

## 蛋白固定与亲和纯化试剂盒

产品编号	产品名称	包装
P2059S	蛋白固定与亲和纯化试剂盒	5次

### 产品简介:

- 碧云天研发生产的蛋白固定与亲和纯化试剂盒(Protein Immobilization and Affinity Purification Kit), 也称巯基蛋白固定试剂盒(Sulfhydryl Immobilization Kit for Proteins)或巯基多肽固定试剂盒(Sulfhydryl Immobilization Kit for Peptides), 是一种将多肽或蛋白(包括抗原、抗体等)通过其巯基固定在碘乙酰胺琼脂糖凝胶(Iodoacetyl Agarose)上, 进而蛋白与蛋白或多肽等之间的特异性相互作用通过亲和层析分离纯化目的蛋白或多肽的试剂盒, 包括利用抗原抗体的特异性反应对免疫血清或培养液上清中的抗体进行高效纯化。
- 本试剂盒中提供的Iodoacetyl Agarose (碘乙酰胺琼脂糖凝胶), 也称Iodoacetyl琼脂糖凝胶、巯基蛋白琼脂糖凝胶、Iodoacetyl Resin, 是由高质量的碘乙酸衍生物与高度交联的6%琼脂糖共价偶联而成, 可快速、高效、特异地与含巯基的抗原结合, 从而实现抗原的固定化, 进而利用抗原抗体的特异性反应对免疫血清中的抗体进行高效纯化, 是常用的抗体高效纯化介质。碘乙酰胺琼脂糖凝胶也可以与含巯基的多肽、蛋白或其它生物样品结合, 从而用于去除样品中含巯基的生物杂质。
- 本试剂盒原理如下。卤代乙酰基(Haloacetyls)与巯基化合物在生理至碱性条件下(pH7.2-9)会发生亲核取代反应, 形成稳定的硫醚键, 该反应主要分为两步: 第一步为亲核取代, 即巯基中的硫原子作为亲核试剂, 攻击卤代物中的卤素原子形成一个中间体; 第二步为消除反应, 中间体经过一系列的质子转移和电子重排形成最终的产物。本试剂盒中Iodoacetyl Agarose主要基于碘乙酰胺在生理环境下容易与谷胱甘肽和半胱氨酸发生反应, 形成相应的硫醚和卤化氢[1], 从而进一步用于后续的亲和纯化。
- 本试剂盒在抗体纯化等领域内应用非常广泛。Iodoacetyl Agarose可以特异地结合并固定含巯基的抗原、多肽或蛋白等生物配体, 用于抗体等能特异性相互作用的蛋白或多肽的纯化。本试剂盒的实验流程参考图1。

