

Protein A-agarose

货号: P0231

储存条件: 4°C保存, 有效期5年。请勿冷冻。

产品描述

Protein A Agarose 主要用于免疫沉淀(Immunoprecipitation, IP)或免疫共沉淀(Co-IP), 也可以用于抗体的纯化。

Protein A 是一种发现于金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的细胞壁表面蛋白, 分子量为 42kDa; 适当重组改造的 Protein A、G 与琼脂糖凝胶(agarose)以一定的方式结合, 可用于免疫沉淀或抗体的纯化。Protein A Agarose 适合于免疫沉淀 human IgG1、IgG2、IgG4, mouse IgG2a、IgG2b 及 rabbit IgG 等。

本品中的重组 Protein A 可与多数哺乳动物 IgG 的 Fc 端特异性结合, 分子量为 14kDa。该重组 Protein A 经过基因工程技术的改造, 使其成为耐碱结构域, 从而实现 Protein A 的耐碱特性, 并仅保留了与 IgG Fc 端结合相关的氨基酸序列, 去除了结合位点以外可能导致非特异性结合的序列, 从而可以有效减少非特异性结合。

本品中的 Protein A 共价连到大孔径琼脂糖上。每 ml Protein A agarose beads (沉淀物)可以结合超过 60mg human IgG。本品中 agarose beads 的平均直径为 45-165um, 抗体纯化时的推荐线性流速为, 400cm/h, 耐压指数最高为 0.5MPa。工作 pH 值范围为 3-12。

本产品配制在可以直接用于免疫沉淀和抗体纯化的适当溶液中, 每 ml 中共含有 0.25ml agarose beads (沉淀物)。如果用于常规的免疫沉淀, 每 ml 本产品(沉淀和溶液为 1:3 的混合物)可以免疫沉淀 50 次。

注意事项

1. 请勿冷冻保存本产品。
2. Protein A Agarose 使用前一定要充分重悬, 即充分颠倒若干次使混合均匀。
3. 本产品含有微量的防腐剂, 不会影响常规的免疫沉淀和抗体纯化。但如果后续涉及酶活性测定, 使用本产品前宜先用 TBS 等适当溶液洗涤 Protein A agarose beads 三次, 以充分消除防腐剂可能产生的干扰。
4. 从蛋白样品收集开始, 所有步骤中蛋白样品都必须在 4 度或冰上操作。
5. 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, 不得用于食品或药品, 不得存放于普通住宅内。
6. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明:

1. 免疫沉淀(Immunoprecipitation, IP):

a. 蛋白样品的准备:

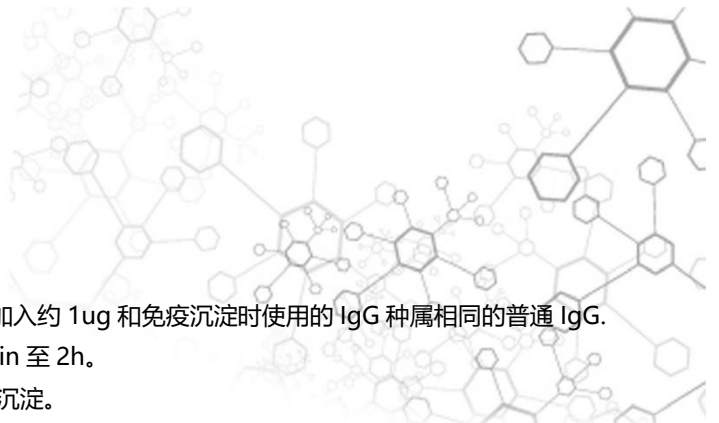
(a) 对于 10cm 细胞培养皿中的贴壁细胞, 吸除细胞培养液, PBS 洗涤一次, 然后加入 500ul 至 2ml 细胞裂解液裂解细胞。可使用 LABLEAD 生产的 Westen 及 IP 细胞裂解液 (Cat: W0013) 或各种 RIPA 裂解液 (Cat: R1090/R1091) 等进行细胞的裂解。

