



rProtein A/G Beads 4FF

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 4FF 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，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 4FF 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	10-15 mg Rabbit IgG/ml 介质
粒径 (µm)	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 1XPBS
储存温度	2°C - 8°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 μm 或 0.45 μm 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

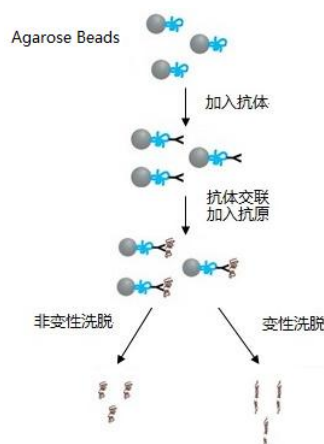
上柱前要确保样品溶液有合适的离子强度和 pH 值, 可以用平衡/洗杂液对血清样品、腹水或细胞培养液稀释, 或者样品用平衡/洗杂液透析。对于 100 mm 培养皿中的贴壁细胞, 吸除细胞培养液, 使用预冷 PBS 洗涤一次后加入 2 ml 细胞裂解液裂解细胞。对于悬浮细胞, 离心收集细胞后, PBS 洗涤一次后参考贴壁细胞的裂解方法进行裂解。植物或动物组织样品可以使用液氮研磨方法裂解。具体的裂解方法请参考不同裂解液的使用说明, 裂解液最终总蛋白浓度选择在 0.5-1 μg/μl 范围内较为合适。通常针对目标蛋白的表达量不同, 需要对总蛋白浓度进行预实验调整。

2.3 去除非特异性结合 (可选)

- 1) 取 200 μl 至 1 ml 蛋白样品, 加入约 1 μg 和免疫沉淀时使用的 IgG 种属相同的 Normal IgG 和 20 μl 充分重悬的 **rProtein A/G Beads 4FF**, 4°C 缓慢摇动 30 min。
- 2) 2500 rpm (约 1000×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 4FF** 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 4FF** 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。

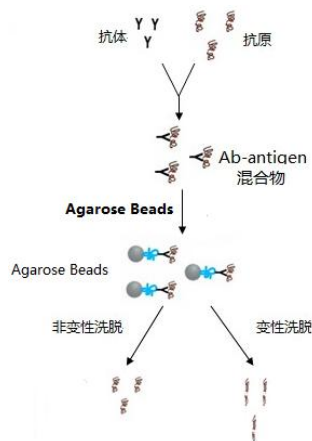
2.4.3 抗原沉淀反应

- 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 $^{\circ}$ C 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 \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 $^{\circ}$ C 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 4FF** 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-抗体混合物加入到处理好的填料中，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 4FF	SA032005	5 ml
	SA032025	25 ml
	SA032100	100 ml
	SA032500	500 ml
	SA03201L	1 L
	SA03210L	10 L
AbCap A/G 4FF	SA032C11	1 X 1 ml
	SA032C51	5 X 1 ml
	SA032C15	1 X 5 ml
	SA032C55	5 X 5 ml
	SA032CS	3X1 ml+1X5 ml