发现于金黄色葡萄球菌的细胞壁表面蛋白, 天然蛋白 G (Protein G) 是一种分离自 G 型或 C 型链球菌属的细胞表面蛋白, 二者功能相似, 主要通过与其免疫球蛋白 (Ig) 的 Fc 区相互作用, 可结合大多数哺乳动物的 IgG。然而两者结合特异性上有所不同 (详见附录 1, 蛋白 A, G 对不同物种 Ig 的结合能力总表)。蛋白 A, 蛋白 G 常共价偶联在固体载体如琼脂糖珠或丙烯酸树脂小珠上, 直接用以做免疫沉淀 (IP) 或者免疫共沉淀 (Co-IP) 来进行蛋白功能相关研究, 或者直接装在层析柱上来纯化单克隆或者多克隆抗体。

本品使用的是基因改造后的蛋白 A 和蛋白 G, 不仅维持其本身的 Ig 亲和特性, 同时也去除了天然蛋白本身的非主要结合域以降低非特异性结合。本品同时将蛋白 A 和蛋白 G 共价偶联到琼脂糖凝胶微球表面, 比单独的蛋白 A 或者蛋白 G 都有更广的结合范围, 适合于所有蛋白 A 琼脂糖珠和蛋白 G 琼脂糖珠单独可以结合的 Ig, 实用性更高。

产品信息

货号	36403ES03 / 36403ES05/36403ES08/36403ES25/36403ES60
规格	1 mL / 2 mL/5 mL/25 mL/100 mL

产品性质

基质 (Matrix)	高度交联的 4%琼脂糖微球
配体 (Ligand)	重组蛋白 A/G
孔径 (Bead size)	45-165 μm
最大流速 (Flow _{max})	0.3 MPa, 3 bar
储存缓冲液 (Buffer)	含 20%乙醇的 1×PBS
载量 (Capacity)	约 10-15 mg Rabbit IgG/mL 基质
pH 范围 (pH range)	3-10

储存条件

2~8°C 保存, 有效期 2 年。

使用说明

本产品主要应用于免疫沉淀 (IP) 以及免疫共沉淀 (Co-IP) 研究。

1. 需准备试剂

【注】建议以下缓冲液在使用前用 0.22 μm 或 0.45 μm 滤膜过滤。

结合/洗杂缓冲液: 0.15 M NaCl, 20mM Na₂HPO₄, pH7.0

洗脱缓冲液: 0.1 M 甘氨酸, pH 3.0

中和液: 1 M Tris-HCl, pH 8.5

交联缓冲液: 0.2 M 三乙醇胺, pH8.2

交联剂: DMP(Dimethyl pimelimidate dihydrochloride)

终止液: 50 mM Tris-HCl, pH 7.5

2. 操作流程

1) 免疫沉淀 (Immunoprecipitation, IP) :

a. 蛋白样品的准备:

- 贴壁细胞: 取 10 cm 细胞培养皿中的贴壁细胞, 吸除细胞培养液, PBS 洗涤 2 次, 然后加入 500 μ L 至 2 mL 细胞裂解液裂解细胞 (如 WB/IP 裂解液, Cat#20118ES) ;
- 悬浮细胞: 离心收集细胞后, PBS 洗涤 1 次, 然后参考贴壁细胞的裂解方法进行裂解;
- 动植物组织样本: 参考贴壁细胞使用裂解液的比例进行裂解;

【注】 ① 具体的裂解方法, 应参考不同裂解液的详细使用方法; ② 不同量的细胞, 应选用适当裂解液的用量进行裂解 (如果裂解获得的蛋白样品浓度过高, 可以用裂解液或 PBS 适当稀释, 如果蛋白样品浓度过低, 在以后的裂解过程中宜适当减少裂解液的用量), 通常裂解液最终总蛋白浓度选择在 0.5-1 μ g/ μ L 范围内较合适; ③ **可选:** 细胞或组织处理时加入全能核酸酶 (Cat#20157ES), 能够降解所有形式的 DNA 和 RNA (单链、双链、线形和环状), 而无蛋白水解活性。此步操作可以降低背景, 保障实验的可重复性。

b. 去除非特异性结合 (可选) :

