

## Protein A/G 琼脂糖凝胶

Catalog Number: EA-IP-007

**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。 |
| 抗体属性 | 高纯度的重组Protein A/G。                                             |
| 凝胶属性 | 琼脂糖凝胶颗粒，平均粒径 100~200μm。                                        |
| 凝胶载量 | 1mL Sepharose 4B 琼脂糖颗粒，共价偶联20mg 重组Protein A/G。                 |
| 主要成分 | 0.5mL Protein A/G 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/G 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

### 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℃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℃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。**

### 1. 装柱及孵育

- a. ProteinA/G 凝胶的准备：将凝胶充分混悬，取40μL 凝胶悬液（含 10μL 凝胶），置于离心管中，加入250μL 1×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×PBS 稀释抗体，配制成为抗体工作液。或将抗体总体积调整至500μL。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 10min。
- 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250μL 1×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。

## 2. 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200μL 准备好的样本（见步骤 1），摇床上室温孵育30min，也可4℃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250μL 1×PBST，温和混匀，清洗凝胶，1000rpm 离心30sec，弃上清。重复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20μl 1 ×PBS 和5μl 5×上样缓冲液，混合均匀，95℃煮样5min。
- b. 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 100~200μl 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×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

Mouse IgG 免疫磁珠由高品质的正常小鼠IgG 与磁珠共价偶联而成，通常用作免疫沉淀、免疫共沉淀、染色质免疫沉淀等抗体 相关实验时小鼠来源抗体磁珠的对照IgG 磁珠。作为对照磁珠时，可以排除IgG 本身和特定目的蛋白或其它特定生物分子的非特异性结合。

## 储存方法

4℃可保存 12 个月。