

Protein G agarose

货号: P0232

储存条件: 4°C保存, 有效期5年。请勿冷冻。

产品描述

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

Protein G 是 C 型或 G 型链球菌(*Streptococcal bacteria*)表达的免疫球蛋白结合蛋白。Protein A 和 Protein G 功能相似, 能特异性地与哺乳动物免疫球蛋白 (Immunoglobulin, Ig)结合, 结合的部位通常为免疫球蛋白的 Fc 区, 但有资料显示 Protein A 也会和人 VH3 家族的 Fab 区结合, 而 Protein G 有时与 Fab 区也有一定结合。同时, 两者对于不同的免疫球蛋白亚类的结合能力有所不同。适当重组改造的 Protein 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 G Agarose 适合于免疫沉淀 human IgG1、IgG2、IgG3、IgG4, mouse IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3, rat IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG2c, 以及 rabbit、goat 多克隆抗体。

本产品中的 Protein G 可与多数哺乳动物 IgG 的 Fc 端特异性结合, 分子量为 22KDa。该重组 Protein G 通过改造, 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。每个 Protein G 分子可结合 3 个 IgG 分子。

本产品中 Protein G 共价连接到 4%的高交联度、高流速琼脂糖上。每 ml Protein G agarose beads (沉淀物)可以结合超过 40mg human IgG。本产品中 agarose beads 的直径为 45-165 μ m, 抗体纯化时的推荐线性流速为 50-300cm/h, 耐压指数最高为 0.45MPa。Protein G Agarose 如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 G 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, 使用本产品前直先用 TBS 等适当溶液洗涤 Protein G 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 Western 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 10cm 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 至 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 G 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其它 mouse IgG 类型的抗体。通过和 normal IgG 和 Protein G 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 G 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 G 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也不能吸掉 Protein G 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骤(c)。

(e) 完成最后一次洗涤后，去除上清，加入 20-40ul 2X SDS-PAGE 电泳上样缓冲液 Vortex 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-PAGE 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-IP)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，用适当量的 Protein G Agarose 装填纯化柱。也可使用 LABLEAD 的预装柱产品。

(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 G 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。