- 取 0.2-1 mL 细胞或组织裂解液, 蛋白量约为 0.2-1 mg, 加入约 1 μ g 和免疫沉淀时使用的 IgG 种属相同的普通 IgG 和 20 μ L 充分重悬的 rProtein A/G Agarose Resin, 4 $^{\circ}$ C 缓慢摇动 30 min~2 h。
- 1000 rpm 离心 5 min, 取上清用于后续的免疫沉淀。

【注】 所谓种属相同的 IgG 是指与后续免疫沉淀用一抗宿主相同的正常 IgG。此步骤可以预先去除样本与 rProtein A/G Agarose Resin 的非特异性结合, 降低背景。

c. 免疫沉淀:

a) 抗体吸附

- 取适量 rProtein A/G Agarose Resin 加入到 2 mL 离心管中, 1000 rpm 离心 1 min, 吸弃上清。
- 加入 0.5 mL 结合缓冲液重悬树脂, 1000 rpm 离心 1 min, 吸弃上清。继续重复 2 次此操作。
- 向上述已平衡树脂中加入抗体溶液, 重悬树脂, 室温下轻轻翻转离心管或置于翻转混合仪混匀 30 min 后, 1000 rpm 离心 1 min, 收集上清液, 备用, 待检测。
- 向上述树脂中加入 0.5 mL 的洗杂缓冲液, 重悬树脂对其进行清洗, 去除非特异性吸附的杂蛋白, 1000 rpm 离心 1 min, 吸弃上清。再重复 2 次。

b) 抗体交联 (可选)

【注】 如需将抗体和目标抗原复合物共同洗脱, 请忽略此步骤。

- 向清洗过的树脂中加入 1 mL 交联 Buffer, 1000 rpm 离心 1 min, 吸弃上清。
- 再向其中加入 1 mL 含 20 mM DMP (Dimethyl pimelimidate dihydrochloride) 的交联 Buffer, 该试剂需现配现用, 重悬树脂, 室温下手动颠倒混匀或置于翻转混合仪轻轻翻转, 促使 Buffer 和树脂充分接触, 30 min 后, 1000 rpm 离心 1 min, 吸弃上清。
- 再向其中加入 1 mL 终止液, 重悬树脂, 终止交联反应, 室温下手动颠倒混匀或置于翻转混合仪轻轻翻转 15 min, 500 rpm 离心 1 min, 吸弃上清。
- 加入 0.5 mL 洗杂缓冲液, 重悬树脂, 进行清洗, 1000 rpm 离心 1 min, 吸弃上清。再重复 2 次。

c) 沉淀反应

- 抗原吸附: 向上述树脂-抗体溶液中加入含抗原的样品, 用移液器轻轻吹打使抗原与树脂-抗体复合物分散均匀, 室温下手动颠倒混匀或置于翻转混合仪轻轻翻转 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 $^{\circ}$ C 下反应过夜。
- 洗杂: 将上述完成抗原吸附的产物 1000 rpm 离心 1 min, 收集上清液置于冰上待检测。向离心管中加入 1 mL 洗杂缓

冲液，用移液器轻轻吹打使树脂-抗体-抗原复合物分散均匀，1000 rpm 离心 1min，弃上清。重复 2 次，最后加入 1 mL 洗杂液，将树脂-抗体-抗原复合物转移至新的离心管中，1000 rpm 离心 1 min，吸弃上清。

d. 样品洗脱

【注】根据后续检测的不同提供两种洗脱方法。

- a) 变性洗脱：该方法适于 SDS-PAGE 检测。向上述离心管中加入 25 μ L 1 \times SDS-PAGE loading buffer 混匀，95 $^{\circ}$ C加热 5 min。1000 rpm 离心 1 min，收集上清进行后续 WB 分析。
- b) 非变性洗脱：该法洗脱的样品保持原有的生物活性，可用于后续功能分析。具体做法：向上述沉淀反应得到的树脂-抗体-抗原复合物中加入 5 倍体积的洗脱 Buffer，用移液器轻轻吹打数次，室温下手动颠倒混匀或置于翻转混合仪轻轻翻转 10 min，1000 rpm 离心 1 min，吸取上清，收集洗脱组分，即为目标抗原，将其收集至新的离心管中，立即加入 1/10 体积的中和液，将洗脱组分 PH 调至 7.0-8.0，备用。

