碧云天生物技术/Beyotime Biotechnology
订货热线：400-1683301或800-8283301
订货e-mail：order@beyotime.com
技术咨询：info@beyotime.com
网址：http://www.beyotime.com

碧云天网站 微信公众号

Protein A Agarose (Fast Flow，抗体纯化用)

产品编号	产品名称	包装
P2015-2ml	Protein A Agarose (Fast Flow，抗体纯化用)	2ml
P2015-10ml	Protein A Agarose (Fast Flow，抗体纯化用)	10ml
P2015-50ml	Protein A Agarose (Fast Flow，抗体纯化用)	50ml
P2015-200ml	Protein A Agarose (Fast Flow，抗体纯化用)	200ml

产品简介：

- 本Protein A Agarose (Fast Flow，抗体纯化用)即快流速蛋白A琼脂糖凝胶，也称为Protein A Resin (蛋白A亲和层析树脂)，主要用于抗体的纯化，也可以用于免疫沉淀(Immunoprecipitation, IP)或免疫共沉淀(Co-IP)。本Protein A Agarose具有耐碱特性，可耐受0.1-0.5M的NaOH。
- 对于免疫沉淀或免疫共沉淀，也可以选用碧云天的P2006 Protein A Agarose (Fast Flow，进口分装)或P2051 Protein A Agarose (Fast Flow, for IP)。
- 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；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 A、G与琼脂糖凝胶(agarose)以一定的方式结合，可用于抗体的纯化或免疫沉淀。
- Protein A Agarose适合于纯化human IgG_1、IgG_2、IgG_4，mouse IgG_{2a}、IgG_{2b}及rabbit IgG等。下表是碧云天Protein A、Protein G、Protein A+G Agarose产品与人、小鼠、大鼠常见的免疫球蛋白亚类的结合能力及不同物种的总结合能力情况表。

Species	Ig	Protein A	Protein G	A+G
Human	IgG_1	++++	++++	++++
	IgG_2	++++	++++	++++
	IgG_3	-	++++	++++
	IgG_4	++++	++++	++++
	IgA	++	-	++
	IgD	++	-	++
	IgE	++	-	++
	IgM	++	-	++
Mouse	IgG_1	+	++++	++++
	IgG_{2a}	++++	++++	++++
	IgG_{2b}	+++	+++	+++
	IgG_3	++	+++	+++
	IgM	+/-	-	+/-
Rat	IgG_1	-	+	+
	IgG_{2a}	-	++++	++++
	IgG_{2b}	-	++	++
	IgG_{2c}	+	++	++
	IgM	+/-	-	+/-

Total Ig	Protein A	Protein G	A+G
Human	++++	++++	++++
Mouse	+++	+++	+++
Rat	+/-	++	++
Rabbit	++++	+++	++++
Goat	-	++	++
Chicken	-	+	+
Cow	++	++++	++++
Guinea Pig	++++	++	++++
Hamster	+	++	++
Horse	++	++++	++++
Pig	+++	+++	+++
Sheep	+/-	++	++

++++: Strong Binding
++~+++: Medium Binding
+: Weak Binding
+/-: Weak or No Binding
-: No Binding

- 本产品中的重组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。每个Protein A分子可以结合2个IgG分子。
- 本产品有如下特点：**超高IgG载量和优异的稳定性**，每毫升Protein A agarose beads (沉淀物)可以结合超过50mg human IgG，在不同的保留时间和流速下具有良好的动态载量表现；**杰出的耐碱性能和超高可重复利用度**，以0.1M NaOH进行200次在位清洗后，载量无明显降低，以0.5M NaOH进行100次在位清洗后，仍保留80%载量；**良好的耐压性能**，使用刚性交联的4%琼脂糖基质，耐压指数最高达0.3MPa；**超低配基脱落**，配基脱落值小于10ng/mg IgG，降低了下游纯化过程中可能由于配基脱落造成的污染。本产品具体参数如下表：

指标	具体参数
规格	多种包装规格，25%悬浊液
琼脂糖	刚性交联的4%琼脂糖
琼脂糖平均粒径	~90μm
配基	耐碱重组Protein A
动态载量	~50mg hIgG/ml Protein A agarose beads (沉淀物) (TR=4min, hIgG 5mg/ml, 300cm/h线性流速)
配基脱落值	<10ng/mg IgG (ELISA)
最高压力	~0.3MPa
最高流速	~1200cm/h
推荐流速	50-300cm/h
化学稳定性	在常用缓冲液中保持稳定
工作pH范围	3-12
在位清洗	0.1-0.5M NaOH
化学兼容性	Detergents: 1% Triton X-100, 1% NP-40, 0.1% SDS; Reductants: 2mM β-mercaptoethanol; Chelates: 20mM EDTA; Others: 1mM PMSF, 5% glycerol
储存	TBS (含防腐剂)，4ºC保存

