

Rabbit IgG 亲和凝胶

Catalog Number: EA-IP-200

Note: 请勿离心，轻柔混匀后使用。

性能指标

应用范围	亲和纯化抗体、排除非特异性吸附，及 IP、CO-IP、Ch-IP 等免疫沉淀相关实验中兔来源抗体琼脂糖凝胶的阴性对照。
抗体属性	兔来源的 IgG。
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 6mg 兔来源的 IgG。
主要成分	1mL Rabbit IgG 亲和凝胶，保存于 1mL 含防腐剂和 50%甘油的 PBS 中。

注意事项

1. 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。
2. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
3. 本产品为凝胶悬液形式，亲和凝胶的含量为 50%，使用前先温和重悬凝胶悬液，然后按照需求取用。
4. IP-WB 样品现配现用，避免影响实验结果。
5. 勿干燥凝胶，勿使用超声处理凝胶，勿使酸处理凝胶时间超过 10min。

使用方法

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×PBS 稀释至蛋白质终浓度为 10~100 $\mu\text{g/mL}$ ，以备后续实验。

2) 细胞内表达目标蛋白样品处理

- a. 将悬浮细胞或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. 用预冷至 4℃的 1×PBS 重悬细胞，1000rpm 离心 3min，弃上清。重复 1 次。
- c. 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 0.5~1×10⁷ 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）。

- d. 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. 免疫（共）沉淀

- a. 温和重悬 Rabbit IgG 亲和凝胶，混合均匀，用切去末端的枪头吸取 40 μL 凝胶悬液（约含 20 μL 亲和凝胶）至离心管中。加入 10 倍凝胶体积（约 200 μL ）的 1×PBS 清洗亲和凝胶，5000rpm 离心 30sec，弃上清，重复此步骤 3 次。
- b. 加入 50~200 μL 含有目标蛋白的细胞裂解液，室温摇床孵育 2h 或者 4℃孵育过夜。
- c. 加入 10 倍凝胶体积（约 200 μL ）的 1×PBS 清洗亲和凝胶，5000rpm 离心 30sec，弃上清，重复此步骤 3 次。
- d. 加入预冷至 4℃的 5 倍凝胶体积（约 100 μL ）的 PBST 预洗液洗涤亲和凝胶，除去非特异性结合蛋白。5000rpm 离心 30sec，弃上清。

- c. 根据抗体性质以及后续实验要求，可以选择竞争洗脱或酸性洗脱。

以下以 Anti-FLAG (DYKDDDDK) 亲和凝胶为例，Anti-FLAG 亲和凝胶使用某种洗脱方式时，IgG 琼脂糖凝胶作为阴性对照，需要使用相同的洗脱方式。

1) 竞争性洗脱

竞争性洗脱方式，洗脱效率高，特异性强，不引起蛋白变性，便于对蛋白的后续分析检测。

- a. 将 2 倍凝胶体积（约 40 μ L），浓度为 2mg/mL 的 FLAG 多肽溶液加入上述沉淀，悬浮亲和凝胶，4 $^{\circ}$ C 摇床孵育 2h。为了提高洗脱效率，可延长孵育时间或重复洗脱。

注：根据蛋白质洗脱难易程度，调整 FLAG 多肽溶液浓度，最高可到 5mg/mL。

- b. 孵育结束后，4 $^{\circ}$ C 条件下，5000rpm 离心 30sec，转移上清到新离心管中。上清即为洗脱的 FLAG 标签蛋白。
c. 按照后续实验需求处理和保存蛋白质。

2) 酸性洗脱

酸性洗脱方式，成本低，操作时间短，一般不引起蛋白变性，便于对蛋白的后续分析检测。

- a. 将预冷的 10 倍凝胶体积（约 200 μ L），pH 3.0 的酸性洗脱液加入上述沉淀，悬浮亲和凝胶，室温孵育 5min。

注：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，建议不超过 10min。

- b. 孵育结束后，4 $^{\circ}$ C 条件下，5000rpm 离心 30sec，转移上清到新的离心管中，并立即加入 1/10 体积的 pH 8.0 的中和液，混匀。上清即为洗脱的 FLAG 标签蛋白。
c. 按照后续实验需求处理和保存蛋白质。

3) 凝胶的清洗与再生

亲和凝胶如需重复使用，洗脱后须立即进行清洗与再生。

- a. 依次用 10 倍凝胶体积的酸性洗脱液、10 倍凝胶体积的中和液、10 倍凝胶体积的 1 $\times$ PBS 清洗 1 次。
b. 再用 3 倍体积含防腐剂和 50% 甘油的 PBS 清洗 1 次。
c. 保存于凝胶等体积的含防腐剂和 50% 甘油的 PBS 中，-20 $^{\circ}$ C 密封存放。

背景信息

Rabbit IgG 亲和凝胶，由高品质的兔 IgG 与琼脂糖凝胶共价偶联制成，具有高载量，高特异性，性质稳定，可反复使用的特点，可用于免疫沉淀(IP)、免疫共沉淀(Co-IP)、染色质免疫沉淀(Ch-IP)等免疫沉淀相关实验时兔来源抗体琼脂糖凝胶的阴性对照(Negative control)，及去除非特异性吸附等。

储存方法

-20 $^{\circ}$ C 可保存 12 个月。