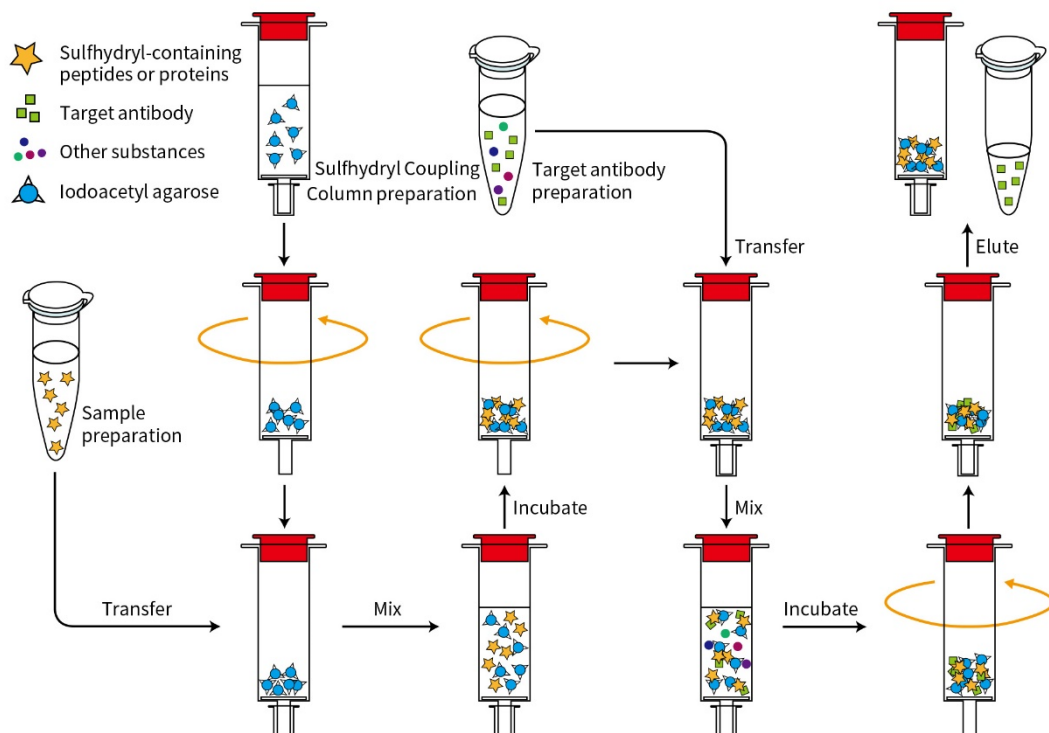


图1. 碧云天的蛋白固定与亲和纯化试剂盒(P2059)的实验流程图。

- **本试剂盒结合容量高。**与同类的很多产品相比, 本试剂盒具有非常高的结合容量, 对复杂样品中含巯基的抗原、多肽或蛋白等生物配体可以快速进行结合和固定。本试剂盒中每1ml Iodoacetyl Agarose沉淀, 可结合不少于3mg IgG。本试剂盒固定Protein A后用于纯化兔IgG的效果参考图2。

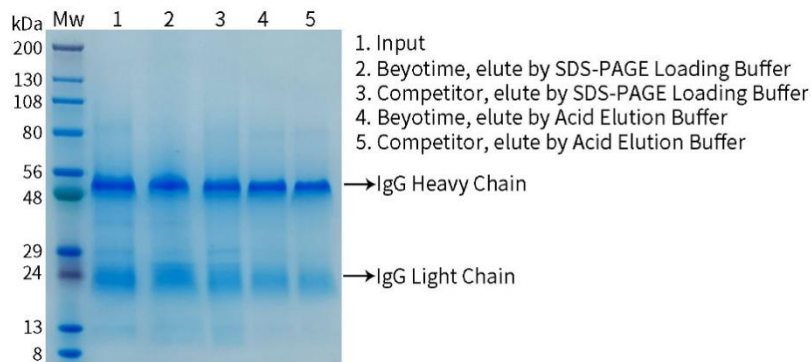


图2. 碧云天的蛋白固定与亲和纯化试剂盒(P2059)用于固定Protein A后进行兔IgG纯化的效果图。样品1为Input, 即为用于纯化的兔IgG; 样品2和4为使用本试剂盒固定Protein A后纯化的兔IgG, 再分别经SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(1X) (P0015A)洗脱或酸性洗脱后得到的样品; 样品3和5为某国际知名品牌同类产品(Competitor)固定Protein A后纯化的兔IgG, 再经SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(1X) (P0015A)洗脱或酸性洗脱后得到的样品。实际结果会因实验条件等的不同而存在差异, 图中效果仅供参考。

- **本试剂盒特异性强。**本试剂盒可特异性地固定含巯基的多肽或蛋白等生物配体以作为抗原, 进而利用抗原抗体的特异性对免疫血清中的抗体进行高效纯化, 获得的产物纯度高, 可进一步用于Western、ELISA、质谱分析等一系列后续的分析测试。
- **本试剂盒操作简单, 使用便捷。**本试剂盒提供了用于蛋白固定的所需的相关试剂以及后续抗体纯化的相关试剂, 其中TCEP (Tris(2-carboxyethyl)phosphine)是一种高效、无异味、不含硫醇基的水溶性还原剂, 是DTT的替代物, 可选择性还原多肽或蛋白质中的二硫键。而且由于不含巯基, 不会干扰碘乙酰的偶联, 因此, 还原后的多肽或蛋白样品上柱前不需要进行脱盐或透析处理, 为后续抗体纯化提供极大的方便。整个实验只需要简单的移液、离心操作, 即可在30-60分钟内完成多肽、蛋白或其它含巯基的生物大分子的固定和结合。
- 本试剂盒中的Iodoacetyl Agarose (碘乙酰琼脂糖凝胶)的主要指标如下表:

Characteristics	Description
Product content	50% settled gel in specific protective buffer
Agarose structure	6% cross-linked agarose
Average particle size	45-165 $\mu$ m
Ligand	The derivative of Iodoacetic acid
Binding capacity	Per ml settled gel: $\geq$ 3mg IgG
Specificity	Free sulfhydryls ligands
pH Stability	pH5-10
Elution method	Elution with acid or SDS-PAGE loading buffer for single-use applications
Application	Antibody purification

- 本试剂盒中提供的Iodoacetyl Agarose为50%凝胶悬液, 每毫升Iodoacetyl Agarose悬液中共含有0.5ml凝胶沉淀物。
- 本试剂盒提供的Empty Columns采用高纯度聚丙烯材质, 柱体高度63mm, 柱体内径8.9mm, 对各种生物分子的吸附极低。其中的筛板采用高纯度的超高分子量聚乙烯(UHWMPE)为原料经过特殊工艺加工而成, 吸附低、不宜产生气泡并具有良好的亲水性, 同时孔径均匀(约50微米)。
- 本试剂盒按照每个柱子使用一次计算, 可以用于5个蛋白样品的固定和5次相应蛋白的亲和纯化。

#### 包装清单:

产品编号	产品名称	包装
P2059S-1	Iodoacetyl Agarose	20ml
P2059S-2	Empty Columns	5 sets
P2059S-3	Coupling Buffer	140ml
P2059S-4	Wash Buffer	200ml
P2059S-5	Binding Buffer	160ml
P2059S-6	Storage Buffer	35ml
P2059S-7	Elution Buffer	35ml
P2059S-8	Neutralizing Buffer	4ml
P2059S-9	0.5M TCEP (pH7.0)	0.5ml
P2059S-10	L-Cysteine	0.1g
—	说明书	1份

#### 保存条件:

-20 $^{\circ}$ C保存, 一年有效; 4 $^{\circ}$ C保存, 至少一个月有效。Iodoacetyl Agarose须避光保存避光。Empty Columns可以室温保存。

## 注意事项:

- 在纯化时, 建议设置阳性和阴性对照组。
- 本试剂盒在使用前, 应将所有试剂平衡至室温。
- 本试剂盒提供的试剂足够进行5次柱纯化实验。如果重复使用纯化柱, 可选购蛋白亲和纯化试剂盒(P2060)。
- 疏水肽在偶联的过程需要进行额外的清洗或添加非离子去垢剂, 以最大限度地减少非特异性结合。
- 疏水肽的等电点(PI)接近偶联缓冲液(Coupling Buffer)的pH值可能会无法溶解, 可以适当的降低偶联缓冲液的pH值, 以增加溶解性。但高pH环境下, Iodoacetyl Agarose会与多肽的氨基结合, 低pH环境下, Iodoacetyl Agarose与目标蛋白或目标多肽的巯基结合力很弱, 因此推荐固定蛋白或多肽的偶联缓冲液的pH值通常在7.2-9之间。
- 疏水肽或其它配体可能会难溶于偶联缓冲液, 可以适当地添加水混溶性溶剂帮助肽或其它配体溶解, 通常水混溶性溶剂在偶联缓冲液的浓度可以高达20%, 例如20% DMSO、DMF或无水乙醇, 或1%吐温-20或4M尿素。
- 蛋白样品收集后宜尽快完成纯化工作, 并应始终放置在4°C或冰浴, 以减缓蛋白降解或变性。为有效抑制蛋白降解, 可以在蛋白样品中添加适量的蛋白酶抑制剂混合物, 例如碧云天的蛋白酶抑制剂混合物(通用型, 100X) (P1005/P1006)、蛋白酶磷酸酶抑制剂混合物(通用型, 质谱兼容, 50X) (P1048/P1049)、蛋白酶抑制剂混合物(哺乳动物样品抽提用, 100X) (P1010/P1011)、蛋白酶磷酸酶抑制剂混合物(哺乳动物样品抽提用, 50X) (P1050/P1051)等。
- 如果离心不能完全除去蛋白样品中的不溶物, 可以将样品溶液用0.45µm的滤膜过滤, 以免堵塞亲和层析柱。使用SDS-PAGE洗脱后的Iodoacetyl Agarose不可重复使用。为了尽量减少碘乙酰胺基的脱落, 无论是手动操作还是自动操作, 低pH洗脱步骤都不要超过10分钟。
- 高浓度的DTT、巯基乙醇、盐酸胍等对本试剂盒中Iodoacetyl Agarose与配体的结合可能有一定影响, 但Western及IP细胞裂解液(P0013)、RIPA裂解液(P0013B/C/D)或NP-40裂解液(P0013F)等都完全兼容本产品。碧云天生产的不同裂解液的主要特点和差异, 以及如何选择裂解液可参考我们的相关网页: <http://www.beyotime.com/support/lysis-buffer.htm>。
- 0.5M TCEP (pH7.0)对人体有害, 操作时请小心, 并注意有效防护以避免直接接触人体或吸入体内。
- 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. 偶联样品的制备。