- 本产品配制在可以直接用于抗体纯化和免疫沉淀的适当溶液中，每毫升中共含有0.25ml agarose beads (沉淀物)。 本产品标注的体积为悬浊液总体积。

包装清单：

产品编号	产品名称	包装
P2015-2ml	Protein A Agarose (Fast Flow, 抗体纯化用)	2ml
P2015-10ml	Protein A Agarose (Fast Flow, 抗体纯化用)	10ml
P2015-50ml	Protein A Agarose (Fast Flow, 抗体纯化用)	50ml
P2015-200ml	Protein A Agarose (Fast Flow, 抗体纯化用)	200ml
—	说明书	1份

保存条件：

4ºC保存，一年有效。请勿冷冻。

注意事项：

- 请勿冷冻保存本产品。
- 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。
- 本产品含有微量的防腐剂，不会影响常规的抗体纯化和免疫沉淀。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。
- 从蛋白样品收集开始，所有步骤中蛋白样品都必须在4ºC或冰上操作。
- 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。
- 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. 抗体纯化：

a. 准备工作：

(a) 用0.45微米或0.2微米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 A Agarose装填纯化柱。也可使用碧云天的预装柱产品(P2024、P2025)。

(d) 用10-20倍柱体积的PBS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。

(e) 建议用PBS对样品进行1:1或更高比例的稀释或透析以确保样品适合的离子浓度、pH值用于结合本产品。

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PBS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，按每毫升洗脱液加入100μl中和液的比例，在收集管中预先加入适量中和液(ST788或1M Tris-HCl, pH8.8)，

然后用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. 纯化柱的清洗和再生：
   (a) 用至少5倍柱体积的PBS洗涤纯化柱。
   (b) 用至少2倍柱体积的0.1M或0.5M的NaOH在位清洗，在位清洗时间至少10分钟。
   (c) 立刻用至少5倍柱体积的无菌且脱气的PBS清洗纯化柱到达中性pH，并保存再生的纯化柱。
   注：纯化柱的清洗和再生须在洗脱后即进行。一般情况，5个使用循环后建议清洗一次，或者使用一个循环用0.1M的NaOH在位清洗一次，每使用十个循环用0.5M的NaOH在位清洗一次。

2. 免疫沉淀(Immunoprecipitation, IP)：

a. 蛋白样品的准备：
   (a) 对于10厘米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500微升至2毫升细胞裂解液裂解细胞。可以使用碧云天生产的Western及IP细胞裂解液(P0013)或各种RIPA裂解液(P0013B、P0013C、P0013D或P0013E)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200微升至1毫升蛋白样品，蛋白量约为200微克至1毫克，加入约1微克和免疫沉淀时使用的IgG种属相同的普通IgG和20微升充分重悬的Protein A Agarose，4ºC缓慢摇动30分钟至2小时。
   (b) 2500rpm(约1000g)离心5分钟，取上清用于后续的免疫沉淀。
   注：所谓种属相同的IgG是指，例如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 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0.2-2微克用于免疫沉淀的一抗，4ºC缓慢摇动过夜。
   (b) 再加入20微升充分重悬的Protein A Agarose，4ºC缓慢摇动1-3个小时(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40微升)。
   (c) 2500rpm(约1000g)离心5分钟，或瞬时高速离心，小心吸除上清，注意宁可留下少量上清也不能吸掉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0.5-1毫升。洗涤时离心条件和吸除上清的要求同上面的步骤(c)。
   (e) 完成最后一次洗涤后，去除上清，加入20-40微升1X 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) 100ºC或沸水浴处理3-5分钟，取部分或全部样品用于SDS-PAGE电泳，暂时不用的样品可以-20ºC保存。