2) 免疫共沉淀 (Co-IP)

a. 抗原抗体的结合：将抗体与含有目的蛋白的裂解液混合，室温孵育 30-60 min，或者 4 $^{\circ}$ C孵育过夜。

【注】① 该步骤孵育时间取决于抗原与抗体的结合效率以及抗原的稳定性，需根据具体情况进行优化；② 抗体的加入量需参考后续加入树脂的量，抗体加入量过多会导致抗原-抗体混合物与树脂的结合。推荐抗体加入量为树脂 80%的最大载量。

b. 树脂准备：

- a) 取适量 rProtein A/G Agarose Resin 加入到 2 mL 离心管中，1000 rpm 离心 1 min，吸弃上清。
- b) 加入 0.5 mL 结合 Buffer 重悬树脂，1000 rpm 离心 1 min，吸弃上清。继续重复 2 次此操作。

c. 抗原-抗体混合物的吸附：将步骤 1 中抗原-抗体混合物加入到已处理的树脂中，混匀，室温下手动颠倒混匀或置于翻转混合仪轻轻翻转 30 min，使其充分接触并吸附，1000 rpm 离心 1 min，收集上清留待检测。

d. 洗杂：向上述离心管中加入 0.5 mL 洗杂缓冲液，重悬树脂，去除非特异性结合，1000 rpm 离心 1 min，吸弃上清。再重复 2 次此操作。

e. 抗原洗脱（根据后续检测的目的提供两种抗原洗脱方法，同免疫沉淀法洗脱）

注意事项

1. 请勿冷冻保存本产品。
2. Protein A/G 琼脂糖珠使用前一定要充分颠倒若干次，使琼脂糖珠混合均匀。
3. 所有操作过程中，样本需要在 4 $^{\circ}$ C或冰上操作。
4. 本产品仅作科研用途。
5. 为了您的安全和健康，请穿实验服并佩戴一次性手套操作。

附录 1. 蛋白 A, G 对不同物种 Ig 的结合能力总表

免疫球蛋白亚型	Protein A	Protein G	免疫球蛋白亚型	Protein A	Protein G
Human IgG	++++	++++	Mouse IgG	++++	++++
Human IgG1	++++	++++	Mouse IgG1	+	++++
Human IgG2	++++	++++	Mouse IgG2a	++++	++++
Human IgG3	+	++++	Mouse IgG2b	+++	+++
Human IgG4	++++	++++	Mouse IgG3	++	+++
Human IgM	Use anti-Human IgM		Mouse IgM	Use anti-Mouse IgM	
Human IgE	NR	NR	Chicken IgG (IgY)	NR	NR
Human IgA	+	NR	Cow IgG	++	++++
Human IgA1	+	NR	Goat IgG	+	++++
Human IgA2	+	NR	Goat IgG1	+	++++
Human IgD	Use anti-Human IgD		Goat IgG2	++++	++++
Rat IgG	+	++	Goat IgM	NR	NR
Rat IgG1	NR	+	Guinea Pig IgG	++++	++
Rat IgG2a	NR	NR	Guinea Pig IgG1	++++	++
Rat IgG2b	NR	+	Guinea Pig IgG2	++++	++
Rat IgG3	+	++	Hamster IgG	+	++
Sheep IgG	+	++	Horse IgG	+	++++
Sheep IgG1	+	++	Rabbit IgG	++++	+++
Sheep IgG2	+	++	Rabbit IgM	NR	NR
Sheep IgM	NR	NR	Rabbit All isotypes	+++	++
Pig IgG	+++	+++	Monkey IgG	++++	++++
Cat IgG	++++	+	Donkey IgG	++	++++
Dog IgG	++++	+			

(+) = weak binding; (++) = moderate binding; (++++) = strong binding; NR= not recommended; (-) = not tested;