

Biolinkedin® Protein G 琼脂糖凝胶

包装清单

| 名称 | 货号 | 包装 |
|-----------|---------|-----|
| Protein G | L-1006 | 1mL |
| 琼脂糖凝胶 | L-1006A | 5mL |

产品概述

Biolinkedin® Protein G 琼脂糖凝胶是以自制的琼脂糖凝胶为介质，以重组 Protein G 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 G 蛋白更适合于结合 mouse IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃, rat IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG_{2c}, rabbit and goat polyclonal Abs, 以及 human IgG₁, IgG₂, IgG₃ 和 IgG₄。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 G 蛋白 |
| 粒径 | 30~100μm |
| 浓度 | 凝胶体积占悬浮液体积的 25% |
| 结合能力 | ≥15mg 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 G 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。

- 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。
- 离心 1000rpm，5min 收集凝胶，除去未结合的样品，保存以备分析。
- 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。
- 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

- 进行实验操作之前，请务必认真阅读本操作说明书。
- 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。**
- 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。
- 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 |
| L-1005 | Protein A 琼脂糖凝胶 |
| 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

- 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
- 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。
- 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

- 蛋白质被降解
建议：加入蛋白酶抑制剂
- 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
- 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。