3. 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。

相关产品：

产品编号	产品名称	包装
P2006	Protein A Agarose (Fast Flow, 进口分装)	2ml
P2009	Protein G Agarose (Fast Flow, 进口分装)	2ml
P2012	Protein A+G Agarose (Fast Flow, 进口分装)	2ml
P2015-2ml	Protein A Agarose (Fast Flow, 抗体纯化用)	2ml
P2015-10ml	Protein A Agarose (Fast Flow, 抗体纯化用)	10ml
P2015-50ml	Protein A Agarose (Fast Flow, 抗体纯化用)	50ml
P2015-200ml	Protein A Agarose (Fast Flow, 抗体纯化用)	200ml
P2017-2ml	Protein G Agarose (Fast Flow, 抗体纯化用)	2ml
P2017-10ml	Protein G Agarose (Fast Flow, 抗体纯化用)	10ml
P2017-50ml	Protein G Agarose (Fast Flow, 抗体纯化用)	50ml
P2017-200ml	Protein G Agarose (Fast Flow, 抗体纯化用)	200ml
P2019-2ml	Protein A+G Agarose (Fast Flow, 抗体纯化用)	2ml
P2019-10ml	Protein A+G Agarose (Fast Flow, 抗体纯化用)	10ml
P2019-50ml	Protein A+G Agarose (Fast Flow, 抗体纯化用)	50ml

P2019-200ml	Protein A+G Agarose (Fast Flow, 抗体纯化用)	200ml
P2024	Protein A Agarose (Fast Flow, 1ml)预装柱	1个
P2025	Protein A Agarose (Fast Flow, 5ml)预装柱	1个
P2026	Protein G Agarose (Fast Flow, 1ml)预装柱	1个
P2027	Protein G Agarose (Fast Flow, 5ml)预装柱	1个
P2028	Protein A+G Agarose (Fast Flow, 1ml)预装柱	1个
P2029	Protein A+G Agarose (Fast Flow, 5ml)预装柱	1个
P2051-2ml	Protein A Agarose (Fast Flow, for IP)	2ml
P2051-10ml	Protein A Agarose (Fast Flow, for IP)	10ml
P2051-50ml	Protein A Agarose (Fast Flow, for IP)	50ml
P2053-2ml	Protein G Agarose (Fast Flow, for IP)	2ml
P2053-10ml	Protein G Agarose (Fast Flow, for IP)	10ml
P2053-50ml	Protein G Agarose (Fast Flow, for IP)	50ml
P2055-2ml	Protein A+G Agarose (Fast Flow, for IP)	2ml
P2055-10ml	Protein A+G Agarose (Fast Flow, for IP)	10ml
P2055-50ml	Protein A+G Agarose (Fast Flow, for IP)	50ml

使用本产品的文献：

1. Zou G,Liu T,Guo L,Huang Y,Feng Y,Duan T. MicroRNA-32 silences WWP2 expression to maintain the pluripotency of human amniotic epithelial stem cells and β islet-like cell differentiation. Int J Mol Med. 2018 Apr;41(4):1983-1991.
2. Mo ZQ,Han Q,Zeng YL,Wang JL,Li XZ,Li YW,Sun HY,Li AX,Luo XC,Dan XM. Molecular characterization and function analysis of grouper (Epinephelus coioides) Bruton's tyrosine kinase BTK. FISH SHELLFISH IMMUN. 2018 Jun;77:91-99.
3. Zhang Q,Zhang P,Qi GJ,Zhang Z,He F,Lv ZX,Peng X,Cai HW,Li TX,Wang XM,Tian B. Cdk5 suppression blocks SIRT1 degradation via the ubiquitin-proteasome pathway in Parkinson's disease models. BBA-GEN SUBJECTS. 2018 Jun;1862(6):1443-1451.
4. Lin J,Zheng J,Zhang H,Chen J,Yu Z,Chen C,Xiong Y,Liu T. Cytochrome P450 family proteins as potential biomarkers for ovarian granulosa cell damage in mice with premature ovarian failure. INT J CLIN EXP PATHO. 2018 Aug 1;11(8):4236-4246. eCollection 2018.
5. Mo ZQ,Wang JL,Han R,Han Q,Li YW,Sun HY,Luo XC,Dan XM. Identification and functional analysis of grouper (Epinephelus coioides) B-cell linker protein BLNK. FISH SHELLFISH IMMUN. 2018 Oct;81:399-407.
6. Ying Y,Jin J,Ye L,Sun P,Wang H,Wang X. Phloretin Prevents Diabetic Cardiomyopathy by Dissociating Keap1/Nrf2 Complex and Inhibiting Oxidative Stress. FRONT ENDOCRINOL. 2018 Dec 20;9:774.

Version 2022.01.19