



rProtein A/G Beads HP

目录

1. 产品介绍.....	1
2. 纯化流程.....	2
3. 订购信息及相关产品.....	4

1. 产品介绍

rProtein A/G Beads HP 是将 rProtein A/G 高密度定向偶联到高度交联的琼脂糖凝胶微球表面, 本产品的基质是小粒径的交联琼脂糖微球组成, 该产品具有更高的抗体结合能力和较低的蛋白非特异吸附率, 洗脱条件更均一, 一步纯化即可从血清样品中分离出纯度大于 90% 的抗体。产品性能见表 1。

本产品主要用于免疫沉淀(IP)以及免疫共沉淀(Co-IP)研究, 也可用于抗体固定及其它相关研究。用户可根据目标抗体的种属来源及亚型选择微球的类别, Protein A, Protein G 和 Protein A/G 与不同抗体的亲和性比较参见表 2。

表 1. rProtein A/G Beads HP 产品性能

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	18-25 mg hlg/ml 介质
平均粒径	30-45 μ m
最大压力	0.3 MPa, 3 bar
pH 稳定范围	3-10
储存缓冲液	20%乙醇
储存温度	2-8 $^{\circ}$ C

表 2. Protein A、Protein G 和 Protein A/G 对不同抗体的结合能力

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	Total IgG	++	++++	++++
Koala		—	+	
Llama		—	+	
Monkey(rhesus)		++++	++++	++++
Mouse	IgG1	+	++++	++
	IgG2a	++++	++++	++++
	IgG2b	+++	+++	+++
	IgG3	++	+++	+++
	IgM	variable	—	—
Pig		+++	+++	++++





表 2. Protein A、Protein G 和 Protein A/G 对不同抗体的结合能力 (续)

Rabbit	Total IgG	++++	+++	++++
Rat	IgG1	—	+	++
	IgG2a	—	++++	++++
	IgG2b	—	++	++
	IgG3	+	++	++
Sheep	Total IgG	+/-	++	++

++++=结合能力强; ++=结合能力中等; —=结合能力弱或没有结合

2. 纯化流程

本产品主要应用于免疫沉淀(IP)以及免疫共沉淀(Co-IP)研究。

2.1 缓冲液的准备

所用水和缓冲液在使用之前建议用 0.22 μ m 或 0.45 μ m 滤膜过滤。

平衡/洗杂液: 0.15 M NaCl, 20 mM Na₂HPO₄, pH 7.0

洗脱液: 0.1 M 甘氨酸, pH 3.0

中和液: 1 M Tris-HCl, pH 8.5

交联液: 0.2 M 三乙醇胺, pH 8.2

交联剂: DMP (dimethyl pimelimidate dihydrochloride)

终止液: 50 mM Tris, pH 7.5

2.2 样品准备

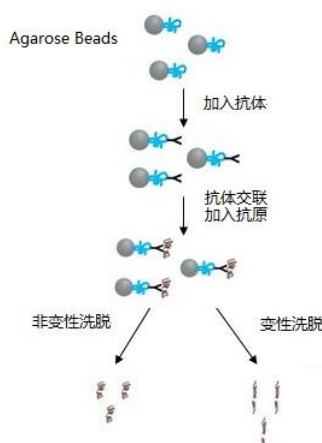
上柱前要确保样品溶液有合适的离子强度和 pH 值, 可以用平衡/洗杂液对血清样品、腹水或细胞培养液稀释, 或者样品用平衡/洗杂液透析。对于 100 mm 培养皿中的贴壁细胞, 吸除细胞培养液, 使用预冷 PBS 洗涤一次后加入 2 ml 细胞裂解液裂解细胞。对于悬浮细胞, 离心收集细胞后, PBS 洗涤一次后参考贴壁细胞的裂解方法进行裂解。植物或动物组织样品可以使用液氮研磨方法裂解。具体的裂解方法请参考不同裂解液的使用说明, 裂解液最终总蛋白浓度选择在 0.5-1 μ g/ μ l 范围内较为合适。通常针对目标蛋白的表达量不同, 需要对总蛋白浓度进行预实验调整。

2.3 去除非特异性结合 (可选)

