

## Biolinkedin® Protein A 琼脂糖凝胶

### 包装清单

名称	货号	包装
Protein A	L-1005	1mL
琼脂糖凝胶	L-1005A	5mL

### 产品概述

Biolinkedin® Protein A 琼脂糖凝胶是以自制的琼脂糖凝胶为介质，以重组 Protein A 蛋白为配体，具有很高的物理化学稳定性，配基不易脱落，寿命长，使用方便。重组 Protein A 蛋白更适用于结合 mouse IgG<sub>2a</sub>, IgG<sub>2b</sub>, IgA, rabbit IgG, 以及 human IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub> 和 IgG<sub>4</sub>。本产品广泛应用于细胞裂解物、细胞分泌上清、血清、腹水等样品中抗原的免疫沉淀 (IP) 或免疫共沉淀 (Co-IP)，也可以用于抗体的纯化。

### 产品特性

基质	4%高度交联的琼脂糖凝胶
配体	重组 Protein A 蛋白
粒径	30~100μm
浓度	凝胶体积占悬浮液体积的 25%
结合能力	≥20mg hlgG/mL 凝胶
适用范围	IP, Co-IP, ChIP, RIP, 抗体纯化等
保质期	在 2~8°C 稳定保存两年

### 操作流程

**注意：缓冲液自行准备或直接购买我司 IP 试剂盒。**

#### 贴壁细胞样品：

1. 移去培养基，用 PBS 洗细胞两次。
2. 收集细胞至 1.5mL EP 管内，按比例加入 IP Lysis/Wash Buffer，同时加入 PMSF 等相应的抑制剂，混匀后置于冰上静置 5~20min (期间混匀几次)。
3. 4°C, 12000~16000xg, 10min 离心收集上清液，置于冰上以备后续实验 (或置于 -80°C 长期保存)。

#### 培养皿 IP Lysis/Wash Buffer 推荐使用体积：

培养皿大小/表面积	IP Lysis/Wash Buffer 体积
100 mm x 100 mm	500~1000μL
100 mm x 60 mm	100~300μL
6 孔板	100~200μL

#### 悬浮细胞样品：

1. 4°C、500~1000xg、10min，收集细胞，弃上清。
2. 用 PBS 洗细胞一次，即用 PBS 将细胞团重悬，4°C、500~1000xg、5min，收集细胞，弃上清。
3. 用预冷的 IP Lysis/Wash Buffer 重悬细胞。每 50mg 细胞使用 500μL IP Lysis/Wash Buffer。同时加入 PMSF 等相应的抑制剂，混匀后置于冰上静置 5~20min (期间混匀几次)。
4. 4°C, 12000~16000xg, 10min 离心收集上清液，置于冰上以备后续实验 (或置于 -80°C 长期保存)。

#### 血清样品：

一般建议用 IP Lysis/Wash Buffer 稀释血清样品至目标蛋白终浓度为 50~150μg/mL，置于冰上备用 (或置于 -20°C 长期保存)。

#### 免疫复合物的制备

**注意：样品所需的量和孵育时间均依赖于每个特定的抗体-抗原体系，因而可能需要优化才能得到最大产量。**

以下实验方案针对 2~10μg 亲和纯化的抗体，根据需要可以按比例放大。

1. 在离心管中 将每个样品的细胞裂解液与 2~10μg 免疫沉淀抗体结合。每个免疫沉淀反应推荐的总蛋白量为 500~1500μg。
2. 用 IP Lysis/Wash Buffer 将抗体以及制备好的样品稀释至 300~500μL。
3. 在室温下孵育 1~2h，或 4°C 2~4h，以形成免疫复合物。

