

ProteinIso[®] Protein A Resin

使用前请仔细阅读说明书

目录号: DP301

版本号: Version 1.1

保存: 2-8°C (20% 乙醇)保存两年。

产品说明

ProteinIso[®] Protein A Resin是一种以Protein A为配基、琼脂糖为基质的亲和层析介质, 可以高效、特异地与抗体Fc段结合, 用于单抗和多抗的分离纯化。因为抗体只有Fc段参与结合Protein A, 而Fab段仍可以结合抗原, 所以ProteinIso[®] Protein A Resin也适用于免疫复合物的分离, 如IP, Co-IP等。

产品特性

参数	指标
基质	4% 交联琼脂糖凝胶
配基	r-Protein A
形状	球形
介质平均粒径	90 μm (45-165)
配基密度	6 mg Protein A/ml wet gel
动态载量	40-50 mg h-IgG /ml wet gel
最高流速(25°C)	300 cm/h
推荐流速	<150 cm/h
最高耐压	0.3 Mpa
pH 稳定性	3-10

操作步骤

一、抗体纯化实验步骤

用ProteinIso[®] Protein A Resin对抗体分离纯化的过程通常包括: 装柱、平衡、上样、洗涤、洗脱、再生步骤。

- 1、装柱: 重悬介质, 根据待纯化蛋白量, 将适量介质加入层析柱, 静置。
- 2、平衡: 用5-10倍柱体积的平衡缓冲液 (20 mM PB, 0.15 M KCl, pH 7.0) 平衡层析柱, 至流出液电导和pH不变 (与平衡缓冲液一致)。
- 3、上样: 样品缓冲液应尽可能与平衡缓冲液一致。为了避免堵塞层析柱, 样品应经离心或微滤(0.45 μm)处理。
- 4、洗涤: 上样完毕后, 用5-10倍柱体积的平衡缓冲液洗涤层析柱, 收集流出液。
- 5、洗脱: 用洗脱缓冲液 (20 mM柠檬酸, pH 3.0-4.0; 或0.1 M甘氨酸, pH 3.0; 或20 mM乙酸钠, pH 3.0-4.0) 洗脱, 收集流出液。具体洗脱条件与抗体结合强度和稳定性密切相关, 必要时需对洗脱缓冲液进行优化。洗脱后, 立即用碱性缓冲液 (如1 M Tris-HCl, pH 9.0) 中和收集到的抗体。
- 6、再生: 介质使用数次后 (具体次数与原料的种类和来源及实验要求有关), 结合能力会有所下降, 需要对介质进行再生。
 - (1) 用3-5倍柱体积0.1 M乙酸或0.1 M乙酸/20%乙醇清洗, 然后立即用5倍柱体积中性PBS缓冲液平衡至中性。
 - (2) 也可用3-5倍柱体积0.05 M NaOH /1 M NaCl或6 M盐酸胍清洗, 并用3-5倍柱体积纯水冲洗, 然后立即用5倍柱体积中性PBS缓冲液平衡至中性。

二、免疫沉淀 (IP) 实验步骤 (以 $2-5 \times 10^7$ 个待检细胞为例) :

- 1、加入3-5 ml预冷的PBS润洗细胞, 弃上清, 重复两次。
- 2、加入1 ml预冷的IP裂解液 (如25 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 mM蛋白酶抑制剂 Cocktail, pH 7.4, 具体成分会因待检蛋白类型而有所不同), 冰上裂解20分钟, 将细胞转移至1.5 ml离心管中, 2-8°C 14,000×g离心10分钟, 取上清。



- 3、预处理（可选）：在上清中加入20 μl *ProteinIso*[®] Protein A Resin或*ProteinIso*[®] Protein G Resin（用前需充分混匀，小心吸取20 μl，重悬于500 μl IP裂解液，2-8℃ 500×g离心5分钟，弃上清，重复三次。）2-8℃混合孵育30-60分钟。2-8℃ 500×g离心5分钟，取上清。
- 4、加入0.5-2 μg待检蛋白相应抗体，2-8℃孵育2-4小时或过夜。
- 5、加入20-50 μl *ProteinIso*[®] Protein A Resin或*ProteinIso*[®] Protein G Resin，2-8℃混合孵育1-2小时或过夜。
- 6、2-8℃ 500×g离心5分钟，弃上清。
- 7、加入500 μl预冷的IP裂解液洗涤琼脂糖珠，2-8℃ 500×g离心5分钟，尽量吸净上清，重复三次。
- 8、加入1×蛋白上样缓冲液，煮沸5分钟，Western Blot检测待检蛋白。

Protein A和Protein G选择指南

Protein A和Protein G偶联的琼脂糖亲和介质都可以用于抗体纯化，但是对不同来源以及亚类的免疫球蛋白，Protein A和Protein G表现出不同的亲和力。下表列出了二者对IgG结合能力的对比，供参考。

需要说明的是，抗体结合能力的强弱，并不直接反应抗体纯化效果的好坏。

来源	IgG亚型	Protein A结合能力	Protein G结合能力
人	IgG ₁	++++	++++
	IgG ₂	++++	++++
	IgG ₃	-	++++
	IgG ₄	++++	++++
小鼠	IgG ₁	+	++++
	IgG _{2a}	++++	++++
	IgG _{2b}	+++	+++
	IgG ₃	++	+++
兔	IgG	++++	+++
山羊	IgG	-	++
马	IgG	++	++++
狗	IgG	++	+
牛	IgG	++	++++
猪	IgG	+++	+++
猴	IgG	++++	++++

注意事项

- 为避免层析柱被堵塞，样品（特别是细菌裂解液）上样前，建议使用0.45 μm过滤器过滤。
- 介质反复使用后，其结合能力的改变与所纯化的样品有关。为避免交叉污染，建议不要用同一份介质纯化不同抗体。

本产品仅供研究，不用于临床诊断。

版本号: V1.1-202302

服务电话 +86-10-57815020

服务邮箱 complaints@transgen.com