- Iodoacetyl Agarose结合含有游离巯基的抗原、多肽或蛋白, 对于合成的抗原、多肽或重组蛋白, 实验前建议使用Ellman法检测蛋白是否存在游离巯基。推荐使用碧云天游离巯基检测试剂盒(DTNB法) (S0138)。如果确定含有游离巯基, 将0.1-2mg抗原、多肽或蛋白样品加入至Coupling Buffer中, 最终体积为2ml。
- 多肽或蛋白样品还原: 如果多肽或蛋白中不含游离的巯基, 可使用还原剂断开二硫键, 暴露出游离巯基。向样品中加入0.1ml 0.5M TCEP (终浓度约为25mM), 室温孵育30分钟。  
注1: TCEP会干扰BCA法对蛋白浓度的测定, 因此使用TCEP还原后的蛋白样品, 不建议采用BCA蛋白浓度测定试剂盒进行蛋白浓度测定。  
注2: 2-巯基乙胺盐酸盐(2-Aminoethanethiol Hydrochloride, or 2-Mercaptoethylamine·HCl, 简称2-MEA, CAS 156-57-0)是一种温和的还原剂, 适用于选择性地裂解IgG重链之间的铰链区二硫键, 同时保留重链和轻链之间的二硫键。对于抗体样品的还原, 建议使用2-巯基乙胺盐酸盐, 但需要使用脱盐柱进行脱盐处理。脱盐柱推荐Beyodex™ G-25系列产品(P2613/P2615)。

### 2. 蛋白或多肽的偶联。

- 适当颠倒混匀Iodoacetyl Agarose, 每个空柱管(Empty Column)盖上下底盖后, 从上口装入4ml Iodoacetyl Agarose (沉淀体积为2ml), 静置5分钟。取下底盖, 整个柱子装入15ml离心管内, 1000×g在4°C离心1分钟去除液体, 随后盖上底盖。  
注: 上述离心过程, 推荐使用15ml离心管(FTUB515)辅助收集柱中的液体。
- 加入2ml Coupling Buffer, 盖上顶盖, 轻轻重悬Iodoacetyl Agarose, 去除顶盖和底盖, 1000×g在4°C离心1分钟, 去除上清。再重复2次, 即共洗涤3次, 随后盖上底盖。
- 加入步骤1中准备好的样品。盖上顶盖, 置于旋转混匀仪或摇床上, 室温混合15分钟。推荐使用BeyoShaker™数字式翘板摇床(E6673)或BeyoVortex™调速式长轴旋转混匀仪(E6826)。  
注: 保留0.1ml步骤1中的样品以测定偶联效率。
- 将亲和纯化柱垂直放置, 在室温下静置, 继续孵育30分钟。
- 取下顶盖和底盖, 将亲和纯化柱放置在洁净的15ml离心管中, 1000×g在4°C离心1分钟。收集并保留穿流液, 后续测定穿流液中的蛋白浓度就可以计算出偶联效率。  
注: 可通过比较未结合的蛋白或多肽的浓度(步骤2e)与起始样品中蛋白或多肽的浓度(步骤2c)确定偶联效率。
- 加入2ml Wash Buffer, 1000×g在4°C离心1分钟, 以洗涤亲和纯化柱。再重复洗涤3次。
- 加入2ml Coupling Buffer, 1000×g在4°C离心1分钟, 以平衡亲和纯化柱。再重复平衡1次, 随后盖上底盖。

### 3. 封闭非特异性结合。

- 2ml Coupling Buffer中加入15.8mg L-Cysteine, 使其终浓度为50mM, 加入到亲和纯化柱中, 盖上顶盖。
- 将亲和纯化柱置于旋转混匀仪或摇床上, 室温孵育15分钟。接着将亲和纯化柱垂直放置, 室温静置30分钟。
- 依次取下顶盖和底盖, 流干溶液, 随后就可以进行亲和纯化(步骤4)。
- 如果后续再使用, 先加入2ml Binding Buffer清洗亲和纯化柱, 1000×g在4°C离心1分钟, 去除穿流液。再重复3次。盖上底盖。