#### 免疫沉淀：

**注意：为保证凝胶均匀分布，使用前通过反复颠倒或轻微涡旋混匀瓶中凝胶。**

1. 将 20~50μL 的 Biolinkedin® Protein A 琼脂糖凝胶加入 1.5mL 离心管中。
2. 向凝胶中加入 500μL 预冷 PBS，轻柔混匀。
3. 将离心管放入离心机中 1000rpm、5min 收集凝胶到离心管的底部，去除上清。
4. 向离心管中加入 200~500μL IP Lysis/Wash Buffer。颠倒离心管数次或轻微涡旋混匀 1min。将离心管放入离心机中 1000rpm，5min 收集凝胶到离心管的底部，去除上清。

5. 将制备好抗原样品/抗体混合物样品加入装有凝胶的离心管中，保持混匀室温下孵育 1~2h，或 4°C 2~4h。
6. 离心 1000rpm，5min 收集凝胶，除去未结合的样品，保存以备分析。
7. 向离心管中加入 1000μL IP Lysis/Wash Buffer，轻柔混匀 5~10min。收集凝胶，弃上清。再重复洗两次。
8. **变性洗脱**：向离心管中加入 80~100μL SDS-PAGE Sample Loading Buffer (1×)，将样品置于 100°C 水浴或者金属浴中加热 10min。通过离心分离凝胶，保留含有目的抗原的上清。

**备注**:如需保持蛋白活性，也可采用以下洗脱方式。

**低 pH 洗脱**：向离心管中加入 100μL Elution Buffer。保持混匀在室温下孵育离心管 5~10min。通过离心分离凝胶，保留含有目的抗原的上清。每 100μL 洗出液中加入 20μL Neutralization Buffer 来中和低 pH。

### 注意事项

1. 进行实验操作之前，请务必认真阅读本操作说明书。
2. IP 实验中不同类型的抗体与抗原结合的亲和性是有区别的，抗体与抗原结合还会受到 IP Lysis/Wash Buffer 的影响，因此**可自行优化操作细节或者筛选及配制缓冲液进行实验**。
3. 琼脂糖凝胶使用前应充分振荡均匀。凝胶应保存在储存溶液中，防止干燥。
4. 本产品仅供科学研究使用。

### 相关产品

货号	产品名称
L-1001	Protein A 磁珠
L-1002	Protein G 磁珠
L-1003	Protein L 磁珠
L-1004	Protein A/G 磁珠
<b>L-1005</b>	<b>Protein A 琼脂糖凝胶</b>
L-1006	Protein G 琼脂糖凝胶
L-1007	Protein L 琼脂糖凝胶
L-1008	Protein A/G 琼脂糖凝胶
L-1201	Protein A 琼脂糖磁珠
L-1202	Protein G 琼脂糖磁珠
L-1203	Protein L 琼脂糖磁珠
L-1204	Protein A/G 琼脂糖磁珠
/	磁力架系列

### 问题解决

#### 1. 抗原没有免疫沉淀下来

- ① 样品中所含的抗原过少，不足以被检测  
**建议**：通过 SDS-PAGE 或蛋白免疫印迹验证裂解液中蛋白的表达和/或裂解效率；如果需要，加大样品量
- ② 抗体无法结合抗原  
**建议**：选择另一种特异性抗体，或者选择另一种识别不同抗原表位的抗体。
- ③ IP Lysis/Wash Buffer 中的成分干扰了抗原与抗体的结合  
**建议**：使用其它缓冲液进行免疫沉淀和漂洗（例如，含有 0.5% CHAPS 的 TBS）

#### 2. 获得的蛋白量低

- ① 蛋白质被降解  
**建议**：加入蛋白酶抑制剂
- ② 所使用的凝胶量不够  
**建议**：提高捕获免疫复合物所使用的凝胶量
- ③ 样品中的目标蛋白量不够  
**建议**：提高抗原样品量

#### 3. 多条非特异条带

有非特异性的蛋白结合在凝胶上

**建议**：在 IP Lysis/Wash Buffer 中加入 50~350mM NaCl。加大洗脱力度和次数。

#### 4. 凝胶易粘附管壁

**建议**：使用低吸附率的耗材进行凝胶操作。