- 1) 取 200 μ l 至 1 ml 蛋白样品, 加入约 1 μ g 和免疫沉淀时使用的 IgG 种属相同的 Normal IgG 和 20 μ l 充分重悬的 **rProtein A/G Beads HP**, 4 $^{\circ}$ C 缓慢摇动 30 min。
- 2) 2500 rpm (约 1000 $\times$ g) 离心 1 min, 取上清用于后续的免疫沉淀。注: 哺乳动物细胞内有多种成分可以和 IgG 发生结合, 可能会在后续免疫印迹中出现非特异性条带。使用 normal IgG 和 **rProtein A/G Beads HP** 对裂解液预处理可以降低非特异性吸附。

2.4 免疫沉淀操作流程

免疫沉淀直接法操作流程示意图如下:





2.4.1 抗体吸附

- 1) 取适量的 **rProtein A/G Beads HP** 加入到 2 ml 离心管中, 800 rpm 离心 1 min, 吸弃上清。
- 2) 加入 0.5 ml 平衡液, 悬浮填料 (使填料处于与目的蛋白相同的缓冲体系下, 起到保护蛋白的作用), 800 rpm 离心 1min, 吸弃上清。再重复两次。
- 3) 向步骤 2) 平衡的填料中加入抗体溶液, 悬浮填料, 室温下置于翻转混合仪或者手工轻轻翻转离心管, 约 30 min 后, 800 rpm 离心 1 min, 收集上清液, 留待检测。
- 4) 向 3) 的填料中加入 0.5 ml 的洗杂液, 悬浮填料, 进行清洗, 去除非特异性吸附的杂蛋白, 800 rpm 离心 1 min, 吸弃上清。再重复两次。

2.4.2 抗体交联 (备选)

如果需要将抗体和目标抗原复合物共同洗脱, 请忽略本步骤, 直接进行 2.4.3。50 μ l-1 ml 填料量均可以按照以下步骤操作, 无需额外增加交联液体积。

- 1) 向清洗过的填料中加入 1 ml 交联液, 800 rpm 离心 1 min, 吸弃上清。
- 2) 再向其中加入 1 ml 含 20 mM DMP (dimethyl pimelimidate dihydrochloride) 的交联液, 此试剂需要现用现配, 悬浮填料, 在室温下置于翻转混合仪或者手工轻轻翻转离心管, 促使缓冲液和填料充分接触, 约 30 min 后, 800 rpm 离心 1 min, 吸弃上清。
- 3) 再向其中加入 1ml 终止液, 悬浮填料, 终止交联反应, 在室温下置于翻转混合仪或者手工轻轻翻转离心管, 约 15 min 后, 800 rpm 离心 1 min, 再吸弃上清。
- 4) 加入 0.5 ml 的洗杂液, 悬浮填料, 进行清洗, 800 rpm 离心 1 min, 吸弃上清。再重复两次。

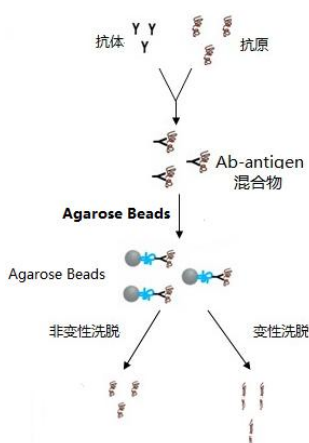
2.4.3 抗原沉淀反应

- 1) 抗原吸附: 加入含有抗原的样品 (来源 2.2 或 2.3), 用移液器轻轻吹打使抗原与填料-抗体复合物均匀分散。在室温下置于翻转混合仪或者手工轻轻翻转离心管 10 min, 使抗原与抗体充分结合, 如结合力较弱则可在室温下反应 1 h 或者在 4℃ 下反应过夜。
- 2) 洗杂: 将上述完成抗原吸附的填料-抗体-抗原复合物进行离心, 800 rpm 离心 1 min, 收集上清液, 置于冰上以备后续检测。向离心管中加入 1 ml 洗杂液, 用移液器轻轻吹打使填料-抗体-抗原复合物均匀分散, 然后进行离心分离, 800 rpm 离心 1 min, 弃上清液。再重复洗涤两次。最后加入 1 ml 洗杂液, 用移液器将填料-抗体-抗原复合物悬液转移至新的 1.5 ml 离心管中, 并进行离心分离, 800 rpm 离心 1 min, 弃上清液。
- 3) 抗原洗脱: 提供以下两种抗原洗脱方案, 可根据后期检测的需要选择不同的抗原洗脱方法。