盖，加入2ml Storage Buffer，盖上顶盖，置于4°C直立储存。

注：须避光储存，严禁冻结。

#### 4. 亲和纯化。

- 接步骤3c，将亲和纯化柱平衡至室温，加入2ml Binding Buffer平衡亲和纯化柱，1000×g在4°C离心1分钟，去除上清。再重复3次。
- 盖上底盖，取适量用Binding Buffer稀释的目标样品(<2ml)加入到亲和纯化柱中，盖上顶盖，置于旋转混合仪或摇床上，室温孵育30-60分钟。  
注1：如有必要，可以置于4°C旋转混合60分钟，以防止目标蛋白降解。  
注2：对于>2ml的目标蛋白，通常需要分批进行处理。
- 依次取下顶盖和底盖，1000×g在4°C离心1分钟，并保留穿流液，随后纯化柱盖上底盖。此处需要保留所有穿流液，用于评估亲和纯化柱的结合效率和载量。
- 取2ml Wash Buffer加入亲和纯化柱中，盖上顶盖，轻轻重悬Iodoacetyl Agarose，去除顶盖和底盖，1000×g在4°C离心1分钟，去除穿流液。再重复2-4次。
- 加入2ml Elution Buffer，放入洁净的加入了200μl Neutralizing Buffer的15ml离心管中，1000×g在4°C离心1分钟。保留混合的洗脱液。再重复本步骤洗脱2-3次，在确定洗脱效果之前不合并洗脱液。
- 可通过SDS-PAGE直接检测蛋白，或者通过蛋白浓度测定试剂盒进行浓度检测。如果用于特定的下游实验或者储存，可通过透析、凝胶过滤或超滤置换Buffer。  
注：洗脱完毕后立即平衡亲和纯化柱，以避免低pH值的Elution Buffer破坏固定的多肽或蛋白。通常，亲和纯化柱可以重复使用约10次，具体的使用次数取决于固定的多肽或蛋白的稳定性。
- 洗脱完毕后的亲和纯化柱，连续4次加入2ml Wash Buffer用来平衡亲和纯化柱，使Wash Buffer流穿柱子。
- 盖上底盖，加入2ml Storage Buffer用于长期保存。盖上顶盖，置于4°C直立保存，不要冻存纯化柱。

#### 常见问题：

Problem	Possible Causes	Solution
Protein/peptide precipitates in Coupling Buffer.	Protein/peptide was not soluble in Coupling Buffer.	Dissolve sample in ≤30% DMSO or DMF or 6M Guanidine·HCl in Coupling Buffer.
Low coupling efficiency.	Sulfhydryls were oxidized.	Reduce protein/peptide with DTT or TCEP and proceed immediately with desalting and coupling procedure to prevent reformation of disulfide bonds.
	Sulfhydryl-containing reductant was not removed from sample.	(1) Remove reductant from the reduced sample using a desalting column before coupling agarose. (2) Reduce sample using TCEP.
Column flows exceedingly slow.	Air bubbles in column.	Remove air bubbles by stirring or centrifugation the agarose.
The purity of elution fraction is low.	The column was not washed thoroughly.	Increase the volume of Binding/Wash Buffer.

#### 参考文献：

- F Dickens. Biochemical Journal. 1933. 27 (4): 1141–1151.

#### 相关产品：

产品编号	产品名称	包装
P2015	Protein A Agarose (Fast Flow, 抗体纯化用)	2/10/50/200ml
P2017	Protein G Agarose (Fast Flow, 抗体纯化用)	2/10/50/200ml
P2019	Protein A+G Agarose (Fast Flow, 抗体纯化用)	2/10/50/200ml
P2059S	蛋白固定与亲和纯化试剂盒	5次
P2157	Biotin Agarose (生物素琼脂糖凝胶)	1/5/20ml
P2159	Streptavidin Agarose (链霉亲和素琼脂糖凝胶)	1/5/20ml
P2165	Heparin Agarose (肝素琼脂糖凝胶)	1/5/20ml
P2169	Iodoacetyl Agarose (碘乙酰琼脂糖凝胶)	1/5/20/100ml

Version 2024.12.25