(b) 对于组织样品参考贴壁细胞使用裂解液的比例进行裂解。

(c) 对于悬浮细胞, 离心收集细胞后, PBS 洗涤一次, 然后参考贴壁细胞的裂解方法进行裂解。

注:详细的裂解方法参考不同裂解液的详细使用方法。对于不同的培养器材, 参考 10 厘米培养皿的裂解液的用量进行裂解。如果裂解获得的蛋白样品浓度过高, 可以用裂解液或 PBS 适当稀释, 如果蛋白样品浓度过低, 在以后的裂解过程中宜适当减少裂解液的用量。





b. 去除非特异性结合(可选做):

(a) 取 200ul~1ml 蛋白样品, 蛋白量约为 200ug 至 1mg, 加入约 1ug 和免疫沉淀时使用的 IgG 种属相同的普通 IgG. 和 20ul 充分重悬的 Protein A Agarose, 4°C 缓慢摇动 30min 至 2h。

(b) 2500rpm(约 1000g)离心 5min, 取上清用于后续的免疫沉淀。

注: 所谓种属相同的 IgG 是指后续免疫沉淀时用的是小鼠 IgG, 则在本步骤中可以加入 normal mouse IgG, 如无 normal IgG, 可以加入其它不影响后续检测的 mouse IgG 类型的抗体。通过和 normal IgG 和 Protein A Agarose 的孵育, 可以充分降低非特异性的结合, 降低背景。

c. 免疫沉淀:

(a) 加入 0.2-2ug 用于免疫沉淀的一抗, 4°C 缓慢摇动过夜。

(b) 再加入 20ul 充分重悬的 Protein A Agarose, 4°C 缓慢摇动 1-3h(为方便后续的洗涤操作, 可以把加入充分重悬的 Protein A Agarose 的量调整为 40ul)。

(c) 2500rpm(约 1000g)离心 5min, 或瞬时高速离心, 小心吸除上清, 注意可留下少量上清但不能吸掉 Protein A Agarose。

(d) 用准备蛋白样品时的裂解液或 PBS 洗涤沉淀 5 次, 裂解液或 PBS 的用量每次为 0.5-1ml。洗涤时离心条件和吸除上清的要求同步(c)。

(e) 完成最后一次洗涤后, 去除上清, 加入 20-40ul 1XSDS-PAGE 电泳上样缓冲液 Votex 重悬沉淀, 瞬时高速离心把样品离心至管底。

(f) 100°C 或沸水浴处理 3-5min, 取部分或全部样品用于 SDS-RAGE 电泳, 暂时不用的样品可以 -20°C 保存。

2. 免疫共沉淀:

参考免疫沉淀的方法进行, 但免疫共沉淀(Co-P)通常必须使用未经冻存的新鲜蛋白样品。普通的免疫沉淀虽然可以使用冻存的蛋白样品, 但也宜用新鲜的蛋白样品为佳。

3. 抗体纯化:

a. 准备工作:

(a) 用 0.45um 或 0.2um 孔径的滤膜过滤所用的溶液。

(b) 所有的溶液必须用超声等方法脱气(degas)。

(c) 选择适当的纯化柱, 用适量的 Protein A Agarose 装填纯化柱。也可使用 LABLEAD 的预装柱产品 (Cat:P0231G)

(d) 用 10-20 倍柱体积的 TBS 洗涤并平衡纯化柱, 流速可以用恒流泵控制为 1ml/min (1ml 预装柱)。如无恒流泵, 也可以完全依靠重力洗涤并平衡纯化柱。

b. 抗体纯化:

(a) 把含有待纯化的抗体上样到纯化柱。

(b) 待纯化的抗体过柱后, 用 10-20 倍柱体积的 TBS 洗涤, 以去除未结合和非特异性结合的蛋白。洗涤是否完全可以通过测定 280nm 的吸光度进行确定。

(c) 洗涤完后, 用 10ml 50mM glycine, pH2.7 作为洗脱液洗脱结合的抗体。某些抗体和 Protein A 的结合能力很强, 在 pH2.7 时洗脱效果不太理想, 可以使用 50mM glycine, pH1.9 作为洗脱液。分管收集洗脱下的抗体, 根据蛋白浓度或后续的检测效果确定洗脱峰在哪几个收集管中。

c. 纯化柱的再生:

(a) 用 10-20 倍柱体积的 TBS 洗涤纯化柱, 使纯化柱达到中性的 pH。

(b) 用 TBS 来保存再生的纯化柱。





兰博利德 LABLEAD
高新技术企业

