

Protein A 琼脂糖凝胶

Catalog Number: EA-IP-015

Note: 请勿离心，轻柔混匀后使用。

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 类蛋白质的免疫（共）沉淀，覆盖大部分 IgG 亚型。
偶联物属性	高纯度的重组 Protein A。
凝胶属性	琼脂糖凝胶颗粒，平均粒径 100~200 μm 。
凝胶载量	1mL Sepharose 4B 琼脂糖颗粒，共价偶联 20mg 重组 Protein A。
主要成分	0.5mL Protein A 琼脂糖凝胶，保存于 1.5mL 含防腐剂和 50%甘油的 PBS 中。

注意事项

1. 本产品-20℃可保存 1 年，冷藏条件下运输。
2. 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗。
3. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
4. 本产品以凝胶悬液形式提供亲和凝胶，凝胶悬液中亲和凝胶的含量为 25%，使用前先温和重悬凝胶，按需取用。
5. 各物种的抗体（IgG, IgM, IgA, IgD）与 Protein A 结合亲和力不同，使用请认真阅读本说明书附件。
6. 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。
7. 配套使用的相关试剂，需实验室自备。

使用方法

注：所有步骤尽可能在冰上进行，以避免目标蛋白质降解。以下操作步骤，使用凝胶悬液用量为 40 μL （含 10 μL 凝胶），可从 15 μL 血清或者 100 μL 细胞上清中结合 20 μg IgG，请根据待结合抗体量，调节凝胶使用量。

1. 目标蛋白样品制备

1) 血清及分泌表达目标蛋白样品处理

收集血清或培养基上清，检测目标蛋白浓度。如果目标蛋白质浓度较高，建议用 1 $\times$ PBS 稀释至蛋白质终浓度为 10~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，以备后续实验。

2) 细胞内表达目标蛋白样品处理

- a. 悬浮细胞和半贴壁细胞从细胞培养瓶上吹下来后转入离心管中，1000rpm 离心 5min，弃上清。
- b. 贴壁细胞用细胞刮子轻轻从瓶壁上刮下来，连同培养基转入离心管中，1000rpm 离心 5min，弃上清。
- c. 用预冷至 4℃的 1 $\times$ PBS 重悬细胞，1000rpm 离心 3min，弃上清。重复 1 次。
- d. 根据细胞的量加入相应体积的细胞裂解液，反复吹打后冰上放置 10~20min。

注：一般 1mL 细胞裂解液可以处理约 0.5~1 $\times 10^7$ 个细胞。为了避免目标蛋白质降解，您可以添加蛋白酶抑制剂（PMSF 工作浓度：0.1~1.0mmol/L）。

- e. 用超声破碎仪处理细胞裂解液，直至细胞裂解液透明，不再粘稠。冰上放置 30min 之后，12000rpm，4℃离心 10min。取上清，可立即进行下一步实验或置于-80℃冻存。

注：若无超声破碎仪，也可使用削成斜口的枪头或注射器反复吹吸，直至细胞裂解液透明，不再粘稠。

2. 对照组设置（仅供参考，实验过程中请按实际需要调整）

1) 阴性对照

For Research Use Only

- a. 抗体的阴性对照：以凝胶偶联 Mouse IgG 亚型抗体为例，选择 Mouse IgG 做为抗体的阴性对照，使用方法与抗体相同。
- b. 蛋白的阴性对照：使用不表达靶蛋白X 但表达无关蛋白Y 的蛋白样品做对照，处理方法与待对照靶蛋白相同。

2) 阳性对照

- a. 以未添加磁珠凝胶偶联抗体处理的蛋白样品作为阳性对照，即 Input 组。上样缓冲液制备方法与实验组相同。

3. 装柱及孵育

- a. ProteinA 凝胶的准备：将凝胶充分混悬，取 40 μ L 凝胶悬液（含 10 μ L 凝胶），置于离心管中，加入 250 μ L 1 $\times$ PBS，充分混悬，1000rpm 离心 30sec，弃上清；重复此洗涤步骤 2 次。
- b. 抗体准备：根据抗体说明书推荐的 IP 稀释比，用 1 $\times$ PBS 稀释抗体，配制成为抗体工作液。或将抗体总体积调整至 500 μ L。置于冰上备用。
- c. 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 30min。
- d. 1000rpm 离心 30sec，取上清液至新的离心管中，以便后续使用。
- e. 向凝胶中加入 250 μ L 1 $\times$ PBS，温和混匀，清洗凝胶，1000rpm 离心 30sec，弃上清。重复此步骤 4 次。得到抗体-凝胶复合物。

4. 目标蛋白与抗体-凝胶复合物结合

- a. 孵育：在抗体-凝胶复合物中加入 200 μ L 准备好的样本（见步骤 1），摇床上室温孵育 30min，也可 4 $^{\circ}$ C 孵育 2h 或更长时间。
- b. 离心分离：孵育完毕后，1000rpm 离心 30sec，弃上清。加入 250 μ L 1 $\times$ PBST，温和混匀，清洗凝胶，1000rpm 离心 30sec，弃上清。重复 4 次。

5. 目标蛋白洗脱

本说明书提供以下两种目标蛋白洗脱方案，请根据后期检测的需要选择不同的目标蛋白洗脱方法。

变性洗脱法

此方法的目标，适用于 SDS-PAGE 检测。

- a. 将凝胶移至 1.5ml 离心管，离心，弃上清，向凝胶中加入 20 μ L 1 $\times$ PBS 和 5 μ L 5 $\times$ 上样缓冲液，混合均匀，95 $^{\circ}$ C 煮样 5min。离心分离凝胶，收集上清，进行 SDS-PAGE 检测。

酸性洗脱法

此方法洗脱的目标蛋白，可用于后期功能分析。

- a. 向凝胶中加入 100~200 μ L 酸性洗脱液，室温孵育 10min；

注：酸性环境会缩短免疫凝胶的使用寿命，应尽量缩短凝胶与酸性洗脱液的接触时间，建议不超过 10min。

- b. 5000rpm 离心 30sec，收集上清至新的离心管，并立即滴入总体积 1/10 体积的 10 $\times$ PBST Buffer 中和，将洗脱产物 pH 调节至中性，样品可用于后期功能分析。

背景信息

本产品由高品质的 Protein A 与琼脂糖凝胶共价偶联制成，可用于免疫沉淀（IP）和免疫共沉淀（Co-IP）。本产品具有高载量，操作迅速便捷，特异性强和可结合范围广等特点。

储存方法

-20 $^{\circ}$ C 可保存 12 个月。

附件

Protein A 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	+++
Sheep	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	+++
Chicken	Total IgY	-
Monkey	Total IgG	+++

“+”表示亲和力的相对强度，“-”表示无亲和力。