变性洗脱法: 此方法洗脱的样品适用于 SDS-PAGE 检测。向离心管中加入 25 μ l 1×SDS-PAGE Loading Buffer 混合均匀, 95℃ 加热 5 min。然后进行离心, 800 rpm 离心 1 min, 收集上清液, 进行 SDS-PAGE 电泳, 转膜后进行 Western 分析。

非变性洗脱法: 此方法洗脱的样品保持原有的生物活性, 可用于后期功能分析。向离心管中加入 5 倍柱体积的洗脱液, 用移液器吹打 5 次, 混匀, 然后在室温下置于翻转混合仪或者手工轻轻翻转离心管, 10 min 后, 离心, 800 rpm 离心 1 min, 吸取上清液, 收集洗脱组分, 即为目标抗原, 收集上清液至新的离心管中, 并立即加入十分之一体积的中和液, 将洗脱组分 pH 调节至 7.0-8.0, 用于后期功能分析。

2.5 免疫沉淀操作流程 2



- 1) 抗体与抗原混合: 将抗体与含有目的蛋白的裂解液 (来源 2.2 或 2.3) 混合, 室温震荡孵育 30 min-60 min, 或者 2-8℃ 孵育过夜, 取决于抗体与抗原的结合效率以及抗原的稳定性, 需要自己优化结合条件。形成抗原-抗体混合物。

注意: 抗体的加入量要考虑到下面填料的量, 抗体的加入量过多会影响到抗原-抗体混合物与填料的结合。建议抗体加入量为填料 80% 的最大载量。

- 2) 填料准备: 取适量的 **rProtein A/G Beads HP** 加入到 2 ml 离心管中, 800 rpm 离心 1 min, 吸弃上清。加入 0.5ml 平衡液, 悬浮填料 (使填料处于与目的蛋白相同的缓冲体系下, 起到保护蛋白的作用), 800 rpm 离心 1 min, 吸弃上清。再重复两次。
- 3) 抗原-抗体混合物的吸附: 将步骤 1) 中得到的抗原-抗体混合物加入处理好后的填料中, 混合均匀, 在室温下置于翻转混合仪或者手工轻轻翻转离心管, 促使样品和填料充分接触并吸附, 约 30 min 后, 800 rpm 离心 1 min, 收集上清液, 留待检测。





4) 洗杂：向上述离心管中加入 0.5 ml 的洗杂液，悬浮填料，进行清洗，去除非特异性吸附的杂蛋白，800 rpm 离心 1 min，吸弃上清。再重复两次。

5) 抗原洗脱：提供以下两种抗原洗脱方案，可根据后期检测的需要选择不同的抗原洗脱方法。

变性洗脱法：此方法洗脱的样品适用于 SDS-PAGE 检测。向离心管中加入 25 μ l 1 $\times$ SDS-PAGE Loading Buffer 混合均匀，95 $^{\circ}$ C 加热 5 min。然后进行离心，800 rpm 离心 1 min，收集上清液，进行 SDS-PAGE 电泳，转膜后进行 Western 分析。

非变性洗脱法：此方法洗脱的样品保持原有的生物活性，可用于后期功能分析。向离心管中加入 5 倍柱体积的洗脱液，用移液器吹打 5 次，混合均匀，然后在室温下置于翻转混合仪或者手工轻轻翻转离心管，10 min 后，800 rpm 离心 1 min，吸取上清液，收集洗脱组分，即为目标抗原，收集上清液至新的离心管中，并立即加入十分之一体积的中和液，将洗脱组分 pH 调节至 7.0-8.0，用于后期功能分析。

3. 订购信息及相关产品

产品名称	货号	规格
rProtein A/G Beads HP	SA133005	5 ml
	SA133025	25 ml
	SA133100	100 ml
	SA133500	500 ml
	SA13301L	1 L

