

Protein A Beads

产品描述

本品使用重组蛋白 A 为配基，具有很高的物理化学稳定性，能够与选定哺乳动物物种的 IgG 类抗体 Fc 区相互作用。IgG 结合功能在 pH 值 8.2 时最佳，但在中性和生理缓冲液（pH 值 7.0 至 7.6）也可高效结合。Protein A beads 以高度交联的琼脂糖凝胶为基质，可以在相对较高的流速下进行抗体的纯化。蛋白 A 结合大多数人和小鼠 IgG 亚类（如人 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA；小鼠 IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3）。它还能结合大鼠 IgG1、IgG2c；山羊 IgG1、IgG2；绵羊 IgG1、IgG2；奶牛 IgG1、IgG2；马 IgG（ab）、IgG（c）。蛋白 A 与兔、狗、猫、猪、豚鼠的总 IgG 有很强的结合力。

由于该产品可以纯化多种哺乳动物的 IgG 亚类（见上文），用以做免疫沉淀（IP）或者免疫共沉淀（Co-IP）来进行蛋白功能相关研究。也可以直接装在层析柱上来纯化抗体。客户可以从腹水、血清和培养液等样品中得到高纯度的抗体，使用方便，应用广泛。

注意： 本品含有 20%乙醇，使用前请去除。

产品性质

基质 (Matrix)	CNBr-activated Sepharose™ 4FF
偶联条件 (Coupling conditions of matrix)	pH 7-9, 4°C to 25°C, 2-16 h
配体 (Ligand)	重组蛋白 A
孔径 (Bead size)	45–165 µm
平均孔径 (Mean bead size)	90 µm
结构 (Bead structure)	Highly cross-linked agarose, 4%
最大流速 (Flow Max)	4 ml/min/cm ²
推荐流速 (Recommended flow rate)	1-3 ml/min/cm ²
载量 (Capacity)	10 mg IgG per ml
pH 稳定性 (pH stability)	pH 3-10 (ligand dependent)

保存方法

4°C 保存，有效期 1 年。

需准备试剂

1. 洗液/平衡缓冲液: 0.15 M NaCl, 20 mM Na₂HPO₄, pH7.0
2. 洗脱缓冲液: 0.1 mol Glycine Hydrochloride, PH3.0
3. 中和液: 1 M Tris-HCl, pH 8.5
4. 储存液: 20% ethanol

样本准备

1. 上柱之前要确保样品溶液有合适的离子强度和 pH 值, 可以用结合/洗涤缓冲液对血清样品、腹水或细胞培养液稀释, 或者样品用结合/洗涤缓冲液透析。确保其含量和 pH 值与平衡缓冲液一致。
2. 离心稀释后的样本以沉淀碎片。
3. 用 0.45 μ m 过滤器过滤上清液。

使用方法

一、亲和纯化 (Affinity-purification)

1. 将蛋白 A 凝胶珠装入空柱中。
2. 用 3-5 倍柱体积的洗液洗涤色谱柱以去除乙醇, 然后用 5-10 倍柱体积的平衡缓冲液洗涤色谱柱以达到平衡。
3. 将样品置于室温下, 用注射器或泵将样品装入色谱柱。在大多数情况下, 样品的总体积并不重要。
4. 将样品装入柱中, 收集流动液体, 重复此动作 3-5 次。如有必要, 可重复多次, 然后对收集的液体进行合理处理。
5. 10-15 倍柱体积的洗液洗杂 Buffer 进行清洗, 洗液洗涤色谱柱以去除其他蛋白质。直到紫外吸收测到无蛋白流出。
6. 用洗脱缓冲液洗脱, 收集蛋白, 收集时用中和液调节其 pH。客户可以根据自己的要求测试抗体的相关数据。
7. 清洗及保存: 依次使用 3-5 倍柱体积的结合 Buffer 和 5 倍柱体积的去离子水平衡填料, 最后再用 5 倍柱体积的 20%的乙醇平衡, 然后保存在等体积的 20%的乙醇中, 置于 4℃ 保存, 防止填料被细菌污染。

二、免疫沉淀 (Immunoprecipitation, IP)

A. 蛋白抽提

1. 从板上刮下细胞, 把提取物转移至微量离心管。置于冰上。
2. 吸干培养基。添加含有调节因子的新鲜培养基, 使其对细胞进行处理一段时间。
3. 在非变性条件下收集细胞, 去除培养基后用冰预冷的 1X PBS 洗涤细胞 2 次。3000 转离心 3min。
4. 去除 PBS, 每块平板 (10 cm) 加入 5-7 倍沉淀体积的 RIPA 裂解液, 冰上孵育 1 小时
5. 在冰上进行 3 次超声破碎, 每次 5 秒。
6. 在 4℃, 10,000 x g 条件下, 微量离心 10 分钟, 将上清转移到新管中。上清液即为细



胞裂解物。

7. 测定裂解物浓度，取出 50 μ l 加入上样缓冲液稀释到 3mg/ml 作为 input 组，剩余部分进行后续实验。

B. 抗体孵育

1. 将一抗（按产品说明书中推荐的合适稀释比例配制）加入到浓度为 2 mg/ml 400 μ l（即为 0.8mg 总蛋白）细胞裂解物中。在 4°C 下，旋转孵育过夜。
2. 添加 protein A 琼脂糖（10–30 μ l 的 50% 珠浆），在 4°C 下，旋转孵育 6 小时。
3. 用 TBS 洗涤 6-8 次，最后加入 80 μ l 裂解液，4 度孵育 30 分钟，加入 20 μ l 5X 上样缓冲液，沸水浴 5 分钟，10000 转离心 10 分钟，留上清，进行后续实验。
4. 继续使用蛋白免疫印迹法对样品进行分析。

注意事项

1. 请勿冷冻保存本产品。
2. Protein A 琼脂糖珠使用前一定要充分颠倒若干次，使琼脂糖珠混合均匀。
3. 所有操作过程中，样本需要在 4°C 或冰上操作。
4. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
5. 本产品仅作科研用途。