

**Note:** 请勿离心，轻柔混匀后使用。

## 性能指标

<b>应用范围</b>	纯化分离含有相应糖基化修饰的细胞、细胞核或糖蛋白。 仅适用于分泌蛋白的亲亲和纯化。
<b>偶联物属性:</b>	刀豆素 A。
<b>凝胶属性</b>	琼脂糖凝胶颗粒，平均粒径 100~200 μm。
<b>主要成分</b>	1mL Con A 琼脂糖凝胶，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 10~100μg/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°C 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 0.5~1×10<sup>7</sup> 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°C 离心 10min。取上清，以备后续实验。

**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. 装柱及孵育

#### 1) 刀豆素 A (Con A) 琼脂糖凝胶准备

- a. 温和重悬刀豆素 A (Con A) 琼脂糖凝胶，混合均匀，取 40μL 凝胶悬液（约含 20μL 凝胶）至离心管中。
- b. 加入 10 倍凝胶体积（约 200μL）的 1×PBS 轻柔重悬清洗凝胶，5000rpm 离心 30sec，弃上清，重复此步骤 3 次。

**注：多个样品时，可将凝胶重悬后分装到数个反应管中分别进行反应。**

#### 2) 目的蛋白与刀豆素 A (Con A) 琼脂糖凝胶的结合

- a. 孵育：清洗后的凝胶中加入 200μL 准备好的样本，摇床上室温孵育 2h，也可 4°C 孵育过夜或更长时间。

## For Research Use Only

- b. 清洗：孵育完毕后，5000rpm 离心 30sec，弃上清。加入 200 $\mu$ L 1 $\times$ PBST，温和混匀，清洗凝胶，5000rpm 离心 30sec，弃上清，重复此步骤 4 次。

### 3) 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

此方法只适用于 SDS-PAGE 检测。

- a. 加入 16 $\mu$ L 1 $\times$ PBS 和 4 $\mu$ L 5 $\times$ 上样缓冲液，煮样 5min，冷却至室温并离心。
- b. 取上清进行 SDS-PAGE 实验，以备后续的 Western Blotting 检测。

#### 酸性洗脱法

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 $\mu$ 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。上清即为洗脱的糖蛋白。
- c. 按照后续实验需求处理和保存蛋白质。

### 背景信息

刀豆素 A (Con A) 琼脂糖凝胶，由高品质的 Con A 与琼脂糖凝胶共价偶联制成，能够快速、高效、灵敏、特异性地与  $\alpha$ -D-甘露糖基和  $\alpha$ -D-葡萄糖基残基结合，可用于分离细胞、细胞核或糖蛋白等含有相应糖基化修饰的成分。获得的纯化产物可用作 Western-bolt、质谱等的检测和分析。

### 储存方法

-20 $^{\circ}$ C 可保存 12 个月。

### For Research Use Only