

产品介绍

本产品是重组偶联有**Protein A/G**的**beads**,可以与大部份哺乳动物免疫球蛋白**Fc**结合, 本产品结合力高, 载量高, 可应用于免疫沉淀/免疫共沉淀实验以及抗体的纯化。

指标	性能
基质	高度交联的 4% 琼脂糖微球
配体	重组蛋白 A/G
载量	>15mg 人IgG/mL微球 (干体积)
粒径 (um)	45-165
最大压力	0.3 MPa, 3 bar
pH 稳定范围	3-10
储存缓冲液	含 20% 乙醇的 1×PBS
储存温度	2℃-8℃

包装规格

保存条件

使用方法

25% beads悬液 2mL/5mL

Beads保存在含**20%**乙醇的**PBS**中, **2℃-8℃**保存, 有效期**2**年。不可低于**0度**保存。

使用本产品前, 先确认一抗种属和亚型, 参考下表确认本产品与之兼容。如不确定亚型或出于兼容考虑, 可以考虑**Protein A/G beads**, 其结合能力参考下表。

种属	亚型	Protein A	Protein G	Protein A/G
Human	IgA	variable	—	++
	IgD	—	—	—
	IgE	—	—	—
	IgG1	++++	++++	++++
	IgG2	++++	++++	++++
	IgG3	—	++++	++++
	IgG4	++++	++++	++++
	IgM	variable	—	++
Avian egg yolk	IgY	—	—	—
Cow		++	++++	++++
Dog		++	+	++++
Goat		—	++	++++
Guinea pig	IgG1	++++	++	++++
	IgG2	++++	++	++++
Hamster		+	++	—
Horse		++	++++	++++
Koala		—	+	—
Llama		—	+	—
Monkey(rhesus)		++++	++++	++++
Mouse	IgG1	+	++++	++
	IgG2a	++++	++++	++++
	IgG2b	+++	+++	+++
	IgG3	++	+++	+++
	IgM	variable	—	—
Pig		+++	+++	++++
Rabbit	no distinction	++++	+++	++++

Rat	IgG1	—	+	++
	IgG2a	—	++++	++++
	IgG2b	—	++	++
	IgG3	+	++	++
Sheep		+/-	++	++

++++=结合能力强；++=结合能力中等；—=结合能力弱或没有结合。

免疫沉淀

方式一（SDS Sample buffer洗脱法）

1. 用预冷的含蛋白酶抑制剂的RIPA buffer裂解细胞或组织。取1-3 mg总蛋白的裂解物（体积控制在200-400 uL），加入1-4 ug特异性抗体以及 150-300 uL Incubation buffer。4℃旋转过夜。
2. 吸取等量蛋白裂解物，加入等量Incubation buffer并加入同种属等量的IgG孵育作为Control IgG对照组。4℃旋转过夜。
3. 加入80-100 uL重悬的 Protein A/G beads（预先用PBS低速离心洗涤3次），4℃ 旋转孵育1-4 h。
4. 用1 × Washing buffer（现加蛋白酶抑制剂）洗涤沉淀复合物,4℃ 500 g离心30 s，弃上清，重复洗涤5次。最后一次洗涤后留约80 uL Washing buffer。
5. 加入20 uL 5 × Sample Buffer，重悬IP复合物beads，沸水浴加热5 min。
6. 8000 g-10000 g离心3 min，小心吸取上清转入新的EP管中。取20-40 uL样品进行免疫印迹检测，设置Control IgG对照和Input对照。

方式二（酸洗法）

1. 用预冷的含蛋白酶抑制剂的RIPA buffer裂解细胞或组织。取1-3 mg总蛋白的裂解物200-400 uL，加入下端带有堵帽的纯化柱中，同时加入1-4 ug特异性抗体以及 150-300 uL Incubation buffer。4℃旋转过夜。
2. 吸取等量蛋白裂解物，加入等量Incubation buffer并加入同种属等量的IgG孵育作为Control IgG对照组。4℃旋转过夜。
3. 向纯化柱中加入80-100 uL重悬的 Protein A/G beads（已预先用PBS低速离心洗涤3次），4℃旋转孵育1-4 h。
4. 打开纯化柱末端堵帽，将上清自然流出弃除。用1 × Washing buffer（现加蛋白酶抑制剂）洗涤沉淀复合物5次。洗涤结束后，将纯化柱置入收集管中 4℃ 500g离心30s，弃收集管以及离心产物。
5. 用堵帽堵住纯化柱下端出液口，向纯化柱中加入80 uL Elution buffer，盖上盖子，室温静置5-10 min，期间可以轻轻摇晃2-3次，重悬沉淀复合物，以达到更好的洗脱效果。洗脱完成，取下堵帽，将纯化柱置入新的离心管，4℃ 8000-10000 g 离心 1 min 收集产物。
6. 向洗脱产物中加入10 uL 碱中和液以及23 uL 5 × Sample Buffer，沸水浴加热5 min。
7. 取20-40 uL样品进行免疫印迹检测，设置Control IgG对照和Input对照。

参考配方：

RIPA裂解液	配制：1000 ml
Tris	6 g
NaCl	8.76 g
脱氧胆酸钠	5 g
SDS	1 g
NaF	0.42 g
EDTA.2Na.2H ₂ O	1.86 g
Triton X-100	10 ml
盐酸调pH至7.4，补ddH ₂ O定容至1000 ml，4℃保存	
注：PMSF及其它蛋白酶抑制剂现用现加	

5X SDS sample buffer	配制：50 ml
Tris HCl(1M母液，pH 7.0)	12.5 ml
甘油	17.5 ml
SDS	7.5 g
溴酚蓝	15 mg
补ddH ₂ O至37.5 ml，分装并保存在-20℃	
现用现加还原剂：25% DTT(2M母液)	

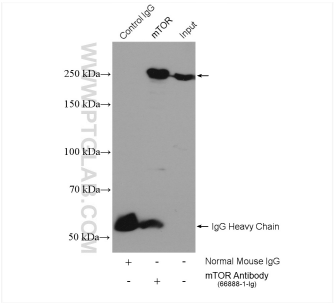
Incubation buffer	配制：1000 ml
KCl	0.2 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	1.14 g
NaCl	8 g

NaF	0.42 g
EDTA.2Na.2H ₂ O	1.86 g
盐酸调pH至7.4，补ddH ₂ O定容至1000 ml，4℃保存	
Washing buffer（1 x TBST）	
配制：1000 ml	
Tris	2.42 g
NaCl	8.76 g
KCl	0.373 g
Tween-20	2 ml
盐酸调pH至7.4，补ddH ₂ O定容至1000 ml	
洗脱液 (Elution buffer)	
配制：500 ml	
NaCl	14.6 g
Glycine	5.625 g
调pH至1.5-2.0，补ddH ₂ O定容至500 ml，4℃保存	
碱中和液 (Alkali neutralization buffer)	
NaOH溶液	0.9 M-1.3 M
The final concentration is adjusted addcording to Elution buffer	

抗体纯化

- 根据抗体的亚型确定填料种类。对于IgG1亚型的小鼠单抗一般采用Protein G beads（货号：[PR40024](#)）纯化，对于兔IgG类单抗、小鼠IgG2a、IgG2b、IgG2c、IgG3亚型的抗体、兔和鼠来源的多抗可采用Protein A beads（货号：[PR40023](#)）纯化。其他亚型的抗体参考上面的结合特性表选用填料。
- 填料的预处理。根据粗原料中抗体抗体以及纯化规模大致估计所需要的填料体积，摇匀本产品后立即取出所需体积的填料。用填料30倍体积的PBS洗涤以去除保存液。洗涤可以在纯化柱中进行，也可以用离心管进行1000 g 离心洗涤（每轮离心5-10分钟）。
- 粗原料的处理。为了得到高纯度的产品，同时让填料发挥最大性能，粗原料要求清澈均匀，待纯化的粗原料可以用0.2 um膜过滤或10000g离心10分钟以去除不溶成份。如果粗原料是动物腹水或抗血清，澄清后用PBS稀释 2 - 3 倍后再进行下一步可以有效降低非特异性结合。
- 抗体的结合。结合可以用静态法，也可以用动态法。
静态法：将待纯化的粗原料与填料混合（可以用瓶子或离心管盛装），密封好后在旋转器上旋转反应，反应可以在室温或37℃进行2-4小时，也可以4℃过夜反应。反应结束后1000 g 离心5-10分钟分离填料和上清（流穿液）。
动态法：将填料装在空的层析柱中，接至纯化仪或蠕动泵上，再使粗原料反复流经纯化柱进行结合反应，反应可以在室温或37℃进行2-4小时，也可以4℃过夜反应。反应结束后放出管路和层析柱中液体（流穿液）。
- 杂质的洗涤。用30倍填料体积的PBS洗涤填料以去除非特异结合以及未结合的杂质。操作同第 2 步。
- 抗体的洗脱。将填料转移至合适大小的层析柱内，转移后填料高度为1-5cm为宜。用洗脱液洗脱，洗脱液可以用pH 2.0-2.5 0.2M Glycine, 也可以用pH 2.0-2.5 HCl + 150mM NaCl。洗脱过程可以连续洗脱也可以用不连续洗脱。用UV法或其他快速定量方法判断洗脱峰。
- 抗体的保存。洗脱下来的抗体立即用1M Tris或饱和磷酸氢二钠中和至中性。注意中和完后可能部份抗体在等电点处沉淀形成浑浊，此时可以将pH调至8.0左右 使之溶解。最后终产品于-80℃长期保存，为了减少反复冻融可以适当分装。也可以加甘油和防腐剂后于-20℃保存。
- 填料重生和保存。纯化后的填料可以用酸碱交替洗涤各30倍柱体积，最后用PBS洗涤至中性，4度保存在20%乙醇中。

Validation Data



IP result of anti-mTOR(IP:66888-1-Ig, 5 ug;
Detection:66888-1-Ig 1:20000) with HeLa cells
lysate 640 ug.